

# 开发未可培养微生物技术的研究进展

孙晓媛 李 影 钱爱东\*

(吉林农业大学动物科技学院 长春 130118)

**摘要:** 细菌的“活的非可培养状态”(VBNC, viable but nonculturable)发现于 20 世纪 80 年代, 处于此状态的细菌不但丧失了培养基上生长繁殖的能力, 而且具有与原菌相似的致病性, 成为可以逃避检测的“隐性”传染源, 对周围的环境及人类安全构成潜在威胁。作为公认的未可培养微生物, 它一直是预防医学、流行病学、微生物生态学以及公共卫生检验检疫方面研究的热点问题之一。现代分子生物学技术和基因组学的深入研究, 为开发环境中的未可培养微生物提供了新的研究方法和机遇。其中遗传指纹图谱技术、宏基因组技术显示出一定的优势, 同时, 随着各种细菌的非可培养状态的实验室模型已日臻成熟, 这为开发和利用未可培养微生物资源提供了新的研究思路。

**关键词:** VBNC, 未可培养微生物, 宏基因组学, 遗传指纹图谱技术

## Advance in Technique on the Development of Uncultured Microorganism

SUN Xiao-Yuan LI Ying QIAN Ai-Dong\*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

**Abstract:** Viable but non-culturable state in bacterial cells as received uncultured microorganism has become the fundamental research issues in medical microbiology, epidemiology, general microbial ecology and sanitation quarantine since it was put forward in 1982. When in this state, bacterium are no longer able to grow and form colonies on conventional culture media, but maintain their pathogenicity, may become latent infection escaping detection to threaten environment and human security. With the development of modern molecular biology technique and metagenomics, it provide new research method and opportunity for uncultured microorganism in the environment. Recently, with the application of the metagenome technique, genetic fingerprinting technical etc, it becomes more and more popular. Simultaneously, along with this state become maturity in the laboratory. It provides a new research route for development and exploitation the uncultured microorganism.

**Keywords:** VBNC, Uncultured microorganism, Metagenomics, Genetic fingerprinting technical

环境中存在着大量的微生物, 长期以来是依靠纯培养技术研究微生物的, 然而绝大多数种类的微生物因为不能培养而无法被了解, 严重地限制了人们对微生物的认识。许多未知细菌是以前从未培养

过的, 缺乏再现环境条件的方法和培养基质, 造成了大多数微生物难以被实验室标准方法复苏和培养, 成为未可培养微生物(uncultured microorganism)<sup>[1]</sup>。目前用于开发未可培养微生物的方法有多种, 如: 宏基因组技术、遗传指纹图谱技术、VBNC 菌技术等等。现将各项技术综述如下:

## 1 宏基因组技术

“宏基因组(Metagenome)”是由 Handelsman 等<sup>[2]</sup>1998 年提出的, 它包含了比可培养微生物大得多的遗传信息, 其定义为生境中全部微小生物遗传物质的总和, 最初用来定义土壤细菌混合基因组。所谓宏基因组学就是利用现代基因组技术针对宏基因组进行系统研究, 一般是分析微生物在环境中的基因组集合, 直接分离未培养微生物基因组 DNA, 克隆到可培养微生物中, 最后筛选所需的克隆。

通过宏基因组技术我们已经获得大量的新基因, 而且从宏基因组文库中获得的大量信息可以有效的丰富工业(开发新型生物催化剂)、农业、医学以及环境生态等各个领域, 并且带来了很多应用的可能。Berry<sup>[3]</sup>、Courtois<sup>[4]</sup>等运用宏基因组技术对未知微生物做了相应的研究, 同时对该项技术的应用起到了促进作用。然而, 宏基因组的实际应用还受到许多技术和方法的限制, 如宏基因组文库的建立和筛选手段等, 另外异源表达的相关问题也是限制其成功与否的关键。常规的检出方法昂贵且费时。相信随着这一技术的不断完善和发展, 我们能建立更加快速、方便、有效的方法来开发未可培养微生物资源。

## 2 遗传指纹图谱技术

核酸指纹图谱技术即 DNA 指纹图谱法是 1985 年由 Jeffreys 等<sup>[5]</sup>提出, 它是通过用限制性内切酶消化和与特异的核心探针杂交取得不同大小的 DNA 片段的多点区带图谱, 并与另一个 DNA 图谱比较以评价其相似性的技术, 是对多点带图谱中个体的特异性进行评价的方法。此项技术已经广泛的应用于微生物学和生态学中, 余育和等<sup>[6]</sup>运用 DNA 指纹分析技术对群落生命系统进行了分析, 并取得了一定的成果。而且从中可以看出其优点是不受显隐性关系、环境和发育阶段的影响, 允许同时进行多样本

分析, 这为研究未可培养微生物提供了行之有效的办法。该技术的不足是过于依赖内切酶的选用, 同时由于方法繁杂、周期长、实验条件高等缺陷而无法大范围推广, 对复杂微生物群落进行 DNA 分析时, 得到的信息过大, 图谱中的谱带较多, 各带强度不一, 不利于分析, 较难判断等位基因等。因此, 微生物生态中使用的指纹图谱技术各有优缺点, 我们可以在各项技术的优缺点中总结出合适的实验技术, 从而更好的为我们认识未知微生物打开方便之门。

### 2.1 梯度凝胶电泳技术

变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)由 Fisher 和 Lerman<sup>[7]</sup>于 1983 年创立, 以后该技术和 PCR 技术相结合被广泛应用于各种突变分析。它主要是利用梯度变性胶来分离 DNA 片段。1993 年 Muyzer 等<sup>[8]</sup>首次将 DGGE 用于微生物生态学研究, 更加完整和准确地描述了微生物种群多样性、数量比例和系统进化等。该方法经过改进, 又发展出了温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)、瞬时温度梯度电泳(Temporal Temperature Gradient Electrophoresis, TTGE)、和恒定变性凝胶电泳(Constant Denaturant Gel Electrophoresis, CDGE)。

该方法具有分辨率高、重现性好、方便快捷等优点, 不但避免了传统上耗时多的菌种分离, 而且可以对群落中无法培养的可能成员进行鉴定、追踪, 被广泛地应用于微生物群落多样性和动态性的分析, 该技术的发展还可以促进其它基因指纹技术的发展。DGGE 技术的应用在国内还处于初步阶段, 还有一定的局限性, 例如它不能提供有关微生物活性的信息、待测样品的预处理是实验误差的主要来源等等, 很多都会影响到 DGGE 的分析结果。不过若能充分了解 DGGE 的技术原理和局限性, 再结合其他的分子生物学技术, 就能更好的为开发微生态学提供可靠的技术。

### 2.2 核酸杂交技术

核酸杂交技术是 70 年代发展起来的一种崭新的分子生物学技术, 即根据 DNA 分子碱基互补配对的原理, 以一特异性的 cDNA 探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。它包括籽粒 DNA 印迹杂交、狭线印迹杂交法、斑点杂交法等。

该法具有高度的特异性和灵敏度, 而且快速简

便。所以近年来核酸杂交技术已成为检测环境微生物的有力手段之一。其中荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息,可以对环境中的不同微生物进行检测和鉴定,尤其是对难培养和未被培养的微生物进行检测。此方法具有快速、简便、精确等优点。但是它也有缺点,它不能提供微生物的形态学、数量、空间分布和细胞环境的信息。近年来,绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)分子应用到微生物生态学中,为 FISH 技术的应用得到进一步的提高。

### 2.3 其它技术

PCR 技术的原理是体外扩增核酸序列获得多个核酸拷贝,包括对双链 DNA 的直接测序或克隆后测序。它包括以下 3 种方法:嵌套式 PCR、PCR 扩增、竞争性 PCR。此外还有核酸探针检测技术,它是能与特定核苷酸序列发生特异性互补的已知核酸片段作探针为有效方式标记,即利用探针的灵敏检测杂交结果,分辨样品中待定 DNA 序列。主要有稳定同位素探针法、寡聚核苷酸探针法、16S rRNA 扩增和测序、16S rDNA 直接过核苷酸探针等技术。可确定某分离物为某一分类单元或证明为新一类单元,为检测未知菌提供了有效的方法。

分子生物学技术最大的优点是直接从样品中提取总 DNA,中间没有任何筛选性的过程,因此所得 DNA 能够准确地反映样品中微生物的实际情况,避免了传统培养方法不能真实反映微生态实际情况的缺点,也不会丢失样品中存在的任何微生物,能够对某一微生物在环境下存在的含量做出估计,对研究未可培养微生物资源,发现新基因及其他生物活性物质的基因有着非常重要的意义。尽管分子生物学技术已经获得了广泛的应用,并且取得了一系列的重要研究成果,但作为新兴技术,还存在许多不足,例如:获取的信息大、分析的样本多、微生物的个体信息不具体、无法获得系统发育信息、不能得到未知菌的菌体、对于细菌的代谢机制不能清楚地了解、有的仪器价格昂贵、一些药品的价格问题等等,给微生物学技术的发挥带来一定的困难。相信这些不足在技术的不断发展中能够得到完善进而加以解决。

## 3 VBNC 菌在开发未可培养微生物中的应用

VBNC(viable but nonculturable)是公认的未培养微生物,1982 年徐怀恕<sup>[9]</sup>等人通过对霍乱弧菌和大肠杆菌存活规律的研究,并首次发现并提出了细菌“活的非可培养状态(viable but non-culturable state, VBNC)”即细菌在不良环境条件下,细胞缩成球形,用常规方法(平板法、最大可能近似值法)培养不能生长繁殖,但仍然具有代谢活性,是活的一种特殊存在形式。细菌 VBNC 状态自上世纪 80 年代发现至今,受到极大的关注。随着研究的深入,具有 VBNC 状态的细菌的种类越来越多,到现在为止已报道将近 60 多种细菌<sup>[10,11]</sup>进入 VBNC 状态。其中包括许多对人体有害的病原菌,一些病原菌在 VBNC 状态下仍然具有致病性,从而对人类的安全构成威胁。

随着研究的深入,VBNC 菌实验室模型已经日臻成熟。自发现细菌活的非可培养(VBNC)状态以来,已陆续有大量不同细菌能进入 VBNC 状态的研究报道<sup>[12]</sup>。Timothy 等<sup>[13]</sup>研究类鼻疽假单胞菌在自然环境中的各种因素下:如渗透压、寡营养、高/低温、高压、pH 值、氧气浓度、光照强度或盐度的剧烈变化等一些环境因子的改变对细菌进入 VBNC 状态有一定的影响。VBNC 状态下细菌可能发生一系列变化,包括细胞形态变化、细胞成分、DNA 排列方式、ATP 含量的改变、呼吸频率、代谢活性、大分子的合成、基因的表达以及在固体或液体培养基中生长繁殖能力的改变<sup>[31-43]</sup>等,而可能最终导致细菌进入 VBNC 状态。

### 3.1 诱导

各种理化因素中,温度可能是诱导细菌进入 VBNC 状态最为显著的因子,同时也伴随其他条件的改变,如寡营养环境(人工海水)等。不同的细菌,甚至同一种细菌的不同菌株进入 VBNC 状态的条件也不尽相同。通常弧菌受低温影响明显,而其它细菌对高温似乎更加敏感。同时盐度对细菌的生存影响也很大。

杜萌等<sup>[14]</sup>采用 4℃ 灭菌海水培养迟钝爱德华菌 CW7 株于 28 d 后平板计数结果小于 0.1 CFU/mL,而活菌数却始终保持在 10<sup>9</sup> CFU/mL,表明该菌已经

进入 VBNC 状态, 同时可在鸡胚或者营养丰富且温度回升的培养基中得到复苏, 复苏后仍然具有致病性; 同年杜萌等<sup>[15]</sup>将溶藻弧菌 VIB283 用灭菌的海水在 4℃ 孵育 90 d 后, 平板计数结果小于 0.1 CFU/mL 并且活菌数始终保持在  $10^9$  CFU/mL~ $10^{10}$  CFU/mL, 表明此菌进入 VBNC 状态, 温度转换后可以使菌在 16 h 或 8 d 内复苏, 复苏后的菌株与原菌大多没有差异, 同样具有致病性; Ben Smith 和 James D Oliver 等<sup>[16]</sup>低温诱导一种嗜盐弧菌进入 VBNC 状态, 并首次报道进入 VBNC 状态后, 在温海水中培养嗜盐弧菌其 *vvhA*(hemolysin) 基因的表达对形成细胞膜是必需的。厌氧菌暴露在空气中时会进入休眠状态, 如 Rollins 和 Colwell 指出空肠弯曲杆菌处于振荡培养中相对静止培养可以很快进入 VBNC 状态, 此现象表明氧胁迫对细菌尤其是肠道菌存活状态有一定的影响。最近 Caroline Cuny 等<sup>[17]</sup>经研究证明将大肠杆菌由液体培养基转入固体培养基中, 由于氧化应激的作用, 使大肠杆菌进入 VBNC 状态。

### 3.2 复苏

VBNC 菌进入可培养状态的过程称为“复苏”。在复苏期间, 其细胞的形态及数量均要发生显著的变化。从诱导的研究近况来看, 某些直接逆转不利条件可使 VBNC 细菌复苏, 例如: 培养温度恢复到正常条件、在培养基中加入某些营养盐、对因盐度过高而进入 VBNC 状态的某些细菌添加保护剂等。有的研究表明 VBNC 细菌转入宿主体内孵育, 可以使其得到复苏。更有人利用“鲑鱼效应”来促进 VBNC 细菌的复苏。但复苏不是简单的诱导的逆过程, 它是一个极其复杂的过程, 目前尚无可使所有 VBNC 细菌都得到复苏的报道。

### 3.3 检测

目前, 分子生物学技术包括基因探针、分子杂交和 PCR 等已经广泛地应用到 VBNC 细菌的检测中, 因为当细菌处于 VBNC 状态时, 仍能启动某些基因使其表达, 如霍乱弧菌的 *vvh* 基因、肠球菌的 *pbp5* 基因、真菌或霉菌的 *act* 基因。Gunnar 等<sup>[18]</sup>在 NASBA 分析检测水样中的 *V. cholerae* 时, 运用了即时核酸序列依赖的扩增方法, 此方法能快速简洁的检测出 VBNC 状态下霍乱弧菌的毒力基因 *tcpA* 和 *ctxA*。近年来, DNA 指纹图谱技术也广泛应用到

VBNC 菌的检测<sup>[19]</sup>。

## 4 结语

随着各项技术的深入研究与发展, 人们对未可培养微生物的认识更加深入。根据现有的成熟的未可培养微生物的检测方法即 VBNC 细菌的检测方法, 它在随着分子生物学技术的发展而进步, 也日渐成为人们探索的热点, VBNC 菌作为自然环境中的一种公认的不可培养菌, 很有可能是其在极端环境下或是恶劣条件下, 其基因发生了某些变化而导致其进入不可培养状态, 但是仍然具有微弱的代谢活性。畜产品中的食源性病原菌一旦进入这种状态常会造成漏检, 从而引起严重的公共卫生危机, 所以建立一种针对畜产品相关病原菌 VBNC 状态的检测方法, 对保障动物食品的安全以及人类健康势在必行。由此我们更应该利用现有的成熟的实验室中的 VBNC 菌的模型来建立细菌 VBNC 基因的检测方法。根据实验室中的 VBNC 菌的研究进展, 我们有理由相信在自然环境中的大多非可培养菌具有相同的一组或几组基因, 可以在实验室中的成熟 VBNC 菌模型中寻找相同的基因, 设计探针来检测环境中的非可培养菌, 特别是进入了 VBNC 状态的食源性病原菌, 同时, 也可为我们认识自然界中非可培养微生物提供一项新的研究路线。

## 参考文献

- [1] Newman DK, Banfield JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 2002, **296**: 1071-1077.
- [2] Handelman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* Molecular biological access to the hem is try of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Dying Chem Biol*, 1998, **5**(10): 245-249.
- [3] Berry AE, Chiochini C, Selby T, *et al.* Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **223**: 15-20.
- [4] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, *et al.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 49-5549.
- [5] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature*, 1985, **314**: 67-73.
- [6] 余育和, 张文静, 颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级

- 生命系统应用的可能性. 水生生物学报, 2004, 28: 457-463.
- [7] Fisher SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1579-1583.
- [8] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
- [9] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, et al. Sunr and viability of nonculmmbc *Escherichia coil* and *Vibrio cholerar* in the csturne and nl&nnc environment. *Microb Ecol*, 1982, 8(4): 313-323.
- [10] James D Oliver. The wiable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 2005, pp.93-100.
- [11] Ben Smith, James D Oliver. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, pp. 1445-1451.
- [12] 郑桂丽, 廖绍安, 翟俊辉, 等. 环境中“活的非可培养 (VBNC)”细菌的研究进展. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(4): 58-66.
- [13] Timothy J, Inglis J, Jose-Luis Sagripanti. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov, 2006, pp.6865-6875.
- [14] Meng Du, Jixiang Chen, Xiaohua Zhang, et al. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, pp. 1349-1354.
- [15] Du M, Chen J, Zhang X, et al. Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch Microbiol*, 2007, 188(3): 283-288.
- [16] Ben Smith, James D Oliver. *In situ* gene expression by *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental Microbiology*, 2006, pp. 2244-2246.
- [17] Caroline Cuny, Maïale`ne Lesbats, Sam Dukan. Induction of a global stress response during the first step of *Escherichia coli* plate growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, pp. 885-889.
- [18] Else M Fykse, Gunnar Skogan, William Davies, et al. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, pp. 1457-1466.
- [19] Satoshi Ishii, Tao Yan, Dawn A Shively, et al. *Cladophora* (*Chlorophyta*) spp. harbor human bacterial pathogens in nearshore water of lake michigan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, pp. 4545-4553.

## 科技信息

### 引发头皮屑“元凶”查明

头皮屑几乎每个人都有,搔痒抓梳一会就像细雪花那样纷纷落地。引发头皮屑的“元凶”就是一种真菌,其学名叫“*Malasszia globosa*”(译为“球状鳞斑霉”),它以头皮中的脂肪为食,刺激皮肤,造成成片的细胞像雪花状脱落,找到其“元凶”为治疗这种皮肤病将提供新方法。这种真菌产生一种酶导致皮肤过敏,易引发头皮屑的发生,研究人员测定了该菌的基因组,引发头皮屑的真菌酶不只是一种,至目前为止,已找到14种与头皮屑有关的酶,有助于为针对性地开发酶抑制药物提供新途径。

(柯为 供稿)