



自然界中处于 VBNC 状态微生物的研究进展*

岳秀娟 余利岩** 张月琴

(中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要: 自然界中大约有 90% 以上的微生物尚未被分离鉴定。80 年代初提出 VBNC 状态微生物的存在, 所谓的 VBNC 是指微生物在自然界中生存的一种状态, 本文综述了在实验室条件下 VBNC 状态的形成条件、培养性的恢复及处于 VBNC 状态微生物的检测方法等方面的研究进展, 并介绍了第一个微生物生长因子 Rpf。

关键词: VBNC 状态微生物, 培养性的恢复, Rpf

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0108-04

PROGRESS IN RESEARCH OF MICROORGANISMS OF NATURAL ENVIRONMENTS IN THE VIABLE BUT NON-CULTURABLE STATE

YUE Xiu-Juan YU Li-Yan ZHANG Yue-Qin

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

Abstract: At the beginning of the 1980's, a concept of viable but non-culturable (VBNC) was suggested. VBNC is a survival strategy adopted by microorganisms when they are exposed to environmental stress. This article try to make a summary of research of the conditions of VBNC formation, recovery of culturability and methods of VBNC cells detection. In addition, introduces the first growth factor of microorganisms-Rpf.

Key words: VBNC, Recovery of culturability, Rpf

自然环境中的微生物经常受到诸如温湿度变化、营养缺乏、紫外线照射等带来的生存压力, 日益增加的环境污染、全球温室效应也影响着微生物菌群之间的平衡及它们的代谢活动^[1]。但是微生物对于环境条件变化具有很强的适应力, 例如, 产芽孢的细菌当其环境中营养缺乏及有害代谢产物累积时, 就开始形成芽孢。芽孢具有极强的抗热、抗辐射、抗化学药物和抗静水压的能力, 其休眠能力也是惊人的, 一般来说芽孢在普通的条件下可存活几年至几十年。然而那些不能形成芽孢的微生物当受到环境中的种种压力时会产生怎样的生理变化呢? 80 年代初 Xu 首次在流行病学领域中提出的 VBNC 的概念, 使人们对于微生物在自然界的生存状态有了新的认识。VBNC (viable but non-culturable) 是指那些存活而不增殖的微生物, 它们在受到外界压力刺激后, 通过一

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30100001)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30100001)

** 联系人 Tel: 010-63165277, E-mail: yuliyang_2000@yahoo.com

收稿日期: 2003-02-18, 修回日期: 2003-04-04

系列类似分化的遗传程序而使自身处于一种能抵抗饥饿和压力的状态。处于 VBNC 状态下的微生物不能在普通的培养基上形成菌落或只能形成肉眼不可见的微小菌落,但如果给予合适条件又能够恢复生长繁殖。

VBNC 状态微生物具有 3 种类型:第一种是在现有的培养条件下无法分离培养得到的微生物,它们实际上是可以生长繁殖的,因为不了解其合适的生长繁殖的条件,所以培养不出来,只要深入探索它们的培养条件,这类菌是可以培养的;第二种是由于条件的改变使其转变成无法繁殖的状态,但在适当的条件下可以恢复其分裂能力;第三种是无论给予任何条件都不能恢复其生长繁殖,也就是说只有走向死亡^[2]。本文所涉及的 VBNC 状态的微生物主要是指处于前两种生理状态的微生物。

虽然在 VBNC 状态菌的培养性恢复方面已有一些报道,但是还没有在基因水平上对 VBNC 状态微生物进行鉴别。由于对细胞存活和死亡的界定还存在着争议,因此对于 VBNC 状态是否存在同样也存在着争议^[1]。

VBNC 概念的提出引起了许多微生物学者的重视,在流行病学领域,VBNC 的提出使人们对于一些曾经被认为已经消失的流行病的重新爆发有了新的认识。而对于从事微生物资源研究开发的学者来说,随着对 VBNC 状态的深入研究,无疑会帮助其挖掘出更多有价值的新的微生物种类。

1 VBNC 状态的形成条件

据报道,有些种类的微生物尤其是革兰氏阴性病原菌在受到环境压力,特别是在饥饿时会进入 VBNC 状态^[3-5]。营养缺乏和低温条件可诱导微生物培养性的丧失,如将嗜盐弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 接种到海水中 5℃ 培养 27d 后,再接种到平板培养基上发现失去培养性,如果将这种失去培养性的菌在室温下放置 3d,然后再涂布到平板培养基上,发现可检测到的菌落数会大大增加,说明由于温度降低所引起的培养性的丧失可通过提高温度加以恢复。但这并不表明逆转所有的有害条件都可使 VBNC 状态的微生物恢复生长繁殖能力。肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) 在低温、营养缺乏时也会进入 VBNC 状态^[6]。高浓度的铜离子的存在可诱导大肠杆菌 ED8739 进入 VBNC 状态,为了确定这种诱导是否具有菌株特异性,对大肠杆菌 ES80 进行同样的处理,发现也可诱导其进入 VBNC 状态。为了证明平板上菌落数的减少是由于菌体处于 VBNC 状态而并非菌体死亡引起的,在一定浓度的硫酸铜处理过的菌液中加入螯合剂 EDTA,再将其接种在普通培养基上,发现经过这种处理后,已经失去培养活性的菌又重新在平板上形成菌落。推测可能是由于铜离子与细胞膜的结合催化过氧化氢自由基的形成,从而使细胞为抵御有害环境而进入 VBNC 状态^[7],一旦铜离子被 EDTA 螯合,VBNC 状态的大肠杆菌又恢复生长。此外,大肠杆菌 K-12 在高氯酸存在时也可进入 VBNC 状态。

2 VBNC 状态菌的培养性的恢复

某些 VBNC 状态的微生物在合适条件下是可以恢复培养性的。例如将对数期后期的大肠杆菌 E32511/HSC 菌株接种在无菌蒸馏水中,4℃ 条件下培养 21d,再将其涂到普通平板培养基上,发现菌落数由 3×10^6 CFU/mL 下降到 0.1CFU/mL,但如果在平板培养基上加入能降解过氧化氢的物质如过氧化氢酶、丙酮酸钠或 α -酮戊二酸,则可使菌落数

在48h内达到 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL^[6]。对此现象的成因, Bloomfield等推测那些由于营养缺乏而进入VBNC状态的微生物, 所产生的一个变化就是营养基质与转运途径之间亲和力大大提高了, 当重新接种到营养丰富的培养基上时, 由于过量营养物质的摄入, 基质会迅速氧化导致过多的自由基和超氧化物的产生, 损害了细胞甚至能导致细胞死亡^[1]。而加入具有除氧性质的物质会促进VBNC状态菌恢复生长活性。采用高倍稀释的细菌用培养基, 可从低营养的自然环境分离到专性的寡营养需求细菌, 它们在高浓度蛋白质的培养基上不能增殖。

关于VBNC培养性恢复方面的报道还有: 常规方法不能培养的某些弧菌(*Vibrios*)接种到人的内脏中可重新获得繁殖能力; VBNC状态的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) TS1-4经过热处理后, 可恢复形成菌落的能力, NH_4Cl 能支持该种细菌在低营养培养基中生长, 在恢复细菌菌落形成能力中也起着重要作用; 在老化的空腔弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)培养物中通入微含氧的气体混合物, 可迅速提高具有菌落形成能力的细菌数; 肠菌属的某些菌在去甲肾上腺素应激反应中分泌的生长诱导物能使VBNC状态的肠出血性大肠杆菌恢复生长繁殖能力^[8]。

日本学者土田隆采用GMDs(Gel microdroplets)法, 将营养肉汤不能培养的活性污泥中的微生物分离出来, 对它们的培养条件进行探讨时发现, 添加活性污泥的离心上清液对它们的增殖有很大的影响, 另外, 加入一些特殊的物质如2-羟脯氨酸- β -环化糊精, 甲基- β -环化糊精等都能使其中的一部分细菌得以培养。从这些微生物的16SrDNA序列和生理生化性质上可以确认它们不仅具有属水平的多样性而且存在着新的微生物种类, 改变培养条件可使那些本来在固体平板上形成肉眼不可见的微小菌落的微生物恢复其生长繁殖能力。

3 微生物生长因子 Rpf

Rpf(resuscitation-promoting factor)是藤黄色微球菌分泌的一种分子量约为16~17kD的蛋白, 皮摩尔浓度的Rpf可促使休眠的藤黄色微球菌复苏也可刺激其他几种高G+C含量的革兰氏阳性菌的生长和休眠菌株的复活。Rpf是迄今为止发现的第一个能使休眠的细菌恢复生长繁殖能力的因子, 和细胞因子的性质相似, 能采取自分泌或旁分泌的方式, 不但能刺激休眠菌的复活也能刺激正常菌的生长, 并且可能参与细胞繁殖的调控过程。纯化的Rpf对快速生长和缓慢生长的分支杆菌均能缩短其生长延迟期。Rpf^[9]通常被认为先与细胞膜结合, 促使细胞应答产生第二信使分子cGMP, 然后激活不同的信号途径和初级代谢的不同阶段, 引起一系列反应。和Rpf相似的基因在其他高G+C的革兰氏阳性菌中也已经被发现, 包括链霉菌、棒状杆菌、结核菌。DNA序列数据库中目前已包含30多个Rpf基因家族成员, 大多数微生物带有几种代表性的Rpf基因。如分支杆菌属的结核杆菌及BCG包含5个Rpf家族基因, 同属的麻风杆菌(*Leprae*)已发现2个Rpf家族基因, 他们所编码的产物与Rpf相似。目前Rpf已经成功在大肠杆菌中表达, 产物已经被分离纯化, 加热和用胰蛋白酶处理会使其失去活性。

4 其它进展

T. Kaeberlein等模拟海水的天然环境分离海洋淤泥中的微生物取得了成功。通过这种方法分离得到菌株MSC1和MSC2, 它们在纯培养基上只能进行有限次数的分裂, 而

在含有天然成分的培养基上可持续生长。然而当菌株 MSC1 与其他微生物共培养则可在纯培养基上生长得很好。由此推断微生物生长需要天然因子和其他菌株发出的信号^[10]。当这些条件没有满足时微生物可能处于我们所说的 VBNC 状态。研究还发现一些 VBNC 状态的细胞除了丧失生长繁殖能力,还会伴随其他生理生化改变,由于营养缺乏进入 VBNC 状态的 *V. harveyi* 和 *V. fischeri* 会同时失去发光性,这种情况也可通过添加营养丰富的碳源和发光刺激物而恢复正常的生理状态^[11]。进入 VBNC 状态大肠杆菌 KN126 镜检可以发现细胞变小,形态由杆状变为球形,通过 HPLC 分析肽聚糖组成,发现比对照对数期的细胞的 DAP-DAP 交联程度几乎高出 3 倍,多聚糖链则比分裂细胞缩短,青霉素结合蛋白 PBP_{1A}, 1B, 2, 3 消失,而且 VBNC 细胞比对照对数期细胞的自溶能力大大提高了^[12]。粪便中的肠球菌的 VBNC 状态细胞的蛋白质结构不同于饥饿和对数生长期的细菌^[13]。有些病原菌的 VBNC 细胞仍具有黏附能力但粘附效率则大大减低,这或许是引起宿主细胞中感染病原菌数目减少的原因之一^[14]。

表 1 若干菌种的 VBNC 状态的检测方法

| 菌种 | 检测方法 |
|------------------------------|---|
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 来自湖水中的 VBNC 细胞采用 PCR 方法检测 |
| <i>Escherichia coli</i> 0157 | 来自河水中的 VBNC 细胞通过 BacLight 检测 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | MPN 方法分析和平皿记数方法 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | ①将水中的样品接种到蛋黄上检测其生长 ②通过检测细胞的完整性,呼吸活性,蛋白质的二维结构 ③通过呼吸染色(CTC),细胞体积,内部 pH 的变化,及细胞膜的延展性 |
| 牛奶中的细菌 | ①CFU 平板记数法 ② <i>gfp</i> 报告基因的从头表达 ③膜完整性的检查 |

5 总结

目前人们已发现的微生物物种仅为自然界中微生物总数的 5% 左右,用传统方法从自然环境中分离得到的微生物远远不能代表自然环境中微生物的全部种类,不断发展新的方法来分离和认识环境中难分离培养的微生物对于人类研究利用微生物具有十分重要的意义。随着人们对 VBNC 状态微生物的深入了解,将帮助我们改进传统的分离培养方法,更好地开发微生物资源。

参考文献

- [1] Edwards C. *Mol Biotechnology*, 2000, 15: 211 ~ 223.
- [2] Kazuhiro K. *Microbes and Environments*, 1999, 3: 185 ~ 189.
- [3] Cappelier J M, Minet J, Magras C, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 5154 ~ 5157.
- [4] Alexander E, Pham D, Steck T R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3754 ~ 3756.
- [5] Caro A, Got P, Lesne J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3229 ~ 3232.
- [6] Wai S N, Mizunoe Y, Takade A, *et al.* *Arch Microbiol*, 1999, 172: 63 ~ 67.
- [7] Grey B, Steck T R. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 5325 ~ 5327.
- [8] Reissbrodt R, Rieznacker I, Romanova J M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (10): 4788 ~ 4794.
- [9] Mukamolova G V, Kormer S S, Kell D B, *et al.* *Arch Microbiol*, 1999, 172: 9 ~ 14.
- [10] Kacherlein T, Lewis K, Epstein S S. *Science*, 2002, 296: 1127 ~ 1129.
- [11] Sails A D, Bolton F J, Fox A J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (3): 1319 ~ 1324.
- [12] Signoretto C, del Mar Lleo M, Canepari P. *Curr Microbiol*, 2002, 44 (2): 125 ~ 131.
- [13] Heim S, Del Mar Lleo M, Bonato B, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, 184 (23): 6739 ~ 6745.
- [14] Pruzzo C, Tarsi R, Lleo Md Mdel M, *et al.* *Curr Microbiol*, 2002, 45 (2): 105 ~ 110.