

活的非可培养状态大肠杆菌O157:H7的复苏研究

田 聪, 余以刚, 肖性龙*, 李建龙, 吴 晖
(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 为研究活的非可培养状态(viable but nonculturable state, VBNC)的*Escherichia coli* O157:H7的复苏能力, 将*E. coli* O157:H7分别置于LB液体培养基和生理盐水在-18℃低温条件下诱导生产活的非可培养状态*E. coli*。结合吖啶橙荧光显微镜计数法、活菌直接计数法和平板计数法对样本细菌检测验证, 分别在第15天和第18天得到VBNC样本。采用将培养液直接升温到37℃、加入体积分数为25%酵母浸膏(25℃)和加入体积分数为8%吐温-80(37℃)3种方法进行复苏研究。同时利用荧光定量PCR技术监测从诱导到复苏整个过程中的菌数变化。结果显示: 3种方法均能使VBNC状态*E. coli* O157:H7在2d内复苏, 复苏后菌株与正常菌株形态类似; 细菌进入VBNC状态15d后, 采用相同的方法则无法复苏。

关键词: VBNC状态; *E. coli* O157:H7; 复苏; 检测

Resuscitation of Viable but Non-culturable *E. coli* O157:H7

TIAN Cong, YU Yi-gang, XIAO Xing-long*, LI Jian-long, WU Hui
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to explore the resuscitative capability of viable but nonculturable (VBNC) *Escherichia coli* O157:H7, the bacteria were induced into LB broth and physiological saline at low temperatures (-18 °C) respectively. Plate count, scanning electron microscope and qPCR technique were used to detect the VBNC cell populations on the 15th and 18th days, respectively. Resuscitation of VBNC samples within 2 d was achieved by direct heating to 37 °C, addition of 25% yeast extract at 25 °C, or addition of 8% Tween-80 at 37 °C. The pattern of the resuscitated VBNC cells was similar to that of the normal cells. However, the bacteria could not resuscitate after the VBNC state was kept for 15 d.

Key words: VBNC state; *E. coli* O157:H7; resuscitation; detection

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)11-0218-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201311047

细菌的活的非可培养状态(viable but nonculturable state, VBNC)是活菌的一种特殊存在状态, 细菌在外界环境压力条件下, 失去在常规培养基生长繁殖的能力, 但是仍然具有代谢活性, 在一定的条件下能够复苏。VBNC菌的一个重要特征是复苏, 只有细胞能够提高代谢活性并且恢复可培养性才能够有效证明VBNC状态是细菌保留活性的一种形式。目前的研究结果并不能将所有的VBNC菌都复苏, 复苏是一个复杂的过程, 并非直接去除诱导因子即能实现^[1]。

大肠杆菌O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)是一种常见的食源性致病菌, 能够通过食物和水源传播, 对人类的安全构成威胁^[2]。当遇到如低温、高渗透压、pH值、紫外

线辐射和改变营养等不良环境条件时, *E. coli* O157:H7会进入VBNC^[3], 细菌在这种状态下仍然具有新陈代谢活性, 保留毒性基因, 但是常规方法无法培养, 造成漏检^[4], 许多VBNC菌在合适的外界条件下可以实现复苏^[5]。

目前对于VBNC的复苏研究普遍集中在弧菌上, 对于VBNC状态的大肠杆菌复苏研究较少^[6]。*E. coli* O157:H7在低温寡营养条件下诱导21d后进入VBNC状态, 通过在平板培养基中加入过氧化氢酶或者丙酮酸盐等物质, 2d内平板计数增加到 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL, 研究者^[7]认为通过添加的物质能够降解代谢副产物H₂O₂, 促进细胞恢复活性达到复苏的目的, 而不是通过提供细胞培养所需要的营养物质恢复可培养能力。

收稿日期: 2012-07-19

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(20110172120034); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101279); 中央高校基本科研业务费专项(2011ZM0101)

作者简介: 田聪(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品致病菌活菌检测。E-mail: tianminnie0731@gmail.com

*通信作者: 肖性龙(1977—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: fexxl@scut.edu.cn

Ohtomo等^[8]利用高盐环境诱导*E.coli* CE273进入VBNC状态,菌落数在19h内减少90%,当解除压力环境后,细胞在2h内恢复可培养性,菌落数达到诱导前浓度。Pinto等^[9]首次利用在基本培养基中加入氨基酸或者改变温度的方法,使得4℃条件下诱导的*E.coli*成功复苏。对于大肠杆菌的不同株型的VBNC菌的复苏方法并不相同,复苏的差异性和复杂性使得复苏条件的筛选显得尤为重要。

目前对VBNC状态*E.coli* O157:H7复苏研究较少,本实验研究低温因素对其VBNC状态诱导的作用,对不同复苏条件进行筛选,结合利用荧光定量PCR与荧光显微镜观察等方法,探讨*E.coli* O157:H7的复苏能力。本实验利用常规简便的复苏方法,对诱导进入VBNC状态的*E.coli* O157:H7体外复苏,复苏实验成功同时可以作为VBNC状态诱导成功的佐证。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养条件

大肠杆菌*E.coli* O157:H7(ATCC6589),为本实验室保存菌种。

细菌培养采用LB液体培养基:蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、氯化钠10g/L, pH值调至7.0,培养基经过121℃、20min灭菌后使用。*E.coli* O157:H7接种到LB液体培养基中,37℃、180r/min摇床过夜培养至对数生长期($OD_{600nm} \approx 1.0$)。液体培养基中添加1.8g/100mL的琼脂粉即固体培养基,用于平板法测可培养菌数。

1.2 试剂与仪器

吖啶橙、苏丹黑 美国Amresco公司;萘啶酮酸、酵母膏、吐温-80 美国Sigma公司;细菌基因组DNA快速提取试剂盒 北京艾德莱生物科技有限公司;PCR Amplification Kit 日本TaKaRa公司;革兰氏染色液 广东环凯微生物科技有限公司。

紫外分光光度计、台式高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;Milli-Q Academic超纯水系统 美国Millipore公司;Olympus CX-31落射荧光显微镜 日本奥林帕斯公司;ABI7500荧光定量PCR仪器 美国应用生物系统公司。

1.3 方法

1.3.1 VBNC状态*E.coli* O157:H7的诱导

将过夜培养后处于对数成长期的*E.coli* O157:H7采用平板计数法测得菌液浓度为 10^9 CFU/mL。菌悬液 $8000 \times g$ 离心2min,用无菌水重悬,接入30mL诱导液中,加入无菌水调整细菌浓度达到 10^6 CFU/mL左右。诱导液为:LB液体培养基(-18℃)和生理盐水溶液(-18℃)。诱导过程中定期每隔2d用平板计数法、吖啶橙荧光显微镜计数法

(acridine orange direct count, AODC)和活菌直接计数法(direct viable count, DVC)定量检测可培养菌数、总菌数和活菌数的变化,设3次平行实验。

1.3.2 复苏条件的筛选

取3mL诱导结束刚进入VBNC状态的*E.coli* O157:H7于 $8000 \times g$ 离心2min,用无菌水重悬,接入3mL无菌水中,分别用4种方法复苏。同时取3mL无菌Milli-Q水作为阴性对照组。

1)直接升温复苏:VBNC菌液直接置于37℃恒温培养箱中200r/min振荡培养,2d后平板计数。

2)添加营养物质升温复苏:VBNC菌液中加入体积分数为25%无菌酵母浸膏,25℃、180r/min培养,2d后平板计数。

3)添加化学物质升温复苏:VBNC菌液中加入体积分数为8%无菌吐温-80,37℃、200r/min培养,2d后平板计数。

4)热激复苏:VBNC菌液置于45℃水浴15s,恢复室温后平板计数。

1.3.3 荧光显微镜观察

VBNC状态菌的诱导和检测以及复苏过程用AODC和DVC法分别检测细菌总数和活菌总数,同时用荧光显微镜观察不同时期的细菌细胞形态。从诱导环境中取菌液10倍稀释,取合适浓度的菌液1mL于 $8000 \times g$ 转速条件下离心2min,用无菌水重悬。洗涤后的菌液中加入100μL的1g/L吖啶橙溶液,暗处染色5min。吸取10μL染色完毕的菌液,均匀地滴在置于无自发荧光的载玻片中心处微孔滤膜上,微孔滤膜之前用2g/L的苏丹黑溶液染色以去除背景荧光。制成的样本用落射荧光显微镜观察结果^[10]。当可培养数降为0时,连续检测3d仍为0,DVC检测显示有活菌存在时,认为诱导环境中的菌体进入VBNC状态。取对数生长期的正常活菌作为对照组进行荧光观察。复苏成功后采用相同的方法检测,并进行荧光观察。

1.3.4 细菌DNA提取及实时荧光定量PCR检测

取500μL菌液 $10000 \times g$ 离心3min收集菌体,采用细菌基因组DNA快速提取试剂盒提取DNA,得到终体积为50μL的PCR反应模板。

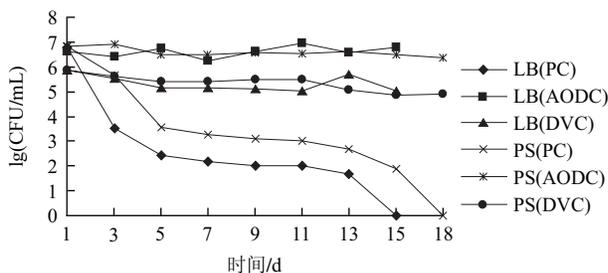
利用ABI 7500 Real Time PCR System检测。*E.coli* O157:H7上游引物5'-CTACAGGTGAAGGTGGAATGGT-3'(22bp),下游引物5'-GTAGCCTATAACGTTCATGCCAAT-3'(23bp),以及*TaqMan*水解探针5'-FAM-TCACGAATGACAAAACACTTTATGAC-BHQ1^[11]。PCR扩增反应体系为25μL: $10 \times (NH_4)_2SO_4$ Buffer 2.5μL, 25mmol/L $MgCl_2$ 3.5μL, 上下游引物各1μmol/L, 探针0.5μmol/L, 25mmol/L dNTPs 1μL, *Taq* DNA聚合酶0.5μg/μL, DNA模板2μL, 补加无菌水至25μL。PCR反应条件为:95℃预变性5min; 95℃、5s, 60℃、40s(收集荧光),进

行40个循环;反应结束后40℃保温。3次平行实验,计算平均循环阈值(Ct)和样本标准差。

2 结果与分析

2.1 VBNC状态诱导

改变温度是诱导VBNC菌的常用方法,不同细菌对于低温的耐受性不同,当有其他不利因素,如寡营养协同诱导时,有利于细菌形成VBNC状态。初始浓度为 6.5×10^6 CFU/mL的*E. coli* O157:H7菌液于低温(-18℃)的作用下分别在富营养(LB液体培养基)和寡营养(生理盐水)环境条件下诱导,可培养数分别在诱导的第15天和第18天降为0。同时,通过AODC法检测的总菌数在整个诱导过程中保持稳定,而DVC法测得的活菌数缓慢降低,至诱导结束时活菌数分别下降1~2个数量级(图1),即进入VBNC状态。说明两种环境均能够诱导*E. coli* O157:H7进入VBNC状态,低温是VBNC状态的*E. coli* O157:H7诱导的重要影响因子。*E. coli*的活性与温度相关是因为低温能够导致新陈代谢活性的减弱,可以延缓对于细胞的损害^[12],低温有利于*E. coli*进入VBNC状态^[13]。同时,结果显示在低温条件下营养条件对于*E. coli* O157:H7的VBNC状态诱导影响不大。



LB. LB液体培养基; PC. 平板计数; AODC. 吡啶橙荧光显微镜计数法; DVC. 活菌直接计数法; PS. 生理盐水。

图1 *E. coli* O157:H7在LB培养基和生理盐水中的菌数变化

Fig.1 Change in cell counts of *E. coli* O157:H7 in LB broth and physiological saline

2.2 VBNC状态*E. coli* O157:H7的复苏

2.2.1 平板计数法验证复苏

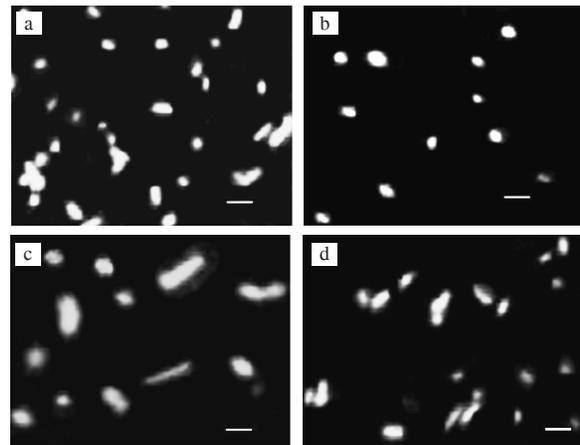
对于低温寡营养方法诱导的VBNC菌,去除诱导时的不利环境因子,提高温度和添加营养物质可能会使VBNC菌复苏。取刚进入VBNC菌株进行复苏,2d后经检测结果显示,升温、添加25%酵母浸膏和添加8%吐温-80均能够使VBNC菌恢复可培养状态(表1)。通过涂布平板发现,平板上长出的单菌落比正常的单菌落略小,可能与VBNC状态下细菌细胞缩小有关。复苏后的浓度达到 10^5 CFU/mL左右,比诱导前的细菌浓度 10^6 CFU/mL低1个数量级,重复实验得到相同的结果。细菌进入VBNC

状态15d后,采用相同的方法复苏,4种方法均不能使VBNC菌恢复可培养性。说明*E. coli* O157:H7只能维持VBNC一段时间,之后便会进入死亡期^[14],实验结果证明细菌VBNC状态的诱导和维持时间可能与诱导环境和细菌自身对于环境的抵御适应能力有关。VBNC状态的复苏与诱导方法、复苏条件选择和VBNC状态的诱导和维持时间有关,是一个复杂的过程。

表1 VBNC状态*E. coli* O157:H7复苏结果
Table 1 Resuscitation of VBNC *E. coli* O157:H7

VBNC菌液	平板计数菌落数(lg(CFU/mL))			
	直接升温复苏	添加营养物质升温复苏	添加化学物质升温复苏	热激复苏
LB培养基	5.11	6.23	4.69	0
生理盐水	5.18	4.72	5.83	0
阴性对照	0	0	0	0

2.2.2 荧光显微镜验证复苏



a. AODC法观察正常状态*E. coli* O157:H7的荧光图像; b. AODC法观察VBNC状态*E. coli* O157:H7的荧光图像; c. DVC法观察VBNC状态*E. coli* O157:H7的荧光图像; d. AODC法观察复苏状态*E. coli* O157:H7的荧光图像。

图2 不同状态*E. coli* O157:H7荧光图像(标尺为10μm)

Fig.2 Fluorescence images of *E. coli* O157:H7 at different states (bar represents 10 μm)

图2为不同状态下*E. coli* O157:H7的荧光显微图像。菌悬液经过吡啶橙染色后,经荧光显微镜观察,发现诱导后进入VBNC状态的菌体变小,缩小接近于球状,正常菌体为杆状,菌体比较大。经过吸收营养处理的VBNC菌体染色后经荧光显微镜观察,部分菌体体积增大1~2倍左右,认为是VBNC状态细菌,少数细菌体积不变,认为是死菌。DVC法使用萘啶酮酸抑制DNA复制,在营养物质作用下,活细胞只生长不分裂,可以通过染色后观察从而实现活菌的检测^[15]。复苏后的*E. coli* O157:H7经过AODC法处理后,菌体形态和大小与正常菌体基本相同。

2.2.3 荧光定量PCR检测结果

利用荧光定量PCR技术检测两种诱导环境中*E. coli* O157:H7在正常状态、VBNC状态和复苏后的菌数变化,

不同状态下的样本Ct值略有不同。由图3可知, *E. coli* O157:H7从诱导到复苏整个过程中, 总菌数变化不大, VBNC状态时总菌数略有降低, 与AODC法检测结果相同。同时, 荧光定量PCR结果证明复苏后通过平板法检测到的菌落不是杂菌污染, 进一步证实了复苏成功。

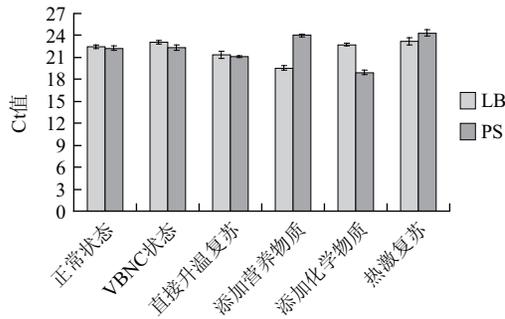


图3 荧光定量PCR检测不同状态下的*E. coli* O157:H7
Fig.3 qPCR detection of *E. coli* O157: H7 at different states

3 结论

菌液浓度为 10^6 CFU/mL的*E. coli* O157:H7分别在富营养和寡营养以及-18℃低温的作用下, 15d和18d内分别进入VBNC状态, 37℃直接升温复苏、25℃加入25%酵母液和37℃加入8%吐温-80均能在2d内使VBNC状态*E. coli* O157:H7复苏, 可培养菌数到达 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL, 接近于诱导前浓度。对于VBNC菌的检测结合了平板计数法、荧光显微镜观察法和荧光定量PCR技术, 有效、快速、准确地验证实验结果, 克服了传统平板计数法对于VBNC菌的漏检缺陷。

参考文献:

[1] ROWAN N J. Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis?[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15: 462-467.

[2] CHALMERS R M, AIRD H, BOLTON F J. Waterborne *Escherichia coli* O157:H7[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(Suppl 1): 124-132.

[3] MAROUANI G N, OLIVIER F, DANIELLE C, et al. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and from viable but non-culturable cells on a food-conduct surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 96-103.

[4] OLIVER J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34: 415-425.

[5] KEEP N H, WARD J M, ROBERTSON G, et al. Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63: 2555-2559.

[6] WHITESIDES M D, OLIVER J D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 64: 3025-3028.

[7] MIZUNOE Y, SUN N W, TAKADE A, et al. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds[J]. Arch Microbiol, 1999, 172: 63-67.

[8] OHTOMO R, SAITO M. Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state[J]. Microb Ecol, 2001, 42: 208-214.

[9] PINTO D, ALMEIDA V, SANTOS M A, et al. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110: 1601-1611.

[10] 李影, 段锐, 钱爱东, 等. “活的非可培养状态”细菌荧光观察方法[J]. 生物技术, 2010, 20(3): 66-68.

[11] ELIZAQUÍVEL P, GABALDÓN J A, AZNAR R. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis[J]. Food Control, 2011, 22: 158-164.

[12] INÉS A, ALICIA M, MAITE O, et al. Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 74: 500-509.

[13] KOCH A L. The adaptive responses of *Escherichia coli* to a famine and feast existence[J]. Adv Microb Physiol, 1971, 6: 147-217.

[14] 岳秀娟, 余利岩, 张月琴. 自然界中处于VBNC状态微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 108-111.

[15] KOGURE K, SIMIDU U, TAGA N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria[J]. Can J Microbiol, 1979, 25: 415-420.