

## 微囊藻毒素粗提物对水环境中温和气单胞菌活的非可培养状态的影响\*

潘高山, 胡章立\*\*, 雷安平, 黎双飞

(深圳大学生命科学学院, 深圳大学生态环境研究所, 深圳 518060)

**摘要:** 细菌 VBNC 状态 (Viable but non-culturable state), 又称“活的非可培养状态”, 是自然水体中广泛存在的细菌的一种特殊存活状态, 复杂的环境因子变化是 VBNC 状态转换的可能原因. 本研究利用接种温和气单胞菌的无菌湖水, 研究铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 培养液和微囊藻毒素粗提液对水环境中温和气单胞菌 VBNC 状态转换的影响, 结果发现, 温和气单胞菌在无菌湖水中同时存在 VBNC 状态和可培养状态; 产毒微囊藻培养液和微囊藻毒素粗提液均能促进温和气单胞菌中 VBNC 细菌与可培养细菌之间的状态转换, 说明微囊藻毒素可能是水环境中影响细菌 VBNC 状态转换的重要环境因素, 其进一步的分子机制研究正在进行中.

**关键词:** 微囊藻毒素; 温和气单胞菌; 细菌 VBNC 状态

### Effect of crude microcystin on the viable but non-culturable state of *Aeromonas sobria* in aquatic environment

PAN Gaoshan, HU Zhangli, LEI Anping & LI Shuangfei

(College of Life Science, Shenzhen University, Institute of Ecology and Environment, Shenzhen 518060, P.R.China)

**Abstract:** Viable But Non-Culturable (VBNC) is a special state of bacteria for survival. It is a conventional state for bacteria in natural water body. Complicated environment factors may be the rational reason of the interchange. In this study, the effects of cyanobacterial media and crude microcystin on the VBNC state of *A. sobria* were conducted by incubating *Aeromonas sobria* into a sterile lake water. The results showed that some bacteria were in the VBNC state while others in culturable state; both cyanobacterial media and crude microcystin could improve the change of *A. sobria* from VBNC state to culturable state. It revealed that microcystin might be an important environmental factor involved in the VBNC state transferring in aquatic environment. More research concerned about molecular mechanism was undergoing.

**Keywords:** *Aeromonas sobria*; microcystin; bacterial VBNC state

Colwell 等<sup>[1]</sup>首次发现了细菌的一种特殊状态, 即“活的非可培养 (Viable but non-culturable state, VBNC)”状态. 在进一步对 *Vibrio cholerae* 和 *E. coli* 存活规律的研究中, 发现细菌处于不良环境条件下, 其细胞缩成球形, 用常规方法培养不能使其生长繁殖, 但仍然具有代谢活性. 细菌的 VBNC 状态是细菌的一种特殊存活形式. 许多革兰氏阴性菌 (G<sup>-</sup>) 及某些不形成芽胞的革兰氏阳性菌 (G<sup>+</sup>) 在不良环境条件下都可能进入这种状态<sup>[2]</sup>. 这些细菌通过进入 VBNC 状态而度过各种不利因素造成的压迫并存活下来. 在细菌的 VBNC 状态被发现之前, 人们认为细菌不能被培养就证明是死的, 事实证明, 这种看法有失偏颇. 多种致病菌可以在环境条件不利的情况下进入 VBNC 状态, 并具有潜在的致病性, 在条件适宜时又可复苏并重新获得致病能力.

温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*), 是气单胞菌属的一种有单鞭毛的革兰氏阴性杆菌. 温和气单胞菌分布广泛, 是水中常居菌, 可引起多种冷血动物和温血动物致病, 包括鱼类、两栖类、虫类、哺乳类, 甚

\* 国家自然科学基金项目 (30470281) 和国家重点基础研究发展计划项目 (2002CB412309) 联合资助. 2007-02-07 收稿; 2007-04-18 收修改稿. 潘高山, 男, 1978 年生, 硕士研究生.

\*\* 通讯作者; huzl@szu.edu.cn.

至是人类。目前我国危害鱼的种类最多、范围最大、流行地区最广、流行季节最长及造成损失最大的一种传染病是细菌性败血症。该病主要是由气单胞菌属的两种细菌——嗜水气单胞菌和温和气单胞菌引起的。由于温和气单胞菌对水产养殖业影响重大,其 VBNC 状态的存在与否关系到水环境中温和气单胞菌的检测问题,具有重要的实用意义及经济价值。

近年来,我国经济的快速发展给自然水环境带来了巨大污染负荷,造成我国很多河流湖泊富营养化。富营养化水体中频繁暴发的蓝藻水华给我国的生态环境和人们日常生活带来很多负面的影响。实验使用的温和气单胞菌是从严重富营养化的滇池中分离的。Lemke 等<sup>[3]</sup>的实验已表明自然环境中存在较高比例的 VBNC 状态细菌,并且这些细菌在一定条件的作用下会转变成可培养的细菌。温和气单胞菌作为一种具有较高危险性的致病菌,其在蓝藻水华环境中的生理状态以及生理状态间的转换与环境中的重要因子微囊藻毒素是否存在某种关系是本文探讨的主要内容。冯胜等<sup>[4]</sup>的研究指出水体微生物与水华的形成有密切的关系,可以根据细菌数量的变化判断水质,进而预测水华的发生。藻菌关系是有毒蓝藻水华研究领域的重要内容。通过本研究,可以从藻菌关系的角度进一步探讨蓝藻水华消长的规律及细菌 VBNC 状态转换的分子机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 温和气单胞菌分离与培养

于 2005 年 8-9 月间,从暴发蓝藻水华的滇池富营养化水体中分离出温和气单胞菌,由广东省微生物研究所鉴定(委托登记号:粤微检 SP 0934 号)。所用培养基为 LB,培养条件为固体平板 37℃倒置培养或液体 37℃、200 转/min 摇床培养。将生长到对数中期的温和气单胞菌 25℃、8000 转/min 离心 2min,去除上清后,用无菌湖水清洗,然后再离心一遍。菌体先用无菌湖水重悬,稀释适当倍数后按 1%的接种量加入 100ml 的无菌湖水中作为实验模型。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* FACHB 924)来自中国科学院水生生物研究所淡水保种库。

### 1.2 无菌湖水的制备

将采集的湖水室温下静置一周后用 0.22 $\mu$ m 的膜过滤。滤液再经过高温高压灭菌后作为无菌湖水使用。

### 1.3 细菌平板计数

采用 Plate Count Agar, 购自 OXOID 公司。取 100 $\mu$ l 细菌样品,加到用 Plate Count Agar 制成的无菌平板中,再用涂布器涂匀。每个样品设三个平行样。

### 1.4 DAPI 荧光染色直接计数

方法参考文献[5]。DAPI 为 4,6-联脒-2-苯基吡啶,购自 Sigma 公司。

### 1.5 铜绿微囊藻培养液和微囊藻毒素粗提液的制备

已培养至对数中期的铜绿微囊藻培养液(650nm 吸光值 1.046)经 10℃、6000 转/min 离心 10min 收集。上清液经过 0.22 $\mu$ m 滤膜抽滤除菌后即可作为微囊藻培养液使用。藻细胞沉淀置于-20℃急冻后,置冷冻干燥机干燥再称重。取 0.2 克干重的藻细胞中加入 20ml 5%(V/V)乙酸溶液搅拌提取 20min,8000 转/min 离心 5min,得上清液 I。沉淀用 20ml 100%甲醇提取 20min,10℃、8000 转/min 离心 5min,得上清液 II。重复以上步骤得上清液 III。合并上清液 I、II 和 III 得溶液 IV。将合并液 IV 的 pH 值调到 4.0 使藻胆蛋白等沉淀,经 6000 转/min 离心 5min,取上清液,将 pH 调回 7.0,再旋转浓缩至约 2-3ml 作为上样液。用 15ml 100%甲醇活化 SPE 固相萃取柱(购自 Waters 公司),再用 20ml 去离子水清洗。上样后依次用 15ml 20%甲醇预淋洗 SPE 柱,5ml 100%甲醇洗脱,得藻毒素粗提液约 5 ml。实验前,此粗提液同样需经 0.22 $\mu$ m 滤膜抽滤除菌方可使用。

### 1.6 VBNC 状态细菌比例 (VBNC Percentage)的计算

VBNC 状态细菌比例,简称为 VBNC 比例,即活细菌总数减去可培养细菌数得 VBNC 细菌数,用后者除活细菌总数即得 VBNC 状态细菌比例。

## 2 结果

### 2.1 温和气单胞菌的 VBNC 状态

取两个 250ml 的三角瓶,在其中加入 100ml 的过滤湖水,高温高压灭菌备用。实验时,在三角瓶中按

1%的接种量加入已经稀释过的菌液，室温放置。每隔两天在无菌条件下取样，进行平板计数和 DAPI 荧光染色计数，然后计算 VBNC 状态细菌比例。温和气单胞菌在无菌湖水中可以进入 VBNC 状态，而且随着时间的延长，VBNC 状态细菌比例不断增加，到第4d 达到 90%。此外，活细菌总数在第 3d 会增加到峰值，推测可能是细菌利用湖水的营养物质进行繁殖生长(图 1)。之后，活细菌总数和可培养细菌数都在减少，但可培养数减少得更为迅速，其中大部分细菌进入了 VBNC 状态。

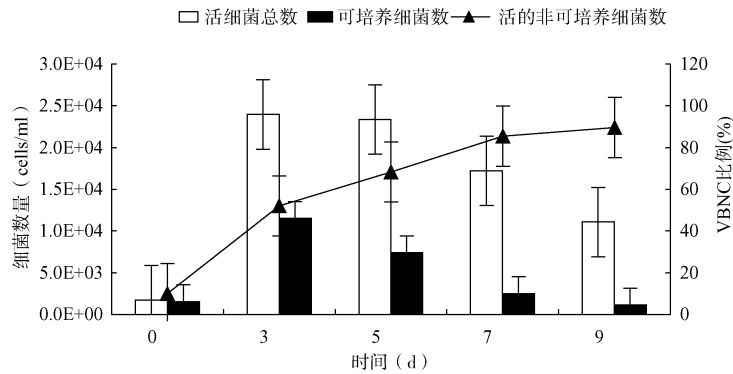


图 1 温和气单胞菌在无菌湖水中的 VBNC 状态与可培养情况

Fig.1 The VBNC state and culturable state of *Aeromonas sobria* in artificial lake water

### 2.2 微囊藻培养液对温和气单胞菌 VBNC 状态的影响

将已过滤除菌的微囊藻培养液加入 100ml 无菌湖水中与温和气单胞菌共培养，研究微囊藻培养液存在的情况下，细菌 VBNC 状态的动态变化(图 2)。添加 1ml 的微囊藻培养液与对照相似，VBNC 状态细菌比例随着时间的延长逐渐增加，在第 7d 达到最大值。与此明显不同，添加 10ml 微囊藻培养液的处理组 VBNC 状态细菌在第 5d 的时候，由第 3d 的 97%降为 22.34%，在第 7d 达到 3.85%。利用 Excel 软件对各指标进行单因素方差分析，得到：添加 1ml 微囊藻培养液时的可培养细菌数与对照比较的  $p$  值是 0.34( $n=4$ )，而添加 10ml 微囊藻培养液时的  $p$  值是 0.04( $n=4$ )。这表明，添加 10ml 微囊藻培养液对温和气单胞菌的可培养细菌数影响差异显著。由此可见，10ml 的蓝藻培养液与对照相比，能明显地促进温和气单胞菌由 VBNC 状态转化为可培养状态。具体原因有可能是 10ml 的微囊藻培养液中含有某些活性成份(如培养基成分，藻毒素等)或含有足够的营养物质对 VBNC 状态细菌的转变起促进作用。

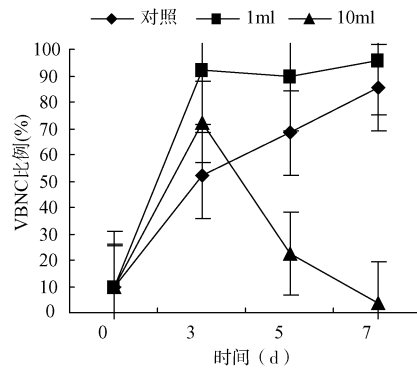


图 2 微囊藻培养液对温和气单胞菌 VBNC 状态细菌比例的影响

Fig.2 The effect of the solution from the cultures of *Microcystis aeruginosa* FACHB 924 on the rate of bacterial VBNC cells

### 2.3 微囊藻毒素粗提液对温和气单胞菌 VBNC 状态的影响

将微囊藻毒素粗提液用 0.22 $\mu$ m 的滤膜过滤除菌后备用。将 6 个 250ml 经灭菌处理的三角瓶分为 A、B、C 3 组，每组三角瓶中分别装入 100ml 无菌湖水，高温高压灭菌。分别向三组三角瓶加入 0 $\mu$ l, 100 $\mu$ l 和 1ml 上述备用的微囊藻毒素粗提液。最后再加入 1ml(即按 1%的接种量)经过适当稀释的温和气单胞菌，室温放置。每隔两天在无菌条件下取样，进行平板计数和 DAPI 染色荧光显微镜下计数，然后计算各种类别的细菌数目。

2.3.1 微囊藻毒素粗提液对活细菌总数的影响 通过荧光染色计数检测实验期间活细菌总数的变化(图 3)。结果表明，实验期间三组之间的区别不大，三组的波动都具有有一致性。所以，不同浓度的微囊藻毒素粗提

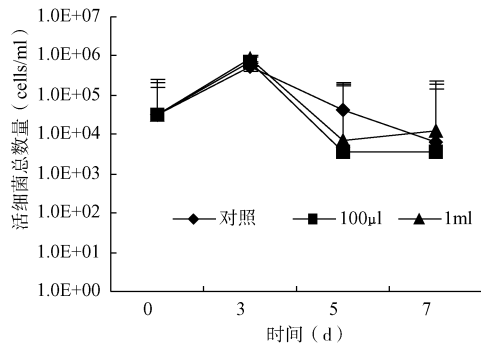


图3 微囊藻毒素粗提液对活细菌总数的影响  
Fig.3 The effect of crude microcystin on the number of total viable bacteria

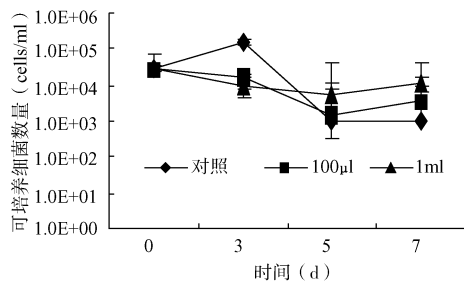


图4 微囊藻毒素粗提液对可培养细菌数的影响  
Fig.4 The effect of crude microcystin on the number of culturable bacteria

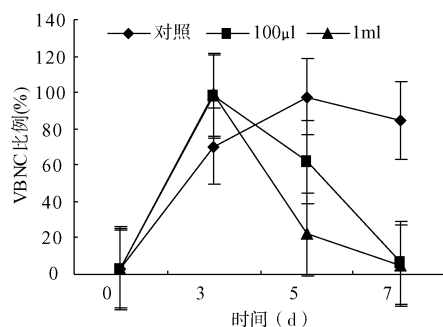


图5 微囊藻毒素粗提液对VBNC状态细菌比例的影响  
Fig.5 The effect of crude microcystin on the VBNC bacteria percentage

培养能力,甚至可使其可培养能力降低.二是藻类培养液中含有某些能诱导细菌从VBNC状态转变成可培养状态的物质(如藻毒素、生长调节物质等).微囊藻毒素粗提液的影响实验进一步证实了这种可能性.

从藻毒素粗提液对温和气单胞菌VBNC状态的影响结果来看,微囊藻毒素可能是促使细菌VBNC状

液对活细菌总数的影响没有明显差别.同时,活细菌总数变化的原因未知,推测可能是由于无菌湖水中营养物质波动造成的.

2.3.2 微囊藻毒素粗提液对可培养细菌数的影响  
每次取样时用PCA(Plate Count Agar)平板对实验模型进行可培养细菌数检测.在实验的第5d和第7d,处理组的可培养细菌数都比对照组高.在第7d达到峰值(图4).由此可见,微囊藻毒素粗提液对可培养细菌数有一定的促进作用.

2.3.3 微囊藻毒素粗提液对VBNC状态细菌比例的影响  
温和气单胞菌的VBNC状态细菌的比例从第5d开始有一个明显的变化:处理组比对照组低20%以上,甚至达到约80%,并且微囊藻毒素粗提液的浓度越高,降低的程度越大(图5).这说明微囊藻毒素粗提液可以降低实验水体中VBNC状态细菌的比例.

### 3 讨论

根据郑桂丽等<sup>[6]</sup>的概括总结,自然界中的许多细菌都存在VBNC状态,即“活的非可培养状态”.本实验结果表明,温和气单胞菌可以进入VBNC状态,与已报道<sup>[7]</sup>同属的杀蛙气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)存在VBNC状态的结果类似.常规的微生物检测项目主要通过检测可培养细菌来判定环境中是否存在某种细菌.VBNC状态细菌的存在证明了这种方法的局限性.本实验证明若仅通过常规的微生物检测可能导致检测结果的假阴性.鉴于此,对于存在VBNC状态的细菌的检测应采用染色法为宜.与此同时,许多存在VBNC状态的细菌都具有较强的传染性,如果漏检将带来严重的卫生学问题.总之,本实验为解决检测方法的局限性提出了重要的理论依据,同时也为疾病预防与控制等卫生学问题提供理论基础.

本实验结果表明,温和气单胞菌在无菌湖水中会逐渐转化为VBNC状态,而添加藻类培养液后,促使细菌从VBNC状态转化成可培养状态,可能的原因有两方面,一是加入的培养液中含有大量的营养成分,缓解了无菌湖水中因细菌繁殖而出现的营养胁迫.然而,有研究报道<sup>[8-9]</sup>,饥饿环境中增加营养并不一定能增强细菌的活性或可

态转变成可培养状态的重要因素之一. Ashton<sup>[10]</sup>等在研究有毒甲藻 *Ostreopsis lenticularis* 与其共生细菌的关系时发现甲藻藻毒素的存在与细菌 VBNC 状态细菌比率呈负相关关系. 根据本实验结果, 微囊藻毒素极有可能对 VBNC 状态细菌起到类似的效果. Dixon<sup>[11]</sup>等人以 *E.coli*(pBR322)为实验材料研究了 MC-LR 对细菌细胞膜通透性的影响. 结果显示, 微囊藻毒素提高了 *E.coli* 细胞膜对某些物质的通透性. 周立红<sup>[12]</sup>等人的研究发现, 低浓度藻毒素粗提液对钠钾 ATP 酶有激活作用, 高浓度则有抑制作用. 因此推测细菌可能在微囊藻毒素的作用下加快吸收微囊藻毒素作为营养物质而进入可培养状态, 又或者激活 ATP 酶而促使细菌进入更有活力的可培养状态. 这些推测只存在理论上的可能性, 还有待进一步验证.

#### 4 参考文献

- [1] Xu HS, Singleton F, Conwell *et al.* Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *J Microbiol Ecol*, 1982, **8**: 313-323.
- [2] 许兵, 纪伟尚, 徐怀恕. 一种新发现的细菌的特殊存活形式——活的非可培养状态. *中国生态学杂志*, 1990, **2**(3): 144-149.
- [3] Lemke MJ, Leff LG. Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population levels. *Microb Ecol*, 2006, **51**(3): 365-74.
- [4] 冯胜, 高光, 秦伯强等. 太湖北部湖区水体中浮游细菌的动态变化. *湖泊科学*, 2006, **18**(6): 634-642.
- [5] Porter KG, Feing YS. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *J Limnol Oceanogr*, 1980, **25**(5): 943-948.
- [6] 郑桂丽, 廖绍安, 纪伟尚等. 环境中“活的非可培养(VBNC)”细菌的研究进展. *微生物免疫学进展*, 2004, **32**(4): 58-65.
- [7] Morgan JA, Rhodes G, Pickup RW. Survival of non-culturable *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 874-80.
- [8] Thomas TD, Batt RD. Survival of *Streptococcus lactisin* starvation conditions. *J Gen Microbiol*, 1968, **50**(3): 367-382.
- [9] Ensign JC. Long-term starvation survival of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *J Bacteriol*, 1970, **103**(3): 569-577.
- [10] Ashton M, Rosado W, Tosteson TR *et al.* Cultural and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *ostreopsis lenticularis*. *J Toxicon*, 2003, **42**: 419-424.
- [11] Dixon RA, Al-Nazawi M, Alderson G. Permeabilizing effects of sub-inhibitory concentrations of microcystin on the growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **230**(2): 167-170.
- [12] 周立红, 陈学豪. 塔玛亚历山大藻对罗非鱼肝及鳃组织 ATP 酶活性的影响. *海洋科学*, 2003, (12): 75-78.