

绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌在越冬水体的饥饿存活及复苏

张庆华 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 将绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌(Ah4332^{GFP})置模拟越冬水体(8—10℃)内,进行饥饿存活试验,用三种计数方法检查水体中的细菌数量变化。在 41d 后平板计数法(PC)降至 0,而细菌总数法(DC)和活菌直接计数法(DVC)结果相似,只是 DVC 计数结果低于细菌总数 1—2 个数量级。显示细菌已经变成活的非可培养(Viable but nonculturable, VBNC)状态。复苏试验表明,升高温度、添加鱼血清或新鲜培养的 Ah4332^{GFP}细菌上清及通过兔肠管结扎,均使 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP}得到复苏。荧光显微镜和电镜观察处于可培养和 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP},后者的细菌细胞比前者体积明显缩小,形态由杆状变成了球形,但细胞膜和细胞壁是完整的,不是细菌 L 型。

关键词: 绿色荧光蛋白;嗜水气单胞菌;饥饿存活;活的非可培养状态;复苏

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)05-0465-07

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, strain Ah)是多种水生动物细菌性败血症的主要病原之一^[1]。该病多在水温较高的季节流行,而在冬季,养殖鱼类却鲜有暴发此病的报道,这种现象与所谓的嗜水气单胞菌越冬问题密切相关。国内外学者对弧菌以及其它细菌的饥饿存活进行了广泛的研究^[2-9],细菌在缺乏产能基质的环境中的存活称为饥饿存活^[5],有的细菌在长期饥饿条件下进入休眠状态,呈活的非可培养(Viable but nonculturable, VBNC)状态。该状态的细菌细胞缩小成球形,用培养基在常规培养条件下培养不能生长繁殖,但仍然具有代谢活性,是细菌的一种特殊存活方式。嗜水气单胞菌在越冬水体如何存在,是否也有饥饿存活过程,是否呈 VBNC 状态,是否可以复苏,正是本试验所要解答的问题。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及水样 嗜水气单胞菌 Ah4322 株,由德国吉森大学动物卫生所 Baljer 教授惠赠;Ah4322^{GFP}由作者用绿色荧光蛋白(GFP)标记构建(另文发表)。于 1998 年冬季自南

收稿日期: 2001-04-08; 修订日期: 2001-06-06

基金项目: 国家“九五”攻关项目子课题(96-005-03-01)

作者简介: 张庆华(1972—),女,河北;硕士,上海水产大学渔业学院助教;从事水产动物医学方面的研究

通讯作者: 陆承平

京农业大学校内某池塘取水样 3 000 mL, 分作 6 组, 每组 500 mL。将第 1、2 组用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 第 3、4 组用 0.45 μm 的滤膜过滤, 第 5、6 组在 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

1.2 饥饿存活实验 参照 Ferguson^[10] 的方法加以改进。将 Ah4322 和 Ah4322^{GFP} 分别接种于 TSB 和含氨苄青霉素 (Amp) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TSB 肉汤中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养至指数期, 以 10 000 r/min 离心 15 min, 用 1、3、5 水样洗涤 Ah4322, 用 2、4、6 水样洗涤 Ah4322^{GFP}, 再离心洗涤, 最后在 1、3、5 水样接种 Ah4322, 2、4、6 水样接种 Ah4322^{GFP}。每组水样均为 1000 mL, 使初始细菌浓度达 $10^5 - 10^6$ cells/mL, 置 8—10 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。定期取水样, 用三种计数方法分别检查菌数的变化。

1.3 细菌计数 参照徐怀恕等^[3] 和 Kogure 等^[11] 的方法并加以改进。细菌总数的测定, 采用直接计数法 (direct count, DC); 活菌计数, 采用活菌直接计数方法 (Direct viable count, DVC); 可培养细菌计数, 采用常规涂布平板法 (Plate count, PC)。

1.4 VBNC 状态细菌的复苏 用 Ah4332^{GFP} 并参照许兵等^[12] 方法进行。通过改变温度、化学及生物因素使之复苏。逐步升温法: 取 10 mL VBNC 状态的 Ah4332^{GFP} 菌悬液加入无菌试管中, 加 1 mL TSB 培养基, 分两组, 一组于 18 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 存放各 5 d, 分别于 1、3、5 d 取水样, 另一组于 18 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 存放各 5 d, 分别于 5、10、15 d 时取水样, 在 TSA (Amp) 培养基上划线培养; 一次升温法: 取饥饿 27、28、29 d 的水样, 平板涂布, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 1 d, 然后转入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中再培养 3—5 d。每天检查细菌菌落数。

1.5 化学因素的影响 在含 1 mL TSB 的 VBNC 的 Ah4332^{GFP} 菌悬液中, 分别加入维生素 C 及 VB1 0.5 mg、甘氨酸 0.1 g、精氨酸 0.1 g、灭菌的人尿 0.5 mL、未灭菌的人尿 0.5 mL、新鲜培养的 Ah4332^{GFP} 上清 0.5 mL、异育银鲫的皮肤黏液或血清 0.5 mL。同时设不加 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP} 的未灭菌人尿、Ah4332^{GFP} 细菌上清、异育银鲫皮肤黏液对照。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 分别于 1、3、5 d 用 TSA 平板划线检查。

1.6 兔肠管结扎实验 于 10 $^{\circ}\text{C}$, 6 000 r/min 离心收集 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP}, 再用无菌生理盐水制成浓缩的菌悬液, 测定含菌量为 $5.2 \times 10^8/\text{mL}$ 。取体重 2~3 kg 的健康家兔 2 只, 饲养一周, 手术前 48 h 停食, 只喂清水。按 Spira 等^[13] 的方法进行, 将 1 号兔肠结扎五段, 注射物及浓度见表 4, 注射量均为 1 mL。2 号兔只结扎两段并切断, 结扎段分别注射灭菌生理盐水及浓缩的 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP}, 含菌量为 5.2×10^8 cells/mL。手术后 16—72 h, 观察兔肠道的病理变化, 吸取肠积液, 计数总菌数和活菌数, 同时接种营养肉汤培养基, 并在 TSA (Amp) 平板上划线培养。

1.7 小鼠接种试验 取 12 只清洁级小鼠 (购自南京军区总医院), 随机分为三组, 每组 4 只。分别作腹腔注射, 0.2 mL/只。第一组 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP}, 第二组新鲜培养的 Ah4332^{GFP}, 第三组为生理盐水对照。1—3 d 内分离细菌, 划线于 TSA (Amp) 平板。

1.8 异育银鲫接种试验 取 12 尾体重 200 g 左右的异育银鲫 (购自南京农贸市场)。饲养水体 3—4 L, 水温 26—30 $^{\circ}\text{C}$, 气泵充气。采用与小鼠接种相同的分组方法背部肌肉注射, 并进行细菌分离。

1.9 细胞形态观察 取新鲜培养和 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP}, 直接涂在玻片上, 火焰固定后在荧光显微镜 (1 000 $\times$) 下直接观察。样品经离心沉淀, 琼脂粉凝聚, 戊二醛前固定, 再用四氧化 后固定, 经乙醇逐级脱水, 用环氧树脂 (Epon 812) 包埋, LKB 2188 切片机做超

薄切片。最后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, 在 JEOL-100CX- II 型透射电镜下观察。

2 结果

2.1 细菌计数

对六组水样进行细菌总数计数、活细菌计数及 VBNC 细菌计数, 结果可见, 水样中细菌总数均在 10^6 cells/ mL, DVC 法计数活菌比细菌总数低 1—2 个数量级, 而 PC 法计数可培养的未标记的 Ah4332 在 7d 内降为 0(图 1A); 标记的 Ah4332^{GFP} 在 14d 时为 10^3 cells/ mL 左右(图 1B), 至 41d 时才降为 0(数据未显示), 标记的 Ah4332^{GFP} 可培养的细菌数在高压灭菌的第 6 组水样中, 降低速度较慢, 在过滤灭菌的第 2 组和第 4 组水样中降低速度较快(图 2)。

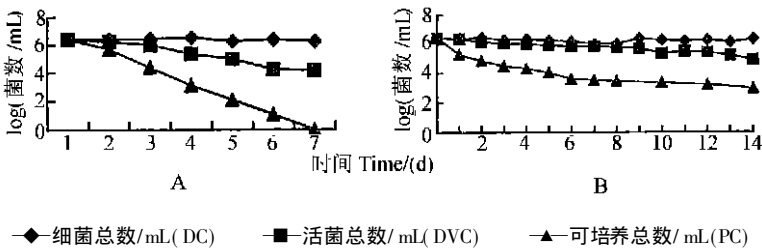


图 1 Ah4332(A) 和 Ah4332^{GFP}(B) 在越冬水体(8—10℃) 的饥饿存活曲线。
图中数据为三组水样的平均值

Fig. 1 Changes in the total cell concentrations(A) and GFP marked(B) cells of Ah4332 during starvation survival at 8—10℃ in overwintering water. Data are the means of triplicate flasks.

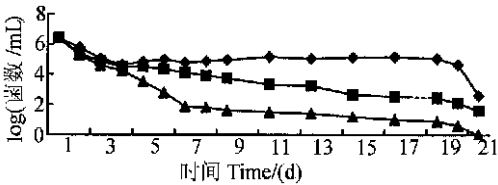


图 2 PC 法计数灭菌水体(8—10℃) 中的 Ah4332^{GFP}

Fig. 2 The culturable cells of Ah4332^{GFP} by plate count at 8—10℃ in the sterilized water
—◆— Ah4332G-6 —■— Ah4332G-4 —▲— Ah4332G-2

2.2 温度的影响

VBNC 状态 Ah4332^{GFP} 在第一组 18℃、28℃、37℃培养 5d, 在 1、3、5d 时 TSA 平板上有绿色荧光菌落生长, 变回可培养状态。第二组用逐步升温的方法也得到了同样的结果(表 1)。

表 1 逐步升温法对复苏的影响

Tab. 1 The results of resuscitation experiment by increasing temperature

温度	时间	胰大豆蛋白胨平板
Temperature(℃)	Duration(d)	TSA
18	1—5	G Growth occurs(生长)
28	6—10	G
37	11—15	G

饥饿 27、28、29d 后的 Ah4332^{GFP} 在 TSA 平板上 28℃生长 24h, 几乎很少能形成菌落, 再

继续培养 24、48h 后菌落数无变化,但转入 37℃再培养 24、48h 后平板上的菌落数明显增加,再延长培养时间,可培养菌数不再增加(表 2)。说明饥饿一定时间的细菌再形成可培养菌落有一个延迟期,温度升高有利于平板上可培养菌落的形成。

表 2 升高温度对平板上饥饿细菌形成可培养菌落的影响

Tab. 2 Effect on starvation cell forming culturable cell by increasing temperature on plate

饥饿时间 Starvation(d)	生长时间 Growth time(h)	生长温度 Temperature(℃)	菌落数/皿 CFU/ disc		
27	24	28	0	0	0
	24	37	31	25	22
	48	37	64	54	27
	72	37	64	54	27
28	24	28	1	0	1
	24	37	9	4	3
	48	37	11	7	8
	72	37	11	7	8
29	24	28	0	0	0
	24	37	7	6	4
	48	37	9	7	5
	72	37	9	7	5

2.3 添加营养物质

添加新鲜培养的 Ah4332^{GFP} 细菌上清、异育银鲫血清的水样在 1d、3d 及 5d 均有细菌生长,在紫外灯下有绿色荧光,细菌上清的对照试验中没有细菌生长,表明添加细菌上清和异育银鲫血清使 VBNC 状态的 Ah4332^{GFP} 变成可培养状。而添加未经灭菌的人尿、异育银鲫皮肤黏液组虽有细菌生长,但无绿色荧光,属非试验菌株。

2.4 兔肠结扎实验

VBNC 状态 Ah4332^{GFP} 在兔肠结扎段内生长、繁殖,回复到可培养状态(表 3)。肠结扎段积水、肿胀,肠道内壁溃烂坏死,兔肠积液在 TSA(Amp) 平板上划线培养,均长出绿色荧光的 Ah4332^{GFP} 菌落。

2.5 小鼠接种试验

注射新鲜培养的 Ah4332^{GFP} 的小鼠 18h 后死亡,体内分离出绿色荧光细菌。注射 VBNC 的 Ah4332^{GFP} 的小鼠健活,于 2、4、6d 剖杀分离细菌,在血液、肠、肾、肝、心脏等处均未分离到绿色荧光细菌。

2.6 异育银鲫接种试验

注射新鲜培养的 Ah4332^{GFP} 的异育银鲫,第 4d、5d 死亡 3 尾,另一尾于第 7d 剖杀,分离细菌,均有绿色荧光细菌。注射 VBNC 的 Ah4332^{GFP} 的异育银鲫第 5、6d 各死亡两尾,于鳃、背部肌肉、肠、血液、肾、心脏等处均未分离到绿色荧光细菌。

2.7 细胞形态比较

在荧光显微镜和电镜下,正常状态的 Ah4332^{GFP} 细菌形态呈杆状,个体较大,达到 1.3—1.5×0.7μm。进入 VBNC 状态后,细胞缩小变成球形,直径仅为 0.8μm。VBNC 状态的 Ah4332^{GFP} 细胞内的核糖体和核酸物质分布不均匀,密度明显降低,但还保持着正常的

细胞外膜和细胞壁。

表 3 经过兔肠结扎段 VBNC 状态 Ah4332^{GFP}的复苏

Tab. 3 The resuscitation of VBNC Ah4332^{GFP} by rabbit ligated ileal loop(LIL)

肠结扎段 编号 No. of LIL	注射物(剂量) Injections(Dose)	体积 Volume(mL)	结扎段中液体	Fluid in the LIL
			细菌数量(cells/ mL) Amount of bacteria	有无绿色荧光 With or without green fluorescent
I - 1	灭菌生理盐水 autoclaved saline	1. 5	1. 6× 10 ⁸	-
I - 2	灭菌 TSB 肉汤 autoclaved TSB	2. 1	1. 42× 10 ⁸	-
I - 3	VBNC 的 Ah4332 ^{GFP} (4. 7× 10 ⁵ cells/mL)	2. 4	3. 2× 10 ⁷	+
I - 4	VBNC 的 Ah4332 ^{GFP} (5. 2× 10 ⁸ cells/mL)	2. 9	6. 8× 10 ⁹	+
	Ah4332 ^{GFP} 新鲜培养物 fresh culture of	3. 2	2. 31× 10 ⁹	+
I - 5	Ah4332 ^{GFP} (8. 6× 10 ⁷ /mL)			
II - 1	VBNC Ah4332 ^{GFP} (5. 2× 10 ⁸ cells/mL)	2. 7	3. 14× 10 ⁹	+
II - 2	灭菌生理盐水 autoclaved saline	1. 4	1. 4× 10 ⁷	-

+ : 有绿色荧光细菌生长; - : 无绿色荧光细菌生长

3 讨论

3.1 嗜水气单胞菌的越冬问题

本试验显示,Ah 在低温时能以 VBNC 状态存活,一旦温度回升,它便可复苏。这与文献记载的霍乱弧菌的情况类似,从而证实了多年来对 Ah 可以在低温越冬的推测。本试验采用绿色荧光蛋白标记的 Ah,方法更可靠,结果有说服力。

3.2 饥饿存活的时间

未标记的 Ah4332 在越冬水体中饥饿 7d,平板划线检测不到菌落,而标记的 Ah4332^{GFP}在相同条件下,14d 时还有 10³CFU/ mL,提示 GFP 标记菌株比未标记菌株更有利于在不良环境生存,推测可能与 Ah4332^{GFP}带有 Amp 抗性质粒有关,大多数 Ah 菌株均有 Amp 抗性,是否这与 Ah 在水体的存活有某种联系,尚待研究。

3.3 电镜下细胞形态

细菌细胞从正常状态如何过渡到 VBNC 状态,一直未有形态学证据。本试验电镜观察表明,进入 NVC 状态的 Ah4332^{GFP}细胞中央先出现空腔,核内物质向外扩展,然后空腔慢慢变大,拉动两极物质向中间聚集,细胞壁出现皱缩或突起,体积缩小,渐渐由杆状变为球形,但细胞壁完整。细胞内核糖体和核酸物质密度降低,着色浅。充分说明此种 VBNC 状态的细菌不是细菌 L 型,也不是细菌芽孢。

3.4 VBNC 状态细菌的复苏

在饥饿 45d 后对 Ah4332^{GFP}进行复苏,在升高温度时,只有添加复杂成份的营养物质如该菌上清及鱼血清才得以复苏,而成份简单的维生素及氨基酸却不能奏效。但是鱼黏液及灭菌人尿也是复杂的生物代谢物,添加不起作用,是否它们有抑菌作用,不得而知。兔肠管结扎试验能使 VBNC 的 Ah4332^{GFP}复苏,令人费解的是,接种小鼠和鱼却不行,是否说明健康机体对 VBNC 状态的细菌抵抗力较强,值得研究。

3.5 水环境中活细菌数的计数方法

DVC 法计数的原理是具有代谢活性的细菌能够吸收营养物质,并在萘啶酮酸的刺激

下菌体长大,变粗,但不分裂,因为萘啶酮酸具有抑制 DNA 复制的作用^[11,14]。在荧光显微镜下,带有绿色荧光的长大或变粗的菌体,被认为是活菌^[11]。Quinn^[15]应用多种活菌计数法比较了淡水环境中的细菌数量,证明 DVC 计数样品中的活菌占细菌总数的 10%—40%,高出平板计数法所得结果两个数量级。本实验结果与之基本一致,采用绿色荧光蛋白(GFP)标记嗜水气单胞菌用于 VBNC 状态的细菌计数,省用荧光染料,方法更为简便,很有发展前途。但 DVC 法只适用于革兰氏阴性菌,不适用于自然水体中的萘啶酮酸抗性菌株,因而也存在一定的局限性,有待进一步改进。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病[J]. 水产学报, 1992, **16**(3): 282—288
- [2] Xu H S., Roberts N, Singleton FL *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* [J], 1982, **8**: 313—323
- [3] 徐怀恕, Colwell RR. 霍乱弧菌的越冬方式—活的非可培养状态及其检测方法[J]. 青岛海洋大学学报, 1989, **19**(2): 77—83
- [4] Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems[J]. *Can J. Microbiol*, 1984, **30**(3): 334—338
- [5] Morita RY. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature[J]. *Can J Microbiol*, 1988, **34**(4): 436—441
- [6] May PS, Pauling C, Morita RY. Starvation survival processes of a marine *Vibrio* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983a, **45**: 1041—1048
- [7] May PS, Pauling C, Morita RY. Recovery from nutrient starvation by a marine *Vibrio* sp. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983b, **45**: 1685—1690
- [8] Hartke A, Bouche S, Gansel X. Starvation induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL 1403[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(9): 3474—3478
- [9] Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state[J]. *J Bacteriol*, 1991, **173**(16): 5054—5059
- [10] Ferguson Y, Glover LA, McGillivray DM *at al.* Survival and activity of lux marked *Aeromonas salmonicida* in seawater[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(9): 3494—3498
- [11] Kogure K. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria[J]. *Can J Microbiol*, 1979, **25**: 415—420
- [12] 许兵, 徐怀恕, 纪伟尚, 等. 活的非可培养状态霍乱弧菌的复苏[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, **24**(2): 187—194
- [13] Spira WM. Simple adult rabbit model for *vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea[J]. *Infect Immun*, 1981, **32**: 739—742
- [14] Siporin C. The evolution of fluorinated quinolones: pharmacology, microbiological activity, clinical uses, and toxicities[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1989, **43**: 601—627
- [15] Quinn JP. The modification and evaluation of some sytochemical techniques for the enumeration of metabolically active heterotrophic bacteria in the aquatic environment[J]. *J Appl Bacteriol*, 1984, **57**: 51—57

STARVATION SURVIVAL AND RESUSCITATION OF GFP-MARKED Ah4332 IN THE OVERWINTERING WATER

ZHANG Qing-hua and LU Cheng-ping

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095)

Abstract: Starvation survival of GFP-marked Ah4332 strain had been detected at 8~10 °C in the overwintering water in laboratory. The changes of bacterial amount were monitored by three counting ways. After 41 days the plate counts (PC) of Ah4332^{GFP} dropped to zero. In all cases, the total number of Ah4332^{GFP} remained the same level with direct viable count (DVC) or direct count (DC), but the DVC was about one or two log lower than the DC. It suggested that the Ah4332^{GFP} had entered a dormant, viable but nonculturable (VBNC) state.

The resuscitation of VBNC Ah4332^{GFP} strain was tested in different conditions. Under increasing the temperature, culturable Ah4332^{GFP} strain was recovered from VBNC state by two methods of either adding some substances e. g. fish serum, supernatant from late logarithmic phase Ah4332^{GFP} cultures or injecting VBNC Ah4332^{GFP} into the rabbit ligated ileal loop.

By using electron microscopy and vertical fluorescent microscopy, the culturable and VBNC Ah4332^{GFP} were observed. Comparing with the culturable cells of Ah4332^{GFP}, the VBNC bacteria processed a significant reduction in cell size and a morphological change from bacilli to cocci, meanwhile the cell membrane and cell wall were intact. It demonstrated that the VBNC state of Ah4332^{GFP} was not the L-form bacterium.

Key words: Green Fluorescent protein (GFP); *Aeromonas hydrophila* (Ah); Starvation survival; Viable but nonculturable (VBNC) state; Resuscitation