

植物乳杆菌活的非可培养状态的初步研究

金磊, 王丽, 钟青萍*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

摘要:利用16S rDNA序列分析法测得实验室保藏的乳酸菌的16S rDNA序列,并与基因库中基因序列进行同源性比较,经鉴定此菌为植物乳杆菌。并研究了植物乳杆菌进入活的非可培养状态(Viable but Non-culturable, VBNC)的诱导条件和复苏条件。结果显示,在诱导条件为MRS液体培养基、pH5.5~6.2、温度-20℃和有氧环境时,植物乳杆菌在12d之后进入了VBNC状态;复苏条件为添加有6%吐温-80的MRS液体培养基和普通MRS液体培养基分别在48h和96h之内可以使VBNC的植物乳杆菌复苏。

关键词:植物乳杆菌, 16S rDNA, 活的非可培养状态, 诱导, 复苏

Preliminary study on the viable but non-culturable state of *Lactobacillus plantarum*

JIN Lei, WANG Li, ZHONG Qing-ping*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The 16S rDNA sequence of an unidentified lactic acid bacteria was measured by 16S rDNA sequence analysis method, and compared the gene sequences homology with the gene pool, and the bacterium was identified as *Lactobacillus plantarum*. Conditions to induce *Lactobacillus plantarum* into viable but non-culturable (VBNC) and the resuscitation conditions were studied. Results showed that when the bacterium was induced in the condition of aerobic, -20℃, in MRS liquid medium, pH5.5~6.2 the bacterium entered VBNC state in 12d. *Lactobacillus plantarum* could resuscitate from VBNC state when it was incubated in MRS liquid medium added with 6% tween-80 and the MRS liquid medium added with nothing in 48h and 96h respectively.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; 16S rDNA; viable but non-culturable; induce; resuscitate

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)16-0187-04

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 是乳酸菌的一种, 革兰氏染色阳性、厌氧、无芽孢、耐酸、耐胆盐。植物乳杆菌与人类的生活密切相关, 是一种常见于乳制品、肉类、蔬菜以及果汁中的乳酸菌, 能通过胃肠并定植于肠道发挥有益作用^[1]。有研究表明, 植物乳杆菌对人体和动物具有多种保健功能, 主要包括免疫调节作用、对致病菌的拮抗作用、降低血清胆固醇含量及预防心血管疾病的作用, 还具有维持肠道内菌群平衡、促进营养物质吸收、缓解乳糖不耐症及抑制肿瘤细胞的形成等多种功能。植物乳杆菌在食品、饲料、医疗保健、化妆品、生物防腐剂、益生菌

制剂等多方面有较好的应用前景^[2]。细菌的活的非可培养 (Viable But Non-culturable, VBNC) 状态是指在不良环境条件下细菌细胞形态发生改变, 通常浓缩成球状, 用常规培养法无法检出, 却在一定条件下可以复苏并仍具有生物活性、毒性或致病性的一种特殊生理状态^[3], 是细菌抵抗恶劣生存环境的一种自我保护状态。该状态自从20世纪80年代被发现以来, 受到微生物学界的极大关注, 这不仅为环境中微生物多样性的发展提供了新的线索, 而且对预防兽医学、疫病流行病学及公共卫生学等方面具有重要的意义^[4]。诱导细菌进入VBNC的因素有很多。常见诱导微生物进入VBNC状态的因素可分为物理因素 (如温度、湿度、氧气浓度、光照强度等)、化学因素 (营养成分、有害化学物质)^[5]及生物因素^[6]。细菌从VBNC状态退出, 进入可培养状态的过程称之为复苏。复苏是VBNC细菌的鲜明特征, 是VBNC概念成立的先决因

收稿日期: 2013-01-21 * 通讯联系人

作者简介: 金磊 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271956); 国家自然科学基金基金青年项目 (31000781)。

[14] 孔繁东, 安家彦, 孙浩, 等. 草莓酒发酵过程中成分组成及色度变化[J]. 酿酒科技, 2000(5): 80-82.

[15] 杨雅利, 沈海亮, 阚建全. 紫色甘薯酒香气成分分析和发

酵规律[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 242-246.

[16] 吕慧威, 孙玉梅, 卢明春, 等. 自选酵母菌株草莓酒发酵特性比较[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 197-201.

素。然而大量研究表明,复苏是一个极为复杂的过程,不是简单地诱导的逆过程,这就决定了复苏条件的筛选并非易事^[7]。常见的复苏方法有升温法、添加有机物法、富营养法、生物法等^[8]。细菌VBNC状态的研究初期是针对环境中的细菌,而近年研究发现,很多致病菌可进入VBNC状态,已报道能进入VBNC状态的细菌达60多种,其中常见的病原菌主要包括大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、空肠弯曲杆菌等^[9-10],但有关益生菌植物乳杆菌的VBNC状态的研究在国内外尚属首次,本文对植物乳杆菌的VBNC状态进行了初步研究,为了找出诱导植物乳杆菌进入VBNC的影响因素,笔者根据对该菌生长有重大影响的四种因素设计诱导方案。并且为了使VBNC的植物乳杆菌尽快复苏,建立了多种复苏方案。为植物乳杆菌的保藏及VBNC植物乳杆菌的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

乳酸菌 华南农业大学食品学院保藏的;MRS液体培养基 蛋白胨10g,牛肉膏10g,酵母提取粉5g,磷酸氢二钾2g,柠檬酸二铵2g,乙酸钠5g,无水葡萄糖20g,吐温-80 1mL, MgSO₄·7H₂O 0.58g, MnSO₄·4H₂O 0.25g, 蒸馏水1000mL;琼脂粉、2×Taq酶PCR Mix Takara公司;DNA回收纯化试剂盒 上海捷瑞生物工程有限公司;TE溶液,STE溶液,20% SDS,高氯酸钠,氯仿,异戊醇,无水乙醇,NaCl,无菌水,琼脂糖,新鲜牛奶。

752型紫外分光光度计 上海精密仪器有限公司;扫描电镜 德国TVIPS公司;5417R型高速冷冻离心机 德国Eppendorf股份有限公司;梯度PCR仪 德国Biometra公司;Gel Doc 2000凝胶成像系统 美国Bio-RAD公司;150A型恒温培养箱 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;BCD-216SCM型低温冰箱 青岛海尔集团公司;TH2-C型气浴恒温摇床 江苏省金坛市医疗器械厂;YX280A型高压蒸汽灭菌锅 上海三申医疗有限公司;精密PHS-3C型pH计 上海雷磁仪器厂。

1.2 菌株的16S rDNA扩增及鉴定

PCR扩增引物采用细菌通用引物,即27-F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1541-R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3',其PCR扩增片段约为1500bp。利用细菌总DNA提取法——氯仿法^[11]提取新鲜细菌的总DNA。在PCR反应体系中依次加入2×Taq酶PCR Mix 25μL,上下游引物(10μmol/L)均为1μL,模板DNA 1μL,最后用灭菌双蒸水补至50μL,反应设水为空白对照。按95℃ 5min;(94℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 90s)33个循环;72℃ 10min。扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,并用BioFlux公司的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收。PCR产物由华大基因公司测序,应用在线Blast进行物种分类鉴定。

1.3 VBNC状态的诱导

根据营养条件、pH、温度、氧四种诱导因素设计混合正交表(见表1)。营养条件包括MRS液体培养

基、灭菌生理盐水和新鲜灭菌牛奶。pH条件有pH2~3、pH5.5~6.2、pH9~10。温度条件有-20、4、25℃。无氧条件采用灭菌液体石蜡液封法和反口胶塞隔绝氧气。其中牛奶遇酸、遇碱和在25℃条件下易变性。建立的混合正交表如表1所示。取处于对数生长期的菌液1mL于无菌的1.5mL离心管中,6000r/min离心5min,弃上清液,菌体用灭菌生理盐水清洗2次,以无菌生理盐水溶解,分别置于200mL的不同基质中,混匀,按方案要求静置诱导。

表1 诱导乳酸菌进入VBNC状态的方案

Table 1 The scheme to induce lactic acid bacteria into VBNC

诱导方案	营养条件	氧气条件	pH	温度(℃)
1	MRS液体培养基	无氧	2~3	4
2	MRS液体培养基	有氧	5.5~6.2	-20
3	MRS液体培养基	无氧	9~10	25
4	灭菌生理盐水	无氧	5.5~6.2	25
5	灭菌生理盐水	有氧	9~10	4
6	灭菌生理盐水	无氧	2~3	-20
7	灭菌生理盐水	无氧	9~10	-20
8	灭菌生理盐水	有氧	2~3	25
9	灭菌生理盐水	无氧	5.5~6.2	4
10	灭菌新鲜牛奶	无氧	-	4
11	灭菌新鲜牛奶	无氧	-	-20

注:-表示无需调节。

1.4 可培养菌落数测定

取菌液1mL,进行10倍梯度稀释,然后取100μL适当稀释度的菌液涂于MRS琼脂平板上,37℃培养,观察计数。当平板无菌落生长时,加大接种量,仍须连续培养3次,若无菌落生长,则进入VBNC状态。

1.5 VBNC细菌的复苏

在添加有各种营养物质的MRS液体培养基中接种诱导方案中无法在平板上生长的乳酸菌,在适宜温度、pH和有氧条件下诱导复苏。营养条件包括添加有6%吐温-80、6%维生素C、6%维生素B₂、6%吐温-20的MRS液体培养基和未添加额外营养物的MRS液体培养基以及新鲜灭菌牛奶。

取1mL进入VBNC状态的乳酸菌,于无菌的1.5mL离心管中,6000r/min离心5min,弃上清,用灭菌生理盐水清洗2次,菌体用无菌生理盐水溶解,置于100mL含基质的三角瓶中,混匀,37℃条件下培养。并每隔24h取样,对样品进行梯度稀释,取合适梯度的稀释液进行平板计数,观察是否有菌落生长。

1.6 扫描电镜观察

分别取正常状态、活的非可培养状态和复苏之后的乳酸菌,以扫描电镜观察处理后的样品。样品的处理及电镜的观察按扫描电镜的操作要求进行。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA法对菌株分类鉴定

菌株的16S rDNA PCR电泳图如图1所示,条带在1000~2000bp之间,约为1500bp。

经测序后,得到目的片段大小为1490bp的序列,

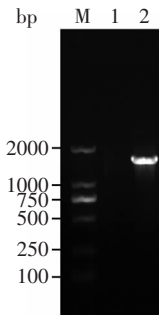


图1 乳酸菌PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of lactic acid bacteria

注: M: Marker; 1: 空白对照; 2: 待鉴定乳酸菌。

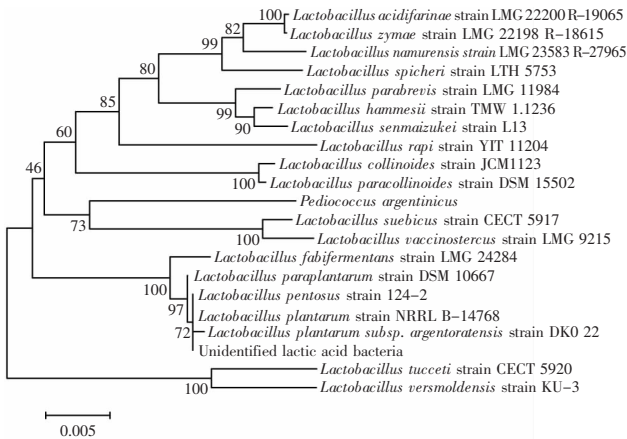


图2 菌种系统发育树

Fig.2 The system development tree of the strain

将测序结果提交至GenBank, 与相关序列的BLAST比对结果表明, 待鉴定乳杆菌与植物乳杆菌的序列同源性均高达99%。选取在BLAST比对结果中排名前20的菌株作为标准菌株, 利用MEGA 5软件基于16S rDNA序列同源性采取N-J法构建系统发育树(如图2)。其中, Bootstrap选择1000次重复。从系统进化树也可以看出, 待鉴定乳酸菌与植物乳杆菌菌株NRRL B-14768 (*Lactobacillus plantarum* strain NRRL B-14768) 位于同一个分支水平且距离最接近, 具有很高的同源性。因此鉴定该乳酸菌属于植物乳杆菌。

2.2 植物乳杆菌的VBNC状态的诱导

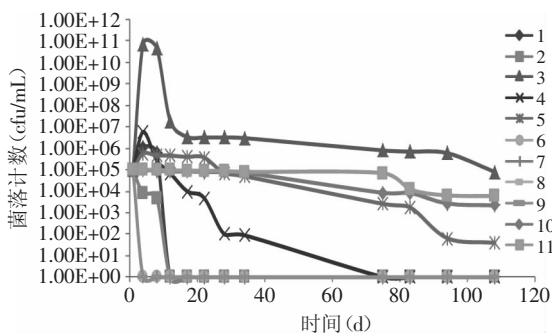


图3 植物乳杆菌的诱导曲线

Fig.3 The induced curves of *Lactobacillus plantarum*

注: 1~11代表相应的诱导方案编号。

以时间为横轴, 可培养菌落数为纵轴, 绘制乳酸菌的诱导曲线(图3)。从图3中可以看出, 方案3、5、10、11号在诱导超过100d之后仍然有菌落生长, 由于诱导时间有限, 因此无法断定这些方案是否能使乳酸菌诱导进入VBNC状态。剩余的7个诱导方案在诱导100d之后, 均无可培养的菌落生长。可知, 第1、2、4、6、7、8、9号诱导方案中的乳酸菌可能进入了VBNC状态或者死亡。其中, 第6、7、8、9号诱导方案中的乳酸菌在接种后的第4d即无菌落生长, 它们的诱导曲线重合。

2.3 VBNC乳酸菌的复苏

对第1、2、4、6、7、8、9号诱导方案中的乳酸菌分别进行复苏实验。除了2号方案中的乳酸菌可以复苏之外, 其他方案均无法复苏。因此可知第2号方案能诱导植物乳杆菌进入VBNC状态, 且诱导进入VBNC状态的时间是12d, 其余6个方案中的植物乳杆菌死亡。其中从对2号诱导方案中的乳酸菌的复苏实验得知, 添加有6%吐温-80的MRS液体培养基能在48h内使VBNC状态的乳酸菌复苏, 未添加任何额外营养物质的MRS液体培养基能在96h内使VBNC状态的乳酸菌复苏。添加有维生素C、维生素B₂、吐温-20的MRS液体培养基以及新鲜牛奶均无法使VBNC状态的乳酸菌复苏, 说明这些营养物质可能对植物乳杆菌的复苏有抑制作用。灭菌的新鲜牛奶也无法使VBNC状态的植物乳杆菌复苏, 说明VBNC状态的植物乳杆菌对营养环境的要求很高。

从第4、6、7、8、9号诱导方案可知, 在生理盐水中, 植物乳杆菌很难进入VBNC状态而更易死亡。从第5号方案可知, 在高碱度环境下, 植物乳杆菌可能通过自身调节, 降低pH环境, 适宜自身生长。从第6号和8号可知, 在低酸度条件下, 植物乳杆菌很快进入死亡, 可能是因为低酸度环境使MRS液体培养基发生了变质, 乳杆菌因缺乏营养而无法存活。在室温条件下, 植物乳杆菌生理活性较强, 消耗营养, 大量繁殖, 很难进入VBNC状态。

2.4 扫描电镜观察

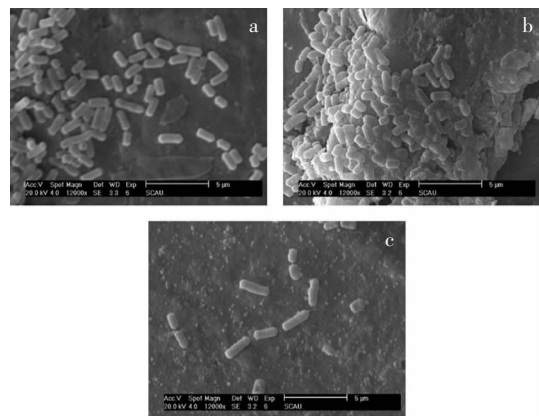


图4 扫描电镜下不同状态的植物乳杆菌的形态特征(12000×)

Fig.4 Morphological characteristics of different states of *Lactobacillus plantarum* under scanning electron microscope (12000×)

注: a: 正常状态的植物乳杆菌; b: VBNC状态的植物乳杆菌; c: 复苏之后的植物乳杆菌。

分别取正常状态、活的非可培养状态和复苏之后的植物乳杆菌在扫描电镜下进行观察,发现VBNC状态的植物乳杆菌细胞发生了形态变化。从图4中可以看出:正常状态下的植物乳杆菌呈长杆状,且排列较分散;而进入VBNC状态的植物乳杆菌体积较正常状态的植物乳杆菌普遍变小,趋于球形,菌体较聚集,且细胞结构完整;复苏之后的植物乳杆菌恢复成了正常状态的长杆状,与原始植物乳杆菌几乎无差别。国内外对不同菌的VBNC状态的形态研究^[12-13]均表明,当细菌进入VBNC状态后,其菌体细胞变成球形,且体积缩小,复苏后的细胞形态大小与正常状态相同,细胞的结构完整。

从形态上的变化可以看出,当植物乳杆菌处于不利于生长的条件下,其必定存在一种生存机制,使其适应环境的变化。表现在形态上就是菌体变小,趋于球形。当环境适宜,又会恢复到正常状态。

3 结论与讨论

16S rDNA序列分析法能快速对未知菌进行鉴定分析。本研究中,所得16S rDNA序列利用NCBI在线比对分析发现,其序列与植物乳杆菌序列同源性高达99%,同时建立了此菌的系统发育树。结果表明,此法可以实现对乳酸菌种属水平的鉴定,适合实验室及工业生产中乳酸菌的鉴定。

根据营养条件、pH、温度、氧四种因素设计了11种诱导植物乳杆菌进入活的VBNC的诱导方案。但只有第2号诱导方案,即当诱导条件为MRS液体培养基,pH5.5~6.2,温度-20℃和有氧条件时,植物乳杆菌在12d之后进入了VBNC状态。从诱导实验可知,营养条件、适宜的pH、低温对植物乳杆菌进入VBNC起很重要的影响。在设计6种复苏方案中,只有添加有6%吐温-80的MRS液体培养基和普通MRS液体培养基分别在48h和96h之内使VBNC的植物乳杆菌复苏。由此可见,吐温-80是一种优良的能快速使VBNC乳杆菌复苏的促进剂。植物乳杆菌VBNC状态的诱导和复苏实验,为今后植物乳杆菌的更加广泛应用提供了参考依据。

利用扫描电镜观察到VBNC的植物乳杆菌比正常状态和复苏之后的菌体体型略小且偏向于球形,复苏之后的菌体与正常状态的菌体形态基本无异。从本研究可以看出,细菌的VBNC状态与细菌的死亡不是同一概念,不可混为一谈。VBNC状态不是细菌的死亡状态,在环境适宜条件下,VBNC细菌是可以重新复苏,恢复成与正常细菌基本相同的状态。细菌的VBNC状态这一变化表明,VBNC状态的植物乳杆菌必定在其生理特征方面亦发生了变化。细菌的VBNC状态作为细菌在不适环境下生存的一种机制,这种机制有利于生物的繁衍。尽管近年来有许多关于细菌VBNC的机理研究报道^[14-16],但还是无法完全解释清楚。而有关乳酸菌的VBNC的研究报道很少,还有待于后续的深入研究。

研究植物乳杆菌的VBNC状态,在国内外研究中尚属首次。VBNC状态下的益生菌保藏时间更长且保

藏条件更加廉价方便。采用全新的研究思路和某一特殊的技术手段,将细菌活的非可培养状态这一特性引入到微生态制剂^[17]的研究之中,为长效生物制剂的生产找到一种生产工艺更简单方便、成本更低廉、保存期更长的方法。为进一步研制新型实用的防病治病的益生菌活菌制剂开辟了一条新的途径。

参考文献

- [1] 于志会,刘志强. 植物乳杆菌在食品工业中的应用[J]. 吉林农业科技学报,2012(3):32-34.
- [2] 杨四润,马燕,杨明容,等. 鲜牛奶中植物乳杆菌D14的分离鉴定[J]. 安徽农业科学,2011(23):14113-14114.
- [3] 常亮,陈智斌,李铁晶. 弧菌VBNC状态的研究进展[J]. 食品工业科技,2010(4):411-415.
- [4] 郭淑敏,李莹,王立新,等. 细菌非可培养状态复苏方法研究进展[J]. 吉林畜牧兽医,2011(11):3-6.
- [5] Serpaggi V, Remize F, Recorbet G, et al. Characterization of the "viable but nonculturable"(VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*[J]. Food Microbiology, 2012:438-447.
- [6] 丁林贤,苏晓梅,横田明. 活的但非可培养(VBNC)状态菌的研究进展[J]. 微生物学报,2011(7):858-862.
- [7] 李影,王伟利,段锐,等. 活的非可培养状态细菌生物学特性研究进展[J]. 动物医学进展,2010(4):68-71.
- [8] Pinto D, Almeida V, Almeida S M, et al. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6):1601-1611.
- [9] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. Journal of Microbiology, 2005, 43:93-100.
- [10] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34:415-425.
- [11] 贾爱荣,张永刚,王萍,等. 食品检测中华兰氏阳性菌DNA提取新方法的研究[J]. 食品工业,2011(12):104-107.
- [12] 钟琳红,陈吉祥,姜莹安,等. 非可培养状态哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)复苏后生理特征及毒力相关基因表达[J]. 海洋与湖沼,2010(3):435-439.
- [13] Pawlowski David R, Metzger Daniel J, Raslawsky Amy, et al. Entry of *Yersinia pestis* into the Viable but Nonculturable State in a Low-Temperature Tap Water Microcosm[J]. Plos One, 2011, 6(3):175-185.
- [14] TAKEDA Yoshifumi. *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 2011, 87:1-12.
- [15] Moorhead S M, Griffiths M W. Expression and characterization of cell-signalling molecules in *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3):786-800.
- [16] Trevors J T. Viable but non-culturable(VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(2):266-273.
- [17] 王立新,李莹,李影. 细菌活的非可培养状态在动物微生态制剂生产中的应用[J]. 科学养鱼,2012(8):54-55.