

· 实验研究 ·

产肠毒素大肠埃希菌活的非可培养状态 实验室初步研究

陈道利 冯玉华

【摘要】 目的 初步研究产肠毒素大肠埃希菌(ETEC)7株“活的非可培养状态”菌株的形态学、抗原特性以及复苏后生物学、抗原特性、致病性、药物敏感性等特性。方法 运用常规革兰染色、动物肠腔复苏、复苏菌株致病性、血清学凝集、生化鉴定、体外药物敏感等试验观察“活的非可培养状态”ETEC及复苏后生物学特性的变异。结果 这7株“活的非可培养状态”ETEC除菌体营养细胞缩小成球形休眠体外,其他特性均无明显变异,仍保留着较强的致病力。结论 细菌“活的非可培养状态”的存在,提示在传染病日常监测过程中应注意这种细菌的存在状态。

【关键词】 产肠毒素大肠埃希菌;活的非可培养状态;复苏;变异

Primary investigation on variable but nonculturable-state of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Vitro
CHEN Dao-li, FENG Yu-hua. Department of Clinical Laboratory, Center for Disease Prevention and Control of Maan shan City of Anhui Province, Maan shan 243011, China

【Abstract】 Objective 7 variable but nonculturable-state strains of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) during the routine bacterial subculture were found in our lab and their morphology and antigen studied. Biological features, antigens and pathogenicity of the revertants were also tested and compared to that of the initial strains in order to detect their variations. **Methods** Biological variations between the variable but nonculturable-state and the revertant of every strain were detected, using the routine gram-staining, reverting the isolates in animal intestinal, reverting their pathogenicity, serological agglutination, biochemical identifications and antibiotic resistance tests. **Results** For the 7 variable but nonculturable-state strains of ETEC, other than the strains that had changed into spherovetate cells, there were no other obvious variations found. However, high pathogenicity of these strains still remained. **Conclusion** The presence of variable but nonculturable-state strains suggested that the routine method of bacteria storage should be changed and more attention should be paid to realize the existence of this kind of bacteria during the routine surveillance of the communicable diseases.

【Key words】 Enterotoxigenic *Escherichia coli*; Variable but nonculturable-state; Revert; Variation

细菌在自然环境中除以常态可培养的形式存在外,还能在不利于生长繁殖的环境中以芽孢、L型和不可培养的特殊形式存在。“活的非可培养状态”(Variable but nonculturable-state, VBNC)是在研究霍乱弧菌存活时发现的^[1,2],它是细菌在不良环境中,整个细胞缩成球形,用常规培养基在常规条件下培养时不能生长繁殖,但仍然是活的特殊存活形式^[1]。本研究对15株产毒大肠埃希菌(ETEC)菌种作常规传代培养时发现7株在4℃冰箱保存过程中转变为“活的非可培养状态”进行了初步研究。

材料与方法

1. 菌种:15株ETEC为2003年从某市郊县腹

泻患者标本分离,接种半固体保存培养基置4℃冰箱保存约16个月。

2. 材料与仪器:革兰染液、麦康凯琼脂、营养肉汤、营养琼脂、微量生化管、M-H培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司;GNI+生化鉴定板购自梅里埃公司;ETEC诊断血清购自卫生部兰州生物制品有限公司;26种药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。VITEK32全自动微生物鉴定系统为法国生物梅里埃有限公司生产。

3. 实验动物:实验用健康小白鼠购自皖南医学院动物室,体重20g左右。

4. 细菌常规复苏分离:取出15株ETEC菌种倒入营养肉汤,用灭菌接种环捣碎半固体,置37℃温箱培养18h后,挑取混浊液至营养琼脂(NA)平板及MAC平板,经37℃ 24h、48h、72h培养,观察生长

情况。取 1 ml 混浊培养液离心,刮取少许沉淀物涂片,革兰染色镜检观察细菌形态及染色结果。

5. 血清学凝集试验:分别挑取混浊培养液和离心沉淀物与 ETEC 多价血清及 O8:K40.47 单因子血清作玻片凝集试验,以生理盐水(NS)作对照。

6. 非可培养状态菌的复苏实验:取 0.3 ml 混浊培养液注射小白鼠腹腔或口腔喂服,同时以无菌肉汤作空白对照,室温环境下观察小白鼠反应。

7. 复苏菌的分离与鉴定:将上述两种方式处理的小白鼠观察 3 天后处死,分别取心血(腹腔注射小鼠)和肠积液(口腔喂服小鼠)于 MAC 平板和 NA 平板,37℃ 培养 18 h 后挑取可疑菌落接种到克氏双糖(KI)斜面培养基 37℃ 培养 18 h,进行血清凝集试验及生化鉴定。

8. 药物敏感试验:挑取 7 株复苏后菌株分别接种至营养肉汤培养过夜,按照 K-B 方法进行。

结 果

1. 细菌常规复苏分离结果:15 株 ETEC 菌株营养肉汤培养后仍为初接种时的混浊状态,分别于 MAC 平板及 NA 平板培养,其中 8 株菌培养 24 h 后在 MAC 平板上生长出红色菌落,在 NA 平板上菌落较混浊、略半透明、光滑、湿润;另 7 株菌株在 MAC 和 NA 培养基上培养 24 h、48 h 和 72 h 后,均未见细菌菌落生长。取 7 株非可培养菌株的营养肉汤培养物沉淀物进行革兰染色镜检,菌落为点状大小的、红色的、无规律排列球形菌体(图 1);其余 8 株菌革兰染色均为革兰阴性短小杆菌(图 2)。



图 1 非可培养状态 ETEC 菌体革兰染色结果

2. 血清学凝集实验:取 7 株非可培养菌株肉汤培养液及其离心沉淀物分别与 ETEC 诊断多价血清和 O8:K40、47 进行凝集试验,结果都出现不同程度的凝集,培养液:多价血清 \pm 、O8:K40、47 \pm ;沉淀

物:多价血清 \pm 、O8:K40、47 \pm 。8 株可培养菌经玻片凝集,均与 ETEC 诊断多价血清和单因子 O8:K40、47 出现 \pm 强凝集;NS 对照均阴性。

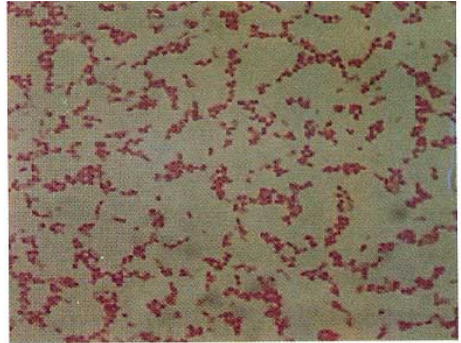


图 2 可培养 ETEC 菌体革兰染色结果

3. 非可培养状态菌的复苏试验结果:营养肉汤培养液腹腔注射及口腔喂养小白鼠后,48 h 内试验组小白鼠均出现竖毛、畏寒、颤抖、无活动能力或活动能力明显下降现象,72 h 后多数小鼠无法站立、反应迟缓。对照组小白鼠无任何不良变化。

4. 复苏菌的分离与鉴定结果:实验动物的心血于 NA 平板和 MAC 平板均无细菌菌落生长;实验组小白鼠肠腔都出现明显的积液,对照组未发现。实验组小白鼠肠腔积液于 NA 平板上出现中等大小、无色半透明、边缘整齐、光滑湿润的菌落;MAC 平板上出现中等大小、中间红色边缘无色、整齐、光滑湿润的菌落,对照组于 NA 平板及 MAC 平板虽有细菌生长,但未发现边缘无色透明的可疑菌落。从上述每块平板中各挑取 5 个可疑菌落接种于 KI 斜面培养后,均生长为 +/⊕、H₂S⁻,菌苔较薄。取培养物做血清凝集试验,7 组实验小白鼠肠腔分离菌均与 ETEC O8:K40、47 呈 \pm 凝集,而对对照组分离株血清学试验为阴性;生化鉴定均为大肠埃希菌(表 1)。

5. 药敏试验结果:7 株 VBNC 对 26 种药敏纸片中敏感(S)的有链霉素、先锋噻吩、呋喃妥因、环丙沙星、痢特灵、卡那霉素、头孢肤肟、氯霉素、妥布霉素、先锋 V、头孢拉定、复达欣、庆大霉素、氧哌嗪青霉素、丁胺卡那、菌必治、先锋必、氟派酸;耐药(R)的有四环素、万古霉素、苯唑青霉素、青霉素 G、强力霉素和红霉素,7 株 VBNC 对氨苄青霉素中介(I),对复方新诺明有 4 株为 I、3 株为 S。与原始菌比较发现,药敏抑制环直径与原始菌基本一致,除原始菌对复方新诺明全部为 R 外,其余结果完全一致。

表1 7株 ETEC 非可培养状态复苏菌与原始菌
VITEK 生化结果对比

生化项目	复苏菌	原始菌	生化项目	复苏菌	原始菌
三氯新	0	0	棉子糖	3	7
葡萄糖氧化	7	7	山梨醇	7	7
阳性生长控制	7	7	蔗糖	1	7
乙酰氨	0	0	肌醇	0	0
叶苷	0	0	侧金盏花醇	0	0
植物尿蓝母	0	0	香豆酸	5	7
尿素	0	0	硫化氢	0	0
枸橼酸盐	0	0	β -半乳糖苷酶	7	7
丙二酸盐	0	0	鼠李糖	7	7
苯丙氨酸	0	0	阿拉伯糖	7	7
多粘菌素 B	0	0	葡萄糖发酵	7	7
乳糖	7	7	精氨酸	0	0
麦芽糖	7	7	赖氨酸	7	7
甘露醇	7	7	鸟氨酸	7	7
木糖	7	7	氧化酶	0	0

注:表中数据为阳性菌株数

讨 论

“L”型是细菌的细胞壁缺陷型,细胞壁受损的细菌在等渗环境中不能耐受胞内高渗透压,而使细胞膨胀破裂死亡。其细胞形态常呈高度多形态,如杆形、球形、丝状体等,染色不易着色^[2];由于细胞壁的部分缺失,不具有完整的抗原结构,无法与相应的抗体结合。本实验室在菌种传代过程中发现的这种特殊现象,根据其在营养肉汤中生长特点、革兰染色镜检结果、血清学凝集试验及动物肠腔菌种复苏实验结果判断,可完全排除“L”型状态存在的可能。

自 VBNC 发现以来,对 VBNC 进行了多方面研究,研究的种类达 22 个属 40 种,对 VBNC 的形成条件、细胞形态结构的变化(如膜脂肪酸、蛋白等细微结构)、新陈代谢变化、致病力、复苏以及研究技术等进行了较深入的研究^[3-5]。目前所知温度、营养匮乏是细菌转变成 VBNC 的重要因素之一^[6]。4℃ 冰箱冷冻菌种是基层实验室常规保藏菌种的方法之一,这种保藏方法可导致菌种数月后“死亡”。作者此次发现并研究的这 7 株 ETEC 非可培养状态菌就是由于低温环境下保藏较长时间所致,因此应改变我们常规保藏菌种的方法,采用真空冻干或甘油肉汤超低温冷冻保藏菌种较为理想。

细菌非可培养生命现象的发现,使我们重新思考细菌的这种生命现象与人类公共健康的关系。如公共卫生学的粪便污染检测、食品的微生物检测、遗传工程中细菌向环境释放的安全性问题、霍乱弧菌的越冬机制以及菌种保藏技术等,因为这些微生物检测都是建立在培养基培养基础上,而培养法检测不出 VBNC 状态的细菌,这将对人类健康构成威

胁。本次 7 株 ETEC 均为腹泻疫情病例及外环境中分离到,致病性较强,在复苏过程中实验小白鼠均出现不同程度的畏寒、颤抖、竖毛、无运动能力或运动明显减退等症状,而且解剖发现实验组小鼠均有肠腔积液,这些现象说明致病菌在 VBNC 下仍存在一定的致病力。

人们在研究霍乱弧菌的越冬模式时提出了多种说法,但都不够理想,用“非可培养状态”存在理论可以较合理地解释其越冬机制,也是目前细菌学研究者认同的观点^[7,8]。本实验室发现的这 7 株非可培养状态菌,同样说明 ETEC 也可以“非可培养状态”越冬,等来年气温回升时再通过某一途径复苏,恢复生长繁殖继续危害人类健康。病原菌可能以“非可培养状态”存在,条件符合其生长繁殖时再次袭击人类健康,这也可能是有些疫源地反复出现疫情的原因之一。

科学家在实验室条件下试图通过改变温度、pH 值、盐度、维生素、氨基酸、添加粪便提取物使 VBNC 复苏生长,但都没有成功。大多数实验者是通过家兔肠腔完成复苏过程^[7],肠菌属的某些菌在去甲肾上腺素应激反应中分泌的生长诱导物能使 VBNC 状态的肠出血性大肠埃希菌恢复生长繁殖能力,变回可培养状态^[9]。本研究的 7 株非可培养状态菌是通过小鼠肠腔复苏的。这些实验提示,水环境中鱼类等生物体肠腔可能成为 VBNC 复苏的天然“培养基”,因此对复苏过程应深入研究,更好地预防疾病。

参 考 文 献

- 1 刘秉阳. 医学细菌学 过去 现在 未来(上). 北京:中国科学技术出版社,1989. 174-192.
- 2 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术. 北京:人民卫生出版社,2002. 49-50.
- 3 Ashley PD, James DO. Changes in membrane fatty acid composition during entry of vibriovulnificus into the viable but nonculturable state. J Microbiol, 2004, 42: 69-73.
- 4 Susana PA, Rosa F, Mari'a J, et al. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. Microbiology, 2003, 149: 369-375.
- 5 Mark AR, Martin FP, Eelin L, et al. Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5469-5476.
- 6 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. 微生物学通报, 2004, 31: 108-111.
- 7 许兵, 徐怀恕, 纪尚伟, 等. 活的非可培养状态霍乱弧菌的复苏. 青岛海洋大学学报, 1994, 24: 187-189.
- 8 徐怀恕, 黄备, 祁自忠, 等. 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的细胞形态研究. 活的非可培养状态细胞. 青岛海洋大学学报, 1997, 27: 187-190.
- 9 Reissbrodt R, Rienecker I, Romanova JM, et al. Resuscitation of *Salmonella enterica* Serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4788-4794.

(收稿日期:2005-05-19)

(本文编辑:孙强正)