معرفی باکتری‌های زنده لکن غیرقابل کشت (VBNC)

مهدی حسن شاهیان[1] روحا کسری کرمانشاهی[2]

(دریافت ۸۵/۱۲/۲٤ پذیرش ۸٦/۱۰/۱۷)

چکیده

حالت زنده لکن غیر قابل کشت (VBNC)، شرایطی است که در آن باکتری‌ها قابلیت رشد روی محیط‌های باکتریولوژیک معمولی که به طور عادی در آن رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دهند را از دست داده لکن هنوز زنده بوده و قادر به بازیابی فعالیت متابولیکی خود می‌باشند. حالت VBNC در ارزیابی سلامت عمومی، استریل بودن آب آشامیدنی و مواد دارویی و صنایع غذایی واجد اهمیت است. باکتری‌های متعددی که عمدتاً پاتوژن‌های انسانی می‌باشند می‌توانند وارد این حالت شوند. باکتری‌ها در پاسخ به تعدادی از استرس‌های طبیعی از قبیل: گرسنگی، انکوباسیون خارج از دمای بهینه رشد و افزایش فشار اسمزی وارد این حالت می‌شوند. باکتری‌هایی که وارد حالت VBNC می‌شوند متحمل تغییرات زیاد فیزیولوژیک، ساختاری و ژنتیکی می‌گردند به طوری که اندازه سلول‌ها کاهش می‌یابد و از فرم میله‌ای به کوکسی تبدیل می‌شوند. دیواره سلولی ضخیم شده و پپتیدوگلیکان دارای پیوندهای تقاطعی زیادی می‌شود. غشای سلولی تمامیت خود را حفظ می‌نماید، هر چند متحمل تغییرات اساسی در ساختار خود می‌شود. از تغییرات متابولیک می‌توان کاهش رشد، کاهش در جذب مواد غذایی، کاهش در میزان تنفس و همین طور سنتز پروتئین‌های جدید و باقی ماندن ATP در یک سطح ثابت را نام برد. در حالت VBNC برخی از پاتوژن‌ها خصوصیات ویرولانس خود را حفظ می‌کنند. بیان ژن در سلول‌های VBNC ادامه می‌یابد. اسیدهای نوکلئیک در فازهای اولیه که باکتری وارد حالت VBNC شده است دست نخورده باقی می‌ماند، لکن با طولانی شدن و پایداری آن در این حالت به تدریج تجزیه می‌شوند. برای مطالعه حالت VBNC، از روشهای سیتولوژیک از قبیل شمارش زنده به طور مستقیم و احیای نمک تترازولیوم همچنین روشهای مولکولی مانند واکنش نسخه‌برداری معکوس و پروتئین سبز فلورسنت استفاده شده است. احیاء از حالت VBNC با حذف عامل القاء کننده شروع می‌شود. عواملی که موجب احیاء باکتری‌ها از فاز VBNC می‌شوند شامل اضافه‌کردن مواد غذایی و مواد شیمیایی مشخص، اضافه کردن کم سلول‌های قابل رشد و پاساژ در میزبان حیوانی می‌باشند که برحسب نوع باکتری عامل احیاء فرق دارد. به دلیل باقی ماندن خصوصیات ویرولانس باکتری‌ها در حالت VBNC باید توجه ویژه‌ای به این موضوع در ارزیابی سلامت آب آشامیدنی شود.

واژه‌های کلیدی: حالت VBNC، باکتری، بیماری‌زایی، گرسنگی، آب آشامیدنی.

Introduce of Viable But Nonculturable Bacteria

Mehdi Hassanshahian[1] *Roha Kasra Kermanshahi[2]*

(Received Mar. 14, 2007 Accepted Jan. 7, 2008)

Abstract

Viable-But-Nonculturable-State (VBNC) is the condition in which bacteria fail to grow on their routine bacteriological media where they would normally grow and develop into colonies, but are still alive and capable of renewed metabolic activity. VBNC state is useful for evaluating public health and for ascertaining the sterility of drinking water, pharmaceuticals, and foodstuff. A number of bacteria, mostly pathogenic to humans, have been proved to enter into this state in response to natural stresses such as starvation, incubation out of optimum growth temperature, increased osmotic pressure, etc. Once in the VBNC state, they undergo various physiological, structural, and genetic alterations. These alterations result in reduced cell size, conversion from bacilli to coccid, thickened cell walls, and peptidoglycan gaining many cross links. Metabolic changes also occur that include reductions in growth, nutrient transport, and respiratory rate; biosynthesis of new protein, and ATP remaining at a

۱- دانشجوی دکترای میکرو بیولوژی دانشگاه اصفهان، mshahi@biol.ui.ac.ir

۲- استاد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان

1. Ph.D Student of Microbiology, Isfahan University, mshahi@biol.ui.ac.ir
2. Professor of Biology, Faculty of Science, Isfahan University

constant level. It has been shown that in the VBNC state, some pathogens conserve their virulence properties. Gene expression continues in the VBNC cell. Nucleic acids remain intact in the early VBNC phase but they gradually undergo degradation with prolonged VBNC. Cytological methods such as direct viable count and reduction of tetrazolium salts, and molecular methods such as reverse transcription polymerase chain reaction and green fluorescent protein have been used for the study of VBNC. Resuscitation from VBNC state starts when the inducing factor(s) is/are lifted. Factors that help the resuscitation of VBNC bacteria include addition of certain nutrients and chemicals, introduction of a few culturable cells into the VBNC cell population, and passage through the animal host. As virulence properties are sustained during the VBNC phase, special care must be paid when evaluating sterility of drinking water.

Keywords: VBNC Phase, Bacterium, Virulence, Starvation, Drinking Water.

۱- مقدمه

اکولوژیست‌های میکربی در دهه گذشته عنوان کردند که تعداد باکتری‌ها در خاک، رودخانه و اقیانوسها کمتر از یک درصد کل باکتری‌هایی است که به وسیله روش میکروسکپی مستقیم دیده می‌شوند. امروزه دلیل این امر را به ورود در حالت VBNC[1] نسبت داده‌اند. هنگامی که گونه‌های باکتریایی که به راحتی قابل کشت هستند تحت گرسنگی طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی قرار می‌گیرند تعداد سلول‌های قابل کشت کاهش می‌یابد در حالی که تعداد کل سلول‌ها در سطح اولیه باقی می‌ماند و این منجر به تجمع سلول‌های غیرقابل کشت می‌شود. یک توضیح قابل تأمل در این باره آن است که سلول‌های قابل کشت مرده‌اند. شالوده روشهای متکی به کشت بر این توضیح استوار است. لکن توضیح دیگری مدعی است که سلول‌های غیرقابل کشت در حالت VBNC هستند، یعنی زنده لکن غیرقابل کشت‌اند [۱، ۲ و ۳].

زو[2] و همکاران در سال ۱۹۸۲ اولین شاهد آزمایشگاهی حضور VBNC را در باکتری‌های پاتوژن ثابت کردند. آنها نشان دادند که *E.coli* و *V.cholera* که در آبهای دریایی مصنوعی سوسپانسیون می‌شوند به سرعت قابلیت رشد روی محیطی که به طور عادی برای تشخیص آنها به کار می‌رود را از دست می‌دهند [۴]. پس از این روشن شد که تعداد بسیار زیادی از پاتوژن‌ها و همین طور غیر پاتوژن‌ها وارد این حالت خفتگی می‌شوند که این مسئله استفاده از باکتری‌ها به عنوان اندیکاتور مدفوعی را در پزشکی و در مورد اکثر مطالعات میکروبیولوژیکی از اهمیت خاصی برخوردار می‌کند. در این مقاله جنبه‌های مختلف این پدیده شرح داده خواهد شد [۲ و ۳].

۲- تعریف حالت VBNC و اهمیت آن

باکتری‌ها در حالت VBNC قادر به رشد روی محیط‌های باکتریولوژیک روتین که به طور عادی در آن رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دادند، نمی‌باشند؛ اما زنده بوده و قادر به بازیابی فعالیت متابولیکی خود هستند. به نظر می‌رسد ورود به حالت VBNC یک وضعیت حفاظتی باشد، به طوری که ثابت شده سلول‌های VBNC دارای مقاومت فزاینده‌ای نسبت به استرس‌هایی از قبیل آسیب اکسیداتیو، آسیب مکانیکی و شوک حرارتی می‌باشند. بنابراین ممکن است پاسخ VBNC ساز و کاری برای زنده ماندن عمومی مشابه اسپورزایی در تعدادی از باکتری‌ها از قبیل باسیلوس‌ها و میکسو باکتری‌ها باشد [۵، ۶ و ۷].

طبق گزارشها بسیاری از باکتری‌های پاتوژن که به حالت VBNC وار شده بودند پس از واکشت[3] در میزبان حیوانی به حالت عفونی برگشته‌اند که این امر در ارزیابی خطر سلامت عمومی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین گزارشها حاکی از آن‌اند که بسیاری از باکتری‌های فوق العاده خطرناک با تیمار، در غذای فرآوری شده، شیر پاستوریزه، آب آشامیدنی و در محیط زنده می‌مانند [۴ و ۵].

اهمیت دیگر آنها در فرآیندهای سلامت غذا، توزیع و نگهداری غذا می‌باشد که مستلزم درجه بالایی از اطمینان می‌باشند. همچنین غذای آماده برای مصرف باید عاری از میکروارگانیسم‌های پاتوژن و یا توکسین باشد. سایر موارد مهم شامل استریل بودن مواد دارویی، شیمیایی و آب آشامیدنی است. VBNC همچنین در نمونه‌های ادراری که برای تشخیص به کار می‌روند واجد اهمیت است.

۳- باکتری‌هایی که وارد حالت VBNC می‌شوند

تعداد گونه‌هایی که وارد حالت VBNC می‌شوند به طور پیوسته در حال افزایش است. تقریباً ۶۰ گزارش جدید این حالت را ثابت کرده‌اند که شامل تعداد زیادی از پاتوژن‌های انسانی از قبیل: *Campylobacter, Francisella tularensis, E.coli, Helicobacter pylori* و *Vibrio cholera* می‌باشد. فهرستی از

[1] Viable But Non Culturabe (VBNC)
[2] Xu
[3] Passage

این باکتری‌ها که می‌توانند وارد این حالت شوند در جدول ۱ آمده است [۲، ۳ و ۸].

به علاوه، درباره باکتری‌هایی با منشاء آب و غذا نیز که وارد حالت VBNC می‌شوند گزارشهایی در دست است. تعداد باکتری‌هایی که با منشاء مزبور وارد این حالت می‌شوند، به ویژه در دو دهه اخیر که پیشرفت زیادی در فن‌آوری حاصل شده به طور پیوسته رو به افزایش است [۹].

۴- عوامل القایی برای ورود باکتری‌ها به حالت VBNC

سلول‌ها در پاسخ به تعداد زیادی از استرس‌های طبیعی از قبیل گرسنگی، انکوباسیون خارج از دمای رشد، افزایش فشار اسمزی،

جدول ۱- باکتری‌هایی که وارد فاز VBNC می‌شوند [۱۰]

Aeromonas salmonicida	*Lactobacillus plantarum*	*Serratia marcescens*
Agrobacterium tumefaciens	*Lactococcus lactis*	*Shigella dysenteriae*
Alcaligenes eutrophus	*Legionella pneumophila*	*S. flexneri*
Aquaspirillum sp.	*Listeria monocytogenes*	*S. sonnei*
Burkholderia cepacia	*Micrococcus flavus*	*Sinorhizobium meliloti*
B. pseudomallei	*M. luteus*	*Streptococcus faecalis*
Campylobacter coli	*M. varians*	*Tenacibaculum sp.*
C. jejuni	*Mycobacterium tuberculosis*	*Vibrio anguillarum*
C. lari	*M. smegmatis*	*V. campbellii*
Cytophaga allerginae	*Pasteurella piscida*	*V. cholerae*
Enterobacter aerogenes	*Pseudomonas aeruginosa*	*V. fischeri*
E. cloacae	*P. fluorescens*	*V. harveyi*
Enterococcus faecalis	*P. putida*	*V. mimicus*
E. hirae	*P. syringae*	*V. natriegens*
E. faecium	*Ralstonia solanacearum*	*V. parahaemolyticus*
Escherichia coli (including EHEC)	*Rhizobium leguminosarum*	*V. proteolytica*
Francisella tularensis	*R. meliloti*	*V. shiloi*
Helicobacter pylori	*Rhodococcus rhodochrous*	*V. vulnificus (types 1&2)*
Klebsiella aerogenes		*Xanthomonas campestris*
K. pneumoniae	*Salmonella enteritidis*	
K. planticola	*S. typhi*	
	S. typhimurium	

غلظت اکسیژن و همچنین در معرض نور سفید واقع شدن وارد حالت VBNC می‌شوند. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از فرآیندها که به طور عادی برای باکتری‌ها به صورت باکتریسیدال در نظر گرفته می‌شوند، مانند دمای پاستوریزاسیون شیر و کلر زدایی پسابها، ممکن است موجب باقی ماندن باکتری‌ها در حالت VBNC گردند. در *V. vulnificus* که باکتری دریایی پاتوژن انسانی است مشاهده شده که انکوباسیون در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد موجب ورود آن به حالت VBNC گردیده و انکوباسیون در دمای ۲۲درجه سانتی‌گراد آن را از این حالت خارج می‌کند. در *Chlamydia trachomatis* فوق عفونت با HSV-2[1] تغییرات مورفولوژیک در آن القاء کرده که موجب ورود آن به حالت VBNC می‌شود و به پایداری طولانی مدت آن می‌انجامد [۱۱]. غلظت بالای مس می‌تواند عامل القای VBNC در باکتری‌هایی همچون *E. coli, Agrobacterium tumfacieance* و *Rhizobium meliloti* شود [۱۲]. در *Listeria monocytogenes* افزایش دما و غلظت نمک و همچنین در معرض نور سفید بودن می‌تواند حالت VBNC را القاء کند که به دلیل عمومی بودن محل زندگی این میکروارگانیسم و وجود عوامل مزبور در صنایع غذایی این امر می‌تواند مسئله‌ای خطرآفرین برای سلامت عمومی محسوب گردد [۱۳].

۵- خصوصیات فیزیولوژیک باکتری‌ها در حالت VBNC

هنگامی که سلول‌ها وارد حالت VBNC می‌شوند، تغییرات عمده‌ای در ساختار غشای سلولی و همچنین در فعالیتهای متابولیکی آنها رخ می‌دهد. سلول‌هایی که وارد حالت VBNC می‌شوند دچار کاهش اندازه شده و از حالت باسیلی به حالت کوکسی تبدیل می‌گردند [۱۴].

مطالعه بر روی پپتیدوگلیکان دیواره سلولی *E.coli* که وارد حالت VBNC شده بود نشان داد که در پیوندهای تقاطعی افزایش صورت می‌گیرد و همچنین افزایشی در موروپپتید که به طور کووالان به لیپو پروتئین متصل شده است دیده می‌شود. در مقابل از طول متوسط رشته گلیکان در مقایسه با سلول‌های فاز لگاریتمی کاسته می‌گردد. در ضمن قابلیت اتولیتیک در سلول‌های VBNC بیشتر از سلول‌های رشد یافته در فاز لگاریتمی است [۱۵].

سلول‌های *Enterococus facalis* که به حالت VBNC وارد شده‌اند دیواره‌ای دارند که نسبت به تخریب مکانیکی مقاوم‌تر از سلول‌های در حال تقسیم است. این امر به دلیل افزایش پیوندهای تقاطعی است [۱۶]. سلول‌هایی که وارد حالت VBNC می‌شوند پیوستگی غشایی را علی‌رغم تغییرات در ترکیب غشاء حفظ می‌کنند. به طوری که گزارش شده سلول‌ها غشای سیتوپلاسمی طبیعی خود را با کاهش بیش از ۶۰ درصد از اسیدهای چرب اصلی در مقایسه با سلول‌های قابل کشت و همچنین حضور اسیدهای چرب با زنجیره بلند حفظ می‌کنند و سیتوپلاسم در سلول‌های VBNC بسیار متراکم می‌شود.

فعالیتهای متابولیکی باکتری نیز دستخوش تغییرات عمده‌ای در سلول‌های VBNC می‌شوند که شامل کاهش در جذب مواد غذایی، سطوح و میزان تنفس و همچنین کاهش در سنتز ماکرومولکول‌ها است. اگرچه بیوسنتز متوقف نمی‌شود اما طی این دوره پروتئین‌های گرسنگی جدید و پروتئین‌های شوک سرمایی جدید تشکیل می‌شوند. سنتز دیواره سلولی و متابولیسم ترکیبات این ساختار ادامه می‌یابد به طوری که اضافه کردن پنی‌سلین به سلول‌های VBNC عموماً موجب مرگ سریع سلولی می‌شود [۱۷ و ۱۸].

۶- خصوصیات ژنتیکی باکتری‌ها در حالت VBNC

تعدادی از ژن‌ها بلافاصله پس از توقف رشد سلول باکتری، القاء می‌شوند و بر روی تعداد سلول‌های فاز سکون که قابلیت تشکیل کلنی را از دست می‌دهند اثر می‌گذارند. تعدادی از این ژن‌ها اثرات مثبت نشان می‌دهند، بنابراین در نبود این ژن‌ها سلول قابلیت کشت خود را با سرعت فزاینده‌ای از دست می‌دهد و اقدام به کُد کردن پروتئینی می‌کند که نقش اختصاصی آن حفاظت از سلول‌ها در مقابل استرس‌های محیط خارجی از قبیل گرما، اسمز و در معرض مواد شیمیایی قرار گرفتن می‌باشد [۱۴].

مطالعات اخیر، بیان مداوم ژن در سلول‌های فاز VBNC را ثابت می‌کنند به طوری که ژن‌های متعددی از قبیل mobA و rfbE و stx-1 و ژن‌های سنتز 16S rRNA در سلول‌های غیرقابل کشت *E. coli* بیان می‌شوند. همچنین مشخص شده که در *V. vulnificus* در حالت VBNC تعدادی از ژن‌ها برای مدت چهار ماه و نیم قادر به تولید mRNA می‌باشند [۱۹].

آنالیز اسیدهای نوکلئیک از *V.vulnificus* حالت VBNC حاکی از آن است که فازهای اولیه پاسخ VBNC شامل سلول‌هایی با مخزن دست نخورده DNA و RNA است که قادر به احیاءاند. هنگامی که سلول‌ها در فاز VBNC پایدار باقی بمانند، مخزن اسید نوکلئیک دست نخورده دچار کاهش می‌شود. این مسئله می‌تواند دلیلی بر کوتاه بودن عمر بخشی از جمعیت غیر قابل کشت باشد [۲۰].

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در برخی موارد به طور موفقیت‌آمیزی در تشخیص سلول‌های VBNC به کار رفته است. هر چند افزایش مقادیر DNA سلول‌های VBNC برای تکثیر مورد

[1] Herpes Simplex Virus 2

نیاز است ولی امکان فشردگی و تراکم در DNA متعاقب ورود آن به حالت VBNC منتفی نیست. در نتیجهٔ وقوع چنین امری همراه با ضخیم شدن دیواره سلولی، PCR در سلول‌های VBNC در مقایسه با سلول‌های قابل کشت نامؤثرتر می‌شود.

بر پایه این مشاهدات دو حالت در تشکیل سلول‌های VBNC فرض می‌شود:

حالت اول- انتقال از حالت VBNC که با از دست رفتن قابلیت کشت توأم با پیوستگی اسیدهای نوکلئیک و حفظ ساختار سلولی است.

حالت دوم- از دست رفتن تدریجی پیوستگی سلولی و تجزیه RNA و DNA که در نهایت موجب مرگ سلول می‌شود.

به نظر می‌رسد که تجزیه DNA در سلول‌های VBNC پیر مسئول فقدان تکثیر توالی DNA ویژه باشد. در مجموع پایه مولکولی حالت VBNC پیچیده و مشابه اسپورزایی در باکتری‌های گرم مثبت از قبیل *باسیلوس سوبتلیس* به نظر می‌رسد[۱۹،۷ و ۲۰].

۷- رابطه بین حالت VBNC بیماری‌زایی (ویرولانس)

پرسش اساسی این است که آیا قدرت ویرولانس سلول‌ها در حالت VBNC همچنان باقی می‌ماند یا خیر؟ مقالات گیج کننده‌ای در این مورد وجود دارد، لکن حداقل برای تعدادی از پاتوژن‌ها پاسخ مثبت است. نورمن[1] و همکاران باکتری *V. cholera* در فاز VBNC را به داخل ایلئوم بسته خرگوش تلقیح کردند و در همه موارد به جواب مثبت رسیدند و سلول‌های *V. cholera* قابل کشت از مایع روده‌ای جدا شدند [۸]. محققان دیگری ثابت کردند که *C. jejuni* در حالت VBNC در آب می‌تواند موجب مرگ موش شیر خوار شود. کاترینا[2] و همکاران نیز نشان دادند که *E. feacalis* در حالت VBNC قابلیت اتصال به سلول‌های اپی تلیومی قلب و ناحیه ادراری را داراست. این مطالعات حاکی از آن است که سلول‌هایی که زمان زیادی از ورودشان به حالت VBNC نمی‌گذرد قابلیت ایجاد بیماری را دارند و بنابراین هنوز فعال می‌باشند. هر چند در اینجا این امر مشخص نیست که آیا سلول‌های VBNC خود برای ایجاد بیماری کافی هستند و یا اینکه لازم است فعال شده و احیاء شوند و سپس ایجاد بیماری کنند. اما این واضح است که در بدو ورود به حالت VBNC می‌توانند متعاقب واکشت در میزبان فعال گردند [۱۶ و ۲۱].

۸- روشهای مطالعه حالت VBNC در باکتری‌ها

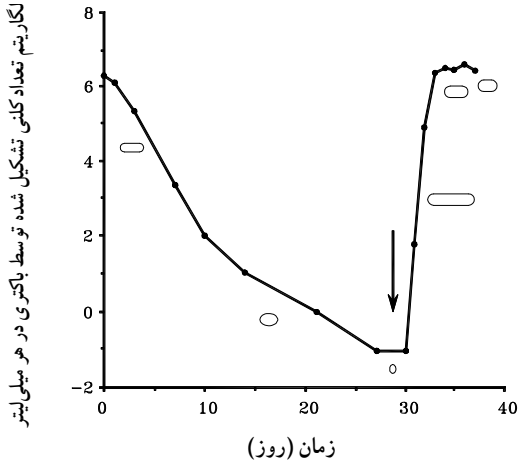
با در نظر گرفتن اینکه حالت VBNC در باکتری‌ها به کمک روشهای وابسته به کشت تشخیص داده نمی‌شود، نیازمند روشهای دیگری برای بررسی این حالت هستیم. در جدول ۲ فهرستی از روشهای سیتولوژیک که برای مطالعه سلول‌های VBNC به کار رفته موجود است. در ادامه تعدادی از این روشها را شرح می دهیم.

[1] Norman

[2] Caterina

جدول ۲- روشهای سیتولوژیک برای مطالعه سلول های VBNC [۲۰ و ۲۲]

روش	حداقل نیازمندی برای جواب مثبت	نظرات
A: شمارش زنده به طور مستقیم (DVC)	پاسخ دادن به تحریکات خارجی، رونویسی، ترجمه و وابسته به انرژی	طویل شدن سلولی در پاسخ به عصاره مخمر و در معرض قرار گرفتن کوینولون- حدس زده می‌شود که وابسته به رشد باشد.
B: القای تولید بتاگالاکتوز یداز	پاسخ دادن به تحریکات خارجی، رونویسی، ترجمه و وابسته به انرژی	مسیر بیوشیمیایی و ژنتیکی به خوبی مشخص شده- دست‌یابی به سوبسترا وابسته به نفوذپذیری می‌باشد- از سایر ژن‌ها و ژن‌های گزارشگر باید استفاده شود.
C: پروب های حساس به انرژی (مثل رودامین)	وابسته به انرژی- انرژی غشای سیتوپلاسمی	نشان‌دار کردن فعال و قابل برگشت با عوامل جفت نشدنی.
D: احیای نمک تترازولیوم (CTC ,INT)	وابسته به انرژی- باقی ماندن فعالیت آنزیمی	وابسته به منابع انرژی در دسترس که می‌تواند خارجی یا درونی باشد و همچنین مسیرهایی که در اکسیداسیون آنها دخیل هستند.
E: سوبسترا های آنزیمی مثل فلورسین دی استات	باقی ماندن فعالیت آنزیمی- دست نخورده بودن غشای نفوذ پذیری	وابسته به بیان آنزیم های درگیر با سلول‌ها. این امر باید مطالعه شود.
F: رنگ آمیزی اسید نوکلئیک	باقی ماندن یکی یا هر دوی DNA و RNA	به طور ویژه یا اندکی وابسته به محتوی ژنومی یا حالت فیزیولوژیکی که به ندرت ثابت شده می باشد.



شکل ۱- فرآیند VBNC به طور شماتیک [۱۰]

۸-۱- روش شمارش زنده به طور مستقیم (DVC)[1]

در این روش باکتری‌ها ابتدا به صورت سوسپانسیون درآمده و در محیطی که دارای مقدار کم مواد غذایی و همراه با حضور مهار کنندهٔ DNA که می‌تواند نالیدیکسیک اسید یا سیپرو فلوکساسین باشد به مدت زمان کم انکوبه می‌شوند. به دلیل حضور آنتی بیوتیک سلول‌های فعال از نظر متابولیکی مواد غذایی را جذب کرده و بدون تقسیم شدن شروع به بزرگ شدن می‌کنند. در حالی که اندازه سلول‌های غیرفعال بدون تغییر می‌ماند که با میکروسکپ اپی فلورسانس مشاهده می‌شود. اما این روش دارای نقص است و آن اینکه در تعدادی از ارگانیسم‌ها علی‌رغم جذب مواد غذایی سلول‌ها طویل نمی‌شوند و این مسئله منجر به گزارشهای کاذب می‌شود [۲۳ و ۲۴].

۸-۲- روش CTC-DAPI[2]

رنگ آمیزی توأم با CTC و DAPI تشخیص کل باکتری‌ها (فلورسنس آبی و قرمز) از باکتری‌های زنده را فراهم می‌آورد. در این روش همه باکتری‌های نمونه به وسیله DAPI رنگ آمیزی می‌شوند. در این میان تنها انواع فعالی که قادر به احیای CTC هستند، رسوب فلورسنت قرمز درون سلولی دارند. این روش نیز دارای ضعف است چون باعث تشکیل گرانول‌های فورمازون می‌شود که ممکن است برای ارگانیسم سمی باشند و از طرفی القاء تشکیل سلول VBNC اغلب منجر به کاهش اندازه می‌شود و این کاهش اندازه می‌تواند تشخیص میکروسکپی گرانول‌های فورمازون را مشکل سازد [۲۵، ۲۶ و ۲۷].

۸-۳- روشهای مولکولی برای مطالعه فاز VBNC

از جمله روشهای مولکولی که برای مطالعه فاز VBNC در باکتری‌ها استفاده شده می‌توان به روش RT-PCR و روش GFP اشاره کرد.

۸-۳-۱- واکنش نسخه برداری معکوس (RT-PCR)[3]

پای[4] و همکاران با استفاده از این روش mRNA از میکوباکتریوم تو برکلوزیس ژن Ag 85B که تولید آن تحت شرایط استرسی افزایش می‌یابد را تشخیص دادند [۲]. از این روش همچنین برای بررسی بیان ژن PbP-5 در *E. feacalis* که بیان آن در فاز VBNC زیاد می‌شود و محصول آن پروتئینی متصل به پنی سلین است استفاده شد. حضور mRNA با فعالیت متابولیکی و قابلیت احیاء همخوانی دارد و دالّ بر زنده ماندن سلول‌های VBNC است [۲ و ۳].

۸-۳-۲- روش پروتئین سبز فلورسنت (GFP)[5]

روشهای مشروح نمی‌توانند مابین سلول‌های تلقیح شده و سایر باکتری‌ها تمایز قائل شوند. به همین دلیل از سیستم‌های مارکر مولکولی به عنوان راهبردی فرعی برای ردیابی میکروارگانیسم‌ها در محیط استفاده شد. از بین انتخابهای مختلف ژن‌های Lux که کُد

---

[1] Direct Viable Count Method (DVC)

[2] 5-cyano-2.3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC). 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI).

[3] Reverse Transcription PCR

[4] Pai

[5] Green Flouresent Protein

کننده لوسیفراز هستند به عنوان مارکر برای آزمایش حالت VBNC و زنده بودن باکتری‌ها در محیط برگزیده شد. اخیراً GFP به عنوان یک مارکر برای کارهای اکولوژی میکربی به کار رفته است. GFP یک سیستم ردیابی خوب است و به راحتی به وسیله مقاومت آنتی بیوتیکی مرسوم، قادر به شمارش کلنی فلورسانس و اندازه‌گیری فلورسنس مستقیم با اسپکتروفتومتری یا اپی فلورسانس است [۲۸ و ۲۹].

۹- احیاء از حالت VBNC

احیاء، کلید فرضیه VBNC است. برای اینکه پاسخ VBNC بازگو کننده زنده ماندن واقعی باشد سلول‌ها باید قادر باشند از این حالت خفته خارج شده و به حالت فعال متابولیکی برگشته و دوباره قادر به کشت باشند. این نوع برگشت در فیزیولوژی احیاء خوانده می‌شود. شکل ۱ به طور شماتیک فرآیند VBNC و احیای آن را نشان می‌دهد. احیاء اغلب به وسیله برداشت ساده عمل استرس القاء کننده پاسخ VBNC شروع می‌شود. پس از احیاء دشواری تعیین این امر است که وجود سلول‌های قابل کشت در نتیجهٔ احیاء واقعی سلول‌های خراب است یا اندک بازماندگان سلول‌های قابل کشتی هستند که قبلاً در جمعیت کلی VBNC قابل تشخیص نبوده‌اند [۳۰].

عواملی که می‌توانند باعث احیاء از حالت VBNC شوند در باکتری‌های مختلف متنوع‌اند. یکی از راهها اضافه کردن برخی مواد شیمیایی و غذایی است. برای مثال اضافه کردن تری هیدروکسی اکسامات، سیدروفور فری اکسامین E و اتوایندیوسر مقاوم به گرما که به وسیله گونه‌های انتروباکتریاسه در پاسخ به نور اپی نفرین تولید می‌شوند منجر به احیای سلول‌های *Salmonella enteritica* و *E. coli* انتروهموراژیک می‌شود که در اثر انکوباسیون طولانی مدت در محیط آب با تیمار گرمایی وارد استرس و حالت VBNC شده‌اند. راه دیگر برای احیای سلول‌های VBNC اضافه کردن تعدادی از سلول‌های قابل کشت به جمعیت VBNC است. در این روش بخش کوچکی از سلول‌های قابل کشت یک سویه به بخش بزرگی از سلول‌های غیر قابل کشت سویه‌های دیگر اضافه می‌شوند. پس از اضافه کردن مواد غذایی و دوره انکوباسیون کشت منتج شده روی محیط آگار پخش می‌شود که در آنجا دو سویه با توجه به کلنی‌ها از هم مجزا می‌گردند [۳۱].

در *لژیونلا پنوموفیلا* که در پاسخ به تخلیه مواد غذایی وارد حالت VBNC می‌شود، صرفاً اضافه کردن مواد غذایی به سلول‌ها منجر به برگشت از حالت خفتگی نمی‌شود. هر چند اضافه کردن آمیب‌های مشخصی که میزبان طبیعی این باکتری در محیط آبی هستند امکان احیاء را فراهم می‌کند. در تعدادی از باکتری‌ها مثل *C. jejuni* و *S. enteritica* واکشت در مدل حیوانی (موش) می‌تواند منجر به احیاء شود [۱۰، ۳۲ و ۳۳].

۱۰- نتیجه گیری

اکنون واضح است که باکتری‌های متعددی اعم از گرم مثبت و گرم منفی، پاتوژن و غیر پاتوژن قابلیت ورود به حالت VBNC را دارند. لیکن هنوز مطالب زیادی وجود دارد که باید در مورد فیزیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک سلول‌هایی که وارد این حالت می‌شوند و احیاء از این حالت مشخص شود.

اما اهمیت سلول‌های VBNC در شروع عفونت انسانی مشخص شده و به نظر می‌رسد که سلول‌ها در این حالت بیماری‌زا باقی می‌مانند. با توجه به اینکه این حالت در باکتری‌ها با روشهای معمول تشخیص داده نمی‌شود، آلوده شدن آب آشامیدنی می‌تواند تهدیدی برای سلامت عمومی باشد. برای جلوگیری از چنین وضعیتی استفاده از روشهای جدید برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها در آزمایشگاههای کنترل کیفیت آب آشامیدنی ضروری به نظر می‌رسد.

۱۱- مراجع

1- Chowdhury, M. A. R., Ravel, J., and Hill, R. T. (2004). “Physiology and molecular genetics of viable but non-culturable microorganisms.” *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 111-128.

2- Neil, J. R. (2004). “Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria.” *Trends in Food Science & Technology*, 15, 462–467.

3- Norma, B., and Marcela, C. C. (2004). “Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of argentina.” *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7481–7486.

4- James, D. O., and Lena, N. (1991). “Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state.” *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2640-2644.

5- Daniel, T., and Jacobson, V. C. (2005). "Molecular analysis of VBNC response." *J. of Microbiology*, 23, 123-150.

۶- کسری کرمانشاهی، ر.، پور مقدس، ح.، و میر خان، آ. (۱۳۸۰). "بررسی ارتباط بین آلودگی میکربی و عوامل فیزیکی و شیمیایی (دما و BOD) در بخشی از آب زاینده رود در فصول مختلف سال." *م. آب و فاضلاب*، ۳۸، ۱۶-۲۲.

7- Valérie, B., Michel F., Eric D., and Florence, J. (2002). "Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*." *Vet. Res.,* 33, 359–370.

8- Mark, D. W. and James, D. O. (1997). "Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state." *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1002–1005.

9- LleoÁ, M. M., Bonato, B., and Signoretto, M. (2001). "Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state." *J. of Applied Microbiology*, 52, 91-102.

10- Yamamato, H. (2000). "Viable but non culturable state as a general phenomenon of non-spore forming bacteria and its modeling." *J. of Infection and Chemotgherapy*, 6 (2), 112-114.

11- Rice, S. A., Mc Dougald, D., and Kjelleberg, S. (2000). "*Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but non culturable state." *The J. of Infection Disease*, 6, 115-120.

12- Besnard, V., Federighi, M. Cappelier, J. M. (2000)."Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*." *Lett. Appl. Microbiol*., 31, 77–81.

13- Tholozan, L., Cappelier, J. M., and Tissier, J. P. (1999). "Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells." *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1110–1116.

14- Cappelier, J. M. C., Magras, J. L., and Federighi, M.(1999). "Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models." *Food Microbiology,* 16, 375-383.

15- Srilekha, D., Jennifer, V., Sophie, D. (2006). "*Chlamydia trachomatis* enters a viable but noncultivable state within herpes simplex virus type 2 co-infected host cells." *Cellular Microbiology*, 1, 149–162.

16- Brian, g., and Todd, R. (2001)."Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition." *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5325–5327.

17- Federighi, M., and Tholozan, J. M. (1998). "Evidence of non-coccoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosmwater by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy." *Food Microbiology*, 15, 539-550.

18- Ishra, R. M., and Shahamat, M. A. R. (1996). "Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1." *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 115–120.

19- Caterina, S., Maria, D., Maria, C., and Pietro, C. (2000). "Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state." *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1953–1959.

20- Oliver, J. D. (1999). "The viable but nonculturable state and cellular resuscitation." *Microbial. Biosystems*, 24, 85-95.

21- Douglas, B., Arseny, K., and Kaprelyants, D. H. (1998). "Viability and activity in readily culturable bacteria a review and discussion of the practical issues." *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 169–187.

22- Tamara, G., and Armisen, P. S. (2004). "Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization." *J. of Microbiological Methods*, 58, 269-279.

۲۳- کسری کرمانشاهی، ر.، و غزالی، م. ن. (۱۳۷۲). "جداسازی، تشخیص و تغییرات فصلی باکتری‌ها در زاینده رود اصفهان." *م. علمی و پژوهشی دانشگاه اصفهان*، ج ۱و۲ علوم پایه، ۱۳۴-۱۷۶.

24- Oliver, D. J. (2005). "The viable but nonculturable state in bacteria." *J. of Microbiology*, 43, 93-100.

25- Patricia, P., Yolanda, M., and Jose, L. A. (2006). "A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability." *Research in Microbiology*, 157, 345–349.

26- Diane, M., Scott, A., Dieter, W., and Sta¡an, K. (1998). "Nonculturability: adaptation or debilitation.?" *FEMS Microbiology Ecology,* 25, 1-9.

27- Yogita, N. S. (2005). "Viable but non-culturable bacteria their impact on public health." *Current Science*, 89, 10-12.

28- Ishrat, R. Shahamat, P. A., Kirchman, Russekcohen, E., and colwell, R. R. (1994). "Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1." *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3573-3579.

29- Rowe, M., Dunstall, T. G. R., Kirk C. F., and Loughney, J. L. (1998). "Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni* and its use to determine their resistance to disinfectants." *Food Microbiology*, 15, 491-498.

30- Jang, C., and Sang-Jong, K. (1999). "Green fluorescent protein-based direct viable count to verify a viable but non-culturable state of *Salmonella thyphi* in environmental samples." *J. of Microbiological Methods*, 36, 227-235.

31- Jeffrey, J. B., Xu, H., and Ritam, R. C.(1991). "Viable but nonculturable bacteria in drinking water." *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 875-878.

32- Bogosian, G., and Edward, V. B. (2001). *A matter of bacteria life and death*, EMBO report. 21, 770-771.

33- Valérie, B., Michel, F., and Eric, V. (2002). "Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Sallmoella thyphi*." *Vet. Res.,* 35, 250-270.