

非可培养状态哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)复苏后 生理特征及毒力相关基因表达*

钟琳红¹ 陈吉祥¹ 姜莹安¹ 王 蓉¹ 贾俊涛²

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室 青岛 266003;

2. 山东出入境检验检疫局 青岛 266002)

提要 将哈维氏弧菌 SF1 接种在自然海水中低温诱导进入活的非可培养状态,用添加营养物质后升温培养的方法进行复苏。用透射电镜观察不同状态哈维氏弧菌细胞形态和结构,研究哈维氏弧菌复苏后对不良环境的抵抗力,用 RT-PCR 检测丝氨酸蛋白酶基因 *Ser* 和 *rpoS* 基因的表达。结果表明,进入 VBNC 状态的哈维氏弧菌由杆状变为球状,体积比正常细胞小,复苏后恢复正常形态且对紫外辐射,热激的抵抗能力没有明显改变,对高渗透压的抵抗力减弱,而对冷激的抵抗力增强。复苏后的哈维氏弧菌对抗生素的敏感性没有改变。用 RT-PCR 未检测到在 VBNC 状态时 *Ser* 和 *rpoS* 基因的表达,而在复苏后的细胞均检测到该基因的表达,可能是其保持致病性的重要原因之一。

关键词 哈维氏弧菌,活的非可培养状态,复苏,生理特性,基因表达

中图分类号 Q346

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种革兰氏阴性、具有发光特性的海洋细菌,广泛分布于近岸海水环境及海洋动物。该菌是我国及其它许多国家和地区养殖对虾和鱼类的致病菌(Austin *et al.*, 1999)。其致病机理尚不十分清楚,Pizzutto 等(1995)发现不同哈维氏弧菌菌株之间存在较大的遗传差异,致病力是由某种可遗传的毒力因子决定。Liu 等(1996)发现来自病虾的哈维氏弧菌胞外蛋白酶、磷脂酶、溶血素的活性较强,在对虾致病性中发挥重要作用,从致病菌株中分离的一种胞外丝氨酸蛋白酶被认为是哈维氏弧菌的主要外毒素。Zhang 等(2000)对 19 株不同来源的哈维氏弧菌致病性及其胞外产物毒性进行研究,发现致病性强的菌株溶血性和其它胞外产物毒性都很强,进一步研究还发现部分强致病性哈维氏弧菌中有两个溶血素编码基因。Harris 等(1999)从哈维氏弧菌分离了 2 个不同分子量大小的蛋白质,对斑节对虾和小鼠都有致病性。哈维氏弧菌的密度感应系统调控如发

光、型分泌系统、铁载体、多糖和金属蛋白酶的产,与致病性密切相关(Lowery *et al.*, 2005)。

细菌在营养缺乏、温度变化、渗透压改变等不良条件下能通过改变其自身的生理和形态变化以适应环境。Xu 等(1982)在研究霍乱弧菌的越冬问题时首次提出了细菌活的非可培养状态(Viable but Nonculturable State, VBNC)的概念,认为它是细菌对不良环境的一种适应方式,在一定条件下可以恢复为可培养形式,并仍保持致病性,现已发现 60 多种革兰氏阴性和部分革兰氏阳性菌形成活的非可培养状态。弧菌属的许多种如霍乱弧菌、创伤弧菌、杀鲑弧菌和拟态弧菌等在不良环境下均可形成活的非可培养状态(Huq *et al.*, 1995; Oliver, 1995, 2005)。作者在研究中发现哈维氏弧菌在自然海水中低温条件下形成活的非可培养状态,复苏后仍保持对斑马鱼的致病性(Sun *et al.*, 2008)。本文进一步研究 VBNC 状态哈维氏弧菌复苏后的形态和生理特性变化,研究复苏细胞的部分

* 国家“863”计划项目, 2007AA09Z416 号; 农业部公益性行业专项, nyhyzx 07-046 号; 国家自然科学基金项目, 30972275 号。钟琳红, 硕士, E-mail: zhonglinhong_821@163.com

通讯作者: 陈吉祥, 教授, E-mail: betcen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2009-02-19, 收修改稿日期: 2009-04-23

毒力相关基因的表达, 探讨哈维氏弧菌在不良环境中生存和毒力变异, 进而揭示其疾病发生和传播机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

哈维氏弧菌 SF1 分离于发病的花鲈(*Lateolabrax japonicus*), 由本实验室保存。

1.2 哈维氏弧菌 VBNC 状态的诱导及复苏

将哈维氏弧菌接种到 500ml 灭菌的无颗粒海水中, 最终菌浓度为 10^6 CFU/ml, 低温保存诱导进入 VBNC 状态, 用吡啶橙染色荧光显微镜直接计数法(AODC)测定细菌总数, 活菌直接计数法(DVC)测定活菌总数, 涂布平板法(PC)测定可培养的细菌数, 按照 Sun 等(2008)方法进行升温复苏。

1.3 哈维氏弧菌的透射电镜观察

将正常状态、活的非可培养状态及复苏的哈维氏弧菌分别离心收集后, 用 3% 戊二醛固定 24h, 用 2.5% 的磷酸缓冲液(pH 7.2)漂洗三遍后再用 1% 锇酸固定、乙醇梯度脱水、用 Epon 812 树脂包埋后进行超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 用 JEOL 1200EX 透射电子显微镜(JEOL, Japan)观察。

1.4 复苏的哈维氏弧菌对环境应激的敏感性

由 VBNC 复苏的哈维氏弧菌细胞和正常生长的细胞分别在 TSA-1%NaCl 液体培养基中培养 12h 至对数生长期后期, 收集菌悬液, 8000r/min, 离心 10min 收集沉淀细胞, 用等体积 PBS (pH 7.4)洗涤, 稀释至适当浓度用于环境应激试验, 每项实验均设计 3 个重复, 每个稀释度作 3 个平行。

紫外辐射: 分别吸取 0.1ml 适当浓度的正常和复苏细胞悬液, 涂布 2216E 平板, 无菌条件下紫外辐射 0、30、60、90s。紫外灯功率为 15W, 照射距离为 30cm, 照射结束后置于暗处避免光修复, 于 28℃ 培养 24h, 进行菌落计数并计算存活率(Watson *et al.*, 1998)。

高渗透压处理: 正常和复苏的菌体细胞置于 PBS 中(含 2.5mol/L NaCl), 分别在室温下放置 0、30、60、90min, 定时取样涂布 2216E 平板, 28℃ 培养 24h, 进行菌落计数并计算存活率(Mary *et al.*, 2003)。

热激处理: 正常和复苏的菌体细胞用预热的 PBS (42℃)悬浮, 再置于 42℃ 水浴中分别处理 0、30、60、90min, 定时取样并迅速置冰浴冷却, 涂 2216E 平板, 置于 28℃ 培养 24h, 进行菌落计数并计算存活

率(Mary *et al.*, 2003)。

冷激处理: 正常和复苏的菌体细胞用预冷的 PBS(4℃)悬浮, 分别在 4℃ 冰箱中处理 0、30、60、90min, 定时取样涂 2216E 平板, 于 28℃ 培养 24h, 进行菌落计数并计算存活率(Chiang *et al.*, 2006)。

1.5 复苏后的哈维氏弧菌对抗菌药物的敏感性

取正常状态和复苏后的哈维氏弧菌悬液(10^7 CFU/ml)100μl 分别涂布于 2216E 培养基平板, 各加入 26 种常用抗生素药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司), 26℃ 培养 24h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径, 依据厂家提供的药敏纸片判定标准判断结果。

1.6 RT-PCR 检测哈维氏弧菌毒力基因表达

根据 GenBank 已有的哈维氏弧菌 *Ser* 和 *rpoS* 基因序列, 分别设计 2 对简并引物, *Ser* 基因引物: 5'-ATCACTCGCAGGACCAT-3'; 5'-CACTCGCCGTTCCATCTTT-3', 扩增 826bp 的特异性片段; *rpoS* 基因引物: 5'-CGAGCAGCAAGAGCCTAG-3'; 5'-CTCACACCGATTGGAGTA-3', 扩增 538bp 的特异性片段, 引物由上海生物工程公司合成。

将正常和复苏的哈维氏弧菌分别接种于 TSA-1%NaCl 液体培养基中, 28℃ 培养 12h, 4℃, 8000r/min 离心 10min 收集菌体。VBNC 状态细胞的收集方法见文献(Saux *et al.*, 2002)。用 Trizol (Invitrogen) 试剂抽提正常状态、复苏状态及 VBNC 状态菌体总 RNA, 用无 RNase 的 DNase 处理提取的 RNA 样品。

于 0.2ml 离心管中加入 4μl DNase 处理后的 RNA, 分别加入 5mmol/L MgCl₂、1×PCR buffer II [50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)], 1mmol/L dNTP、1U RNase 抑制剂、2.5U M-MLV 和 1μmol/L 反向引物。小心混匀, 42℃ 水浴 1h; 90℃ 水浴处理 5min, 冰上冷却, 合成 cDNA 第 1 条链。然后对 cDNA 第 1 条链进行 PCR 扩增, PCR 体系为: 1×PCR buffer I、2mmol/L MgCl₂、200μmol/L dNTP、cDNA 模板 0.5μl、1.25U Taq 聚合酶和 0.5μmol/L 上游下游引物, 用双蒸水补足至 50μl。反应参数为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 5min, 52℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min; 72℃ 延伸 10min 30 个循环, PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 复苏的哈维氏弧菌的透射电镜观察

哈维氏弧菌在自然海水中 4℃ 保存 69 天后大部分细胞进入活的非可培养状态。活的非可培养状态哈维氏弧菌悬液用添加营养物质后升温培养复苏。在透

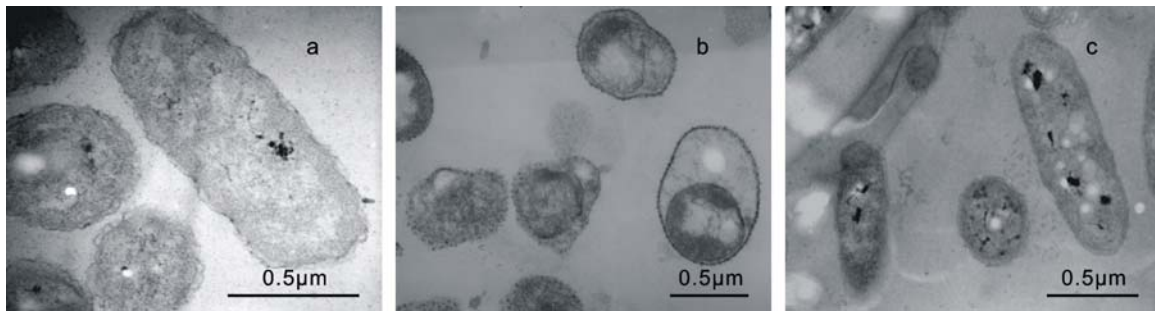


图 1 不同状态的哈维氏弧菌 SF1 在透射电镜下的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of *V. harveyi* SF1 in different states observed by a transmission electron microscope

a. 正常状态细胞; b. VBNC 状态细胞; c. 复苏状态细胞

射电镜下进行观察时, 正常状态的哈维氏弧菌细胞形态呈杆状或弧状, 个体大小为(1.4—1.6) μm \times 0.6 μm (图 1a)。进入活的非可培养状态后, 细胞变成球形, 体积缩小, 直径仅为 0.2—0.5 μm (图 1b), 细胞的周质空间明显变大, 但仍保持着细胞的完整性。复苏后的细胞与正常状态的细胞形态和大小相似, 细胞结构完整(图 1c)。

2.2 复苏的哈维氏弧菌对环境应激的抵抗力

紫外辐射时, 正常和复苏的哈维氏弧菌的存活率随着时间的延长而逐渐降低, 复苏和正常细胞的存活率没有明显差别, 照射 90s 后两种状态的菌体全部失去培养能力(图 2a)。在热激(42 $^{\circ}\text{C}$)条件下, 正常和复苏细胞的存活率随着处理时间的延长迅速降低, 60min 后两种状态的细胞全部失去培养能力(图 2b)。冷激(4 $^{\circ}\text{C}$)条件下, 正常和复苏的细胞存活率均有所降低, 90min 后正常状态的细胞存活率保持在 70%, 而复苏的细胞存活率反而高于初始状态, 增至 107.6%(图 2c)。高渗透压条件下保持 90min 后正常状态细胞的存活率为 78%, 复苏细胞的存活率为 53%(图 2d)。

2.3 复苏后的哈维氏弧菌对抗菌药物的敏感性

研究了复苏后的哈维氏弧菌

对 26 种常用抗生素敏感性, 发现复苏后的细胞对抗生素的敏感性没有改变, 与正常细胞一样, 只对氯霉素敏感, 对其余药物均有抗性。

2.4 复苏的哈维氏弧菌毒力基因表达

用 RT-PCR 检测了复苏后哈维氏弧菌部分毒力相关基因的表达, 复苏后的细菌细胞能检测到 *Ser* 基因和 *rpoS* 基因的表达, 而处于 VBNC 状态的细胞未检测到表达(图 3a、b)。

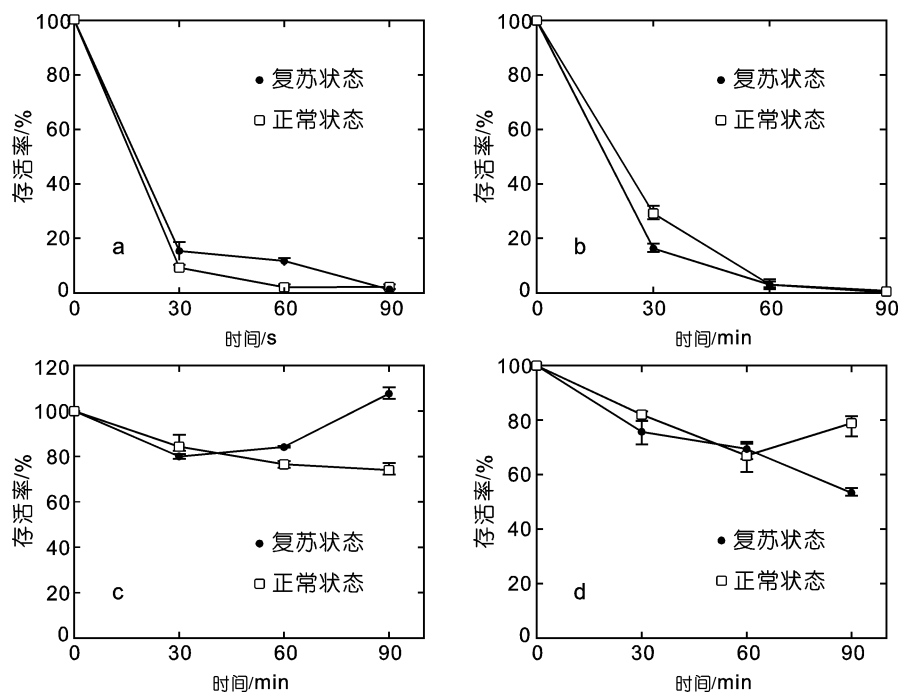


图 2 环境应激对不同状态哈维氏弧菌存活率的影响

Fig.2 Effect of environmental stresses on survival of *V. harveyi* in different states

a. 15-W 紫外灯照射(距离 30cm); b. 热激(42 $^{\circ}\text{C}$); c. 冷激(4 $^{\circ}\text{C}$); d. 高渗透压(2.5mol/L NaCl); \square 为正常状态; \bullet 为复苏状态

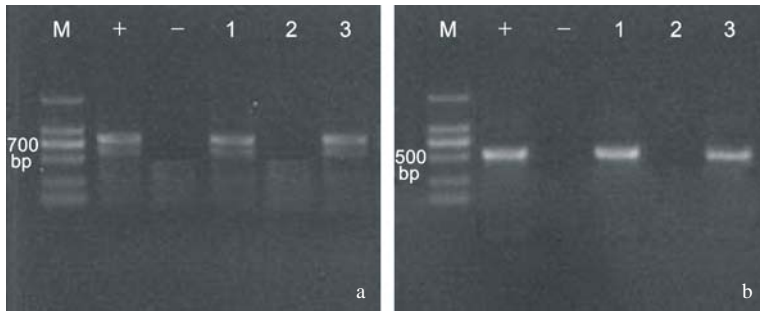


图3 RT-PCR 检测不同状态哈维氏弧菌毒力相关基因表达
Fig.3 RT-PCR detection to virulence related genes of *V. harveyi* in different states

a. *Ser* 基因; b. *rpoS* 基因。M 为 2000bp DNA 分子量标准; + 为哈维氏弧菌基因组 DNA; - 为副溶血弧菌基因组 DNA; 1 为正常状态的哈维氏弧菌; 2 为 VBNC 状态的哈维氏弧菌; 3 为复苏状态的哈维氏弧菌

3 讨论

活的非可培养状态是细菌抵抗不良环境的一种生存方式,不同种的细菌对外界环境压力的耐受性不同(Wong *et al.*, 2004)。哈维氏弧菌不同盐度条件下进入活的非可培养状态的时间有差异, Ramaiah 等(2002)报道哈维氏弧菌 ATCC 14126 在不同盐度的人工海水(35, 10)诱导进入非可培养状态的时间分别是 62 天和 45 天。哈维氏弧菌 SF1 在寡营养的自然海水中 4 保存 69 天时进入活的非可培养状态。细菌进入活的非可培养状态时生理及形态发生变化,细胞变小变圆,但细胞膜、细胞壁等细胞结构保持完整,并能保持正常细胞的表面抗原成分等(Linder *et al.*, 1989)。哈维氏弧菌 SF1 进入活的非可培养状态时细胞形态由杆状变为球状,体积缩小,周质间隙明显增加,但仍保持着完整的细胞膜和细胞壁结构。部分病原菌在 VBNC 状态仍有毒力基因表达, González-Escalona 等(2006)发现 VBNC 状态的霍乱弧菌 *tuf* 基因表达量下降, *relA* 与 *rpoS* 基因表达量增加。Saux 等(2002)发现不同来源的创伤弧菌在人工海水形成 VBNC 时能检测细胞溶血素基因的表达。Coutard 等(2005)报道处于 VBNC 状态的副溶血弧菌可检测到 16S—23S rRNA 和 *rpoS* 基因表达,但没有检测到 *tdh1* 和 *tdh2* 基因表达。

rpoS 基因编码 σ^s , 是细菌进入稳定期的调控因子, σ^s 在稳定期时的大肠杆菌菌体内积累,参与多种基因的特异性表达,增强对外界不良环境的抗逆性和适应能力(Hengge-Aronis, 1996)。在哈维氏弧菌中,经 *rpoS* 基因突变后的菌体在高乙醇条件下存活率下降,但对高渗透压和过氧化氢的抗逆性不变, RpoS 蛋白

与这些环境胁迫的应答无相关性(Lin *et al.*, 2002)。细菌的致病性与其胞外产物有着密切的关系,而胞外蛋白酶是其中不可缺少的致病因子。Sakai(1985)研究表明,杀鲑气单胞菌突变菌株毒力丧失与蛋白酶缺失有关。处于 VBNC 状态哈维氏弧菌没有检测到 *Ser* 和 *rpoS* 基因的表达,但当复苏为可培养状态时,菌体细胞与致病相关的毒力基因的表达恢复到正常水平。

处于活的非可培养状态的哈维氏弧菌添加复合维生素 B 和吐温 20 后在 28 °C 培养,复苏为可培养状态。复苏后的细胞形态大小与正常状态相同,细胞的结构完整,与文献报道的其它细菌的特性一致,复苏细胞的生理生化特征没有明显的改变。复苏后的细胞对紫外辐射,温度应激等的变化具有较强的抵抗能力,且对冷激适应性比正常状态有增强的趋势。复苏后的哈维氏弧菌对抗生素的敏感性没有改变。作者在以前研究中发现哈维氏弧菌复苏后致病力没有明显变化,这些结果进一步说明哈维氏弧菌在适应环境形成活的非可培养状态及复苏的过程中,致病力和生存能力没有明显减弱,可能是该病持续暴发的重要原因之一。

参 考 文 献

- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Chichester UK: Praxis Publishing Ltd, 20: 66—69
- Chiang M L, Ho W L, Chou C C, 2006. Response of *Vibrio parahaemolyticus* to ethanol shock. Food Microbiol, 23: 461—467
- Coutard F, Pommepuy M, Loaec S *et al.*, 2005. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. J Appl Microbiol, 98: 951—961
- González-Escalona N, Fey A, Höfle M G *et al.*, 2006. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. Environ Microbiol, 4: 658—666
- Harris L J, Owens L, 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. Disease of Aquatic Organisms, 38: 11—22
- Hengge-Aronis R, 1996. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 21: 887—893
- Huq A, Colwell R R, 1995. A microbiological paradox: viable but

- nonculturable bacteria with special reference to *Vibrio cholerae*. *J Food Prot*, 59: 96—101
- Lin Y H, Miyamoto C, Meighen E A, 2002. Cloning, sequencing and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveri*. *Biochem Biophys Res Communi*, 293: 456—462
- Linder K, Oliver J D, 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*, 55: 2837—2842
- Liu P C, Lee K K, Chen S N, 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol*, 22: 413—416
- Lowery, C A, McKenzie K M, Qi L *et al*, 2005. Quorum sensing in *Vibrio harveyi*: probing the specificity of the LuxP binding site. *Bioorg Med Chem Lett*, 15: 2395—2398
- Mary P, Sautour M, Chihib N E *et al*, 2003. Tolerance and starvation induced cross-protection against different stresses in *Aeromonas hydrophila*. *Int J Food Microbiol*, 87: 121—130
- Oliver J D, 1995. The viable but nonculturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett*, 133: 203—208
- Oliver J D, 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Microbiology*, 43: 93—100
- Pizzutto M, Hirst R G, 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis Aqu Org*, 21: 61—68
- Ramaiah N, Ravel J, Straube W L, 2002. Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *Syst Appl Microbiol*, 93: 108—116
- Sakai D K, 1985. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun*, 48: 146—152
- Saux M F L, Dominique H H, 2002. Detection of cytotoxic hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains artificial seawater. *Appl Environ Microbiol*, 68: 5641—5646
- Sun F R, Chen J X, Zhong L H *et al*, 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Ecol*, 64: 37—44
- Watson S P, Clements M O, Foster S J, 1998. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 180: 1750—1758
- Wong H C, Wang P, 2004. Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental Stresses. *J Appl Microbiol*, 96: 359—366
- Xu H S, Roberts N, Singleton F L *et al*, 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol*, 8: 313—323
- Zhang X H, Austin B, 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J Fish Dis*, 23: 93—102

THE VIRULENCE RELATED GENE EXPRESSION OF *VIBRIO HARVEYI* RESUSCITATED FROM VIABLE NONCULTURABLE STATE

ZHONG Lin-Hong¹, CHEN Ji-Xiang¹, JIANG Ying-An¹, WANG Rong¹, JIA Jun-Tao²

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao, 266003; 2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, 266002)

Abstract *Vibrio harveyi* SF1 cells were incubated and induced into viable but nonculturable state in sterilized seawater at 4°C. The VBNC cells were resuscitated with temperature increase in nutrition of yeast extract by adding Tween 20 or compound vitamin B. The morphological changes of VBNC cells and resuscitative cells were studied in transmission electron microscopy. Physiological responses of the resuscitative cells to UV, heat (42°C), cold (4°C) and osmotic stresses (2.5mol/L NaCl) were determined. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify expression of virulence related *Ser* and *rpoS* genes of the resuscitative cells. Sensitivity of the resuscitative cells to 26 antimicrobial agents did not change obviously when compared with that of the control. The expressions of *Ser*, *rpoS* genes were not detected in the VBNC cells but in the resuscitative cells. Virulence related genes were expressed in the resuscitative cells, which may partly explained the retaining of the pathogenicity of the resuscitative *V. harveyi*.

Key words *Vibrio harveyi*, VBNC, Resuscitation, Physiological characteristics, Gene expression