

文章编号: 1000-0615(2008)02-0266-07

河流弧菌在天然海水与人工海水中的饥饿效应

义家波, 鄢庆枇, 邹文政, 黄琦琪, 胡雅娟

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:对数生长期河流弧菌分别悬浮于天然海水和人工海水后于 28 ℃ 进行饥饿试验。在饥饿初期, 两种海水中河流弧菌的总菌数、活菌数、菌落形成单位数都明显上升, 但天然海水中的河流弧菌生长时间持续更久、增长幅度也更大; 饥饿中、后期, 总菌数都保持稳定, 而可培养菌数与活菌数逐渐下降, 其中可培养菌数下降幅度高于活菌数, 人工海水中的河流弧菌下降幅度高于天然海水。河流弧菌对青石斑鱼表皮粘液的粘附量随着饥饿时间延长先上升后下降。与对数生长期相比, 饥饿 60 d 的可培养细胞对热和紫外线的耐受性提高。饥饿细胞的间接 ELISA 最低检测限高于对数生长期细胞。通过 SDS-PAGE 分析菌体蛋白发现饥饿细胞的蛋白质条带减少。腹腔注射饥饿 60 d 的河流弧菌不会引起小鼠死亡, 而对数生长期细胞能够引起小鼠死亡。研究结果表明, 河流弧菌能够在温暖的人工海水和天然海水中长时间饥饿存活, 但是饥饿细胞的毒力较低。

关键词:河流弧菌; 饥饿; 存活; 粘附; 毒性

中图分类号: Q 939.1 **文献标识码:** A

河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 是一种嗜盐性革兰氏阴性菌, 广泛存在于河流和出海口环境水域中, 是海水养殖主要的病原菌之一, 可引起鱼、虾、贝等多种养殖动物的疾病^[1-3]。河流弧菌同时也是人类重要的致病菌, 可通过污染食品引起食物中毒, 引发肠胃炎、痢疾以及少儿小肠结肠炎^[4-5]。

海水中的可供营养微生物利用的营养物质相对缺乏, 例如, 海水中溶解的有机物的含量为 0.2 ~ 2.0 mg·L⁻¹ (以碳计算), 并且大部分有机物以化合物以及难溶物质存在, 因此营养是限制海洋异养细菌生长最常见的不利环境因素^[6]。河流弧菌在营养物质浓度较低天然海水中经常处于饥饿状态。因此, 了解河流弧菌在饥饿条件下的生存及生理、生化特征的变化规律有助于阐明其在自然环境中的分布规律及流行病学特征。

近年来对弧菌的饥饿研究发现, 弧菌可通过形态、生理等相应改变以适应寡营养的环境, 如细

胞体积缩小, 大分子量物质合成减少, 呼吸作用下降等^[7-9]。一些弧菌在饥饿条件下进入到活的非可培养 (VBNC) 状态^[7]。河流弧菌在常温海水中的饥饿耐受缺乏研究, 饥饿河流弧菌的毒性、表面抗原以及对粘液的粘附能力的研究等尚无报道。

本文以从患病青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 中分离的病原性河流弧菌为研究对象, 首次研究常温下河流弧菌在天然海水和人工海水饥饿过程中的存活、菌体蛋白质、粘附能力以及毒性等的变化并比较天然海水与人工海水在饥饿诱导方面的差异, 以期能为阐明河流弧菌的流行病学特征及疾病防治提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株和试验海水

试验用河流弧菌 (TS-1) 分离自患病青石斑

收稿日期: 2006-11-23

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2002AA639600); 福建省科技项目 (2006F5066)

作者简介: 义家波 (1980-), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 从事水产动物疾病防治研究。

通讯作者: 鄢庆枇, Tel: 0592-6180204, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

鱼^[10], -80℃保存。沙滤天然海水取自我校海水养殖试验场,经0.2 μm微孔滤膜过滤,在121℃高压灭菌20 min后用于饥饿试验。人工海水配制如下^[11](g·L⁻¹):氯化钠24.72,氯化钾0.67,氯化钙1.36,氯化镁4.66,硫酸镁6.29,碳酸氢钠0.18。121℃高压灭菌20 min后备用。

1.2 细菌培养及饥饿条件

病原性河流弧菌在含1.5% NaCl的营养琼脂斜面活化后接种于含1.5% NaCl营养肉汤,28℃培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.55),10 000 g离心10 min,分别用上述无菌海水洗涤2次去除培养液中的营养物质后重悬浮于相应海水,调节菌浓度并分装后置28℃恒温培养箱中饥饿。

1.3 细菌计数

在饥饿0、1、3、5、10、20、30、40、50、60 d取样,采用血球计数板计数法(DC)、平板涂布计数法(PC)、吖啶橙(acridine orange, AO) - 碘化丙啉(propidium iodide, PI)荧光染色计数法(AO-PI法)^[12]分别测定样品中河流弧菌的总菌数、可培养菌数及死活菌比例。根据总菌数和死、活菌比例计算出活菌数。

1.4 体外粘附试验

参考鄢庆枇等^[13]的方法进行体外粘附试验,具体步骤如下:取50 μL青石斑鱼表皮粘液滴于载玻片中央,然后用盖玻片(22 mm × 22 mm)均匀涂开,与盖玻片大小相同,放置在超净台中过夜干燥后用甲醇固定20 min。取不同饥饿时相的菌液0.5 mL滴加到固定有粘液的载玻片上,25℃孵育1 h后用无菌生理盐水荡洗5次以洗去未粘附的细菌,自然干燥后用甲醇固定20 min。结晶紫染色3 min,清洗、干燥后在显微镜(×1000)下随机选取20个视野,用数码相机拍照后在电脑上计数,取平均值后换算为单位面积的细胞数(cell·mm⁻²)。每个试验设3个平行组,以不涂粘液的载玻片为空白对照。

1.5 ELISA 检测

用间接ELISA分别测定在天然海水与人工海水中饥饿不同时期以及对数生长期河流弧菌的最低检测限。具体步骤如下:菌液用生理盐水进行二倍系列稀释,取各稀释度菌液100 μL分别加入到96孔酶标板各孔中,阴性对照孔中加入100

μL生理盐水,60℃烘干包被,用含0.05% Tween 20的0.01 mol·mL⁻¹ PBST(pH 7.4)洗涤液满孔洗涤3次,每次3 min,然后用3%牛血清白蛋白于37℃封闭1 h,同上洗涤3次,各孔依次加入稀释1000倍的兔抗河流弧菌血清100 μL,37℃温育1 h,同上洗涤3次,每孔加入100 μL羊抗兔IgG-HRP,37℃温育1 h,同上洗涤3次,每孔加入100 μL新鲜配置的OPD-H₂O₂底物溶液,于避光处反应30 min,然后每孔加入50 μL 2 mol·L⁻¹硫酸溶液中止反应,于492 nm下测定每孔OD值。

1.6 抗逆性检测

紫外线处理 取饥饿0、60 d的样品经10倍系列稀释后涂布于含1.5% NaCl的营养琼脂平板,然后在紫外灯(波长253.77 nm,功率20 W)下照射。照射时间设为0、30、60、180、300 s,每组设3个平行。尔后立即置于28℃培养箱避光培养24 h后计算菌落数。

热处理 取饥饿0、60 d的样品在45℃水浴中进行热处理,处理时间设为0、5、10、20 min,每组设3个平行。用平板涂布法测定处理后的样品中的菌落形成单位数。

1.7 菌体蛋白分析

取饥饿0、20、40、60 d的菌液各2 mL,10 000 r·min⁻¹离心10 min,去上清后加入30 μL上样缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8),100 mmol·L⁻¹二硫苏糖醇,2% SDS,0.1% 溴酚蓝,10% 甘油),煮沸5 min,10 000 r·min⁻¹离心1 min,取上清测定蛋白质浓度并按照Marshak等^[14]方法进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用银染法染色。

1.8 毒性试验

用PBS将对数生长期的河流弧菌的活菌浓度调节至2.12 × 10⁹、2.12 × 10⁸、2.12 × 10⁷、2.12 × 10⁶、2.12 × 10⁵ cell·mL⁻¹ 5个梯度;将人工海水中饥饿60 d的河流弧菌的活菌浓度调节至5.0 × 10⁸、5.0 × 10⁷、5.0 × 10⁶、5.0 × 10⁵、5.0 × 10⁴ cell·mL⁻¹;将天然海水中饥饿60 d的河流弧菌的活菌浓度调节至7.25 × 10⁸、7.25 × 10⁷、7.25 × 10⁶、7.25 × 10⁵、7.25 × 10⁴ cell·mL⁻¹。80只体重20 g左右的昆明小鼠随机分为16组,每组5只。其中15组为感染组,分别腹腔注射上述菌液0.5 mL。另外一组为对照组,注射无菌PBS 0.5 mL。注射后连续观察96 h,记录小鼠存活情况。

2 结果与分析

2.1 饥饿存活

饥饿初期,天然海水以及人工海水中河流弧菌的总菌数、活菌数、菌落形成单位数都明显上升(图1和图2)。人工海水中,饥饿前总菌数和活菌数的浓度分别为 2.75×10^8 和 2.06×10^8 cell·mL⁻¹,饥饿3 d分别达到最大值 1.20×10^9 和 1.12×10^9 cell·mL⁻¹,分别增长了3.4倍和4.3倍;饥饿中后期总菌维持在 10^9 cell·mL⁻¹,活菌数缓慢下降,饥饿60 d降为 5.0×10^8 cell·mL⁻¹,下降了55.4%;初始菌落形成单位数为 1.91×10^8 CFU·mL⁻¹,饥饿3 d达到最大值 1.04×10^9 CFU·mL⁻¹,而后逐渐下降至第60天的 4.10×10^6 CFU·mL⁻¹,下降了99.6%。

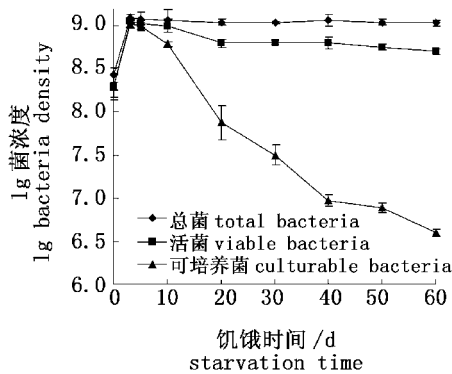


图1 河流弧菌在人工海水中饥饿过程中的数量变化

Fig.1 Variation of *V. fluvialis* quantity during starvation period in artificial seawater

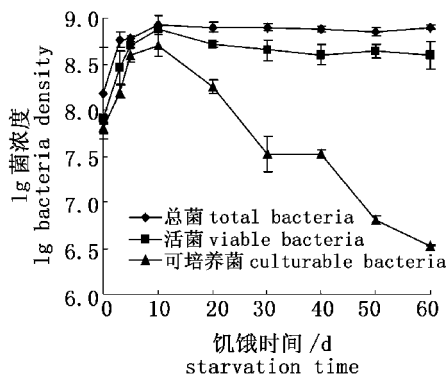


图2 河流弧菌在天然海水中饥饿过程中的数量变化

Fig.2 Variation of *V. fluvialis* quantity during starvation period in natural seawater

天然海水中,总菌数和活菌数初始浓度为 1.52×10^8 和 8.0×10^7 cell·mL⁻¹,饥饿10 d达最大值 8.54×10^8 和 7.62×10^8 cell·mL⁻¹,分别增长了4.6倍和8.5倍;饥饿中后期总菌维持在 8×10^8 cell·mL⁻¹,活菌数缓慢下降,饥饿60 d降为 7.25×10^8 cell·mL⁻¹,下降了5%;初始菌落形成单位数为 2.20×10^7 CFU·mL⁻¹,饥饿10 d达到最大值 5.10×10^8 CFU·mL⁻¹,而后逐渐下降至60 d的 3.29×10^6 CFU·mL⁻¹,下降了99.4%。

2.2 河流弧菌对粘液的粘附作用

河流弧菌在饥饿过程中对青石斑鱼表皮粘液的粘附量先出现短暂上升而后持续下降(表1)。人工海水中,河流弧菌对青石斑鱼表皮粘液的粘附量在饥饿1 d达到最大值 4975 cell·mm⁻²,比饥饿前增长了2.0倍;天然海水中,粘附量也在饥饿1 d达到最大值 7035 cell·mm⁻²,比饥饿前增长了4.4倍。随着饥饿时间延长,人工海水和天然海水中的河流弧菌的粘附量均持续显著下降,饥饿10 d时的粘附量接近空白值。

2.3 ELISA 的检测限

用间接ELISA测定不同饥饿状态的河流弧菌的最低检测限。对数生长期的河流弧菌检测限为 $1.17 \times 10^3 \sim 2.34 \times 10^3$ cells。天然海水饥饿组河流弧菌的检测限都高于对数生长期,其中饥饿10 d的检测限最高,达到 $1.48 \times 10^5 \sim 2.97 \times 10^5$ cells,而后逐渐下降,饥饿30 d的检测限为 $7.40 \times 10^4 \sim 1.48 \times 10^5$ cells,饥饿60 d的检测限为 $7.40 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^4$ cells。

表1 河流弧菌对青石斑鱼表皮粘液的粘附量

Tab.1 Adhesive quantity of *V. fluvialis* to skin mucus of *E. awoara* mean ± SD

饥饿时间(d) starvation time	粘附量 (cell·mm ⁻²) adhesive quantity	
	人工海水组 starvation in ASW	天然海水组 starvation in NSW
0	1662 ± 176	1307 ± 106
1	4975 ± 346	7035 ± 482
2	4020 ± 311	5936 ± 463
3	3049 ± 227	4610 ± 302
5	1838 ± 162	2412 ± 143
7	228 ± 42	871 ± 84
10	46 ± 20	63 ± 17
空白 blank	54 ± 10	54 ± 10

人工海水饥饿组河流弧菌的检测限也都高于对数生长期,并随饥饿时间延长而升高,饥饿 10 d 的河流弧菌的检测限为 $8.6 \times 10^4 \sim 1.75 \times 10^5$ cells;饥饿 30 d 的河流弧菌的检测限为 $1.11 \times 10^5 \sim 2.23 \times 10^5$ cells;饥饿 60d 的河流弧菌的检测限为 $2.06 \times 10^5 \sim 4.12 \times 10^5$ cells。

2.4 对紫外线和热处理的抗性

3 组河流弧菌中可培养菌数都随着 45 °C 热处理时间延长而降低。热处理 20 min,在人工海水饥饿组的河流弧菌 CFU 数降低了 0.4 个数量级,在天然海水饥饿组的河流弧菌降低了近 1 个数量级,对照组降低了 3.2 个数量级(图 3)。3 组

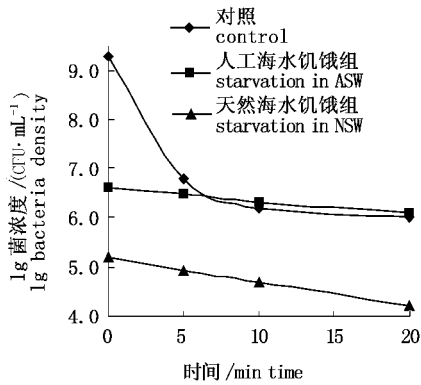


图 3 45 °C 热处理对河流弧菌可培养菌数的影响
Fig.3 Decrease in CFU number of *V. fluvialis* after being challenged by heating at 45°C

2.6 对小鼠的毒性

用人工海水和天然海水中饥饿 60 d 的河流弧菌对小鼠进行腹腔注射,试验组均未观察到死亡,而注射 2.12×10^8 cell·mL⁻¹和 2.12×10^9 cell·mL⁻¹对数生长期河流弧菌的小鼠死亡率为 100% (表 2)。

3 讨论

研究海洋细菌的饥饿耐受时通常采用人工海水和天然海水作为饥饿介质。而不同种类的海水对海洋细菌饥饿诱导效应的差异却未见报道。本文研究发现虽然河流弧菌在天然海水和人工海水中饥饿的过程中的存活情况、粘附能力、菌体蛋白质以及毒性等的变化趋势一致,但变动幅度有所不同,反映出两种海水在饥饿诱导效应上的差异。

河流弧菌中可培养菌数都随着紫外线照射时间延长而降低,紫外线照射 300 s,在人工海水饥饿组的河流弧菌 CFU 数量降低了近 2 个数量级,在天然海水饥饿组的河流弧菌降低了 1.2 个数量级,对照组降低了 4.5 个数量级(图 4)。由此可见,河流弧菌可培养的饥饿细胞对热处理和紫外线的耐受性大于对数生长期细胞。

2.5 饥饿对菌体蛋白的影响

与未饥饿细胞相比,饥饿细胞蛋白质条带有所减少(图 5-A),在天然海水饥饿 60 d 蛋白质条带比在人工海水饥饿 60 d 蛋白质条带少。

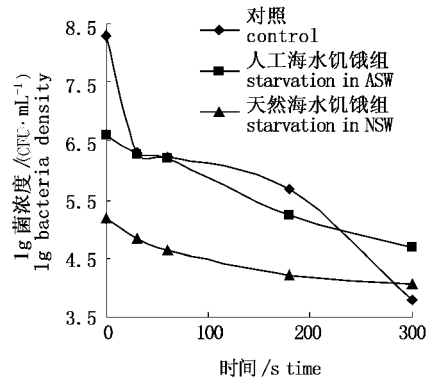


图 4 紫外线处理对河流弧菌可培养菌数的影响
Fig.4 Decrease in CFU number of *V. fluvialis* after being challenged by UV

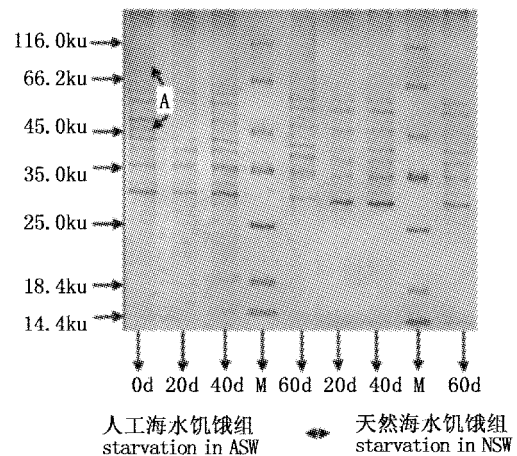


图 5 不同饥饿时间河流弧菌的菌体蛋白的 SDS-PAGE 电泳
Fig.5 Cellular protein profile of *V. fluvialis* after being starved for different time detected by SDS-PAGE

表 2 注射河流弧菌后小鼠的存活情况

Tab.2 Effect of *V. fluvialis* injection on the mortality in mice

对照组 control		人工海水饥饿组 starvation in ASW		天然海水饥饿组 starvation in NSW	
菌浓度 (cell·mL ⁻¹) bacteria density	死亡数(只) death	菌浓度 (cell·mL ⁻¹) bacteria density	死亡数(只) death	菌浓度 (cell·mL ⁻¹) bacteria density	死亡数(只) death
2.12 × 10 ⁹	5	5.0 × 10 ⁸	0	7.25 × 10 ⁸	0
2.12 × 10 ⁸	5	5.0 × 10 ⁷	0	7.25 × 10 ⁷	0
2.12 × 10 ⁷	0	5.0 × 10 ⁶	0	7.25 × 10 ⁶	0
2.12 × 10 ⁶	0	5.0 × 10 ⁵	0	7.25 × 10 ⁵	0
2.12 × 10 ⁵	0	5.0 × 10 ⁴	0	7.25 × 10 ⁴	0

注:注射 PBS 组无死亡;菌浓度以活菌数表示

Notes: Injected with PBS resulted in 100% survival; cell enumeration by viable cells counts

饥饿试验结果表明:饥饿初期,人工海水和天然海水中的河流弧菌总菌数、活菌数和 CFU 数都有较大幅度上升。比较之下,天然海水中河流弧菌总菌数和活菌数的增长速率远大于人工海水中河流弧菌的增长速率,其原因可能是人工海水的河流弧菌只能够利用对数生长期积累的储存物质进行分裂,而天然海水中的河流弧菌除了可以利用对数生长期积累的储存物质,还可以利用天然海水中少量营养物质继续进行细胞分裂。饥饿中后期,人工海水中活菌数的下降幅度是天然海水中活菌数的 10 倍。由此可见河流弧菌更适应天然海水,这应该是由于河流弧菌长期栖息于天然海水所致,也说明天然海水与人工海水成分的不同可能会导致某些试验结果的误差,这是在使用人工海水进行饥饿试验时应该考虑的一个因素。

粘附试验发现在天然海水与人工海水中饥饿的河流弧菌除了粘附量不同,其粘附能力的变化趋势相同,都是先上升后下降。这是由于在饥饿初期,细菌保持较强的粘附能力,同时菌浓度上升,导致粘附量增加。饥饿后期细菌的粘附能力急剧下降,导致粘附量也急剧下降。菌粘附能力的减弱可能与细菌表面结构以及胞内储存能量的变化有关^[15]。天然海水中饥饿的河流弧菌的粘附量大于人工海水,这也说明河流弧菌更适应天然海水。病原菌在宿主表面的粘附是病原菌对宿主侵染致病的第一步^[16],对鱼类粘液的粘附能力是病原菌的毒力指标之一^[17]。在人工海水与天然海水环境中饥饿的河流弧菌对青石斑鱼粘液粘附能力的下降说明了细菌毒力的下降。人工感染试验的结果也表明饥饿导致河流弧菌对小鼠的毒性降低,与 Linder^[18]及 Oliver 等^[19]在低温人工海水诱导创伤弧菌进入 VBNC 状态后对小鼠进行

感染试验得出的结论相似。本文的研究结果说明在寡营养水体中不容易发生弧菌病的原因除了由于寡营养水体中弧菌数量较少以外,还因为此时弧菌的毒力较弱,不易侵染青石斑鱼。

菌体蛋白质的 SDS-PAGE 电泳结果表明在人工海水与天然海水这两种环境中饥饿的河流弧菌蛋白质条带都比饥饿前有所减少,但表现出不同的变化。条带减少是由于饥饿的细胞无法从外界获得于合成代谢的原料,致使细胞内 RNA 和蛋白质的合成速率降低,同时由于一部分的蛋白质被消耗,导致细胞内蛋白质的种类和含量都降低^[20]。不同变化说明人工海水与天然海水环境对细菌饥饿过程中的蛋白质合成可能有不同影响。

人工海水与天然海水中可培养的饥饿细菌与未饥饿细菌相比,对热以及紫外线的耐受性均增强,但两种海水环境使饥饿细菌产生的耐受能力有所差异。饥饿细菌的耐受性受到很多因素的影响,如:细胞形态、胞壁结构的改变以及饥饿蛋白的合成等与细菌在饥饿状态下耐受性的提高密切相关^[21-22]。饥饿诱导的细胞不仅能产生对饥饿的耐受力,同时也能产生对高温、酒精、酸、氧化、辐射、渗透压等多种压力的耐受性^[23-25]。许多研究表明海洋细菌通过改变细胞生理以及形态以适应饥饿的环境^[26-27]。Day 等^[28]发现创伤弧菌在进入 VBNC 状态的过程中,细胞膜的脂肪酸成分发生了很大的改变,在改变温度以及营养条件的最初阶段, C15:0、C16:1、C17:0、C18:0 脂肪酸发生了明显的改变。此外,人工海水与天然海水中饥饿河流弧菌的间接 ELISA 最低检测限都比未饥饿组高,这表明饥饿导致细菌表面的某些抗原物质发生变化。姚斐等^[29]发现用间接 ELISA

技术可以快速有效地检出处于 VBNC 状态的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7,但 VBNC 细菌的检测灵敏度远远低于正常细菌。

综上所述,常温下,病原性河流弧菌在天然海水和人工海水中均可长期饥饿存活,但河流弧菌对天然海水更为适应;饥饿导致河流弧菌的蛋白质合成以及细胞表面抗原发生变化,人工海水与天然海水的影响程度不同;处于饥饿状态的河流弧菌的抗逆性增强,毒力下降。

参考文献:

- [1] 徐伯亥,殷战,吴玉深,等.淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J].水生生物学报,1993,17(3):260-265.
- [2] 聂丽平,丁明进,刘金屏,等.皱纹盘鲍脓疱病病原菌河流弧菌 II 型的生物学性状研究[J].中国微生物生态学杂志,1995,7(1):33-36.
- [3] 张朝霞,苏永全,王军,等.斑节对虾病原菌河流弧菌(I型)的研究[J].中山大学学报(自然科学版),2000,39:208-213.
- [4] 俞青,尹学震,李东松,等.一起河流弧菌引起的食物中毒调查分析[J].江苏预防医学,2004,15(2):34-35.
- [5] Kothary M H, Lowman H, McCardell B A, et al. Purification and characterization of enterotoxigenic El tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis* [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(6): 3213-3220.
- [6] Joux F, Lebaron P, Troussellier M. Changes in cellular states of the marine bacterium *Deleya aquamarina* under starvation conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2686-2694.
- [7] Oliver J D, Nilsson L, Kjelleberg S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57:2640-2644.
- [8] Oliver J D. Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response [M]// Jansson J K, van Elsas J D, Bailey M J, eds. Tracking genetically-engineered microorganisms. Landes Biosciences, Georgetown, TX. 2000.
- [9] 鄢庆枇,义家波,陈强,等.病原性副溶血弧菌在天然海水中的饥饿耐受研究[J].海洋学报,2007,29(3):131-136.
- [10] 鄢庆枇,王军,苏永全,等.网箱养殖青石斑鱼河流弧菌病研究[J].海洋科学,2001,25(10):17-20.
- [11] Whitesides M D, Oliver J D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3):1002-1005.
- [12] Furuya T, Kamada T, Murkami T, et al. Laser scanning cytometry allows detection of cell death with morphological features of apoptosis in cells stained with PI[J]. Cytometry, 1998, 29(2): 173.
- [13] 鄢庆枇,陈强,邹文政,等.不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠粘液的影响[J].水产学报,2006,30(2):254-259.
- [14] Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R, et al. Strategies for purification and characterization: a laboratory course manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 249-256.
- [15] Otto K, Norbeck J, Larsson T, et al. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8):2445-2453.
- [16] John A, Jeff M, Armine S. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 60(1): 55-62.
- [17] Beachey E H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces[J]. Infectious Diseases, 1981, 143(3): 325-345.
- [18] Linder K, Oliver J D. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(11):2837-2842.
- [19] Oliver J D, Bockian R. *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7):2620-2623.
- [20] Payne G A, Nystrom G J, Bhatnagar D, et al. Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59:156-162.
- [21] Signoretto C, Maria D M L, Maria C T, et al. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 1953-1959.
- [22] Maalej S, Denis M, Dukan S. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily

- nonculturable response [J]. *Microbiology*, 2004, 150: 181 – 187.
- [23] Giard J C, Hartks A, Flahaut S, *et al.* Starvation-induced multi-resistance in *Enterococcus faecalis* JH2 – 2 [J]. *Current Microbiology*, 1996, 32: 264 – 271.
- [24] Nystrom T, Olsson R M, Kjelleberg S. Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(1): 55 – 65.
- [25] Preyer J M, Oliver J D. Starvation-induced thermal tolerance as a survival mechanism in a psychrophilic marine bacterium [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 58(1): 2653 – 2656.
- [26] Yaron S, Matthews K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92: 633 – 640.
- [27] Oliver J D. The viable but nonculturable state in bacteria [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43: 93 – 100.
- [28] Day A P, Oliver J D. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state [J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 55(11): 69 – 73.
- [29] 姚 斐, 沙 莎, 陈 刚, 等. 间接酶联免疫吸附技术检测活的非可培养状态的大肠杆菌 O157:H7 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2001, 31(2): 211 – 214.

Effects of starvation induced in natural seawater and artificial seawater on the pathogenic *Vibrio fluvialis*

YI Jia-bo, YAN Qing-pi, ZOU Wen-zheng, HUANG Qi-qi, HU Ya-juan
(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Marine bacteria are in a stable starvation condition in seawater for most of the time. Expounding the survival strategy of pathogen in marine ecosystems is helpful understanding the characteristic of epidemiology. To get a better understanding of the starvation survival strategy of pathogenic *V. fluvialis* isolated from diseased *Epinephelus awoara*, bacterial cells in log-phase were suspended in natural seawater and artificial seawater and kept at 28 °C for starvation study. At the initial starvation stage, all of the total bacteria number, viable bacteria number and CFU number of *V. fluvialis* in both seawater increased remarkably, but *V. fluvialis* in natural seawater exhibited more increase during a longer period than the counterpart in artificial seawater. After reaching their peaks, total bacteria number of *V. fluvialis* remained stable, while the CFU number and viable bacteria in artificial seawater fell more quickly than those in natural seawater. Starvation of *V. fluvialis* both in natural and artificial seawater resulted in increase of bacterial adhesion to the *E. awoara*'s skin mucus at the initial stage and sharp decrease at the later stage. Starved cells showed better resistance to high temperature and UV. The lowest detection limit of starved cells detected by indirect ELISA was higher than that of log phase cells. The result of SDS-PAGE showed less cellular protein bands of starved cells than the unstarved ones. The starved *V. fluvialis* were less virulent to mice than the log phase bacteria. The results indicated that *V. fluvialis* could survive for a long time in both natural and artificial seawater, and the starved cells were less virulent and more resistant to environmental stresses.

Key words: *Vibrio fluvialis*; starvation; survival; adhesion; virulence