

细菌“活的不可培养状态”的生态意义及研究进展

王秀娟 朱琳* 陈中智 李宇

(南开大学环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: “活的不可培养(VBNC)”状态是细菌在不良条件下的一种生存方式。VBNC状态作为细菌的一种生理状态,对传统微生物学产生了深远的影响。进入VBNC状态的细胞发生了一系列变化,无法继续用常规培养方法检测,在医学健康、环境科学等领域产生了巨大的影响,改进检测方法具有重要的意义。本文介绍了进入VBNC状态细菌在DNA、蛋白质组成等方面发生的变化,复苏过程,同时还介绍了VBNC状态的最新检测方法,最后对VBNC状态未来的研究方法进行了讨论。

关键词: 细菌,活的不可培养状态,复苏,可培养性

Ecological Significance and Processes in Research of the Viable but Nonculturable State in Bacteria

WANG Xiu-Juan ZHU Lin* CHEN Zhong-Zhi Li Yu

(College of Environmental Science and Engineering, Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Nankai University) Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: The viable but nonculturable (VBNC) state is a survival strategy when bacteria are exposed to environment stress. The VBNC state is part of the life cycle of non-differentiating bacteria, and it has a far-reaching impact on traditional bacteriology. Cells in the VBNC state fail to grow on the routine bacteriological media, here its significance in human health and environment science are detailed. Cells entering the VBNC state exhibit dwarfing and a number of metabolic changes in respiration rates and macromolecular synthesis. This paper summarized the variations in DNA and protein comparing to the culturable cells. We also discussed the ability of cells to resuscitate from the VBNC state and return to an actively metabolizing and culturable form. Some new methods for monitoring the VBNC state were listed. Finally the future was suggested.

Keywords: Bacteria, Viable but nonculturable state, Resuscitation, Culturability

自然环境处于不断变化之中,细菌对不利因子的耐受能力很大程度上决定了其生存能力。1982年徐怀恕等^[1]正式提出细菌存在“活的不可培养状态(Viable but nonculturable state, VBNC)”,即可培养

的不能产生孢子的细菌遇到环境压力后,在琼脂培养基上形成的菌落数不断下降直至完全消失,但在此期间细胞总数基本恒定,这些细胞仍然是“活的”,条件适宜后能够再次回到可培养状态。VBNC

状态的细菌, 仍能保持细胞膜的完整性, 仍具有低水平的呼吸作用及代谢活性, 还存在一些基因表达。VBNC状态对传统微生物学产生了极大的影响, 其与休眠状态等的生理学差异, VBNC状态的形成机理等至今仍未解决。但VBNC状态已经得到广泛认同, 作为细菌的一种基因调控的独立生理状态受到越来越多的关注。

1 VBNC 状态的形成、变化

目前已发现能够进入 VBNC 状态的细菌约 16 个属 60 余种, 包括沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、患贺氏菌属(*Shigella* spp.)、肠球菌属(*Enterococci*)、弧菌属(*Vibrio* spp.)等。有弯曲杆菌(*Campylobacter* spp.)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、土拉弗氏菌(*Francisella tularensis*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、军团菌(*Legionella pneumophila*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等。其中包括了很多致病菌, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)等。

VBNC状态是不能产生芽孢的细菌对自然界压力的一种反应方式, 其诱导因子均为环境中的不利因素, 如饥饿、渗透压改变、氧浓度改变以及光照变化等, 如果不进入VBNC状态, 上述均可能对细菌产生致命损伤。一些研究显示具有杀菌作用的过程也能诱导细胞进入VBNC状态, 如牛奶的巴氏灭菌^[2]以及废水的氯化杀菌^[3]。

进入VBNC状态的细胞产生了一系列变化, 菌体收缩、变形, 细胞壁、细胞膜结构发生显著变化, 细胞质密度变大, 蛋白质、核糖体及DNA组成均发生变化, 上述变化均使菌体具有更高的机械强度, 能够忍耐各种恶劣环境。迟钝爱德华氏菌^[4] (*Edwardsiella tarda*)进入VBNC状态后, 细胞由 $1.9 \mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$ 的短杆状, 变为平均半径 $0.5 \mu\text{m}$ 的球状。Signoretto^[5]对大肠杆菌VBNC状态的研究发现细胞壁交联度较对数期增加了 3 倍, 胞壁肽中脂蛋白含量增加, 多糖链的平均长度变短。创伤弧菌VBNC

VBNC状态细胞蛋白质和脂类的含量迅速降低, 主要脂肪酸的种类减少多达 60%。

VCBN作为细菌对环境变化的适应机制, 合成新的功能蛋白, 如新的饥饿蛋白和应激蛋白是其形成的必要条件^[6]。Muela^[7]对VBNC状态大肠杆菌外膜蛋白亚蛋白质组学的研究显示, 少数新蛋白质的产生由营养物质减少和光照变化导致, 大部分是由于其暴露于海水而产生的, 且绝大部分蛋白的分子量低于 29 kD。

研究显示大多数VBNC状态细胞DNA含量不断减少。藤黄微球菌^[8](*Micrococcus luteus*)进入VBNC状态后DNA含量基本不变, 但是RNA含量减少达 50%。创伤弧菌长期暴露于低温条件下, DNA和RNA含量持续减少^[9]。VBNC状态的细胞仍然存在基因表达, Yaron和Matthews^[10]发现大肠杆菌O157:H7中 *mobA*、*rfbE*、*stx1* 等基因仍有表达。类似地, Fischer-Le^[11]报道了创伤弧菌在进入不可培养状态 4.5 个月之后仍存在基因的表达。

存在VBNC状态的多为革兰氏阴性细菌, Lleo等^[12]首次报道一种革兰氏阳性细菌——粪肠球菌也存在该状态。粪肠球菌是肠道群落的正常群落, 是水体粪便污染的指示菌之一, 也是海岸娱乐水体和贝类养殖区域微生物质量的重要指示菌。粪肠球菌在淡水和海水中均能够进入VBNC状态, 其在湖水中至少能够保持该状态 3 个月, 通过PCR检测到意大利Garda湖 50%的水样含有 20 个~2000 个/100 mL粪肠球菌, 但无法用传统方法检测到^[13]。Signoretto^[14]证明粪肠球菌VBNC状态细胞吸附到浮游动物体表是其在湖水和海水中生存的主要机制。Lleo^[15]的研究显示, 贫营养与光照、低温等联合作用将使其进入不可培养状态。VBNC状态的粪肠球菌细胞只有轻微的伸长, 细胞壁肽聚糖的交联度增大, 寡聚物增加^[16]。*pbp*(青霉素结合蛋白)结合青霉素的能力是正常细胞的 60%, 其中*pbp5* 仍保持其功能^[16], 并可检测到*pbp5* mRNA^[17]。

2 VBNC 状态细胞的复苏(Resuscitation)

复苏(Resuscitation)特指细胞从不可培养状态回复到可培养状态的过程。可以通过消除诱导其进入VBNC状态的环境压力使细胞复苏, 如增加营养物质、改变环境温度等。简单的升高温度能使创伤弧

菌复苏^[18], 增加营养物质能使杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*)复苏^[19]。在某些条件下细胞需要同种、相近细胞或其的产物才可恢复其自身的生长, Panutdaporn^[20]报道去除生长细胞的上清液可使VBNC状态细胞复苏, 生长细胞所分泌的化合物等可能是促使其复苏的因素。此外在动物或人类志愿者体内复苏是一个非常重要的途径, 生物体内可能综合了上述 2 个条件, 更有利于复苏的实现。在缺乏营养等条件下嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)进入VBNC状态, 但简单的加入营养物质并不能使其复苏, 而加入一些变形虫——水环境中该菌的天然宿主, 才能使该菌复苏^[21]。VBNC状态的霍乱弧菌注射到人类志愿者体内后出现霍乱症状, 随后在志愿者的粪便中分离到了可培养的霍乱弧菌^[22]。

很多复苏过程难以实现, 同种细菌不同品系之间就存在很大的差异。Medema报道VBNC状态的空肠弯曲菌在一日龄雏鸡体内不能复苏^[23], 但Stern报道其能在一周龄的雏鸡体内复苏, 并产生感染^[24]。众多研究者对复苏实验的准确性存在质疑, 由于体内复苏、体外复苏均很难确保复苏之前没有任何可培养细胞存在, 因而争论主要集中在新的可培养细胞是否仅仅是少数残余可培养或者受损伤细胞的重新生长。最早一个比较有说服力的报道是Whitesides与Oliver^[18]对创伤弧菌复苏的研究, 他们将VBNC细胞稀释高达 1000 倍, 使得样品中包含 10^3 个VBNC状态细胞, 但可培养状态细胞 <0.0001 cell/mL。继而在室温下培养, 温度上升 7 h~8 h后, 可培养细胞数量达到 10^6 CFU/mL。如果该结果由可培养细胞产生, 则每小时每个细胞必须分裂 10 次以上, 即世代时间为 6 min。在一个缺乏营养物质和氧气、较低培养温度(22°C)的条件是不可能实现的。此后报道的复苏实验多与该方法类似, 尚无其它新的方法。

从VBNC状态回到可培养状态, 是VBNC状态的确为一种生存机制的最直接证据, 但复苏并不像进入VBNC状态一样容易实现, 仅少数菌种能够实现复苏, 且复苏条件千变万化, 不同菌种有巨大的差异。细胞的自我毁灭机制可能是复苏失败的主要原因。外界条件突然变化时, 物质的过快转移可能改变细胞内部物质浓度, 使得渗透压改变, 导致新陈代谢的不平衡, 进而可能产生大量自由基, 由于缺乏相应的调节解毒蛋白而导致细胞死亡。

3 VBNC 状态的检测方法

传统检测VBNC的方法多基于细胞的活性或对底物的吸收, 在此不再赘述, 现在基因和蛋白检测技术已经得到广泛的应用。

3.1 基于 DNA 技术

早期主要通过DNA检测VBNC状态。Warner^[25]通过随机多态性扩增(RAPD)比较了创伤弧菌饥饿状态和VBNC状态基因表达的差异, 发现DNA结合蛋白对DNA扩增效率有极大的影响, DNA结合蛋白可能与VBNC状态的形成有极大关系。与生长期细胞相比, VBNC状态细胞染色体DNA扩增结果很不稳定, 且必须提取大量DNA才能得到阳性结果, 这可能是VBNC状态DNA大量减少所致, 也可能因为细胞壁变厚、细胞核收缩使得DNA提取效率降低。这种方法还可能扩增死细胞的DNA, 因此目前已逐渐被逆转录—PCR(RT-PCR)所取代。

3.2 基于 mRNA 技术

由于mRNA在细胞新陈代谢中的核心作用, 及其非常短(数分钟)的半衰期, 成为检测VBNC状态的极好工具。Leo利用RT-PCR检测VBNC状态的粪肠球菌^[17]。Fischer-Le^[11]利用RT-PCR检测环境中VBNC状态创伤弧菌溶血素mRNA。Hengge-Aronis^[26]观察到副溶血弧菌进入VBNC状态后保守基因16S-23S rDNA和*rpoS*仍有显著的表达。

3.3 其他技术

Vora^[27]建立了 4 种弧菌的寡核苷酸cDNA基因芯片, 其中包含了大量保守序列、致病基因和耐药性相关序列, 可同时检测VBNC状态相关基因的表达。Heim^[28]通过双向电泳比较了对数增长期、饥饿和VBNC状态下粪肠球菌全菌体表面蛋白的差异。Sachidanandham^[29]通过冻融去除可培养细胞, 利用流式细胞技术检测VBNC状态细胞。

4 VBNC 状态的重要性及实际意义

VBNC状态具有重要的理论和实际意义, 涉及到医学、微生物学、食品和养殖等诸多领域, 动摇了基于平板计数的研究成果, 但同时也开拓了细菌学研究的新领域。越来越多的研究显示, VBNC状态是细菌生存的普遍现象, 涉及到大多数的环境细菌。

VBNC状态细菌能够逃脱传统的检测方法而可

能成为疾病的源头, 因此其是否仍具有致病能力一直受到极大的关注。霍乱和弯曲杆菌病均曾出现可培养细胞个数低于致病阈值的情况, 随后的研究证明霍乱弧菌和空肠弯曲菌确实以 VBNC 状态存在^[30,31]。Makino^[32]对 1998 年日本 *E. coli* O157:H7 爆发的研究发现仅有大约 0.75 个~1.5 个/mL 可培养细胞存在, 但发现一种寿司中含有大量 VBNC 状态细胞, 并证明其为该菌爆发的源头。Peneau^[33]首次证明吸附在肉类加工设施表面的荧光假单胞菌 VBNC 状态细胞能够继续分裂, 杀菌措施只能杀死少量细胞, 细胞能够不断累积。同时 Peneau 还提到牛奶加工生产线、饮食娱乐场所等都可能存在大量的 VBNC 状态细胞。

许多抗生素仅针对能够分裂的细胞, VBNC 状态细胞可能逃过抗生素的作用, 而错过疾病的最佳治疗阶段。VBNC 状态的存在意味着细菌性感染可能存在潜伏阶段, 但由于无法区分细菌的休眠与疾病本身的潜伏期, 以及复苏的细胞和 VBNC 状态细胞在感染过程的相对作用大小, 上述理论也受到很多质疑。

Lee 和 ruby^[34]最近报道海水中 VBNC 状态的费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 仍具有吸附到鱿鱼体表的能力。VBNC 状态的粪肠球菌和创伤弧菌在海水中均有吸附到浮游动物体表的能力, 霍乱弧菌也有类似的报道^[35]。但由于海洋环境的复杂性, 现多仅在实验室内利用人工海水模拟, 众多致病菌 VBNC 状态在海水中的变化及与各种疾病发生的关系还在研究之中。

5 VBNC 状态研究的未来发展趋势

Ravel^[36]的研究是证明 VBNC 状态由基因控制的最有力工作, 他通过转座子突变得得到突变子 JR09H1, 该菌株能够很快进入稳定期, 更早地丧失菌落形成能力, 而能够更快地进入 VBNC 状态。遗憾的是, Ravel 并未找到复苏的方法, 也没能确定具体的突变位点。细胞进入 VBNC 状态, DNA 的调控无疑是主要机制, 但目前分子生物学机制还不清楚。各菌种进入 VBNC 状态及复苏的条件存在巨大的差异, 这些差异是否导致同样的生理学变化, 是否涉及同一组类似的基因诱导或抑制另外一组基因, 目前仍是未知数。VBNC 状态与芽孢、饥饿状态、受损状态等的生理学差异也是有待解决的问题。目前的研究工作多处于现象报道阶段, 不断发现新的能

够进入 VBNC 状态的细菌, 尚未进入机理探讨阶段。与生理学研究相结合, 通过全基因组研究 VBNC 状态形成、变化、复苏基因调控的全过程, 探究 VBNC 状态诱导和调控的机制是未来的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol*, 1982, **8**: 313–323.
- [2] Gunasekera TS, Soerensen A, Attfield PV, *et al.* Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(4): 1988–1993.
- [3] Oliver JD, Dagher M, Linden KG. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J Water Health*, 2005, **3**(3): 249–257.
- [4] Du M, Chen J, Zhang X, *et al.* Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(4): 1349–1354.
- [5] Signoretto C, Lleo MM, Canepari P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr microbial*, 2002, **44**(2): 125–131.
- [6] Morton DS, Oliver JD. Induction of carbon starvation-induced proteins in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(10): 3653–3659.
- [7] Muela A, Seco C, Camafeita E, *et al.* Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **64**(1): 28–36.
- [8] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Kell DB. Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, **67**(3): 289–295.
- [9] Weichart D, McDougald D, Jacobs D, *et al.* In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(7): 2754–2758.
- [10] Yaron S, Matthews KR. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol*, 2002, **92**(4): 633–640.
- [11] Fischer-Le SM, Hervio-Heath D, Loaec S, *et al.* Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. *Appl Environ Microbiol*,

- 2002, **68**(11): 5641–5646.
- [12] Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, **21**(33): 333–339.
- [13] Lleo MM, Tafi MC, Signoretto C, et al. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **30**(4): 345–353.
- [14] Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(11): 6892–6896.
- [15] Lleo MM, Bonato B, Benedetti D, et al. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **54**(2): 189–196.
- [16] Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, et al. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(5): 1953–1959.
- [17] Lleo MM, Pierobon S, Tafi MC, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(10): 4564–4567.
- [18] Whitesides MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(3): 1002–1005.
- [19] Magarinos B, Romalde JL, Barja JL, et al. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(1): 180–186.
- [20] Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H, et al. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella typhimurium* strain LT2. *Int J Food Microbiol*, 2006 **106**(3): 241–247.
- [21] Steinert M, Emody L, Amann R, et al. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(5): 2047–2053.
- [22] Colwell RR, Brayton P, Herrington D, et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996, **12**(1): 28–31.
- [23] Medema GJ, Schets FM, Giessen AW, et al. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Appl Bacteriol*, 1992, **72**(6): 512–516.
- [24] Stern NJ, Jones DM, Wesley IV, et al. Colonization of chicks by non-culturable *Campylobacter* spp.. *Letters in Applied Microbiology*, 1994, **18**(6): 333–336.
- [25] Warner JM, Oliver JD. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(8): 3025–3028.
- [26] Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 373–395.
- [27] Vora GJ, Meador CE, Bird MM, et al. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp.. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(52): 19109–19114.
- [28] Heim S, Lleo MN, Bonato B, et al. The viable but non-culturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol*, 2002, **184**(23): 6739–6745.
- [29] Sachidanandham R, Gin KYH, Poh CL. Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**(1): 24–31.
- [30] Brayton PR, Tamplin ML, Huq A, et al. Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**(12): 2862–2865.
- [31] Pearson 1942D, Greenwood M, Healing TD, et al. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 987–996.
- [32] Makino SI, Kii T, Asakura H, et al. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state insalted Salmon Soe? *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(12): 5536–5539.
- [33] Peneau S, Chassaing D, Carpentier B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(9): 2839–2846.
- [34] Lee K, Ruby EG. Symbiotic role of the viable but nonculturable state of *Vibrio fischeri* in Hawaiian coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(1): 278–283.
- [35] Gil AI, Louis VR, Rivera NG, et al. Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. *Environ Microb*, 2004, **6**(7): 699–706.
- [36] Ravel J, Hill RT, Colwell RR. Isolation of a *Vibrio cholerae* transposon-mutant with an altered viable but non-culturable response. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, **120**(1-2): 57–61.