

活的但非可培养(VBNC)状态菌的研究进展

丁林贤¹, 苏晓梅², 横田明^{1,3}

浙江师范大学,¹ 地理与环境科学学院,² 化学与生命科学学院, 金华 321004

³ 日本东京大学, 分子细胞生物学研究所, 东京 113-0032

摘要: VBNC(viable but non-culturable)是指处于“活的但非可培养”状态的微生物,此微生物体的细胞仍有代谢活性,但用常规方法无法分离培养。本文阐述了 VBNC 状态菌的形成机理、转变与种类、复苏、研究意义及其应用展望。并报道了我们在十余年间针对生态环境中处于 VBNC 状态菌的复苏、可培养化、系统进化关系及潜在功能等方面的一些研究成果,拟为微生物资源的开发与应用提供新的科学依据。

关键词: 活的但非可培养(VBNC), Rpf, 微生物资源

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011)07-0858-05

1982年 Xu等^[1]首次在河口和海洋环境中发现生存但不可培养的霍乱弧菌和大肠杆菌。Colwell于1985年正式提出微生物的VBNC(viable but non-culturable)概念即活的但非可培养的状态^[2],并于2000年首次汇编了处于VBNC状态微生物的研究综述与专著^[3]。20余年来,有关VBNC的报道主要集中于医学、流行病学、病原菌分子遗传学及植物病理学等领域。近年来,VBNC状态菌已经成为微生物各相关学科如动物医疗免疫、现代生物技术、微生物资源化等的研究热点。本文综述了VBNC状态菌的形成机理、转变与种类、复苏、研究意义及其应用展望,同时报道了我们在十余年间针对生态环境中处于VBNC状态菌的复苏、可培养化、系统进化关系及潜在功能等方面的一些研究成果,拟为微生物资源的开发与应用提供新的科学依据。

1 VBNC 状态菌的形成机理

Diane^[4]及 Nyström^[5]等人对 VBNC 状态菌的形

成机制提出了两种假说:一是认为该状态是由于饥饿导致细胞质劣化,从而引起细胞活性的丧失,进而导致细胞衰弱并最终走向凋亡。二是认为处于VBNC状态的细菌并非趋向于死亡,只是为了适应不良环境所做出的一种程序式反应,是一种生存策略^[6]。进入VBNC状态后,其细胞并未受到伤害,能维持其代谢活性,其形成机理类似于孢子的形成机制。据报道^[6-13],不同细菌及同一细菌的不同菌株其进入VBNC状态的条件及机理各不相同。常见诱导微生物进入VBNC状态的因素可分为物理因素(如温度、湿度、氧气浓度、光照强度等)、化学因素(营养成分、有害化学物质)及生物因素。

在以温度为诱导因素的研究中,Whitesides^[7]等人采用5℃低温培养 *Vibrio vulnificus*,发现其活细胞总数在两周后维持在10⁸ CFU/mL,但在HI平板上的计数结果表明该菌在此低温条件下,3-6 d内将进入VBNC(<0.1 CFU/mL)状态。在常温下对该菌复活培养时,发现较少的营养成分有利于复活,其结果虽有异于“饥饿”诱导进入VBNC状态的报

道,但其具体的机理目前尚不明确。杜萌^[8]等人在4℃低温的灭菌海水中培养 *Vibrio alginolyticus* VIB283, 90天后,该活菌数始终保持在 10^9 CFU/mL,而平板计数结果表明该菌已进入 VBNC (<0.1 CFU/mL)状态。当温度转变为26℃、营养充分的条件下,该菌可在8 d内复苏,当营养不足时,复苏的时间延长至16 d。且复苏后的菌株接种至鸡的胚胎中,表明同样具有致病性。Cytryn^[9]等人在研究 *Bradyrhizobium japonicum* 对干燥环境的生理反应及转录过程时,发现短杆瘤菌为适应缺水环境会合成海藻糖和多聚糖。同时会吸收各种蛋白质以保护细胞膜及修复损伤的DNA。通过对基因转录过程的分析,发现干燥的条件将诱导根瘤菌进入VBNC状态。Cuny^[10]等人将处于对数期的大肠杆菌 *Escherichia coli* 从液体培养基中转至固体培养基的研究表明,该菌因氧化应激作用,对细胞产生毒害,使其进入VBNC状态。Matthews^[11]等人在研究不同pH条件对 *E. coli* O157:H7 培养状况的影响时发现:用磷酸盐缓冲液将pH值从7调至4时,细胞进入非可培养状态的速度加快。表明了VBNC的形成机理中物理因子的诱导作用。

在化学诱导因素中,有害化学物质是胁迫微生物进入VBNC状态的关键因素。2000年,Matthews^[11]等人在研究饥饿、pH、温度、氯气浓度对 *E. coli* O157:H7 培养状况的影响中发现:当大肠杆菌暴露于氯气下,该活菌数可在5 d内维持在一定水平,而平板计数结果表明该菌已进入VBNC (<0.1 CFU/mL)状态。因此,氯气可以诱导大肠杆菌进入VBNC状态。2009年,刘严明^[12]等人利用含有氯胺的自来水培养 *E. coli* O157:H7 时发现:在15 min后,90%的大肠杆菌细胞进入VBNC状态。

生物因素诱导微生物进入VBNC状态的现象,在水生细菌抵御不良环境方面的表现尤为突出。当水生细菌遇到不利的环境时,可依附在生物体表面进入VBNC状态,当环境适宜其生存时,重新恢复其生长繁殖状态。Signoretto^[13]等人首次证明了革兰氏阳性菌粪肠球菌可以依附在浮游生物表面进入VBNC状态,以此抵御不良环境得以长时间存活。2005年,Signoretto^[14]等人再次发现粪肠球菌56R菌株在海水和湖水中可以依附在桡足类浮游生物上而躲避不利的生长环境,表明了VBNC菌体的形成及其机能的表达在因生物因素诱导下所处生态环境

中的复杂性。

我们利用直接计数法(Direct count: DC)及平板计数法(CFU)研究了藤黄球菌(*Micrococcus luteus*)在一年内的活菌总数和可培养菌数的变化。结果表明: *M. luteus* 培养液中的活菌数在 $10^9 - 10^8$ CFU/mL范围内变化,而可培养的菌数在最初的一个月内从 10^9 CFU/mL降至 10^5 CFU/mL,在后半年内缓慢降至 10^4 CFU/mL,静置培养一年后的可培养菌数降至 10^3 CFU/mL,从而证实该菌在长期静置培养的环境条件下逐渐进入VBNC状态。

2 VBNC 状态菌的转变及其种类

VBNC状态菌可能发生一系列的变化,包括细胞形态及成分的变化、DNA排列方式的变化、代谢活性的变化及基因表达水平方面的变化等。我们对 *M. luteus* 采用静置培养,利用可作为反映细胞活性指标的Rhodamine123荧光染色对培养两天与培养一年的菌体进行对比观察,发现两者的细胞形态有明显的差异:培养两天的菌体细胞大小以及荧光亮度基本一致,荧光显微镜下视野背景清晰。而对于培养一年的菌体,除可见该菌四叠细胞的大小和荧光亮度基本一致外,另有约三分之一的菌体细胞已变形或解体,且荧光强度变弱(不能排除因细胞自溶引起的菌体变形与形成的细胞碎片),同时,其视野背景也较前者模糊。因此,推测该菌在长期静置培养条件下,其分裂增殖与生存能力逐渐减弱,从而导致部分细胞进入VBNC状态。对上述静置培养液进行平板稀释培养,发现正常培养2天后的菌落大小较为均一整齐,最大菌落直径3.6 mm,最小2.9 mm,平均3.1 mm,其中直径2.9-3.1 mm的占94%。而经5个月静置培养后,最大菌落直径3.6 mm,最小0.3 mm,平均1.4 mm。与培养两天形成的菌落相比,有88%的菌落变小,同等大小的仅占12%,其中直径1-2 mm的占56%。同时,我们在显微镜下还可观察到直径小于0.3 mm的菌落,其数量约占总数的16%。我们根据部分菌落随静置培养时间的延长而呈现变小的现象,从而推测出该菌形成菌落的能力逐渐变弱,最终使得部分细胞进入VBNC状态。

VBNC状态菌的种类随着研究的深入而日益增多,目前,已报道约60多种细菌^[15-16]可进入VBNC

状态。多种研究表明处于 VBNC 状态的菌可能是由于对其生长繁殖条件的不了解,而无法利用现有的分离培养条件得到的微生物。再者可能是由于现有环境条件的改变而使其转变为非可培养状态,而无法分离培养得到的微生物。对于前者可经深入探索其适宜的生长繁殖条件,恢复其可培养状态,从而为开发新的微生物资源提供技术支持。对于后者当给予适宜的条件时可恢复生长繁殖,此适用于对潜在病原菌发病机理的研究及其预防。

3 VBNC 状态菌的复苏

复活促进因子^[17] (Rpf, resuscitation promoting factor) 是由藤黄球菌 (*M. luteus*) 分泌的一种能使处于 VBNC 状态的该菌重新恢复其生长繁殖能力的蛋白质,分子量约为 16 - 17 kDa。Mukamolova^[17] 报道了 Rpf 可以复苏处于 VBNC 时期的革兰氏阳性菌 *Mycobacterium* 属的结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) 和鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 等。并且同 Rpf 相似的基因也在链霉菌、结核菌、棒状杆菌等高 GC 的革兰氏阳性菌中被发现。另外, Mukamolova^[18] 等人还报道了 Rpf 采用自分泌或旁分泌的方式分泌信号,不但能使休眠的微生物复活,还可以刺激正常菌的生长,并能调控细胞的繁殖过程。目前,对 Rpf 的研究主要集中在医学、流行病学、病原菌分子遗传学等领域,尤其表现在对肺结核 (TB) 发病机理的研究上。据相关文献报道^[19-20], 结核杆菌 (*M. tuberculosis*) 含有 5 种类类似 *rpf* 的基因,分别为 *rpfA* (Rv0867c)、*rpfB* (Rv1009)、*rpfC* (Rv1884c)、*rpfD* (Rv2389c)、*rpfE* (Rv2450c)。其中 *rpfB* 能协同蛋白裂解液 (RifA) 共同作用于肽聚糖的裂解过程。

我们通过克隆 *M. luteus* 的 *rpf* 基因,并在大肠杆菌中成功表达,从而获得了具有活性的 Rpf 蛋白。同时采用最大可能数法 (most probable number, 最大或然数法) 对该菌的处理组 (添加 Rpf) 与对照组 (未添加 Rpf) 进行计数的对比试验,结果表明:当不加入 Rpf 时,一年内菌数从 10^8 CFU/mL 降至 10^3 CFU/mL,当添加 Rpf 后,其可培养细胞数可恢复至 10^5 CFU/mL,从而证实了 Rpf 对 VBNC 状态菌具有复苏功能。同时,我们在利用 Rpf 对土壤中处

于 VBNC 状态的细菌进行复苏培养的过程中,发现来自不同地域的 68 种土壤中有 28 种土壤存在 VBNC 状态的革兰氏阳性细菌,主要有 *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Leifsonia*、*Nocardia*、*Kitasatospora*、*Streptomyces*、*Bacillus*、*Paenibacillus* 等属细菌。值得指出的是 Rpf 一般对近缘的高 GC 革兰氏阳性菌的 VBNC 菌体具有复苏的功能,然而我们的研究表明 Rpf 不仅对低 GC 革兰氏阳性菌 (*Bacillus*、*Paenibacillus*) 而且对来自井水的难培养微好氧贫营养革兰氏阴性菌也有良好的复活促进其生长的功能^[21]。

4 VBNC 状态菌的研究意义及其应用展望

利用纯培养技术从土壤、活性污泥、海水、湖水、沉淀物等自然界中分离培养微生物其可培养比例只占 0.01% - 10%,绝大多数微生物处于难分离培养的 VBNC 状态。随着现代生物技术的发展,多种分子生物学研究方法为认识更多的 VBNC 状态菌提供了可能。利用 DGGE、FISH 和 Microarray 解析方法分离提取环境中的 DNA,研究结果表明多种生境中存在非可培养的微生物^[22-23]。另外,我们通过对多种土壤中的 DNA 进行 PCR - DGGE 研究发现:VBNC 状态菌存在特异性的指纹图谱及相应的 16SrRNA 基因序列。近年来,VBNC 可培养化的方法和技术已成为研究的热点^[21]。如为建立和完善相应的畜产品检测制度,对其食源性 VBNC 状态病原菌的研究^[23]。同时,还利用 VBNC 菌体不增殖而在体内具有酶活性的特点开发出新的更为稳定的生物传感器^[24]。我们通过对城市废水处理系统中的 VBNC 状态菌进行复苏研究,从而分离得到多种新种^[25-26],同时发现经复苏培养得到的 VBNC 菌种具有较强的生物除臭及硝化脱氮等功能。

VBNC 状态菌作为自然界中未能开发利用的微生物资源,对其形成机理、潜在机能及应用性能的研究将成为学者们广泛关注的焦点。在 VBNC 形成机理方面,我们需深入研究微生物自身的变化,即进入 VBNC 状态的微生物是否趋于细胞死,抑或是在消除各种环境胁迫的抑制因子后,该菌体能否恢复其正常的生长繁殖功能。其中,对形成 VBNC 状态菌各阶段性的基因表达形式、群集种类间的互生与共

生关系、生态环境因子间的相互作用等都有待通过分子生物学、分子生态学和遗传学等手段进行深入的研究。对 VBNC 的可培养化,特别是潜在机能的研究,将为重新认识和评价微生物在食品发酵、农业、环保等领域的作用提供新的科学依据,赋予其更为广阔的开发应用前景。

参考文献

- [1] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Singleton RW, Attwell, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313-323.
- [2] Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Nature Biotechnology*, 1985, 3:817-820.
- [3] Colwell RR, Grimes DJ. Nonculturable Microorganisms in the Environment. ASM Press, Washington, D. C., 2000.
- [4] Diane MD, Scott AR, Dieter W, Staffan K. Nonculturability: adaptation or debilitation?. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(1): 1-9.
- [5] Nyström T. Not quite dead enough: on bacteria life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(3): 159-164.
- [6] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 415-425.
- [7] Whitesides MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Applied and environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1002-1005.
- [8] Du M, Chen JX, Zhang XH, Li A, Li Y. Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(3): 283-288.
- [9] Cytryn JE, Sangurdekar DP, Streeter JG, Franck WL, Chang WS, Stacey G, Emerich DW, Joshi T, Xu D, Sadowsky MJ. Transcriptional and Physiological Responses of *Bradyrhizobium japonicum* to Desiccation-Induced Stress. *Journal of Bacteriology*, 2007:1-46.
- [10] Cuny C, Lesbats M, Dukan S. Induction of a Global Stress Response during the First Step of *Escherichia coli* Plate Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 885-889.
- [11] Zhao LQ, Matthews KR. Influence of starvation, temperature, and Ph on culturability of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety*, 2000, 20(3): 193-206.
- [12] Liu YM, Wang C, Tyrrell G, Hruday SE, Li XF. Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(2): 155-161.
- [13] Signoretto C, Burlacchini G, Maria ML, Pruzzo C, Zampini M, Pane L, Franzini G, Canepari P. 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. *Applied and environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6892-6896.
- [14] Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, Canepari P. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Applied and environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2756-2761.
- [15] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43: 93-100.
- [16] Smith B, Oliver JD. In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into persistence within and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1445-1451.
- [17] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Biological Sciences Microbiology*, 1998, 95(15): 8916-8921.
- [18] Mukamolova G. V, Turapov OA, Kazarian K, Telkov M, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3): 611-621.
- [19] Kana BD, Mizrahi V. Resuscitation promoting factors in bacterial population dynamics during TB infection. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2010, 7(1): 13-18.
- [20] Young M, Artsatbanov V, Beller HR, Chandra G, Charter KF, Dover LG, Goh EB, Kahan T, Kaprelyants, AS, Kyrpidis N, Lapidus A, Lowry SR, Lykidis A, Mahillon J, Markowitz V, Mavromatis K, Mukamolova GV, Oren A, Rokem SJ, Smith MCM, Young DI, Greenblatt CL. Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living

- actinobacterium. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (3): 841-860.
- [21] Ding LX, Yokota A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56 (3):267-271.
- [22] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2006, 46(3):504-507.
- [23] Cho JC, Giovannoni SJ. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1):432-440.
- [24] Liua L, Liua CY, Li SG, Lia D, Yonga D, Li Q, Dong SJ. Viable but nonculturable cells used in biosensor fabrication for long-term storage stability. *Talanta*, 2010, 83(1):31-35.
- [25] Ding LX, Hirose T, Yokota A. *Amycolatopsis echigonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis niigatensis* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a filtration substrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57:1747-1751.
- [26] Ding LX, Hirose T, Yokota A. Four novel *Arthrobacter* species isolated from filtration substrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009, 59:856-862.

Research progress of VBNC bacteria—A review

Linxian Ding^{1*}, Xiaomei Su², Akira Yokota^{1,3}

¹College of Geography and Environmental Sciences, ²College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

³Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

Abstract: The viable but non-culturable (VBNC) is a microbial state, in which microbial cells are metabolically active but cannot be cultivated by routine methods. In this article, we address the formation mechanism, change and variety, resuscitation, research significance and application prospects of VBNC state in bacteria. Furthermore, we report our research findings on VBNC state of bacteria in the past 10 years, including resuscitation, culturable, phylogenetic relationship and potential functions.

Keywords: viable but non-culturable (VBNC), resuscitation promoting factor, microbial resources

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel: +86-579-82282273; E-mail: linxian@zjnu.cn

Received: 23 November 2011/Revised: 22 January 2011