

CHARAKTERISIERUNG VON *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IM „LEBEND ABER NICHT KULTIVIERBAREN“ (VBNC) STADIUM

Lu Meng, Thomas Alter, Stephan Huehn

Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Deutschland

Hintergrund

Vibrio (*V.*) *parahaemolyticus* (Abb. 1) ist ein in der marinen Umwelt vorkommendes potentiell pathogenes Bakterium, das regelmäßig aus Meerwasser, Sediment und rohen oder unzureichend gegarten marinen Lebensmitteln (z.B. Krustentieren und Muscheln) isoliert wird [1,2]. Der Verzehr sowie der Kontakt mit kontaminiertem Meerwasser können zu Infektionen führen (Gastroenteritis, Wundinfektion und Sepsis).

Wenn die Umgebungstemperatur unter 15 °C liegt, der pH-Wert verändert wird oder die Verfügbarkeit von Nährstoffen abnimmt, können Bakterien, um nachteiligen Bedingungen zu entgehen, in einen lebendigen aber nicht kultivierbaren Zustand, das sog. VBNC-Stadium, (Abb. 2) übergehen. In diesem Stadium verlieren die Zellen ihre Anzuchtbarkeit auf jedem Medium, bleiben aber vital und in der Lage, zum metabolisch aktiven und infektiösen Status zurückzukehren [3]. Vertreter vieler Bakteriengattungen, zum Beispiel *Vibrio*, *Campylobacter*, *Escherichia* und *Salmonella*, können in das VBNC-Stadium übergehen.

Da Zellen im VBNC-Stadium nicht wachsen, müssen diese von toten Zellen unterschieden werden. Eine Möglichkeit bildet Ethidiumbromid Monoazid (EMA), ein DNA bindender Farbstoff, der zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen in Zytometrie und PCR genutzt wird [4]. Tote Zellen weisen Membranschäden auf, hier penetriert EMA und bindet kovalent an die bakterielle DNA. Durch diese Bindung wird die Amplifikation der gebundenen DNA gehemmt, da die Polymerase sterisch gehindert wird.

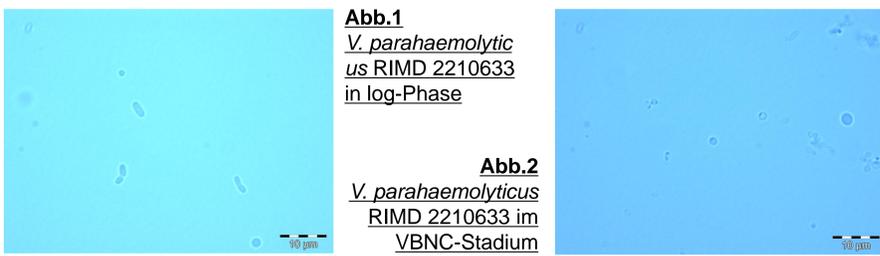


Abb.1
V. parahaemolyticus
us RIMD 2210633
in log-Phase

Abb.2
V. parahaemolyticus
RIMD 2210633 im
VBNC-Stadium

Material und Methoden

Bakterienstamm und Kulturbedingungen

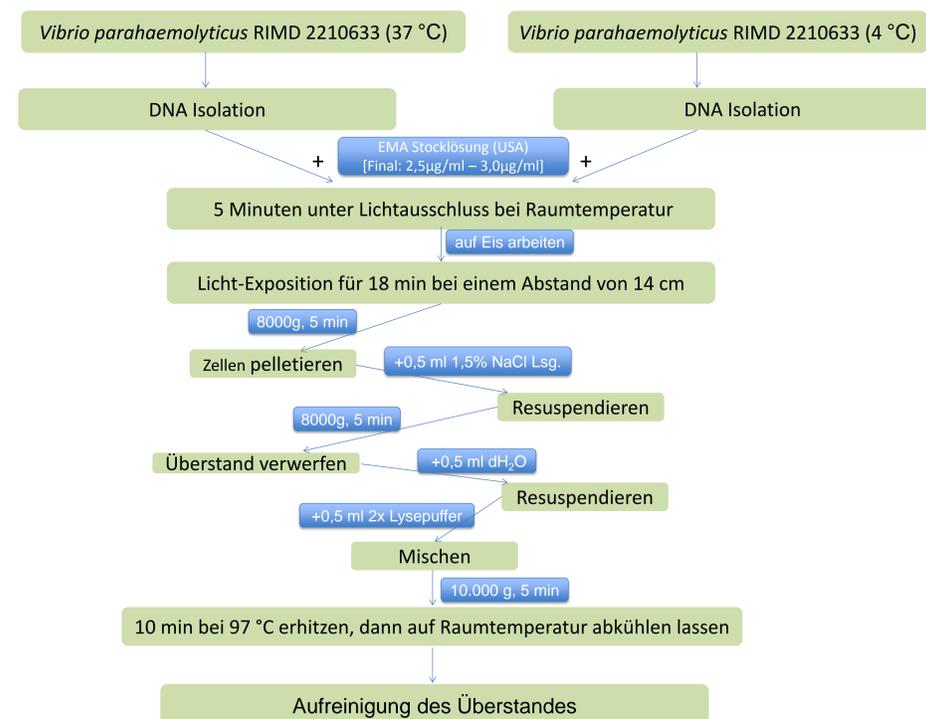
Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 wurde als Modellorganismus genutzt. Eine Einzelkolonie wurde von Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Sucrose (TCBS) Agar in ein 50-ml Zentrifugenröhrchen überführt, das mit ca. 25 ml alkalischem Peptonwasser (APW) gefüllt war. Die Kulturen wurden bei 37 °C unter konstantem Schütteln (200 rpm) für ca. 4 h inkubiert, bis sie sich in der log-Phase befanden.

Induktion des VBNC-Stadiums

V. parahaemolyticus-Zellen, die sich in der mittleren exponentiellen Phase befanden, wurden geerntet und zweimal mit Morita-Mineralisalzlösung (MMS-0.5 % NaCl) gewaschen. Dann wurden die Zellen in MMS in einer Konzentration von OD₆₀₀ = 0,6 resuspendiert und bei 4 °C statisch inkubiert, um den Übergang in das VBNC Stadium zu induzieren.

EMA-Färbung, DNA Isolation und Quantifizierung

EMA-Färbungen wurden wie von Wang *et al.* (2005) beschrieben durchgeführt [4].



Literatur:

[1] Nishibuchi, M., DePaola, A. (2005). *Vibrio* species. In: Fratamico, P. M., Bhunia- Arun K., Smith, J. L. (eds.), *Book Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* (pp. 251-272). Caister Academic Press, Great Britain. [2] Janda, J. M., Powers, C., Bryant, R.G., Abbott, S.L. (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Microbiol. Rev* 1(3), 245-267. [3] Wong, H. C., Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol* 96(2), 359-366. [4] Wang S., Levin, R. E. (2005). Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 64(1), 1 – 8.

Quantitative PCR

Für die relative Quantifizierung von *V. parahaemolyticus* wurde die 16-23S Spacerregion genutzt (F 5'- GCT-GAC-AAA-ACA-ACA-ATT-TAT-TGT-T-3' und R 5'-GGA-GTT-TCG-AGT-TGA-TGA-AC-3') (Abb.3). Ein 12,5 µl-Reaktionsansatz des real time-PCR Mixes bestand aus 6,25 µl 2xSYBR Green SsoFast qPCR Mix (BioRad, USA), Primer (jeweils 5 nM), 15 ng DNA und 3 µl dH₂O. Nach der Anfangsdenaturierung bei 95 °C für 3 min folgten 45 Zyklen mit 95 °C für 10 s, 57 °C für 15 s und 72 °C für 25 s. Die Schmelzkurvenanalyse wurde bei 72 °C – 85 °C mit 0,2 °C-Inkrementen durchgeführt.

Ergebnisse

Induktion des VBNC-Stadiums

Mittels der o.g. Bedingungen gelang es, *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633-Zellen innerhalb von neun Tagen in das VBNC-Stadium zu bringen. Die Kultivierbarkeit sank innerhalb der ersten zwei Tage um 99 %. Am 9. Tag war keine Kultivierbarkeit mehr nachweisbar (Abb.4); außerdem wiesen die Zellen an Tag neun durchgängig eine kokkoide Form auf (Abb.2).

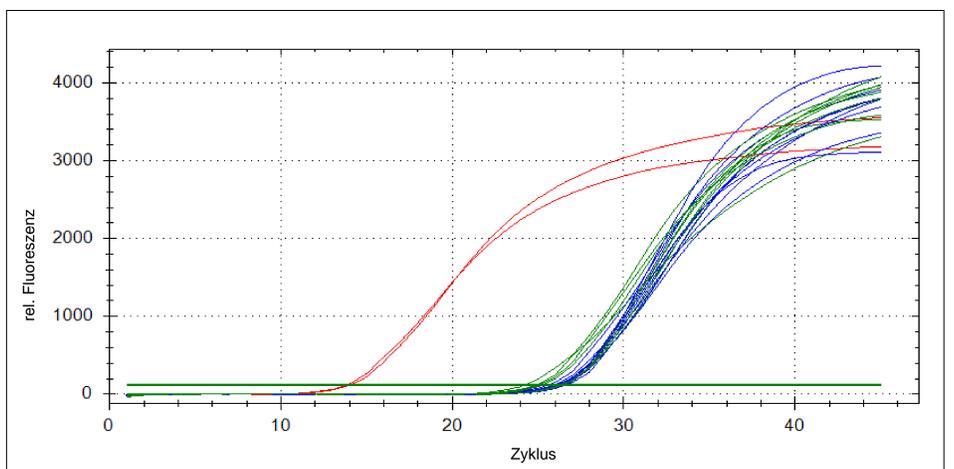


Abb.3 Quantitative PCR von *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633

Zellen im VBNC-Stadium mit EMA-Färbung (blau) und ohne EMA-Färbung (grün). Positiv-Kontrolle (rot).

Quantitative PCR

Die Ct-Werte der Proben mit und ohne EMA-Behandlung zeigten ein stabiles Verhältnis (Abb. 4). Hierbei wird offensichtlich, dass kaum Zellen absterben, wohingegen die Kultivierbarkeit der Zellen (■) kontinuierlich absinkt. An Tag 9 ist kein Wachstum zu verzeichnen, die Ct-Werte zeigen aber, dass die Zellen lebendig sind und die Absterberate unverändert ist.

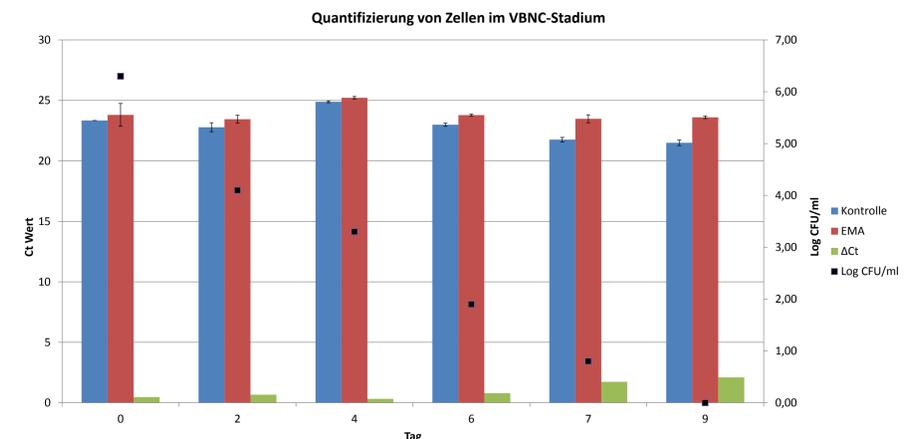


Abb.4 Vergleich der Ct-Werte von mit EMA-behandelten Zellen und nicht mit EMA-behandelten Zellen Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier unabhängiger Replikate.

Diskussion

Das VBNC-Stadium konnte durch Inkubation bei 4 °C in einem Mangelmedium über 9 Tage unter Nutzung von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633-Zellen erfolgreich induziert werden. Nach neun Tagen befanden sich sämtliche Zellen im VBNC-Stadium. Die Detektion von lebendigen Zellen spielt in vielen Bereichen eine bedeutende Rolle. Da Zellen im VBNC-Stadium nicht wachsen, würden diese mit herkömmlichen Methoden nicht erfasst werden. Bei einer Unterbrechung der Kühlkette würden die Bakterien das VBNC-Stadium verlassen und in ihren normalen und pathogenen Zustand zurück kehren und Ausbrüche verursachen.

Hier stellt die EMA-Behandlung von Proben eine Analysemöglichkeit dar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch quantitative PCR-Verfahren in Kombination mit der EMA-Behandlung eine Unterscheidung zwischen von im VBNC-Stadium befindlichen und toten *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633-Zellen möglich ist.

