

细菌的活的非可培养状态

纪伟尚 许 兵 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生物系)

在微生物生态学研究已经知道并非自然界所有细菌都能用人工培养方法分离培养出来,尤其在水环境中,直接显微镜镜检计数细菌总数往往比常规培养法计数(包括平板法和 MPN 法)高许多倍,而导致这种现象的原因并不十分清楚^[1]。近年来,在对人类肠道病原细菌在水环境中的存活和生长规律研究中发现某些肠道病原菌在寡养性大洋水或模拟水体中培养短时间后,即丧失了常规培养基上生长的能力,但有证据表明这些细菌仍然是活的,即处于活的非可培养状态(viable but nonculturable state)^[2]。本文就其发现过程及研究进展作简要综述。

(一) 细菌的活的非可培养状态及其发现过程

长期以来,人们认为多数肠道病原细菌进入水环境中会逐渐“衰亡”(die-off)⁽³⁻⁶⁾。但是,这个结论是使用常规培养法进行研究而得出来的。Colwell(1979)指出,直接借用临床微生物学的方法,从环境中分离或检测肠道病原细菌或其指示菌,是不合适的,因为这些细菌已经受到环境压力的作用,并推测肠道细菌在海水中的“衰亡”现象可能意味着受到环境压力的细菌仍然是活的,只是在常规培养平板上不能生长^[7]。徐怀恕等(1982)研究霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和大肠

杆菌(*Escherichia coli*) 在河口水环境中存活期时,应用新的检测方法证实了活的细菌非可培养状态的存在^[2]。研究中使用的方法及其特点列于表 1。需要指出的是,直接活菌计数法 DVC 是证实常规培养基上不能生长的非可培养状态细菌仍然是活菌的关键方法。萘啶酮酸(nalidixic acid)是 DNA 旋转酶(Gyrase)抑制剂^[8],能抑制 DNA 复制,使细菌不能分裂,但细胞中 RNA 的复制和蛋白质的合成不受抑制。所以在含有一定浓度的萘啶酮酸和酵母胨溶液中,细菌可以吸收营养物质而长大,由于不能分裂,细菌细胞伸长,有的可达 10 μ m 以上。凡能吸收营养物质合成自身物质并能长大的菌体都是活菌。后来,应用放射性自显影法研究也证明非可培养状态的细菌可以代谢基质,是活菌^[9]。

现以霍乱弧菌为例介绍细菌活的非可培养状态的特征。70 年代后期的研究工作已经证明,霍乱弧菌是河口环境中天然微生物区系的成员^[10]。但在冬季当水温降至 10 $^{\circ}$ C 以下时,从水体、沉积物和浮游生物体上都不能分离培养出霍乱弧菌^[11]。将霍乱弧菌制成菌悬液接种于室内模拟水体中,低温静置培养,用表 1 所述方法检测水体中菌数变化情况,得出细菌存活曲

表 1 检查水环境中活的细菌非可培养状态的实验方法^[2,9,12,17,19]

计数方法	方法特点	计数细菌的类别
直接计数法	AODC	使用专染核酸的荧光染料
	FAC	使用专一性抗体血清或单克隆抗体及荧光抗体血清
	DVC	使用萘啶酮酸处理细菌及专染核酸的荧光染料
	ARC	使用 ¹⁴ C 标记的谷氨酸或其他同位素标记的有机化合物
培养计数法	MPN	使用选择性的或非选择性的液体培养基
	HPC	使用选择性的或非选择性的固体培养基
动物实验	将活的非可培养状态细菌注射到免肠结扎段内	可使活的非可培养状态细菌复苏、恢复生长繁殖能力,并检查细菌的毒力

注: AODC: 吖啶橙染色直接计数法 ARC: 放射自显影计数法
FAC: 荧光抗体染色计数法 MPN: 最大可能计数法
DVC: 直接活菌计数法 HPC: 异养平板计数法

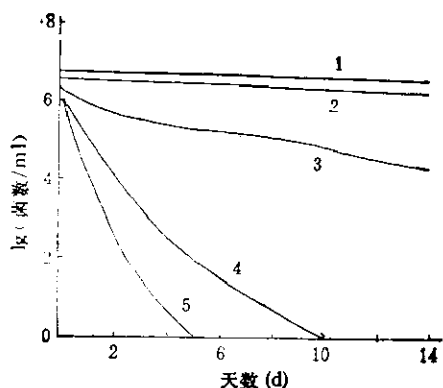


图1 模拟水体中细菌数量随时间变化的典型曲线
1. AODC 2. FAC 3. DVC 4. MPN 5. HPC

线(图1)。在整个实验过程中,直接镜检计数(包括AODC和FAC)曲线变化很小,表明水中总细菌数量变化不大。培养计数法(包括HPC和MPN法)计数菌数却在短时间内降至零。而介于它们之间的DVC曲线则表明水体中多数细菌虽不能在培养基上生长,但却具有代谢活性。活的非可培养状态细菌的主要特征见表2。

表2 细菌活的非可培养状态的主要特征^[2,5,13,15,17,19]

一、培养特征

1. 在常规培养基上,常规培养条件下,不繁殖。
2. 在适宜的环境条件下,可以复苏,恢复生长繁殖。

二、细胞特征

1. 细菌细胞个体变小,往往呈球形。
2. 用AODC和FAC法染色检查,细胞完整无损。
3. 用DVC和ARC法检查,细胞对底物有反应,能吸收营养物质使细胞长大。
4. 可产生诱导酶。

三、毒力特征

1. 仍然具有致病毒力

注: 缩写符号表示同表1

综上所述,细菌活的非可培养状态是指细菌处在不良环境条件下,整个细胞缩小,在常规培养条件下培养时不能繁殖,但仍然是具有代谢活性的活菌,它是细菌对环境压力的适应,是细菌的一种特殊存活形式。

(二) 存在活的非可培养状态的细菌种类

自从1982年徐怀恕等人首次报道了细菌活的非可培养状态之后^[2],这一领域的研究工作进展迅速^[5]。到目前已发现存在活的非可培养状态的细菌有霍乱弧菌^[2]、大肠杆菌^[2]、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)^[6]、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)^[12]、索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)^[13]、根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)^[14]、肺炎克氏杆菌(*Klebsilla pneumoniae*)^[14]、产气肠杆菌

(*Enterobacter aerogenes*)^[14]和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)^[14]。上述细菌均为G⁻细菌,除假单胞菌和大肠杆菌外,其它细菌在实验过程中可培养菌数均可达到零。假单胞菌和大肠杆菌分别维持一定的可培养菌数,但DVC计数结果高于可培养菌数约一个数量级。因此,可以认为这两种细菌能形成活的非可培养状态,但不是全部。已经检查过的G⁺细菌有黄色微球菌(*Micrococcus flavus*)^[14]、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)^[14]和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[14]。前两种细菌在实验过程中可培养菌数迅速达到零,但由于萟啉酮酸DVC法对革兰氏阳性细菌不适用,故不能判断这些细菌是否仍是活菌,因而也不能确定是否处于活的非可培养状态。枯草杆菌可以产生芽孢休眠,故可以维持一定数量的可培养菌数,但远低于其AODC计数值。

(三) 活的非可培养状态的意义

1. 细菌活的非可培养状态的发现,在微生物生态学、预防医学等基础研究中,具有重要意义。Kogure等(1980)应用直接镜检计数(AODC)法、直接活菌计数法(DVC)和异养平板培养法(PC),研究了日本东京湾海域中活的海洋细菌的分布,DVC计数结果平均可达AODC计数结果的11.2%,高出常规平板计数结果2—3个数量级^[15]。而以往海洋中细菌数量的测定数据多以培养法为基础获得的。无疑活的非可培养状态这一概念及检测方法的引入,将会使人们更加准确地认识生态系统,尤其是水环境中细菌之间,以及细菌与其环境之间,相互作用过程的发生和变化。

抗生素效价、化学杀菌剂的杀菌效果,以及各种环境因子对细菌生长的影响等项目的测定方法,均以培养法为基本手段,即根据在实验条件下细菌能否繁殖达到肉眼可见,来判断细菌对该种处理敏感与否,并非真正对细菌能否生长或存活进行测定。实验条件下不能生长繁殖的菌体,不一定是死亡的,有的可能是在环境因子作用下变成了活的非可培养状态,而处于这种状态下的肠道病原菌(如霍乱弧菌)仍有致病力,这已霍乱肠结扎实验及志愿者人体实验中(使用非可培养状态的霍乱弧菌疫苗株)得到证实^[14]。这就需要对现有的测定方法,和对病原菌的有效剂量,进行重新评价和确定。应用直接活菌计数法,测定细菌对抗生素的敏感性,及对重金属的抗性已获得专利。

2. 从公共卫生学和卫生防疫工作的角度,要检查食品、海产品、饮料等的卫生状况,和肠道病原菌对饮用水、娱乐用水的污染程度,研究传染病流行区病原菌的分布和传染途径,及流行间歇期病原菌的存活规律等,而这些工作多是以常规培养法进行的。细菌活的非可培养状态的发现,表明用常规培养法检测环境中的致病菌,或生活污水污染指示菌,所得结果是不可靠的。徐怀恕等(1985)应用间接免疫荧光抗体染色技术

(FAC), 检查美国路易斯安那州环境样品中霍乱弧菌 01 型, 在 8 个用常规培养法阴性结果的样品中, 均检测到霍乱弧菌 01 型的存在^[12]。Brayton 等(1987)应用荧光抗体活菌直接计数 (FA-DVC) 方法检查孟加拉霍乱流行区的河水、池塘和井水的 16 个样品, 以 MPN 法只检出一例霍乱弧菌 01 型, 数量为 2.0 个/100 ml 样品, 而以 FA-DVC 法则从所有样品中均检出霍乱弧菌 01 型, 数量为 $1.6 \times 10^2 - 5.9 \times 10^3$ 个/ml^[13]。

3. 活的非可培养状态可以较合理地解释霍乱弧菌的越冬机理^[19]。霍乱弧菌的越冬问题一直是卫生防疫工作的研究重点。使用常规培养法检查, 在夏季可以比较容易地从环境样品中分离出霍乱弧菌, 而在冬季由于霍乱弧菌变成了活的非可培养状态, 用常规培养法难以检测到。次年春季, 非可培养状态的霍乱弧菌复苏, 恢复生长和繁殖, 故又可分离培养出来。

4. 关于向环境中释放遗传工程微生物的安全性问题。这里关键是遗传工程菌一旦释放到自然环境中, 它们的存在和分布能否得到准确的检测和监视。我们研究了来源于水环境和陆地环境的, 可能被用于遗传工程实验的 7 种细菌, 在水环境中的存活情况^[14], 实验表明, 大多数细菌均可形成活的非可培养状态, 无论是选择性还是非选择性培养基, 均不能用于检测处于非可培养状态的细菌, 需要对用于检测和监视自然水体中的微生物 (尤其是经过遗传工程改造的) 在水环境中的分布和存放的研究方法, 进行重新评价。显然, 以荧光显微镜直接计数为基础的直接法, 优于常规培养方法。

最近, Colwell 等(1989)利用特异序列的 DNA 寡聚物 (20—30bp), 加上一个经放射性标记的 DNA 长尾, 来提高检测环境样品的灵敏度, 该方法的优点是, 寡聚物探针可充当聚合作用的引物, 并可以消除由于游离的 3'-OH 与双脱氧核苷酸结合而产生的背景干

扰。初步结果表明, 该方法灵敏度较普通基因探针法高 2—3 个数量级^[15]。

参 考 文 献

1. Bisset K A: Bacteria. E&S Livingstone Ltd., Edinburgh, Scotland, 1952.
2. Xu H S et al.: *Microb. Ecol.* 8: 313—323, 1982.
3. Chamberlin C E: *Water Pollution Microbiology*. ed. Mitchell R. John Wiley & Sons Inc., New York, Vol.2, p. 325—348, 1978.
4. Baross J A et al.: *Appl. Microbiol.* 30: 309—318, 1975.
5. Rheinheimer, G.: *Aquatic Microbiology*, p. 201—216, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 1985.
6. 钱振儒, 张景镛: *海洋环境科学* 4(2): 28—33, 1985。
7. Colwell R R: *Aquatic Microbial Ecology*. p. 337—344, eds. Colwell R. R. & J. Foster, A Maryland Sea Grant Publication, University of Maryland, 1979.
8. Drlica K: *Microbiol. Rev.* 48: 273—289, 1984.
9. Roszak D B et al.: *Can. J. Microbiol.* 30: 334—338, 1984.
10. Kaper J B et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 829—835, 1977.
11. Colwell R R et al.: *Science*. 198: 394—396, 1977.
12. Rollins D M et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 531—538, 1986.
13. Colwell R R et al.: *Biotechnology*. 3: 817—820, 1985.
14. 徐怀恕等: *中国微生物学杂志* 2(3): 1990。
15. Koungre K et al.: *Can. J. Microbiol.* 26: 318—323, 1980.
16. Colwell R R et al.: *Recent Advances in Microbial Ecology*. eds. Hattori T et al. p. 85—88, Japan Scientific Societies Press, 1989.
17. Xu H S et al.: *J. Microbiol. Methods*. 2: 221—231, 1985.
18. Brayton P R et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2862—2865, 1987.
19. 徐怀恕和 R R Colwell: *青岛海洋大学学报*, 19(2):