

副溶血弧菌菌株 1211U 的活的可培养状态

姚 斐¹ 寇运同² 陈 刚¹ 纪伟尚¹ 徐怀恕¹

(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

(² 山东省商检局 青岛 266001)

提要 将副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 菌株 1211 U 培养于低温贫养条件下, 以平板菌落计数法 (PC) 和最大近似数法 (MPN) 检测可培养细菌数, 50 ~ 60 d 后表明可培养数下降为零。吡啶橙荧光显微镜直接计数法 (AODC) 检测细菌总数, 表明细菌总数始终变化不大, 而活菌直接计数法 (DVC) 检测到的活菌数保持在 10^6 个 / ml。本实验证明了副溶血弧菌 1211 U 株在一定的条件下可进入活的可培养状态 (VBNC)。

关键词 副溶血弧菌菌株 1211 U, 活的可培养状态, 细菌

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是在海洋及盐湖环境中分布极为广泛的一种致病性嗜盐细菌, 是鱼虾贝等水产经济动物的主要致病菌之一, 在急性肠炎病人的粪便中也很容易分离到。近 20 a 人们发现在夏秋季节的沿海地区经常发生的爆发性食物中毒主要是由于食用含有大量副溶血弧菌的海产品而引起的; 即使是在非沿海地区, 食用被此菌污染的盐渍食品, 亦常有食物中毒发生。因此, 已引起世界各国有关部门对该菌的高度重视。一般在冬季不易检出此菌^[1], 并且象霍乱弧菌和创伤弧菌一样, 副溶血弧菌在冬季的暴发频率和发病水平都远远低于夏季。

许多海洋细菌, 特别是弧菌属, 在饥饿的情况下可以通过一系列的细胞生理和形态变化而存活很长时间。1982 年徐怀恕等通过对霍乱弧菌和大肠杆菌存活规律的研究, 首次提出了细菌“活的可培养状态” (Viable But Nonculturable State, VBNC), 即细菌处于不良环境条件下, 细胞缩成球形, 用常规方法培养不能使其生长繁殖, 但仍然是活的一种特殊存活形式^[2]。到目前为止, 微生物学家们已发现有许多人类致病细菌, 例如创伤弧菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、索氏志贺氏菌、杀鲑气单胞菌和空肠弯曲杆菌等, 当它们处于低温和贫营养的环境中时, 可以进入这种活的非可培养状态, 而并非死亡了。

对一些致病细菌来说, 在导致活的非可培养状态的因素中, 低温和营养的被剥夺是最主要的原因。了

解副溶血弧菌在这种低温和贫营养的环境中能否存活, 并且是以何种方式存活是非常重要的。因为进入活的可培养状态的细菌在一定的条件下可以复苏并仍具有毒力, 所以如果副溶血弧菌存在着活的非可培养状态的话, 那么用传统的平板计数法就无法将其检出, 就有可能在实践中造成漏检, 使活的非可培养状态的副溶血弧菌在特定的条件下复苏造成该病的爆发性流行。本文通过将副溶血弧菌 1211 U 株培养于 4 ℃ 的通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌的陈海水中, 研究其存活情况, 证实了副溶血弧菌 1211 U 株确实存在着“活的可培养状态”。

1 实验材料和方法

1.1 实验菌株

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 1211 U 株, 取自中国预防医学科学院流行病研究所。

1.2 实验水体

实验用水取自青岛沿海水域, pH8.0, 盐度 30。水样在实验室中陈化 7 d 后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 以除去颗粒物。在 1 000 ml 经过专门设置橡皮塞上带取样管的三角烧瓶中 (如图 1) 装入 800 ml 过滤的海水, 121 ℃ 蒸汽灭菌 20 min, 同时制备两瓶供平行实验用。

收稿日期: 1999-10-18; 修回日期: 2000-03-03

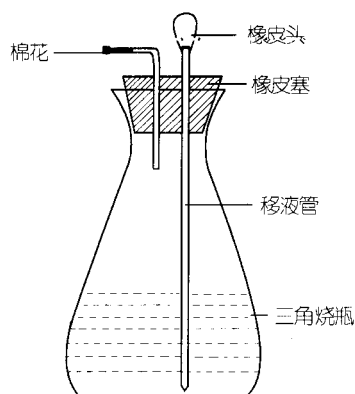


图1 本实验专用三角烧瓶

Fig.1 The specially designed erlenmeyer flask used in this experiment

1.3 菌株的培养

将经过活化和纯化的副溶血弧菌接种于 2216E 斜面上, 28 °C 培养 20 h, 沿试管壁轻轻加入 5 ml 无菌无颗粒的生理盐水, 然后在室温下静置数小时, 使细菌自由地游动到水中, 以防止菌块带入到实验水体中。

1.4 实验条件

用吡啶橙荧光显微镜直接计数法 (AODC) 测得菌液的含菌量为 10^6 个/ml。取 3 ml 菌液接种到实验三角烧瓶中, 放入 4 °C 冰箱中, 刚开始每隔 2 d, 10 d 后每隔 5 d 取样检查细菌数的变化。

1.5 细菌计数

1.5.1 用平板菌落计数法 (PC) 和最大近似数法 (MPN), 测定可培养菌数, 具体方法参见文献[9]。其中平板菌落计数法使用的非选择性培养基为 2216E 琼脂, 选择性培养基为 TCBS 琼脂 (北京陆桥商检新技术公司生产)。最大近似值数采用三个稀释度三管法, 培养基为 2216E 液体培养基。

1.5.2 吡啶橙荧光显微镜直接计数法 (AODC) 检查总菌数的变化; 活菌直接计数法 (DVC) 检查总活菌数的变化。具体方法参照文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 计数结果

接种到陈化的海水中的副溶血弧菌, 在 4 °C 下进行培养, 由于海水中的有机物含量很低, 又处于低

温条件下, 从图 2 可以看出, 由于副溶血弧菌进入非可培养状态后便不能正常地生长繁殖, 可培养的菌数逐渐下降。其中以 TCBS 平板计数法和 2216E 平板计数法, 可培养的细菌数下降得最快, 在第 50 天的时候到达零; 而 MPN 法, 于 60 d 时可培养菌数才到达零。但吡啶橙荧光显微镜直接计数法 (AODC) 结果表明总菌数一直没有很大的变化; 活菌直接镜检计数法 (DVC) 检测到大多数的细菌能在萘啶酮酸的刺激下利用营养物质生长却不能进行分裂。在实验进行到第 60 天时, 可培养的细菌数已降为零, 总菌数几乎没有变化, 而活菌数只比总菌数低了约两个数量级, 每毫升中仍有 10^6 个活菌。这说明大部分的副溶血弧菌都已处于活的非可培养状态。

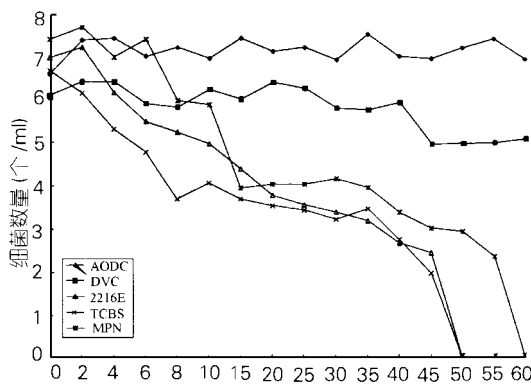


图2 不同天数的细菌计数结果

Fig.2 Bacteria count at different times (in days)

2.2 镜检下的形态变化

显微镜下正常培养的副溶血弧菌, 菌体为棒状、杆状、弧状和球状等多形态。而活的非可培养状态的副溶血弧菌菌体变小, 缩成球形, 这与其他进入活的非可培养状态的细菌的变化是一致的。活菌直接计数法 (DVC) 中, 由于经萘啶酮酸的处理, 缩小的处于非可培养状态的副溶血弧菌变得粗大, 这是因为萘啶酮酸能抑制 DNA 解旋酶的活性从而抑制 DNA 的复制, 使细菌不能分裂, 但不影响细菌中其他合成途径的运转。因此, 在一定浓度营养物质的存在下, 细菌只生长不分裂, 致使菌体伸长变粗, 经过荧光染色, 可以很容易地将它们计数出来。当然还有一部分细菌, 在用萘啶酮酸处理 48 h 以后, 并没有膨大生长, 它们或许死亡了, 或许只是没有生长。

以上的实验结果,证实了副溶血弧菌 1211 U 株的确存在着活的非可培养状态。

2.3 讨论

为了防止在每次取样时对样品造成污染,作者对三角烧瓶的橡皮塞做了处理,如图 1,在橡皮塞上打两个洞,一个洞中插入玻璃弯管做为通气管,另一个插入带橡皮头的移液管作为取样管。每次取样的前后都要用 75% 的酒精对橡皮头进行消毒。然后用无菌的注射器从橡皮头处插入吸取样品。结果证实实验过程中的确没有发生污染,因为每次取样涂布 2216E 平板和 TCBS 平板进行培养,菌落形态都保持着高度的一致。

自 1982 年徐怀恕等首次发表了细菌的活的非可培养状态的文章以来,这一领域的研究工作迅速发展,到 1995 年为止已报道有 30 多种细菌存在活的非可培养状态^[3],其中也包括副溶血弧菌。Xiu Ping Jiang 和 Tur Jyi Chai 于 1996 年研究两株副溶血弧菌(一株是具有致病性的,一株是没有致病性的)时,发现这两株菌在低温贫营养的条件下都可进入活的非可培养状态;并且当温度升高时,还可从这种活的非可培养状态再恢复到可培养状态^[4]。但这并不能说明所有的副溶血弧菌都能进入活的非可培养状态。因为同一菌种的不同菌株之间在活的非可培养状态方面的差异是很大的,有的甚至没有活的非可培养状态。例如,徐怀恕等于 1982 年, Lindeg 和 Oliver 等于 1989 年分别报道了当把大肠杆菌 ATCC25922 株培养在 5 或 10℃ 的人工海水种时,它的培养能力几乎没有下降。而 Byrd 和 Colwell 于 1990 年报道说大肠杆菌 JMB3 株在相同的条件下仅 6 d 就可进入活的非可培养状态。同样的, Wolf 和 Oliver 于 1992 年在研究 7 株创伤弧菌的时候发现有 6 株在 5℃ 时能进入活的非可培养状态,而另一个临床菌株在相同的期间内可培养的细菌总数却始终超过 10^6 个/ml。所以作者研究了由中国预防医学科学院流行病学研究所提供的这株副溶血弧菌,它不仅具有致病性,而且还是一株尿素酶阳性的菌株。因此研究它的活的非可培养状态,对临床及流行病学方面都具有重要的意义。对该实验作者前后共重复了 3 次,每次都得到相同的结果,这就是当细菌的可培养数降为零的时候,细菌总数始终保持在开始的水平,活菌总数变化也不太大,只比细菌总数低两

个数量级。因此,作者可以证实副溶血弧菌 1211 U 株的确存在着活的非可培养状态。

在 Jiang 的研究中发现,进入活的非可培养状态的副溶血弧菌在温度由 3.5℃ 升高到室温后,3 d 内就可从非可培养状态恢复为可培养状态。对副溶血弧菌 1211 U 株能否从活的非可培养状态恢复为可培养状态,作者也做了初步的尝试。共采用了 3 种方法,包括 (1) 回复室温法:取 10 ml 活的非可培养状态的副溶血弧菌的菌液加入到无菌的试管中,于 25℃ 存放 5 d 后,取 0.1 ml 菌液涂布 TCBS 平板。(2) 化学因素的影响:分别取 9 ml 活的非可培养状态的副溶血弧菌的菌液加入到无菌的试管中,再各加入 1 ml 的细胞培养液,支原体培养液和小牛血清,25℃ 培养 5 d 后,取 0.1 ml 菌液涂布 TCBS 平板。(3) 鸡胚复苏实验:取 0.1 ml 活的非可培养状态的副溶血弧菌的菌液注入到正在孵化的鸡胚的卵黄囊中,2 d 后抽取 1 ml 卵黄加入到无菌的试管中,然后用无菌的支原体培养液进行稀释后,涂布 TCBS 平板。结果发现这 3 种方法都无法使活的非可培养状态的副溶血弧菌恢复为可培养状态,而且细菌的形态也没有由球形再恢复为杆状、弧状和棒状。这很可能是作者采用的方法尚不满足该菌的复苏条件。因此,继续研究副溶血弧菌 1211 U 从活的非可培养状态恢复为可培养状态的环境因素,将是我们下一步工作的重点。

当前国外对细菌的活的非可培养状态的研究较多,而国内的研究者相对较少。尤其是目前我国常规的水质和食品的细菌检验中,通常使用传统的培养法,这样的检测结果显然不很可靠,因为它不能检测出处于活的非可培养状态的细菌。因此加强这方面的研究工作,对现行的检测方法加以改进,是十分必要的。本实验室正在尝试使用快速、灵敏、准确的间接免疫荧光抗体染色的免疫学和核酸杂交,PCR 等分子生物学方法来检测活的非可培养状态的细菌。

参考文献

- 1 苏世彦主编.食品微生物检验手册.北京:中国轻工业出版社出版,1998.161
- 2 刘端.疾病监测,1998,13(9):350~354
- 3 Jiang, XP., Chai, T. . *Appl. and Environ. Micro.*, 1996, 62: 1300~1305

(下转 28 页)

THE VIABLE BUT NONCULTURABLE STATE OF *Vibrio parahaemolyticus* 1211U

YAO Fei¹ KOU Yur-tong² CHEN Gang¹ JI Wei-shang¹ XU Hui-shu¹

(¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

(² Shandong Imp and Exp Commodity Inspection Bureau, Qingdao, 266001)

Received: Oct. 18, 1999

Key Words: *Vibrio parahaemolyticus* 1211 U, Viable but nonculturable state, Bacteria

Abstract

Vibrio parahaemolyticus 1211 U was cultured in sterilized sea water by the process of filtration at 4 °C; 50-60 days later, plate count (PC) and most probable number (MPN) showed that there were no culturable bacteria. But acridine orange direct count (AODC) showed that the total number of bacteria was not changed appreciably. Direct viable count (DVC) also confirmed that the number of viable *Vibrio parahaemolyticus* in the water was 10^5 cells/ml. So it is concluded that *Vibrio parahaemolyticus* 1211 U can enter the viable but nonculturable state under certain conditions.

(本文编辑:刘珊珊)