

文章编号: 1674-7054(2014)03-0199-09

## 溶藻弧菌在海水长期饥饿胁迫下的 活性分析及菌落相变特征

龙云映<sup>1,2</sup>, 张昌平<sup>1,2</sup>, 韦露<sup>1,2</sup>, 邓益琴<sup>1,2</sup>, 陈 偿<sup>1,3</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院南海海洋研究所 西沙深海海洋环境观测研究站, 广东 广州 510301)

**摘 要:** 选取3株具有相变特征的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) ZJ-51、E324和E381进行海水长期饥饿培养, 测试每毫升可培养细菌数量变化, 光学显微镜下菌落相变特征, 扫描电子显微镜菌体形态观察与饥饿胁迫前后菌株对卤虫(*Artemia salina*)的毒力对比。结果发现, 饥饿培养的细菌活性可分为3个时期: 1~5 d为上升期, 每毫升海水中可培养细菌数增加并达到最高, 菌落表型无显著变化; 中期为下降期(5~40 d), 细菌数量急剧下降, 部分菌体的运动环皱缩; 41 d后进入平台期, 各菌株在海水中的数量保持在 $10^3 \sim 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>。经500 d培养, 可培养细菌数仍高达 $10^3$  cfu·mL<sup>-1</sup>, 平板上出现一种极小的菌落。扫描电镜发现, 130 d饥饿胁迫后多数细胞变为圆球状, 部分形成超长的长杆状, 或产生成团的絮状物。卤虫致死效应结果显示, 多数菌株在饥饿胁迫500 d后的致死率约下降50%。以上结果为解释溶藻弧菌在寡营养海水中的生存策略提供了重要线索。

**关键词:** 溶藻弧菌; 饥饿胁迫; 菌落相变; 菌体形态; 致病力

**中图分类号:** Q 178.53      **文献标志码:** A

自然海洋环境中可供细菌利用的营养物质十分匮乏, 每升海水只含有0.5~0.8 mg的碳源, 其中大部分不能被生物降解<sup>[1]</sup>, 因而海洋细菌常处于长期饥饿状态。在实验室的研究中, 大部分海洋细菌处于营养丰富状态, 让细菌处于自然状态下再进行进一步研究对科学研究是十分重要的, 即细菌需要处于相对长的时间内寡营养连续培养状态(海水长期培养状态)。溶藻弧菌是一种普遍存在于海洋环境的革兰氏阴性菌, 是许多水产养殖动物的致病菌, 同时也是人类的机会致病菌<sup>[2]</sup>。前期研究<sup>[3]</sup>发现, 溶藻弧菌ZJ-51菌株在特定培养条件下产生2种亚群体, 它们在固体培养基如LA平板上, 一个表现为具有粗糙、浑浊的(Op)菌落表型; 另一个表现为具有光滑、透明的(Tr)表型。这2种菌落形态的菌株在生物膜形成、鞭毛合成与运动能力, 尤其是对胁迫环境的适应性等方面均表现出极大差异。近年来, 已经有越来越多学者关注在自然饥饿状态下细菌的生理生化机制问题。在柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)中, 细胞可以长期存活在饥饿状态下, 但其适应性和毒力均有所降低<sup>[4]</sup>。鄢庆彬等<sup>[5]</sup>发现病原性副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)在长期饥饿过程中大部分进入活的非可培养状态, 细胞内蛋白质种类和含量发生显著变化。但是溶藻弧菌在长期饥饿胁迫下的存活状态、致病力变化以及菌落和菌体形态变化等特征均未见报道。笔者选取了3株具有菌落相变的溶藻弧菌, 每株都有2种菌落形态亚群体, 对他们进行海水长期饥饿胁迫处理。在此过程中追踪菌体各个时期的活性及形态, 并比较了他们对卤虫(*Artemia salina*)的毒力变化, 从而对进一步了解溶藻弧菌在自然界海水中存活的生理机理提供有益的参考。

收稿日期: 2014-06-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重点项目(KZCX2-EW-Q215); 国家自然科学基金面上项目(31272697)

作者简介: 龙云映(1989-), 女, 中国科学院南海海洋研究所2011级海洋生物技术硕士研究生。

通信作者: 陈偿(1973-), 男, 研究员, 博士。E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 溶藻弧菌 ZJ-51、E324 和 E381 分别分离自广东沿海人工养殖的病鱼体内,菌落透明光滑的菌株为 Tr 表型,分别命名为 ZJ-T、E324-T 和 E381-T;菌落不透明多皱的菌株为 Op 表型,分别命名为 ZJ-O、E324-O 和 E381-O。菌株于实验室 -80 °C 冰箱保存,试验前分别划线于 LB 琼脂平板上,30 °C 静置培养过夜活化。

1.1.2 试剂和仪器 实验使用的培养基为常规的 Luria-Bertani (LB) 肉汤。人工海水采用美国红十字会 (Red Cross) 珊瑚盐配制,盐度 30,121 °C 高温灭菌,静置后取上层使用。培养箱为上海智城 ZHWY-2102C 恒温培养箱,分光光度计为 BIO-RAD SmartSpec 3000 型,光学显微镜为 LEICA DMI-RB 型,扫描电子显微镜为 Hitachi S-3400N 型。

### 1.2 方法

1.2.1 海水长期饥饿试验 分别挑取 ZJ-T/O、E324-T/O 和 E381-T/O 在 LB 琼脂平板的单克隆菌落,接种于 3 mL LB 液体培养基中,30 °C 过夜培养。取 100  $\mu$ L 培养液稀释 10 倍于分光光度计中测量光密度 ( $OD_{600}$ ),计算数值以相同浓度  $V/V=1:100$  接种量接种于 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中,30 °C 振荡培养至菌体生长到对数期 ( $OD=0.60$ ),再以  $V/V=1:100$  接种量接种于 20 mL 灭菌人工海水中,在 30 °C 恒温培养箱中黑暗静置长期饥饿培养,培养时间 500 d,并定期取样计数活细菌在每毫升海水中可培养细菌数量。在饥饿前期取样时间间隔短;在饥饿后期菌株进入稳定期取样时间间隔延长。

1.2.2 菌落平板计数 分别取 100  $\mu$ L 各菌株不同时期培养液进行倍比稀释,取稀释后菌液 150  $\mu$ L 涂布于 LA 平板过夜培养,使平板上菌落数约 100 个,记录平板上的菌落数量并换算成细菌浓度。取样时间分别为 0、3、10、17、25、46、59、74、500 d。

1.2.3 菌落形态观察 分别选取培养了 3、17、59 d 的细菌进行显微镜观察。观察平板上生长的菌落形态,并记录这些菌落形态。

1.2.4 扫描电镜观察 取原始接菌培养到对数期的菌液(稀释至  $10^6$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)及经过 130 d 长期饥饿胁迫的海水细菌样品各 2 mL,缓慢滴加戊二醛至 2.5%  $\mu$ g/L,4 °C 固定 4 h;继续用 1.0% 的锇酸后固定 4~6 h。用蒸馏水于  $2000$  r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心洗涤菌体 3 次,然后分别取 1.0 mL 菌液缓慢注射于孔径为 0.22  $\mu$ m 的一次性滤器中进行乙醇梯度脱水,依次用丙酮以及乙酸戊乙酯置换,临界点进行干燥。将一次性滤器中的滤纸取出,裁剪至适当大小,粘贴于载物台上离子溅射真空镀膜,于 20 kV 电压下进行扫描电子显微镜观察拍照。

1.2.5 卤虫毒力测试 饥饿胁迫 500 d 后将原始菌株接种于 LB 液体培养基培养至对数期,倍比稀释,采用分光光度计和平板计数相结合的方法,使稀释后的原始菌株培养液与长期饥饿胁迫细菌的可培养细菌数近似,然后将稀释后的原始菌培养液和饥饿胁迫 500 d 的菌液分别进行卤虫感染实验。感染方法参考 FABRE 等<sup>[6]</sup>的方法并适当改进,具体为收集于灭菌海水中新鲜孵化的卤虫无节幼体,于 12 孔细胞培养板中进行毒力测试。每孔加 2 mL 灭菌海水,放入卤虫无节幼体 30 只,每株菌设置 3 个重复,将攻毒菌液按  $V/V=1:100$  接入,30 °C 培养 16 h,记录每孔卤虫的死亡率并计算平均值。

$$\text{死亡率} = (\text{死虫数} / \text{试虫总数}) \times 100\% \quad (1)$$

## 2 结果与分析

2.1 海水长期饥饿培养对弧菌存活数量的影响 从平板计数结果(见图 1)可见,经过 500 d 的长期饥饿胁迫,溶藻弧菌在海水中的饥饿存活情况明显分为 3 个时期(前期、中期和平台期)。1~5 d 为前期,此时各菌株每毫升海水中的可培养细胞数大幅度增加。由于各菌株利用营养物质的不同,大部分菌株在第 3 天就达到浓度最大值,而 E324-O 和 E381-T 在第 10 天才达到最大值。5~40 d 为中期,此阶段每毫升海水中可培养细胞数急剧降低,ZJ-T/O 和 E324-T/O 大约在第 22 天细菌数量下降到一个较固定的值,而

E381-T/O 则在第 42 天左右到达平台期。41 d 后为平台期, 此时可培养细胞在每毫升海水中的数量不再有太大变化, 基本维持在  $10^3 \sim 10^4$  cfu  $\cdot$  mL $^{-1}$ 。各个 Tr 表型菌株在进入平台期前可培养细胞浓度一直比 Op 表型菌株高, 而在 500 d 饥饿胁迫后 E324 和 E381 的 Op 表型菌株可培养细胞数却比 Tr 表型菌株稍高。

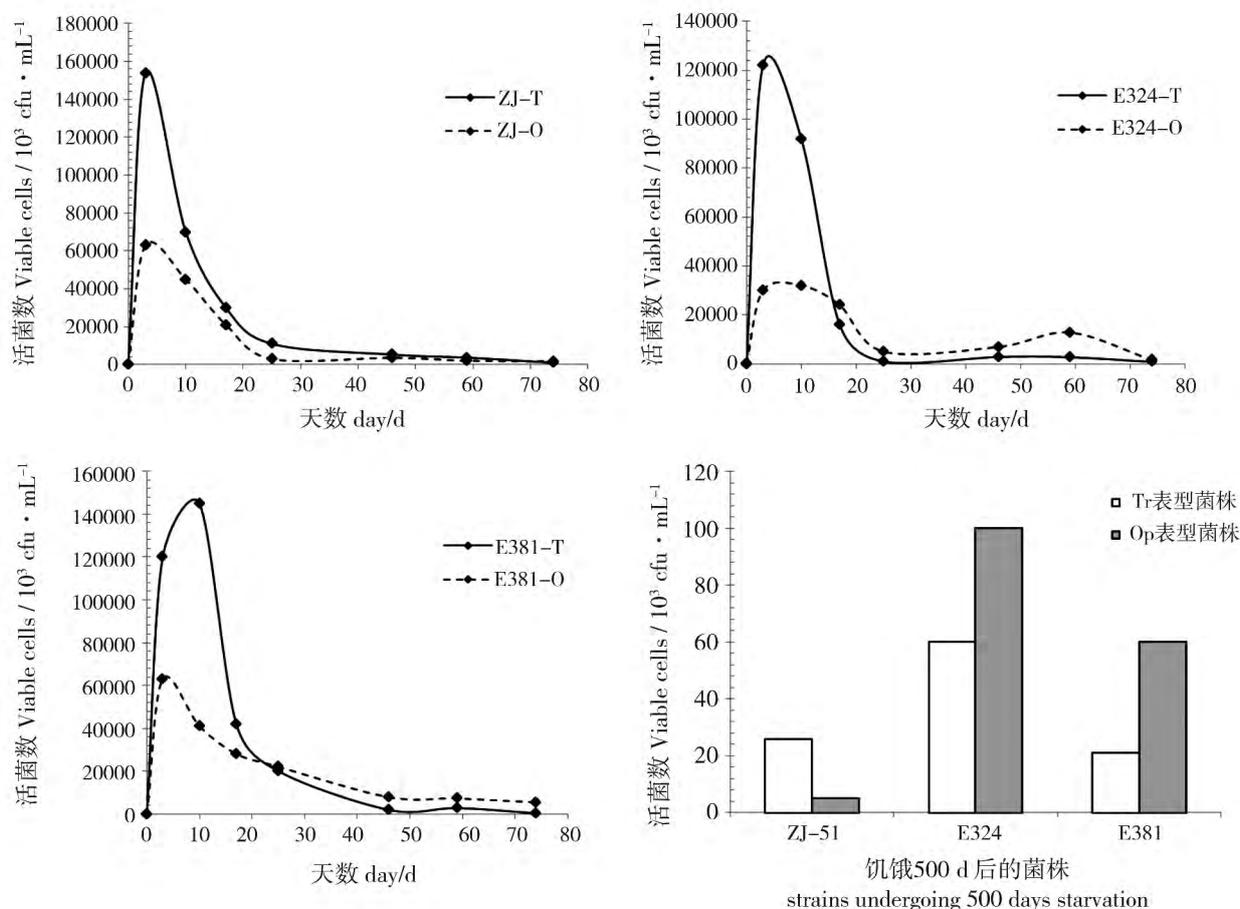


图 1 3 株溶藻弧菌海水长期饥饿胁迫后的活菌计数图

Fig. 1 The viable count graph of 3 *V. alginolyticus* undergoing seawater long-term starvation

2.2 各个时期菌落形态观察 6 个菌株经过 3, 17, 59 d 饥饿胁迫后, 细菌在 LA 平板上形成的菌落形态见图 2。第 3 天所有菌落形态与各自初始培养的菌落形态无明显差别; 第 17 天每毫升海水中可培养弧菌数处于急剧下降期, 部分菌落的周围运动细胞环变小; 第 59 d 时所有菌株在平板上均出现 2 种大小不一的菌落, 大的菌落与初始培养细菌的菌落形态一致, 但是小菌落非常小, 大约 1.5 ~ 2.0 mm, 而且其生长速度显著低于正常菌落, 一般需要培养 36 h 以上肉眼才可见, 而正常菌落一般只需培养约 12 h 即可见。

2.3 弧菌菌体的扫描电镜观察 从不同培养时间后的溶藻弧菌的扫描电子显微镜图片 (见图 3) 可见, 初始培养的细胞呈现典型的直杆或弯曲的短杆状, 大小均一; 经过海水饥饿胁迫 130 d 后, 菌体形态发生了很大改变, 大部分菌体从短杆状变成近圆形的球体, 剩下的一些长杆状菌体与原始菌株比起来也变得很长。长期饥饿胁迫的菌体 (E324-O) 之间还发现有很多絮状物质聚集 (图 2 - D2)。

2.4 卤虫毒性测定 分别用原始菌株培养稀释液与饥饿胁迫 500 d 后的菌液感染卤虫无节幼体, 后者的卤虫致死率均有所降低 (见图 4)。同等浓度下原始菌株培养稀释液的卤虫致死率大约为 25%, 而长期饥饿胁迫菌株的卤虫致死率约 12%。6 个菌株 ZJ-T/O、E324-T/O 和 E381-T/O 经过 500 d 的饥饿胁迫, 卤虫致死率分别仅为原始菌株培养稀释液的 44.0%、38.2%、44.4%、54.5%、43.5% 和 94.1%。

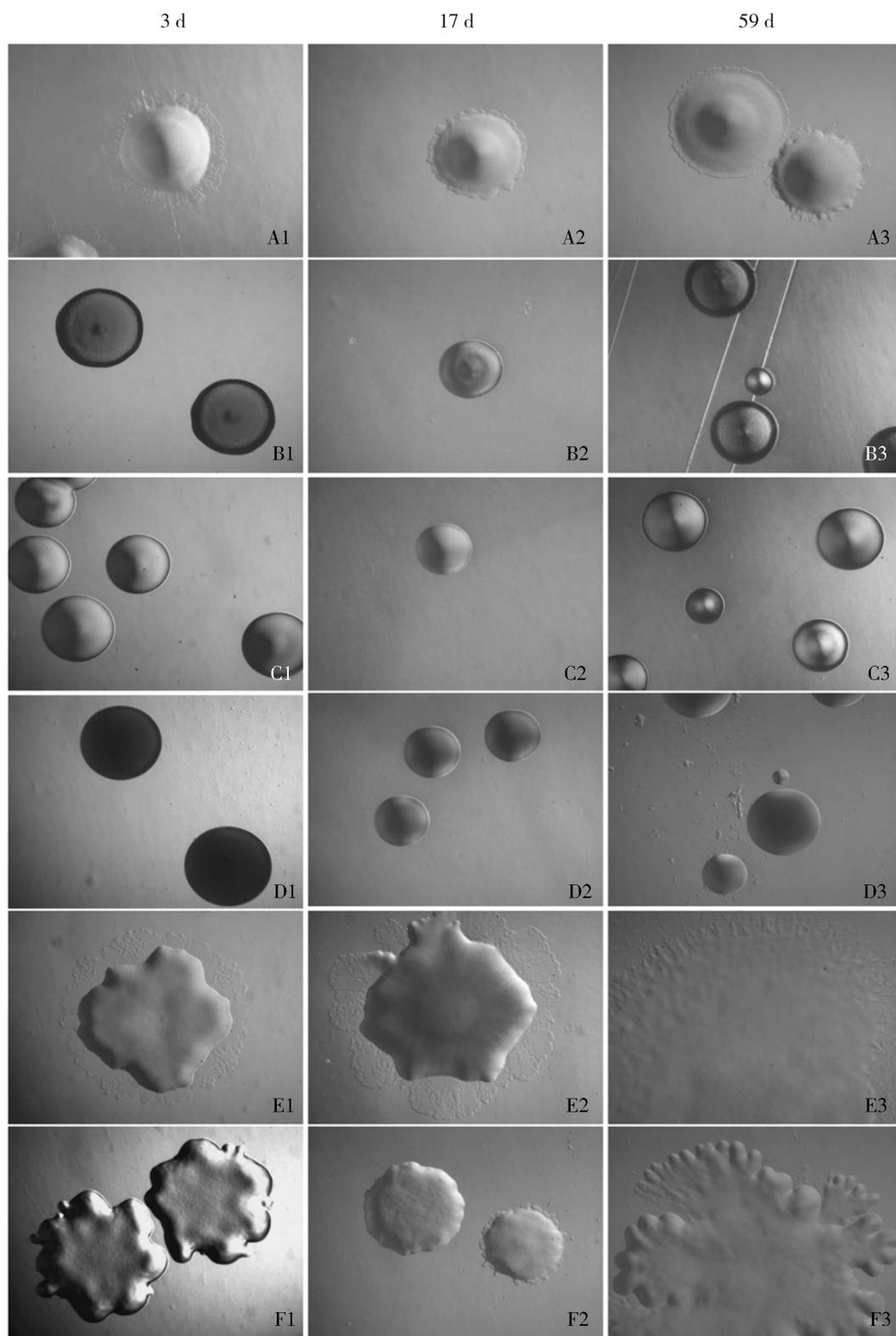


图2 不同培养时期溶藻弧菌在 LB 平板上的菌落形态特征

A. ZJ-T; B. ZJ-O; C. E324-T; D. E324-O; E. E381-T; F. E381-O; 第 1 列为培养 3 d 的菌落, 第 2 列为培养 17 d 的菌落, 第 3 列为培养 59 d 的菌落

Fig. 2. Colonial morphologies of *V. alginolyticus* strains on LB plates during different starving periods  
A. ZJ-T; B. ZJ-O; C. E324-T; D. E324-O; E. E381-T; F. E381-O. The first, second and third columns show strains that starved for 3 d, 17 d and 59 d, respectively

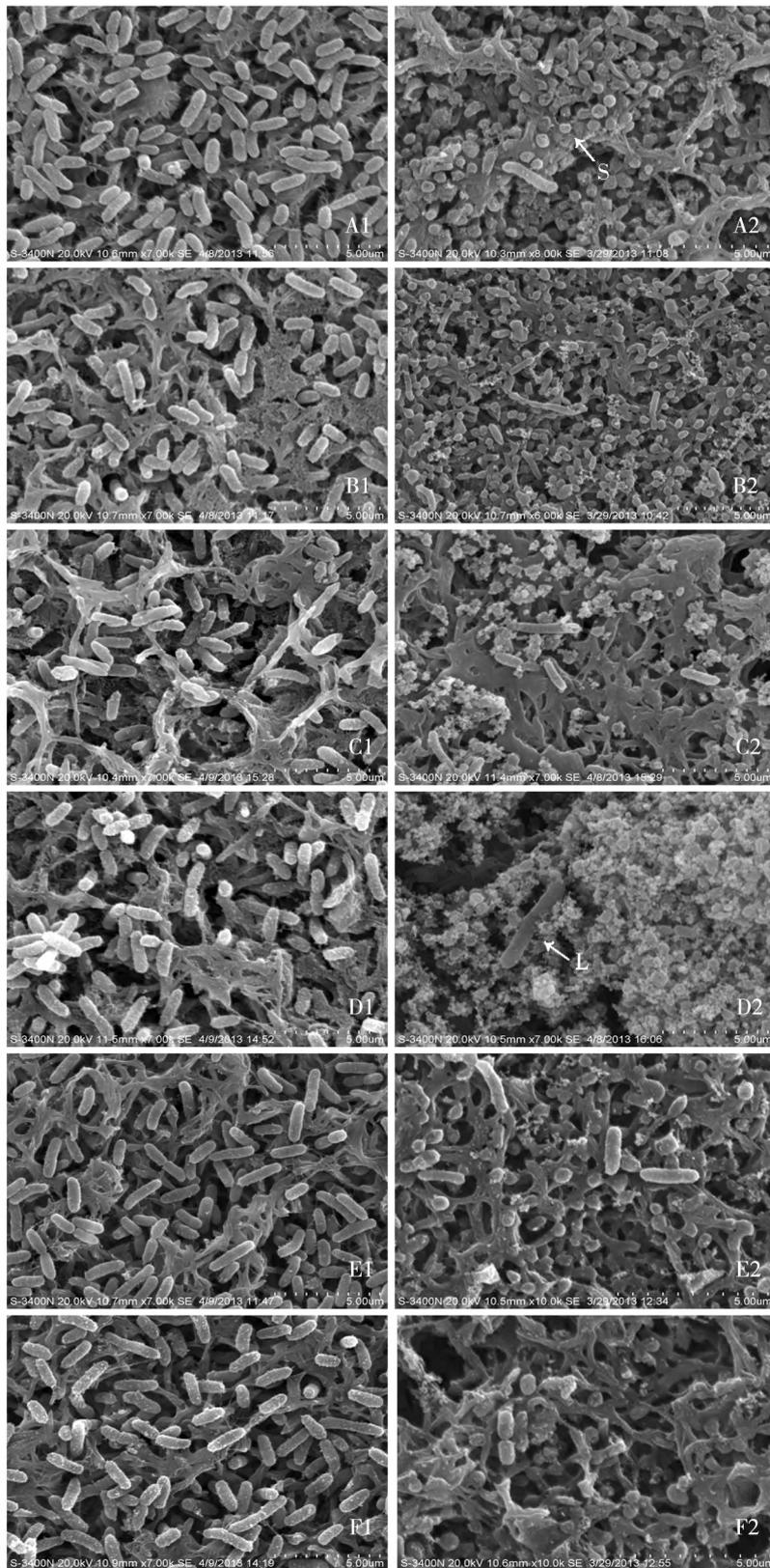


图 3 长期饥饿胁迫后溶藻弧菌形态变化的扫描电子显微镜观察

A. ZJ-T; B. ZJ-O; C. E324-T; D. E324-O; E. E381-T; F. E381-O; 第 1 列为培养 1 d 的菌株, 第 2 列为饥饿胁迫 130 d 的菌株; S. 圆球状细胞; L. 超长杆状细胞

Fig. 3 Cells morphology of *V. alginolyticus* after long-term starvation under SEM

A. ZJ-T; B. ZJ-O; C. E324-T; D. E324-O; E. E381-T; F. E381-O. The first and second columns display the populations that were cultured for 1 d and 130 d, respectively. S. a coccus shape cell; L. a long rod shape cell

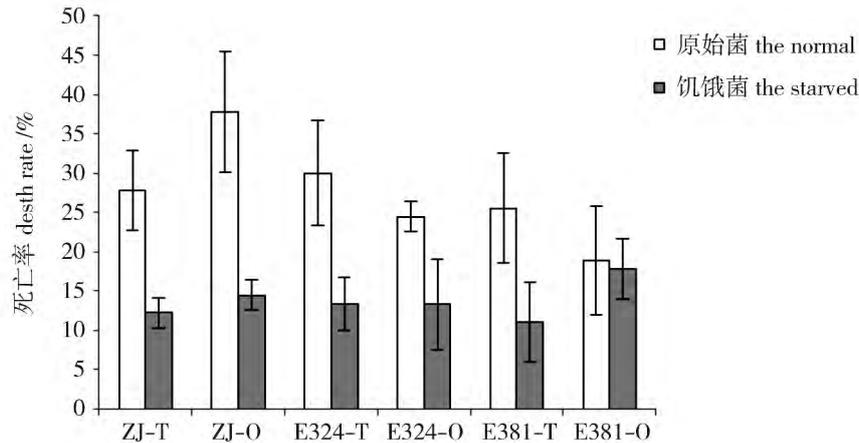


图4 溶藻弧菌饥饿胁迫 500 d 后的卤虫毒力试验结果

Fig. 4 The lethalties of *V. alginolyticus* strains to *A. salina* after 500 d starvation

### 3 讨论

**3.1 溶藻弧菌饥饿胁迫过程中的菌体存活模式** 本研究结果显示,溶藻弧菌在长期饥饿胁迫下的存活模式是前期为上升期,中期为下降期,后期为平台期,即“上升—降低—稳定”的模式。MORITA<sup>[7]</sup>最早把细菌在缺乏营养物质的环境中的存活状态称为“饥饿存活”,这个概念的提出给人们带来了新的认识,即细菌在自然界的存在环境与实验室人工培养的环境不同,是处于营养匮乏状态。进一步的研究<sup>[7]</sup>发现饥饿存活模式可总结为3个步骤:增加—增加—降低,即细菌在初始饥饿培养期间,其可培养细胞数上升,等达到一个相对稳定状态后每毫升海水中细菌数量继续上升,上升至一个稳定状态后活菌数开始下降,这与笔者在溶藻弧菌中遇到的情况显然不同。笔者参考文献[8-11]的结果,作如下解释:在初始上升期的时候,菌落形态跟初始培养菌接近,随着时间推移,每毫升海水中可培养细胞数迅速锐减,光学显微镜下大部分的细菌菌落的运动环也呈现皱缩状态,推断此时细胞开始进入消耗自身内部储能物质或细胞成分阶段<sup>[8]</sup>。当饥饿培养时间足够长的时候,虽然在海水中细菌的数量变化不大,但是显微镜下的菌落形态与开始的时候有很大区别,推测这段时间细胞发生内部剧烈重组反应<sup>[9-10]</sup>,某些细菌通过进入饥饿诱导状态(starvation-induced diversification, SID)使其拥有更加适应环境的突变选择以应对恶劣的环境<sup>[11]</sup>。

**3.2 溶藻弧菌饥饿胁迫后可长期存活** 溶藻弧菌进入稳定期后,各菌株在海水中的数量保持在 $10^3 \sim 10^4$  cfu · mL<sup>-1</sup>,经500 d饥饿胁迫培养,可培养细菌仍高达 $10^3$  cfu · mL<sup>-1</sup>。弧菌的致病性除了与种类、菌株毒力相关外,还与数量有关<sup>[12]</sup>。当水体中弧菌数量达到 $10^4$  cfu · mL<sup>-1</sup>时,对虾感染患病几率显著提高<sup>[13]</sup>,也许耐受长期饥饿胁迫的能力是弧菌在世界范围传播的重要原因之一。据报道,经过5个多月的航行,从中国深圳到美国底特律的货轮压舱水中仍能检测出高浓度的溶藻弧菌<sup>[14]</sup>。

**3.3 饥饿培养对弧菌菌落相变的影响** 本研究发现,饥饿胁迫的初期和中期(1~40 d) Tr菌落可培养细胞数大大高于 Op菌落,而进入稳定期时, E324-O和 E381-O的可培养细胞数比 Tr表型的高,2种菌落的形态并无明显变化。菌落的形态、鞭毛、胞外多糖有关,鞭毛影响菌落运动环的大小,胞外多糖影响菌落的褶皱<sup>[15]</sup>。霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)在饥饿培养条件下光滑型菌落却能变成粗糙型菌落<sup>[16-17]</sup>。粗糙型细菌表面包裹着一层粘稠的胞外多糖(exopolysaccharide, EPS),而光滑型细菌表面缺乏这层多糖<sup>[18]</sup>。EPS除了赋予菌落粗糙和浑浊的表型外,还能增强抗氧化、渗透压等环境胁迫的能力<sup>[19]</sup>,此外,作为一种碳水化合物, EPS也可作为储存碳源,保证细菌在长期营养缺乏的环境中能维持最基本的能量供给,因此,霍乱弧菌粗糙型菌落能更好适应营养缺乏胁迫<sup>[20]</sup>。3株溶藻弧菌经过500 d的饥饿胁迫后,2种菌落形态的活细胞数却无明显的规律,这可能是因为溶藻弧菌菌落型态差异的机制与霍乱弧菌不同,前期的研究<sup>[3]</sup>

发现溶藻弧菌 ZJ-51 的 2 种菌落的胞外多糖含量没有显著差异。

3.4 经过长期饥饿胁迫的溶藻弧菌形态发生改变 据文献[17]报道,细菌遭遇长期饥饿胁迫会形成超微细菌和活的非可培养细菌。文献[21-23]发现细菌在饥饿胁迫状态下会形成“rounding-up”表型,细胞变圆,本研究也发现了类似的现象。饥饿细胞倾向于抛弃多余蛋白和 RNA,使身体减负,从而增大体表与体积比(surface-to-volume ratio),使细胞在单位体积内可以摄取更多营养<sup>[4,24]</sup>。此外,在溶藻弧菌中,长期饥饿胁迫后,除了大量的球状细胞外,还存在着一些超长的长杆状细胞,推测可能是由于细胞可能发生了复制,但却没有完成分裂;或者可能发生了非对称的分裂过程,从而产生了小的圆形细胞和超长细胞。本研究还在电镜下观察到大量絮状物质,可能是细胞胞外产物。海洋弧菌会产生大量胞外产物<sup>[25]</sup>,如细胞溶素、脂酶、铁载体、EPS 和蛋白酶等。部分可引起致病的胞外产物被认为是毒力因子<sup>[26]</sup>,胞外产物也可作为潜在的能量储备物质被饥饿细胞利用,同时,胞外物质在细胞与细胞间的信息传递也可发挥重要作用。长期饥饿培养后,溶藻弧菌菌落形态变化不大,但菌落却有大有小,结合电镜图,笔者认为这可能是细胞经饥饿胁迫后分裂速度减慢,细胞生长速率下降。

3.5 溶藻弧菌经长期饥饿胁迫后毒力降低 经过海水长期培养的细菌跟原始菌株相比,大部分菌株的致病力约降低 50%。这可能是在长期饥饿胁迫下,弧菌细胞为了节省成本,将非生存必须的生物合成与代谢途径降低至最低水平<sup>[27-28]</sup>,同时,细胞的毒力又没有完全丧失,可确保细菌在遇到宿主后能迅速入侵宿主摄取营养。通过 RT-PCR 检测溶藻弧菌饥饿胁迫后的毒力基因变化,发现位于致病力毒力岛(virulence pathogenicity island, VPI)上的基因表达水平降低,但毒力基因 *toxR*, *toxS* 和 *ace* 的表达水平保持不变<sup>[29]</sup>。

溶藻弧菌可以长期存活于饥饿胁迫状态,此过程中细胞和菌落形态发生改变,致病力也有所降低,和细菌到达稳定期可培养细胞数保持在一定水平,这些结果为解释溶藻弧菌在寡营养海水中的生存策略提供了重要线索。

## 参考文献:

- [1] KJELLEBERG S, HERMANSSON M, MARDEN P, et al. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1987, 41(1): 25-49.
- [2] AUSTIN B. Vibrios as causal agents of zoonoses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3): 310-317.
- [3] CHANG C, JIN X, CHAOQUN H. Phenotypic and genetic differences between opaque and translucent colonies of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Biofouling*, 2009, 25(6): 525-531.
- [4] ARIAS C R, LAFRENTZ S, CAI W L, et al. Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes [J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 266.
- [5] 鄢庆彬, 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.
- [6] FABRE B, ARMAU E, ETIENNE G, et al. A simple screening method for insecticidal substances from *actinomycetes* [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(2): 212-219.
- [7] MORITA R Y. Bioavailability of energy and the starvation state [M]. *Starvation in Bacteria*: Springer, 1993: 1-23.
- [8] KOLTER R, SIEGELE D A, TORMO A. The stationary phase of the bacterial life cycle [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1993, 47(1): 855-874.
- [9] SIEGELE D A, ALMIRON M, KOLTER R. Approaches to the study of survival and death in stationary-phase *Escherichia coli* [M]. *Starvation in Bacteria*: Springer, 1993: 151-169.
- [10] NOVITSKY J A, MORITA R Y. Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions [J]. *Marine Biology*, 1978, 48(3): 289-295.
- [11] CHEN H J, CHEN C Y. Starvation induces phenotypic diversification and convergent evolution in *Vibrio vulnificus* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88658.
- [12] AUSTIN B. The effects of pollution on fish health [J]. *Journal of applied microbiology*, 1998, 85(S1): 234S-242S.
- [13] 于占国, 林凤翔. 异养细菌与虾病关系的研究 [J]. *海洋学报*, 1995, 17(3): 85-91.
- [14] WU D, YOU H, ZHANG R, et al. Ballast waters treatment using UV/Ag-TiO<sub>2</sub>+O<sub>3</sub> advanced oxidation process with *Esche-*

- richia coli* and *Vibrio alginolyticus* as indicator microorganisms [J]. *Chemical Engineering Journal* ,2011 ,174( 2) : 714 – 718.
- [15] ZHAO J J , CHEN C , ZHANG L P , et al. Cloning , identification , and characterization of the *rpoS*-like sigma factor *rpoX* from *Vibrio alginolyticus* [J]. *BioMed Research International* ,2009 ,2009: 126986.
- [16] MIZUNOE Y , WAI S N , TAKADE A , et al. Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholerae* O139 strain MO10 [J]. *Infection and Immunity* ,1999 ,67( 2) : 958 – 963.
- [17] WAI S N , MIZUNOE Y , YOSHIDA S I. How *Vibrio cholerae* survive during starvation [J]. *FEMS Microbiology Letters* , 1999 ,180( 2) : 123 – 131.
- [18] WAI S N , MIZUNOE Y , TAKADE A , et al. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology , stress resistance , and biofilm formation [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 , 64( 10) : 3648 – 3655.
- [19] LEIGH J A , COPLIN D L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions [J]. *Annual Reviews in Microbiology* ,1992 , 46( 1) : 307 – 346.
- [20] MORRIS J G , SZTEIN M B , RICE E W , et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans [J]. *Journal of Infectious Diseases* ,1996 ,174( 6) : 1364 – 1368.
- [21] ROSZAK D B , COLWELL R R. Survival strategies of bacteria in the natural environment [J]. *Microbiological Reviews* , 1987 ,51( 3) : 365 – 379.
- [22] NOVITSKY J A , MORITA R Y. Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,1976 ,32( 4) : 617 – 622.
- [23] RAVEL J , KNIGHT I T , MONAHAN C E , et al. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state: growth or resuscitation? [J]. *Microbiology* ,1995 ,141( 2) : 377 – 383.
- [24] GJERMANSEN M , RAGAS P , STERNBERG C , et al. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms [J]. *Environ Microbiol* ,2005 ,7( 6) : 894 – 906.
- [25] HASEGAWA H , LIND E J , BOIN M A , et al. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for *Pacific oyster* ( *Crassostrea gigas* ) larvae [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,2008 ,74( 13) : 4101 – 4110.
- [26] SECADES P , GUIJARRO J A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,1999 ,65( 9) : 3969 – 3975.
- [27] SANA T G , HACHANI A , BUCIOR I , et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and *fur* and modulates internalization in epithelial cells [J]. *J Biol Chem* ,2012 ,287( 32) : 27095 – 27105.
- [28] LAI W B , WONG H C. Influence of combinations of sublethal stresses on the control of *Vibrio parahaemolyticus* and its cellular oxidative response [J]. *Food Control* ,2013 ,33( 1) : 186 – 192.
- [29] BEN ABDALLAH F , ELLAFI A , LAGHA R , et al. Virulence gene expression , proteins secreted and morphological alterations of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in response to long-term starvation in seawater [J]. *Afr J Microbiol Res* ,2011 ,5( 7) : 792 – 801.

## Viability Analysis and Cell Morphology Observation of *Vibrio alginolyticus* under Long-term Starvation

LONG Yunying<sup>1 2</sup>, ZHANG Lyping<sup>1 2</sup>, WEI Lu<sup>1 2</sup>, DENG Yiqin<sup>1 2</sup>, CHEN Chang<sup>1 3</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 10049, China; 3. Marine Observation and Research Station at Xisha Island, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** Three *Vibrio alginolyticus* strains (ZJ-51, E324 and E381) with phase variation were selected to conduct seawater long-term starvation experiments to study viable bacteria density at different periods, colony morphology observation under optical microscope, cell morphology observation under scanning electron microscope (SEM) and the virulence to *Artemia salina* between the fresh and the starved. There are three phases according to bacteria activity undergoing long-term starvation. The cultured bacteria activities increased and peaked during the early period (1 ~ 5 d), and the colonial morphologies did not show significant changes. During the middle phase of starvation (5 ~ 40 d), cultured bacterial cells decreased dramatically, and part of colonial movement rings shrunk. After about 41 d starvation, the populations entered into a long-term stationary phase and the cultured bacteria density maintained at  $10^3 \sim 10^4$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Viable bacteria, with tiny colonies formed on the LA agar plates, remained at about  $10^3$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> after 500 d starvation. Under SEM a large portion of cells changed from short rod shape to coccus shape, and a small portion of cells displayed long rod shape or produced flocs. The results of virulence to *A. salina* show that after being starved for 500 d, the cells of *V. alginolyticus* decreased half of their lethality as compared to the normal cells. These results provide important clues for the survival strategy of *V. alginolyticus* in the oligotrophic seawater environment.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; starvation; phase variation; colonial morphology; virulence