

Article

*Edwardsiella tarda*의 비배양성 생존상태(VBNC) 유도 및 소생 특성

강남이 · 김은희*

전남대학교 수산생명의학과

Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Edwardsiella tarda*

Nam I Kang and Eunheui Kim*

Department of Aquaculture Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

(Received August 30, 2016; Revised September 21, 2016; Accepted September 26, 2016)

ABSTRACT: Bacteria in the viable but nonculturable (VBNC) state fail to produce colonies on routine bacteriological media, but are still alive in the state of very low metabolic activity. The aim of the present study was to induce the VBNC state of the *Edwardsiella tarda* using sea water microcosm under starvation conditions at 10°C and to investigate resuscitation of the VBNC cells in temperatures changed from 10 to 25°C, with and without additives. *E. tarda* entered into the VBNC state within about 42–84 days of incubation in the microcosm. Throughout this period, the total cell counts as determined using acridine orange direct counting remained near the original inoculum level of $\sim 10^8$ cells/ml. The live cell counts measured with direct viable counting, on the other hands, declined to $\sim 10^4$ cells/ml. When the VBNC cells were incubated with addition of yeast extract, fish muscle extract or serum at 25°C, the ratios of resuscitated samples were 37%, 23%, and 37%, respectively. The characteristics of resuscitated *E. tarda* were consistent with those of the original *E. tarda*. When the resuscitated *E. tarda* were intraperitoneally injected into olive flounders, all fishes died within 5 days, indicating that the VBNC *E. tarda* might retain its pathogenic potential. Therefore, *E. tarda* under starvation conditions in the winter enter into the VBNC state and the VBNC *E. tarda* cells resuscitated at summer and autumn seawater temperature are considered to be pathogen continuously to olive flounder on the southern coast of Korea.

Key words: *Edwardsiella tarda*, fish pathogen, resuscitation, viable but nonculturable (VBNC)

어류에 에드워드병(edwardsiellosis)을 일으키는 *Edwardsiella tarda*는 그람 음성 세균으로 넓은 온도, pH, 그리고 염분 농도 범위에서 생존할 수 있는 조건성 병원체로 고수온이나 수질악화와 같은 부적합한 환경에서 어류의 상피나 장으로 지속적인 감염이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Woo *et al.*, 2011).

Sakai 등(1994)은 어류에 있어서 에드워드병은 연중 발생하지만 주로 고수온기에 중점적으로 발생하며 수온이 낮을 때는 수중에서 병원균이 거의 분리되지 않으므로, *E. tarda*가 양식 환경 내에 비배양성 생존(viable but nonculturable; VBNC) 상태로 있을 가능성을 제안하였다. VBNC 상태의 세균은 증식할 수 있는 능력을 완전히 잃어버린 것이 아니므로 적절한

조건이 주어지면 대사가 활발해지고 완전히 배양 가능한 상태로 소생될 수 있으며(McDougald *et al.*, 1998), 병원성을 보유하고 있어 소생되었을 때는 감염도 가능한 것으로 보고되어 있다(Lleó *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008).

E. tarda 이외의 어류 병원세균으로는 *Aeromonas hydrophila* (Rahman *et al.*, 2001), *Flavobacterium columnare* (Arias *et al.*, 2012), *Streptococcus parauberis* (Carras *et al.* 2002) 등이 VBNC 상태에 진입할 수 있으며, 일부 종은 VBNC 상태에서 독력을 보유한다(Carras *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2007)고 증명되고 있기 때문에 수산 양식장의 해수와 저질에서 발견되는 VBNC 세포는 어류에 지속적인 발병 원인이 될 수 있다.

우리나라에서 *E. tarda*는 수온 상승기부터 수온이 떨어지는 11월까지 검출되는데(Cho *et al.*, 2007) 저수온기의 *E. tarda* 동태에 대한 연구는 매우 미흡하다. 따라서 본 연구에서

*For correspondence. E-mail: ehkim@chonnam.ac.kr;
Tel.: +82-61-659-7171; Fax: +82-61-659-7179

는 빈영양 해수 microcosm을 이용하여 우리나라 남해안의 겨울철(12-2월) 평균 해수 온도인 10°C에서 *E. tarda*의 VBNC 상태를 유도하고, 수온이 상승하는 여름과 가을(6-10월)의 평균 수온이라 할 수 있는 25°C에서 다양한 소생조건을 적용하였을 때 VBNC 세포의 소생 및 병원성의 유지 가능성에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 균주

본 연구에 사용된 *E. tarda*는 2002년 7월 전라남도 해남에서 채집한 넙치 병어의 복수로부터 분리하여 -70°C에 보존한 균주를 이용하였다. 균주는 NaCl 농도를 1%로 조정된 tryptic soy agar (TSA, BD) 배지에서 25°C로 배양하여 재생시켰으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 실시하여(Weisburg *et al.*, 1991) 균주 동일성을 확인하였다. 또한 병력이 없는 넙치에 약 10^7 CFU/fish로 복강 주사하여 실험어가 7일 이내에 모두 사망하는 것으로 독력을 확인한 후 실험에 사용하였다.

*E. tarda*의 VBNC 상태 유도

*E. tarda*를 VBNC 상태로 유도하기 위한 microcosm은 Du 등(2007)의 방법을 응용하여 제작하였다. 오래된 해수(aged sea water, ASW)를 pore size 0.45 µm cellulose nitrate membrane filter (Whatman)를 이용하여 여과한 후 121°C에서 20분 동안 2회 고압증기멸균을 하였다. *E. tarda*는 최적생장온도인 31°C로 24시간 동안 TSA에서 배양하여 0.9% NaCl 용액으로 3회 세척하였으며 최종 농도 10^8 CFU/ml가 되도록 멸균된 ASW에 부유하여 빈영양 해수 microcosm을 제작하였다. 이렇게 제작한 microcosms을 10°C로 유지하면서 주 1회 TSA에 도말하여 25°C에서 48시간 배양한 후 배지에 형성된 집락의 수를 계수하여 배양 가능한 균(plate countable cells, PC)으로 나타내었다. Microcosm 시료 10 ml를 pore size 0.22 µm mixed cellulose ester filter (Advantec MFS)로 여과하여 필터를 TSA 배지 중앙에 놓은 후 25°C에서 48시간 배양한 후 나타내는 집락의 수가 1 CFU 미만(0.1 CFU/ml) 일 때 Baffone 등(2003)의 기준에 따라 microcosm 전체가 VBNC 상태에 들어갔다고 판단하였다.

전 균수 측정

Microcosm 내의 전체 세균 수는 acridine orange direct

counting (AODC) 방법으로 확인하였다(Hobbie *et al.*, 1977). 연속 희석한 microcosm 시료에 포르말린(37% formaldehyde solution, Junsei)을 2% 농도가 되도록 첨가하여 시료 내 세포를 고정하였다. Acridine orange (Sigma)를 0.01%의 농도가 되도록 첨가하며 2분 동안 염색한 후 pore size 0.22 µm black polycarbonate filter (Merck Millipore)로 여과하였다. 시료가 여과된 black polycarbonate filter를 형광현미경(Olympus BX51, ×1,000)의 green filter 하에서 관찰하여 단간균이나 구균 형태의 형광을 띄는 세균을 계수하였으며 7일 간격으로 전 균수를 측정하였다.

생존 균수 확인

Microcosm 내의 생존 균(VBNC와 배양가능세균)은 Kogure 등(1979)의 방법을 응용하여 세포분열이 억제된 상태에서 신장, 비대된 세포를 검출하는 direct viable counting (DVC) 법으로 측정하였다. Microcosm 시료에 yeast extract를 0.025% 되게 첨가하고 DNA 합성저해제로서 nalidixic acid (100 µg/ml, Sigma)와 pipemidic acid (50 µg/ml, Sigma)을 혼합하여 0.025% 가 되게 첨가한 후, 25°C에서 16시간 동안 배양하였다. 전 균수 측정법에 준하여 포르말린을 첨가하여 시료 내의 세포를 고정하고 acridine orange로 염색하여 형광현미경으로 관찰하면서 크기가 신장 또는 비대 되어 있고 형광을 띄는 세균을 생존 균으로 계수하였다.

배양 조건에 따른 VBNC *E. tarda* 소생을 비교

소생 실험의 첨가물로써 yeast extract, 넙치 근육추출물 그리고 혈청을 사용하였다. 건강한 넙치 근육 10 g에 PBS (phosphate buffered saline solution, 1×) 50 ml를 첨가하여 마쇄한 뒤 원심 분리하여 상층액을 0.22 µm membrane filter (Advantec MFS)로 여과하여 넙치 근육추출물을 제작하였고, 넙치의 미부 정맥으로부터 채혈한 혈액을 4°C에서 overnight 한 후 혈병과 혈구를 제거하고 membrane filter로 여과하여 혈청을 제작하였다. 빈영양 해수 microcosm 내의 *E. tarda*가 모두 VBNC 상태에 있다고 판정된 시료를 10°C에서 10, 20, 30, 60일 경과 후 각각 10 ml를 취하여 첨가물을 각각 0.025%가 되도록 추가하여 25°C로 온도를 상승시킨 후, VBNC 상태의 세포들이 배양 가능한 형태로 소생되었는지를 확인하였다. 매일 시료를 TSA 배지에 도말하여 31°C에서 24시간 배양한 후 집락 형성 유무를 확인하였으며 소생된 세균이 있는 실험구는 7일 동안 집락의 수를 확인하여 비교하였다.

소생된 *E. tarda*의 특성 분석

소생된 균은 *E. tarda*의 fimbrial gene cluster의 upstream region을 타겟으로 하는 특이 primer (EDt-F, TTCCGCAACC ATGATCAAAG; EDt-R, AGGGCATATATCCACTCACTG) (Sakai *et al.*, 2009)를 이용하여 colony PCR을 실시하였다. PCR은 pre-denaturation (95°C, 5 min) 1 cycle; denaturation (95°C, 30 sec), annealing (55°C, 30 sec), extension (72°C, 30 sec) 30 cycles; final-extension (72°C, 5 min), 1 cycle의 조건으로 실시한 후, 산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 original *E. tarda*와 비교하였다. 또한 소생된 *E. tarda*는 TSA에 1회 계대한 후 TSA 배지에서 배양 성장과 *Salmonella-Shigella* (SS, BD) 배지에서 검은색의 집락을 형성하는지 확인하였고, API 20E kit와 API CH 50E kit (bioMérieux)로 생화학적 특성을 비교 분석하였다. API test는 제조회사의 manual에 따라 수행하였으며 결과는 Api-web (<https://apiweb.biomerieux.com>)을 통해 확인하였다.

소생된 균의 병원성은 넙치에 대한 인위감염으로 확인하였다. 수조에 30 L 해수를 넣고 전장 10–15 cm 넙치를 10마리씩 수용한 후 수온을 $25 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 5일 동안 순치시켰다. Original *E. tarda*와 소생된 *E. tarda*를 각각 넙치에 1.57×10^6 CFU/fish로 복강 접종하고 대조구 넙치는 0.9% 생리식염수를 주사한 후 7일 동안 사망 개체를 확인하였다. 사망 개체는 해부하여 간과 신장으로부터 세균을 분리하였으며 분리된 세균이 SS 배지에서 검은색 집락을 형성할 때 *E. tarda*에 의한 사망으로 판단하였다.

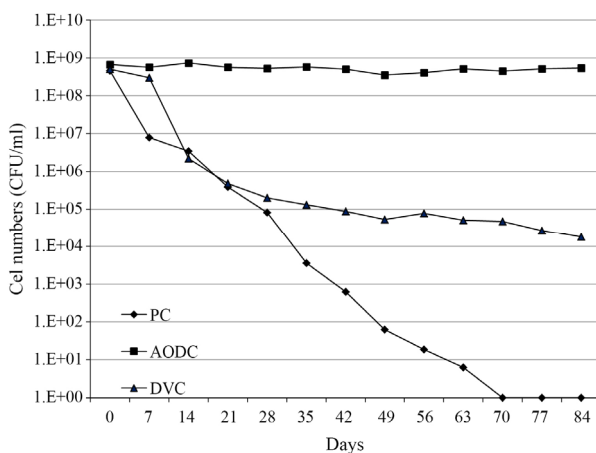


Fig. 1. Entry of *Edwardsiella tarda* into the viable but nonculturable state in an oligotrophic sea water microcosm at 10°C. (◆, PC), plate countable cells counted by plate counting method on TSA; (■, AODC), total cells counted by acridine orange direct count method; (▲, DVC), live cells including viable but nonculturable (VBNC) cells counted by direct viable count method.

결 과

저온 빈영양 해수 microcosm 내에서 *E. tarda*의 군수 변화

Microcosm에서 *E. tarda*의 군수 변화를 조사한 결과(Fig. 1), 일정 시간 경과 후 *E. tarda*의 PC 값은 계수할 수 없을 수치 (<0.1 CFU/ml)까지 감소하였다. 전 군수는 모든 균이 VBNC 상태에 진입한 이후까지 처음 접종했던 농도인 약 10^8 cells/ml로 일정하게 나타났다. 반면 DVC 군수는 배양 시간이 경과함에 따라 점차 줄어드는 경향을 보였으며 7주가 경과하자 10^4 cells/ml로 감소하였으며 모든 세포가 VBNC 상태에 진입하였다고 판단되는 이후에도 약 10^4 cells/ml로 유지되고 있었다. AODC법으로 관찰하였을 때 모든 세균은 형광을 띄는 단균 또는 구균의 형태(Fig. 2A)로 나타난 반면, DVC법으로 관찰하였을 때는 VBNC 상태의 균을 포함하여 살아있는 모든 균을 길이가 신장되거나 부피가 증가되어 나타났다(Fig. 2B). 30개 microcosm을 대상으로 모든 세포가 VBNC 상태에 들어가는 기간을 비교한 결과(Fig. 3), 최단 42일부터 최장 84일로 평균 약 70일이었다.

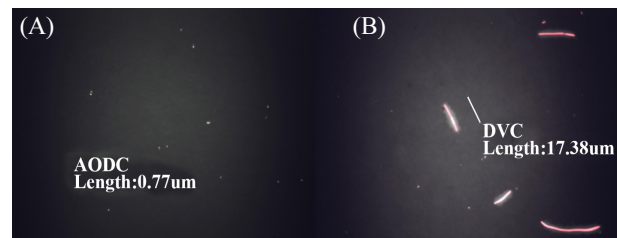


Fig. 2. Morphological characteristics of the *Edwardsiella tarda* analyzed by the acridine orange direct count (A) and direct viable count (B) method under an epifluorescence microscope (Olympus BX51, $\times 1,000$).

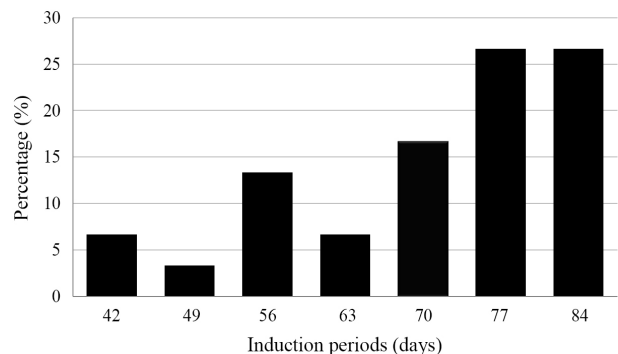


Fig. 3. Periods of induction of *Edwardsiella tarda* (10^8 CFU/ml) into the viable but nonculturable state in the oligotrophic seawater microcosm at 10°C.

VBNC 상태 유도 후의 경과 기간에 따른 *E. tarda*의 소생

*E. tarda*가 VBNC 상태에 모두 진입하였다고 판정한 30개의 빈영양 해수 microcosm에서 VBNC 세포의 소생을 조사한 결과(Fig. 4), 20일과 30일 경과한 시료의 15개 이상(50% 이상)에서 소생이 확인되었으며, 60일 경과한 경우에는 평균 3개(10%)의 시료에서 소생을 보였다.

소생된 균의 생화학적 특성과 독성

E. tarda 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 혈청, 납치근육추출물, 효모추출물을 각각 첨가하고 온도를 상승시킨 조건과 유기물 첨가 없이 온도만 상승시킨 조건에서 소생된 *E. tarda*는 모두 약 270 bp 위치에서 original *E. tarda*와 동일하게 단일 밴드를 나타내었다(Fig. 5). 또한 이들 소생된 균은 API 20E test에서 *E. tarda*와 99.4% 상동성이 있었고, API

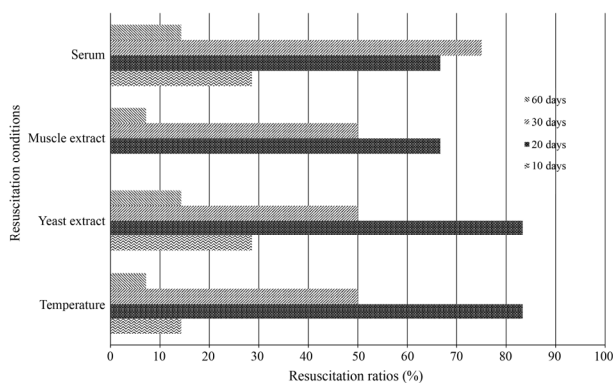


Fig. 4. Sample ratios showed the resuscitation of the VBNC *Edwardsiella tarda* (in vitro) with the addition of fish serum (0.025% v/v), fish muscle extract (0.025% v/v), or yeast extract (0.025% w/v) and with temperature increase only (to 25°C), depending on the days elapsed since VBNC induction.

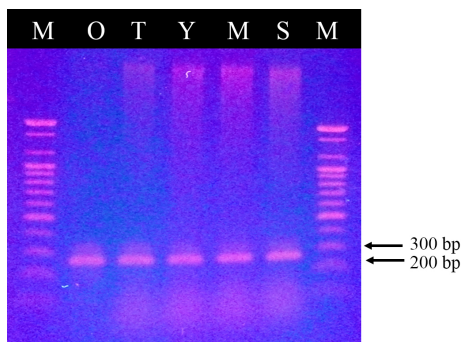


Fig. 5. Colony PCR of resuscitated *Edwardsiella tarda*. O, original *E. tarda*; T, temperature increase only (to 25°C); Y, addition of yeast extract; M, addition of muscle extract; S, addition of serum; M, 100 kb ladder used as a size marker.

CH 50E test에서는 99.8% 상동성을 보였으며, 결과 profile이 original *E. tarda*와 동일하였다.

소생된 *E. tarda*를 납치에 접종하였을 때 시험어는 접종 후 3일 이내에 에드워드병의 전형적인 증상인 복부팽만, 탈장 등을 보이며 95% 이상 사망하였으며(Fig. 6) 사망어류의 간과 신장에서 *E. tarda*가 재분리 되었다. 그러나 소생된 균을 접종한 실험구의 사망어 발생 시기는 original 균을 접종한 실험구에 비해 다소 지연되는 경향을 보였고, 대조구에서도 사망어가 발생하였지만 이들로부터 *E. tarda*는 분리되지 않았다.

고찰

세균은 영양 고갈, 온도 및 삼투압 변화, 자외선 노출 등과 같은 환경적 스트레스에 의해 VBNC 상태로 진입 할 수 있다는 것이 다수 보고되어 있다(Oliver, 2010; Nowakowska and Oliver, 2013; Zhang *et al.*, 2015), VBNC 상태의 세균은 낮은 대사 활성을 가지고 있음에도 불구하고 소생 되었을 때는 배양 가능하며 독성을 나타낼 수도 있기 때문에 환경에서 VBNC 상태의 존재는 잠재적인 병원체로 중요하게 여겨진다.

우리나라에서 양식 납치의 에드워드병은 연중 발생하는 질병 중의 하나이므로 *E. tarda*가 우리나라 남해안의 겨울 해수 온도에서 VBNC 상태로 진입하는지 알아보기 위하여 인위적인 microcosm에서 *E. tarda*의 VBNC 상태를 유도하였다. *E. tarda*가 접종된 빈영양 해수 microcosm을 10°C에서 배양하였을 때, *E. tarda*는 Oliver (2005)가 제시하였던 전형적인 VBNC 유도 그래프를 나타내었다(Fig. 1). 시간 경과에 따라 PC, AODC, DVC에서 계수되는 수는 달랐지만 전 균수는 약 10^8 cells/ml로 일정하였으며 평균 70일 경과 후에 VBNC 상태로 완전 진

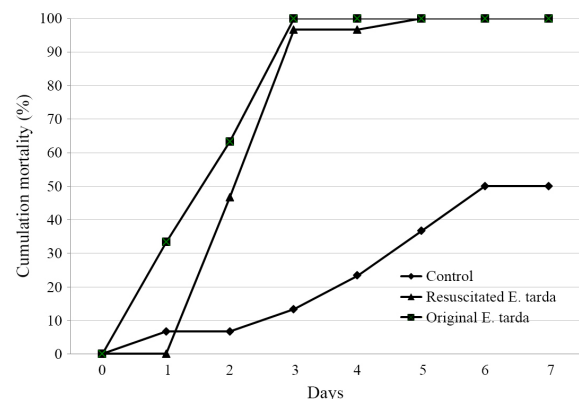


Fig. 6. Mortality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with original *Edwardsiella tarda* (1.57×10^6 CFU/fish), resuscitated *E. tarda* (1.57×10^6 CFU/fish), and sterilized saline solution at 25°C.

입하여 약 10^4 cells/ml로 유지되고 있었다. Du 등(2007)은 *E. tarda* CW7을 10^{11} CFU/ml 농도로 4°C에서 배양하였을 때 28일 이내에 VBNC 상태에 들어간다고 보고하였고, Sakai 등(1994)은 *E. tarda*를 약 10^6 CFU/ml 농도로 25°C 해수 또는 담수에서 배양하였을 때 해수에서는 5일, 담수에서는 15일 이내에 배양 가능한 세포가 계수되지 않는다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 Du 등(2007)의 실험보다 microcosm 내의 균 농도가 낮고 유도 온도는 높은 조건에서, 모든 균이 VBNC 상태로 도입되는 시기는 더 길게 나타나 *E. tarda*가 VBNC 상태로 진입하는 시기는 온도와 균 농도에 따라 많이 달라질 것으로 판단되었다.

VBNC 상태 유도 후 소생률을 확인한 결과, 온도와 배지에 따른 소생률 차이를 보이지는 않았으나, VBNC 상태 경과 시간에 따라 소생률 차이를 나타내었고 20-30일 경과 한 microcosm에서 소생률이 높았다(Fig. 4). 그러므로 우리나라 남해안에서는 수온이 낮아지면서 *E. tarda*는 VBNC 상태로 유도되기 시작하지만, 다시 수온이 올라가는 시기까지는 배양 가능한 균과 VBNC 상태의 균이 혼재할 가능성이 높아 보이며 수온이 올라가면서 VBNC 세포가 소생되어 균의 증가를 가져오면서 *E. tarda*에 의한 질병 발생 가능성이 높아지는 것으로 생각된다. 이는 *E. tarda*가 VBNC 상태로 유지되는 시간이 짧은 우리나라 남해안의 경우에 연중 에드워드병이 발생할 수 있음을 시사한다.

반면, 온도만 상승시킨 대조구와 영양물의 첨가와 함께 온도를 상승시킨 실험구의 소생에 차이가 없는 것으로 보아 *E. tarda*는 영양물의 유무 보다는 온도상승이 소생에 크게 영향을 끼치는 것으로 판단되었다. 소생된 *E. tarda*의 생화학적 특성은 모두 original *E. tarda*와 일치하였는데 Elabed 등(2012)도 *Pseudomonas aeruginosa*가 VBNC 상태로 14년 동안 유지되었음에도 불구하고 소생되었을 때 초기에는 일부 cell의 생화학적 특성이 달랐지만 소생 후 48시간이 경과하면 원래 특성을 회복함을 보고한 바 있다.

많은 병원성 세균이 VBNC 상태에서도 독력을 유지한다는 보고들이 있지만 Colwell 등(1996)은 VBNC 상태의 *Vibrio cholerae*를 이용한 실험에서 VBNC 유도 후 장기간 존재하였던 세포들은 감염성을 잃을지도 모른다고 제안하였다. 본 연구의 인위감염실험에서 소생된 *E. tarda*를 넙치에 접종하였을 때 시험어는 100% 사망하였지만, original 균을 접종한 실험구에 비해 사망이 발생 시기는 다소 지연되는 경향을 보였다. 이는 소생된 균의 경우 지속적인 분열 상태에 있던 original 균에 비해 초기 세대시간이 길어 감염어 내에서의 세균 수에 차이를 나타내었기 때문인 것으로 판단되며, 추후 독성관련 유전자의 발현에 관한 연구가 요구된다.

이상의 결과를 통해 우리나라 남해안의 겨울 해수 온도 10°C에서 *E. tarda*는 평균 70일 후에 VBNC 상태로 완전 진입할 수 있으며 VBNC 상태인 *E. tarda*는 해수 중에 10^5 cells/ml 이하로 생존하면서 여름과 가을철 해수 온도가 25°C로 상승되면 소생되어 넙치에게 지속적인 병원체로 작용한다고 판단된다.

적 요

Viable but nonculturable (VBNC) 상태에 들어간 세균은 일반적인 증균 배지에서는 집락을 형성하지 않지만, 죽은 것이 아니라 낮은 대사활성상태로 유지되고 있다. 본 연구에서는 10°C의 저온 빈영양 해수에서 *Edwardsiella tarda*를 VBNC 상태로 유도한 후, 해수 온도를 10에서 25°C로 상승시킬 때 첨가된 유기물의 종류에 따라 VBNC 상태인 균의 소생 가능성을 알아보고자 하였다. *E. tarda*가 접종된 빈영양 해수 microcosm을 10°C에 유지하였을 때 VBNC 유도 기간은 42-84일까지 다양하였다. 유도 기간 동안 acridine orange direct counting 법으로 계수한 총 균수는 초기 접종 농도인 약 10^8 cells/ml로 일정하였으며, direct viable counting 법으로 계수한 생존 균수는 약 10^4 cells/ml로 감소되었다. VBNC *E. tarda*에 효모추출물, 넙치근육추출물 그리고 혈청을 첨가하여 25°C에서 소생을 유도한 결과 전체 시료 개수의 37%, 23%, 37%에서 각각 소생이 확인되었으며 소생된 *E. tarda*의 특성은 VBNC 유도 전 원래의 세균과 일치하였다. 소생된 *E. tarda*를 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 복강 주사 하였을 때 접종 후 5일 이내에 시험어가 모두 사망함으로써 VBNC 상태의 *E. tarda*가 독력을 유지하고 있었음을 시사하였다. 그러므로 *E. tarda*는 우리나라 남해 연안 겨울의 저온 빈영양 해수에서 VBNC 상태로 유도되었다가 여름과 가을 시기에 수온 상승과 더불어 소생되어 양식 넙치에 지속적인 발병 요인이 되고 있는 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2013년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Arias, C.R., LaFremetz, S., Cai, W., and Olivares-Fuster, O. 2012. Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavo-*

- bacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes. *BMS Microbiol.* **12**, 266.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L., and Donelli, G.** 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *J. Food Microbiol.* **89**, 31–39.
- Cho, M.Y., Kim, M.S., Kwon, M.G., Jee, B.Y., Choi, H.S., Choi, D.L., Park, K.H., Lee, C.H., Kim, J.D., Lee, J.S., et al.** 2007. Epidemiological study of bacterial disease of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. *J. Fish Pathol.* **20**, 61–70.
- Colwell, R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., and Levine, M.** 1996. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 28–31.
- Curras, M., Magarinos, B., Toranzo, A., and Romalde, J.** 2002. Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis. Aquat. Org.* **52**, 129–136.
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., and Wang, Y.** 2007. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1349–1354.
- Elabed, H., Bakhrouf, A., Hamza, R., Azaiez, M., and Gaddour, K.** 2012. Evidence of the adaptive response in *Pseudomonas aeruginosa* to 14 years of incubation in seawater. *Ann. Microbiol.* **62**, 1385–1394.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S.** 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225–1228.
- Kogure, K., Simidu, U., and Taga, N.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415–420.
- Lleò, M.M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C., and Canepari, P.** 2007. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ. Microbiol.* **9**, 2313–2320.
- McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D., and Kjelleberg, S.** 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation?. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**, 1–9.
- Nowakowska, J. and Oliver, J.D.** 2013. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* **84**, 213–222.
- Oliver, J.D.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93–100.
- Oliver, J.D.** 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 415–425.
- Rahman, M.H., Suzuki, S., and Kawai, K.** 2001. Formation of viable but non-culturable state (VBNC) of *Aeromonas hydrophila* and its virulence in goldfish, *Carassius auratus*. *Microbiol. Res.* **156**, 103–106.
- Sakai, M., Atsuta, S., and Kobayashi, M.** 1994. Survival of fish pathogen *Edwardsiella tarda* in sea water and fresh water. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **14**, 188–190.
- Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M., and Iida, T.** 2009. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *J. Aquat. Anim. Health.* **21**, 124–132.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.H., Wang, R., Guo, Q., and Dong, Y.** 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**, 37–44.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703.
- Woo, P.T., Leatherland, J.F., and Bruno, D.W.** 2011. *Edwardsiella* septicaemias : Fish diseases and disorders, Vol. 3, pp. 479–521. In Plumb, J.A. (eds.) CABI, New York, USA.
- Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., and Yu, X.** 2015. UV disinfection induce a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 1721–1728.