

次氯酸钠诱导肠炎沙门氏菌活的非可培养状态形成及复苏过程研究

郑玉玺, 黄利华, 贾强, 韩明, 董蕾*, 张挺, 林凯

(广州城市职业学院食品科学与美食养生学院, 广州 510640)

摘要: **目的** 研究不同有效氯浓度次氯酸钠溶液诱导肠炎沙门氏菌进入活的非可培养状态(viable but non-culturable state, VBNC)及复苏条件。**方法** 以不同有效氯浓度次氯酸钠处理肠炎沙门氏菌, 分析肠炎沙门氏菌活的非可培养状态菌数及 VBNC 发生率的变化, 结合扫描电镜观察肠炎沙门氏菌 VBNC 态细胞与正常细胞的形态差异, 而后比较不同复苏条件的复苏效果, 同时对复苏后的细胞生理活性进行评价。**结果** 40 mg/L 有效氯浓度处理 20 min 可使活菌全部进入 VBNC 状态, 细胞表面出现褶皱塌陷; 高于 60 mg/L 有效氯浓度可全部杀灭, 细胞出现断裂、破损; 进入 VBNC 态的肠炎沙门氏菌在 5 种复苏处理下, 均可恢复可培养性; 在 20 mmol/L 丙酮酸钠×热激条件下恢复效果较好。细胞内 pH (pHi)和胞内腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)显示复苏后细胞活性较正常细胞有所降低。**结论** 在食品生产、环境清洁中应注意次氯酸钠使用浓度, 否则极易造成肠炎沙门氏菌 VBNC 态的形成和复苏, 导致食品污染, 从而增加食品安全风险。

关键词: 次氯酸钠; 肠炎沙门氏菌; 活的非可培养状态; 复苏

Formation and resuscitation process of viable but non-culturable state of foodborne pathogen *Salmonella enteritidis* induced by sodium hypochlorite

ZHENG Yu-Xi, HUANG Li-Hua, JIA Qiang, HAN Ming, DONG Lei*, ZHANG Ting, LIN Kai

(Collage of Food Science and Food Health, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT: Objective To study the induction of *Salmonella enteritidis* into a viable but non-culturable state (VBNC) by sodium hypochlorite solution with different available chlorine concentrations and the resuscitation conditions. **Methods** The *Salmonella enteritidis* was treated with sodium hypochlorite with different concentrations of available chlorine to analyze the changes of the viable non-culturable state bacteria count and the incidence of VBNC of *Salmonella enteritidis*, and the morphological differences between VBNC state cells was observed and normal cells of *Salmonella enteritidis* combined with the scanning electron microscope, and then the resuscitation effects of different resuscitation conditions were compared, and the physiological activity of the cells after resuscitation was evaluated. **Results** After treatment with 40 mg/L available chlorine for 20 min, all the viable

基金项目: 广东高校省级重点平台和重大科研项目(2019GKQNCX083)、广东高校省级重点平台和重大科研项目(2018GkQN CX074)、广州城市职业学院校级科研团队: 精准营养与分析科研团队

Fund: Supported by the Provincial Key Platforms and Major Scientific Research Projects of Guangdong Universities (2019GKQNCX083)

***通信作者:** 董蕾, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: 23024458@qq.com

***Corresponding author:** DONG Lei, Ph.D, Assistant Professor, Collage of Food Science and Food Health, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510640, China. E-mail: 23024458@qq.com

bacteria entered the VBNC state and the cell surface became wrinkled and collapsed, more than 60 mg/L effective chlorine concentration could kill all, cell fractured damaged. *Salmonella enteritidis* entering the VBNC state could be cultured under 5 kinds of resuscitation treatments. The recovery was better under the condition of 20 mmol/L sodium pyruvate×heat shock. PHi and intracellular ATP showed a decrease in cell activity compared with normal cells after resuscitation. **Conclusion** In food production and environmental cleaning, attention should be paid to the concentration of sodium hypochlorite, otherwise it is easy to cause the formation and recovery of VBNC state of *Salmonella enteritidis*, leading to food contamination and thereby increasing food safety risks.

KEY WORDS: sodium hypochlorite; *Salmonella enteritidis*; viable but non-culturable state; resuscitation

0 引言

细菌活的非可培养状态(viable but non-culturable state, VBNC)是细菌存活的一种特殊休眠状态,在这一状态下,细菌能抵抗外界恶劣环境,同时又可在外界胁迫解除或环境适宜时恢复生理活性、进行生长繁殖^[1-2]。VBNC 态的细菌在常规培养基上不可被培养,因此在食品安全检验中容易发生漏检,可能导致食品安全事件发生。现研究发现紫外线^[3]、过氧化氢^[4]、次氯酸钠^[5]等环境胁迫可诱导沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7^[6]等进入 VBNC 状态,同时富营养^[7]、升温^[8]等方式也可实现细菌的复苏。

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是引起全球细菌性食物中毒的主要食源性致病菌之一,在食品、空气、肥料、土壤等广泛存在^[9-10]。常见的沙门氏菌包括鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌等,其中肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)在沙门氏菌感染事件中占比较高^[11-12]。

次氯酸钠溶液(NaClO)作为一种广谱高效的杀菌剂,与水亲和性好,可与水以任意比例互溶,在水中形成次氯酸,与细胞内的蛋白质发生氧化反应或破坏磷酸脱氢酶,使细胞出现糖代谢失调现象,导致细胞死亡^[13-14]。由于成本低廉、杀菌效果好,次氯酸钠一般被广泛使用在食品原材料消毒、环境清洁环节。但现有研究发现其处理食品或清洁工作台面会导致食源性致病菌进入 VBNC 态,从而增加食品安全风险^[15-16]。

现在已有较多研究针对不同食源性致病菌的 VBNC 态诱导及复苏过程进行报道^[17-18],但针对次氯酸钠诱导肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态的过程及复苏过程研究未见有深入研究报告^[19]。因此本研究选用肠炎沙门氏菌[CMCC(B)50335]为研究对象,在前期诱导研究的基础上,用含有效氯浓度为 0~70 mg/L 的次氯酸钠溶液分别处理肠炎沙门氏菌,研究肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态的过程;在进入 VBNC 态后,进行去除胁迫、添加丙酮酸钠及热激处理,探索 VBNC 态肠炎沙门氏菌复苏条件。本研究可为食品加工、生产、环境消毒中次氯酸钠的正确使用提供理论支撑,从而降低食品安全风险。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

肠炎沙门氏菌[CMCC(B)50335],购自中国医学细菌菌种保藏管理中心。

木糖-赖氨酸-硫酸四癸钠琼脂(XLT4)、脑心浸液肉汤(BHI)、缓冲蛋白胨水(BPW)、M9 培养基、LB 琼脂(广东环凯生物科技有限公司); LIVE/DEAD *Bac* Light™ Bacterial Viability Kit Protocol、5(6)羧基荧光素(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);苏丹黑(分析纯,美国 Amresco 公司);丙酮酸钠(食品级,武汉康灿生物科技有限公司);NaClO 溶液[有效氯含量 1.2 g/mL,分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司];NaCl、KCl、MgCl₂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);戊二醛[分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];HiTouch™ 沙门氏菌计数平板(上海威正翔禹生物科技有限公司);ATP 分析试剂盒(美国 Calbiochem Novabiochem 公司);吗啉乙磺酸钠盐(MES,美国 Sigma 公司);尼日利亚菌素(美国 MCE 公司)。

1.2 主要仪器与设备

LDZX-40AI 立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);DH5000AB 型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HC-2518R 高速冷冻离心机(安徽中科科技有限公司);TX150 水浴锅(英国 Grant 公司);DMIL/DFC3000G 荧光显微镜(美国徕卡公司);UV1810S 型紫外分光光度计(青岛聚创环保有限公司);JSM 6360 LV 型扫描电镜(日本电子 JEOL 公司);MILLI-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);VCX130PB 超声波破碎仪(美国 Sonics 公司);闪烁计数器(美国 Beckman Coulter 公司);CaryEclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司);PYE-UNICAM SP9 原子吸收分光光度计(意大利 Unicam 公司)。

1.3 实验条件

1.3.1 菌种活化及菌悬液制备

实验菌株接种于脑心浸液肉汤并涂布 LB 平板划线,挑取单菌落于 10 mL 营养肉汤中,37 °C 振荡培养(150 r/min)

至达到对数生长期。4 °C、2850 r/min 离心 20 min, 利用预冷的 PBS 缓冲液(pH 7.5)清洗 2 次, 无菌水重悬, 调整菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL, 此时 OD₅₅₀ 为 6.30。

1.3.2 诱导肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态

在本实验室前期的实验中, 已发现含有效氯浓度为 30 mg/L 的次氯酸钠溶液处理肠炎沙门氏菌 20 min 可使肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态。因此本研究中分别取 0、83.3、166.7、250.0、333.2、416.5、499.8 和 583.1 μL NaClO 溶液(1.2 g/L)溶于 1 L 水中, 使其混合溶液有效氯浓度分别为 0、10、20、30、40、50、60 和 70 mg/L。

取制备好的菌悬液 24 份, 每份 1 mL, 在 4 °C 下、8000 r/min 离心 3 min, 轻柔弃去上清, 备用。将有效氯浓度为 0、10、20、30、40、50、60 和 70 mg/L NaClO 溶液各 1 mL 分别加入上述菌悬液离心管中, 轻微振荡, 遮光室温处理 20 min, 每个浓度设置 3 个重复。

处理结束后立即在 4 °C 下, 8000 r/min 离心 3 min, 轻柔弃去上清。无菌生理盐水清洗 2 次, 终止反应, 进行计数分析。

(1) 肠炎沙门氏菌总菌数、活菌数和可培养数检测

可培养数检测: 利用 HiTouch™ 沙门氏菌计数平板进行计数。

总菌数检测: 利用吖啶橙荧光显微镜计数法(acridine orange direct count, AODC)进行计数^[17]。

活菌数检测: 利用活菌直接计数法(direct viable count, DVC)进行计数^[20]。

荧光显微镜观察: 观察时随机选取 10 个视野进行观察拍照, 每个视野范围内细菌数不少于 50 个, 拍照计数后取平均^[21]。

VBNC 细胞数及 VBNC 发生率计算方法^[22]见公式(1)、(2):

$$a=b-c \quad (1)$$

$$D/\% = a/b \times 100 \quad (2)$$

其中, a 为 VBNC 态细胞数, b 为活菌数, c 为可培养数, D 为 VBNC 发生率。

(2) 扫描电镜观察

菌液 4 °C 下, 8000 r/min 离心 3 min 后, 轻柔去除上

清。经 4% ($m:V$) 戊二醛固定后抽气, 根据 DING 等^[23]方法进行扫描电镜分析, 随机选取 10 个视野, 拍照。

1.3.3 VBNC 态肠炎沙门氏菌的复苏

按 1.3.2 处理, 取有效氯浓度 40 mg/L NaClO 溶液处理的肠炎沙门氏菌菌液 10 mL, 4 °C 下 8000 r/min 离心 3 min, 轻柔弃去上清。而后分别迅速按照表 1 处理 VBNC 态肠炎沙门氏菌, 每组 3 个重复。所有处理均在 37 °C 振荡培养(150 r/min) 24 h。

培养后, 采用平板计数方法进行计数, 同时进行扫描电镜拍照。若平板上长出菌落则表明 VBNC 态肠炎沙门氏菌实现复苏。

1.3.4 复苏后肠炎沙门氏菌生理活性检测

将 1.3.3 中经表 1 处理的菌液清洗 2 次, 重悬。以 1.3.1 中菌悬液为对照, 分别测定肠炎沙门氏菌的 pH_i 和腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)。

(1) 细胞内 pH (pH_i)测定

肠炎沙门氏菌细胞内 pH (pH_i)测定参考董建军等^[24]改进的胞内 pH 法(intracellular pH, ICP)。

绘制标准曲线: 将 5(6)-羧基荧光素分别加入 pH 为 6.4、6.0、5.6、5.2、4.8、3.0 的 50 mmol/L 柠檬酸盐-磷酸氢二钠缓冲液(含 110 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl₂)中, 测定发射波长 518 nm 和激发波长 488 nm 及 441 nm 下荧光比率的线性关系, 绘制标准曲线。得到方程: $Y=0.8201X-4.1171$, $r^2=0.8925$ ($P<0.05$)。

肠炎沙门氏菌 pH_i 测定: 以二甲基亚砜配制 10 mmol/L 的乙酰化 5(6)-羧基荧光素溶液, 加入 0.03 mL 至肠炎沙门氏菌菌悬液中, 剧烈振荡 1 min, 冰浴 15 min。混匀后用 1 °C 的 MES 缓冲液(含 110 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl₂, pH 6.2)清洗 3 次。离心后去除上清, 沉淀中加入 1 °C 7 mL、50 mmol/L 柠檬酸盐-磷酸氢二钠缓冲液(pH 3.0), 清洗, 重复 2 次后, 第 3 次置于冰浴 90 min。离心去除上清后, 加入柠檬酸盐-磷酸氢二钠缓冲液悬浮。悬浮液立即在激发波长 448 nm、发射波长 518 nm 下测定荧光值, 再在激发波长 441 nm、发射波长 518 nm 下测定荧光值, 根据标准曲线计算 pH_i。

表 1 VBNC 态肠炎沙门氏菌复苏处理
Table 1 Resuscitation of *Salmonella enteritidis* in VBNC state

序号	处理方式
R0	40 mg/L NaClO 溶液 10 mL
R1	0.85% (V:V)生理盐水 10 mL
R2	含 20 mmol/L 丙酮酸钠的 0.85% (V:V)生理盐水 10 mL
R3	0.85% (V:V)生理盐水 10 mL×15 s 热激处理(45 °C)
R4	0.85% (V:V)生理盐水 10 mL×30 s 热激处理
R5	含 20 mmol/L 丙酮酸钠的 0.85% (V:V)生理盐水 10 mL×15 s 热激处理

(2) 细胞内 ATP 测定

细胞内 ATP 浓度测定参考 GANESAN 等^[25]方法, 使用 ATP 分析试剂盒对细胞悬浮液进行处理, 利用闪烁计数器测量发光。

1.3.5 数据统计与分析

采用 Excel 对数据进行常规处理, 采用 SPSS 13.0 进行 ANOVA 方差分析和 DUNCAN 多重比较。

2 结果与分析

2.1 肠炎沙门氏菌 VBNC 态的检测

2.1.1 次氯酸钠诱导肠炎沙门氏菌进入 VBNC 状态

不同浓度有效氯浓度的次氯酸钠溶液处理肠炎沙门氏菌的总菌数、活菌数及可培养数如图 1a 所示。总菌数随着有效氯浓度的升高显著下降, 这可能是在低浓度次氯酸钠胁迫下, 肠炎沙门氏菌细胞仅受到轻微损伤, 细胞结构较为完整, 胞内 DNA 结构未遭到破坏, DNA 与吖啶橙结合发绿色荧光^[17]; 而高浓度下, 肠炎沙门氏菌细胞严重受损, DNA 也进一步分解断裂, 与吖啶橙结合发出红色荧光而不被计作总菌数^[26]。在有效氯浓度为 40 mg/L 处理下, 肠炎沙门氏菌的可培养数下降至 0 CFU/mL, 而此时活菌数仍有 (2.70±0.36) CFU/mL, 表明此时所有活菌均已进入 VBNC 态; 随着有效氯浓度进一步增加, VBNC 态菌数持续下降, 在大于 60 mg/L 时, 已检测不到活的肠炎沙门氏菌。

通过公式(1)和(2)计算出 VBNC 态细胞数量和发生率。如图 1b 所示, 随着有效氯浓度的不断升高, VBNC 态肠炎沙门氏菌的数量在有效氯浓度 10~30 mg/L 范围内不断升高,

30 mg/L 时达到最大值, 而此时 VBNC 发生率并未达到最大值, 这可能是因为部分细菌可在培养基上被培养出来; 当有效氯浓度在 40~50 mg/L 时, VBNC 发生率接近 100%, 表明所有活菌均已进入 VBNC 态, 但此时 VBNC 态肠炎沙门氏菌的数量急剧下降, 这可能是由于高浓度次氯酸钠进一步破坏前期形成的部分 VBNC 态肠炎沙门氏菌细胞所致, 因此可推断 40 mg/L 有效氯浓度的次氯酸钠溶液可使环境中的肠炎沙门氏菌完全进入 VBNC 态。但有效氯浓度超过 60 mg/L 后, 所有细胞均死亡, 细胞数量和 VBNC 发生率均降为 0。

HIGHMORE 等^[27]发现汤普森氏沙门氏菌(*Salmonella thompson*)在 50 mg/L 有效氯浓度下暴露 2 min, 可使其进入 VBNC 状态; FERNANDES 等^[5]发现肠炎沙门氏菌在 60 mg/L 处理下进入 VBNC 状态, 以上研究与本结果略有差异, 这可能是由于不同菌株对次氯酸钠的抗性有所差异。但当有效氯浓度持续增加时, 沙门氏菌均出现全部死亡现象。因此建议日常生产消毒中有效氯浓度应超过 60 mg/L 较为适宜。

2.1.2 扫描电镜观察情况

不同有效氯浓度次氯酸钠处理的肠炎沙门氏菌形态如图 2 所示。未经处理的细胞表面光滑饱满, 呈杆状(图 2a); 经不同有效氯浓度处理的肠炎沙门氏菌则出现不同程度的细胞破损现象。其中, 40 mg/L 有效氯浓度处理下, 细胞表面出现皱缩、凹陷, 部分细胞有破裂现象(图 2b)。PIENAAR 等^[28]曾报道大肠杆菌在 VBNC 态下出现细胞尺寸缩小、形态发生变化等现象。在本研究中, 肠炎沙门氏菌同样出现了相似的现象。而 70 mg/L 有效氯处理的肠炎沙门氏菌则几乎所有细胞均出现了破损、断裂等严重受损现象(图 2c)。

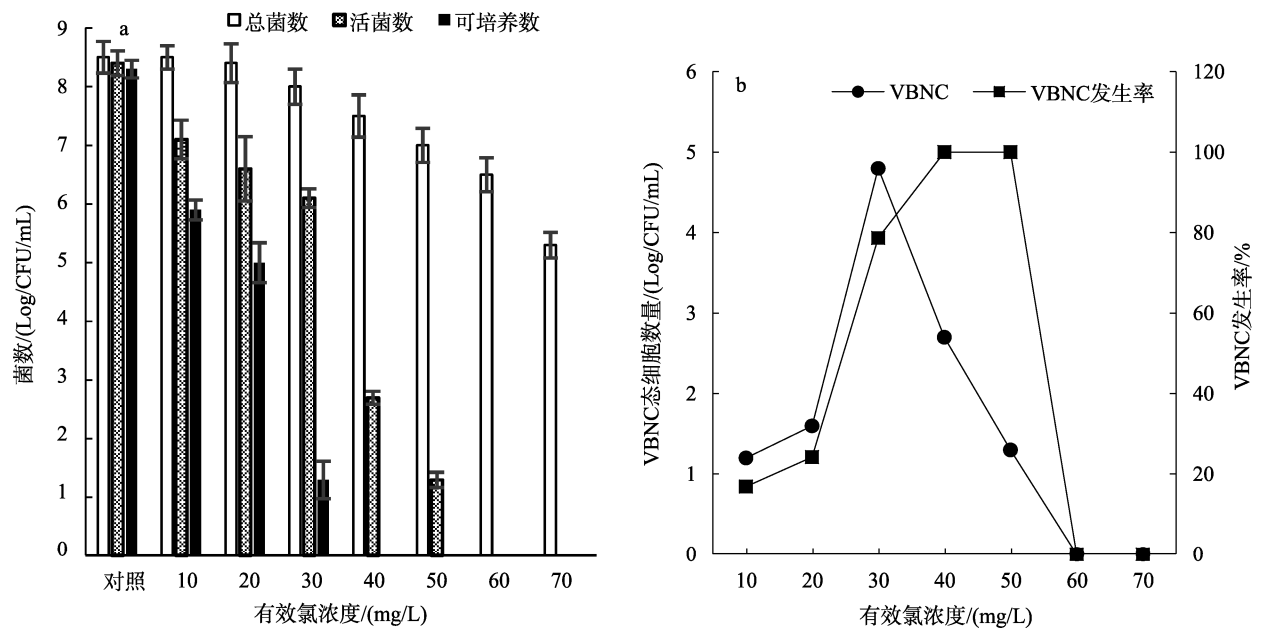
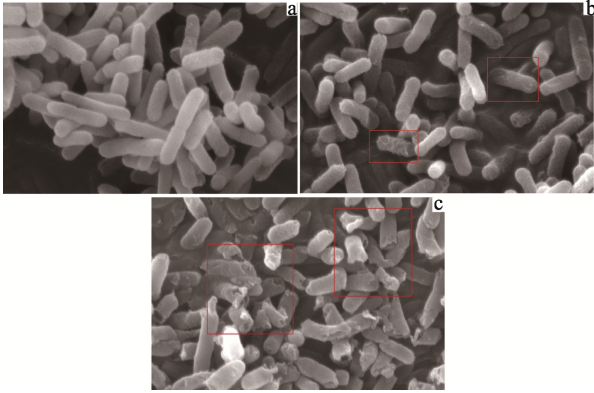


图 1 肠炎沙门氏菌在不同有效氯浓度下处理下的总菌数、活菌数和可培养数变化(a)及 VBNC 态细胞数量、VBNC 发生率(b) (n=3)

Fig.1 Changes of total bacterial count, viable count and culturable number of *Salmonella enteritidis* under different available chlorine concentrations (a), VBNC state cell number and VBNC incidence rate (b) (n=3)



注: a: 未处理; b: 40 mg/L 有效氯浓度处理 20 min; c: 70 mg/L 有效氯浓度处理 20 min。

图 2 肠炎沙门氏菌在不同有效氯浓度处理后外部形态变化 ($\times 12000$)

Fig.2 External morphological changes of *Salmonella enteritidis* treated with different available chlorine concentrations ($\times 12000$)

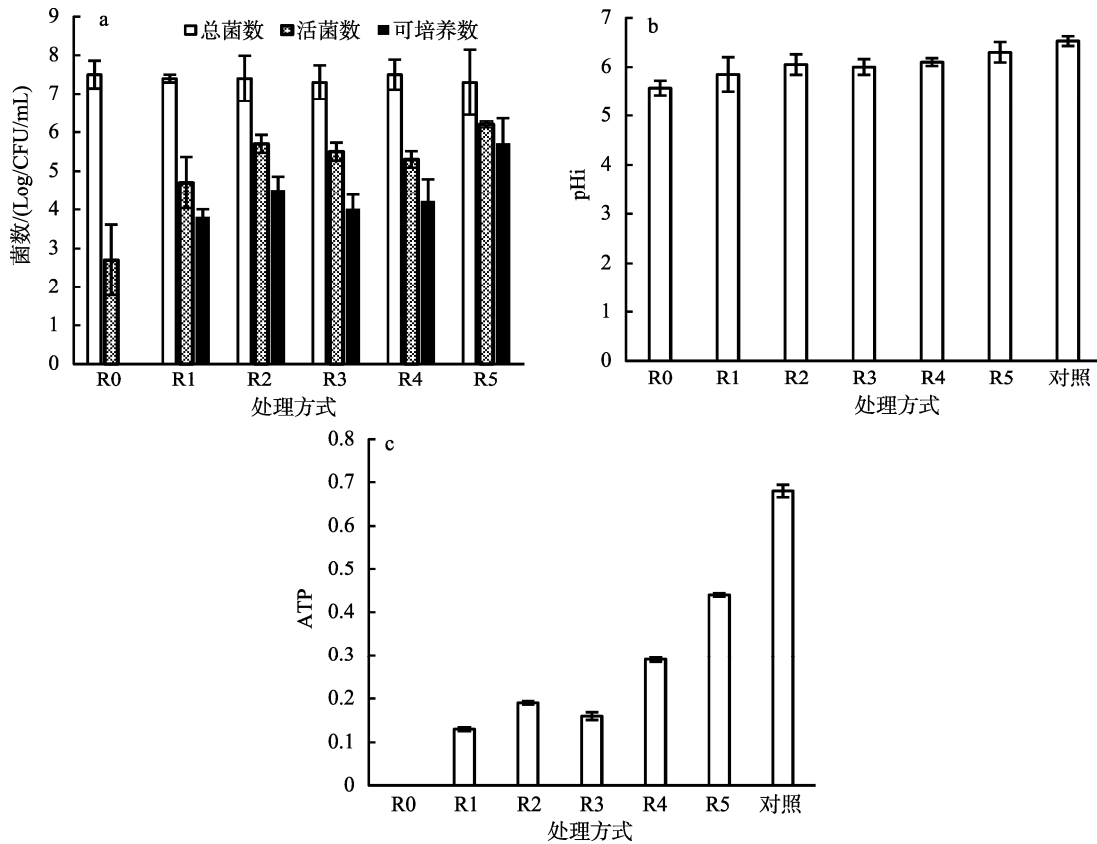
2.2 进入 VBNC 态肠炎沙门氏菌的复苏过程

通过图 1a 中菌数的统计分析, 得出在 40 mg/L 有效氯

浓度次氯酸钠的处理下, 肠炎沙门氏菌已无法培养, 此时所有活菌均进入了 VBNC 态。因此以该浓度处理下的肠炎沙门氏菌进行复苏研究。

如图 3a 所示, 在无何复苏处理的情况下, 对照组肠炎沙门氏菌无法恢复可培养状态。而在 5 种处理方式下, R5 处理的复苏效果最佳, 其可培养数和活菌数均显著高于其他 4 种处理方式 ($P < 0.05$); 其他 4 种处理方式之间则无显著差异。这可能是由于丙酮酸钠作为一种抗氧化剂, 能够有效缓解次氯酸钠对细胞的氧化损伤^[29-30], 而热激作为一种辅助手段, 可能使肠炎沙门氏菌细胞瞬间打开, 使丙酮酸钠进入, 降低氧化损伤^[31](图 3a)。

在 pH_i 和 ATP 的检测中, 本研究对比了正常细胞及复苏细胞(图 3b 和图 3c)。可以看到, VBNC 态肠炎沙门氏菌 pH_i 较低, 为 5.57 ± 0.15 。而经过不同复苏处理后, pH_i 上升, R5 处理下 pH_i 与正常细胞无显著差异 ($P > 0.1$); 而细胞内 ATP 含量则不同, 未经复苏处理 VBNC 态肠炎沙门氏菌的 ATP 为 0 mmol/L, 提示细胞内活性完全丧失, 细胞处于“休眠”状态, 而经过复苏处理后, ATP 上升, 但不同处理下的胞内 ATP 均无法达到正常细胞的水平。



注: a: 肠炎沙门氏菌各复苏处理下的总菌数、活菌数和可培养数; b: 肠炎沙门氏菌各复苏处理下 pH_i;

c: 肠炎沙门氏菌各复苏处理下胞内 ATP 水平。

图 3 VBNC 态肠炎沙门氏菌在复苏处理下的生理变化 ($n=3$)

Fig.3 Physiological changes of VBNC state *Salmonella enteritidis* under resuscitation treatment ($n=3$)

3 结 论

食源性致病菌在不利环境下会进入 VBNC 状态, 此时在常规培养基上不可被培养, 一旦胁迫解除又可恢复生理活性^[32], 引发食品安全风险。本研究利用不同有效氯浓度次氯酸钠处理肠炎沙门氏菌, 探索进入 VBNC 态肠炎沙门氏菌的次氯酸钠浓度, 并研究 VBNC 态肠炎沙门氏菌的复苏条件, 丰富了肠炎沙门氏菌的 VBNC 态研究方向。

在 40 mg/L 有效氯浓度的次氯酸钠处理 20 min 时, 肠炎沙门氏菌全部进入 VBNC 态, 而高于 60 mg/L 有效氯浓度则可全部灭杀肠炎沙门氏菌, 这与 FERNANDES 等^[29]利用次氯酸钠处理肠炎沙门氏菌结果类似。在复苏过程中, 利用生理盐水、20 mmol/L 丙酮酸钠及热激处理, 均可使 VBNC 态肠炎沙门氏菌复苏, 其中 20 mmol/L 丙酮酸钠×热激处理方式复苏效果最佳。复苏后细胞活性较正常细胞略低, 但不影响正常生理过程。

次氯酸钠由于其成本低廉、杀菌效果好而被广泛应用于食品原材料清洗、环境消毒等环节中^[33], 但消毒过程中随着有效氯浓度的降低, 食源性致病菌可能会进入 VBNC 态而不被检出。本研究通过比较有效氯浓度, 获得肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态的最大有效氯浓度, 可为食品加工、环境清洁的有效氯浓度选择提供理论指导和技术支撑。同时以本研究为基础, 应进一步进行肠炎沙门氏菌进入 VBNC 态及复苏过程的分子调控机制研究, 从而丰富肠炎沙门氏菌 VBNC 态的理论研究内容。

参考文献

- [1] PINTO D, SANTOS MA, CHAMBEL L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms [J]. Crit Rev Microbiol, 2015, 41(1): 61–76.
- [2] DUCRET ACM, DUKAN S. Characterization and resuscitation of non-culturable cells of *Ligionella pneumophila* [J]. BMC Microbiol, 2014, 14(1): 3–3.
- [3] DAVIES CM, EVISON LM. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters [J]. J Appl Microbiol, 1991, 70(3): 265–274.
- [4] XU J, SUITA K, OKUNO L, et al. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but non culturable state [J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(1): 133–137.
- [5] FERNANDES E, MARTINS VC, NÓBREGA C, et al. A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 52: 239–246.
- [6] MAROUANI-GADRI N, FIRMESSO O, CHASSAING D, et al. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 144(1): 96–103.
- [7] GUPTE AR, DE REZENDE CLE, JOSEPH SW. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(11): 6669–6675.
- [8] HABIMANA O, NESSE LL, MØRETRØ T, et al. The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: A subject of relevance [J]. Lett Appl Microbiol, 2015, 59(5): 464–470.
- [9] LITTLE CL, RHOADES JR, HUCKLESBY L, et al. Survey of *Salmonella* contamination of raw shell eggs used in food service premises in the United Kingdom, 2005 through 2006 [J]. J Food Prot, 2008, 71(1): 19–26.
- [10] PEDERSEN TB, OLSEN JE, BISGAARD M. Persistence of *Salmonella senftenberg* in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation [J]. Avian Pathol, 2008, 37(4): 421–427.
- [11] EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 [J]. EFSA J, 2015, 13(1): 3991.
- [12] LI Y, XIE X, XU X, et al. Nontyphoidal *Salmonella* infection in children with acute gastroenteritis: Prevalence, serotypes, and antimicrobial resistance in Shanghai, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(3): 200–206.
- [13] 陈丽珠. 次氯酸钠消毒控制微生物的效果评价[J]. 工业用水与废水, 2015, 46(5): 18–20.
CHEN LZ. Effect of microbial controlling by sodium hypochlorite disinfection [J]. Ind Water Wastewater, 2015, 46(5): 18–20.
- [14] 候田莹, 赵园园, 郑淑芳. 次氯酸钠在蔬菜加工中循环利用的杀菌效果评价[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 27–30.
HOU TY, ZHAO YY, ZHENG SF. Bactericidal efficacy evaluation of recycling used sodium hypochlorite during fresh-cut vegetable processing [J]. Food Sci, 2010, 31(13): 27–30.
- [15] AYRAPETYAN M, WILLIAMS TC, OLIVER JD. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable *Vibrios* [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(8): 2478–2483.
- [16] LIAO H, ZHONG X, XU L, et al. Quorum-sensing systems trigger catalase expression to reverse the oxyR deletion-mediated VBNC state in *Salmonella typhimurium* [J]. Res Microbiol, 2019, 170: 65–73.
- [17] SABINA H, MARIA DML, BONATO B, et al. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis [J]. J Bacteriol, 2002, 12(2): 6735–6745.
- [18] BRIAN EG, STECK TR. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(9): 3866–3872.
- [19] ZHAO X, ZHONG J, WEI C, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens [J]. Front Microbiol, 2017, 8(703813): 580.
- [20] 李影. 大肠杆菌、乳酸杆菌“活的非可培养状态”研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
LI Y. Study on viable but non-culturable *Escherichia coli* and *Lactobacillus lactis* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2007.
- [21] 李影, 段锐, 钱爱东, 等. “活的非可培养状态”细菌荧光观察方法[J]. 生物技术, 2010, 20(3): 66–68.
LI Y, DUAN R, QIAN AD, et al. A method of viable but non-culturable bacteria by fluorescence microscopy [J]. Biotechnology, 2010, 20(3): 66–68.
- [22] JIANG Q, FU B, CHEN Y, et al. Quantification of viable but

- nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(13): 6043–6050.
- [23] DING T, XUAN XT, LI J, *et al.* Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Staphylococcus aureus* in pure culture [J]. Food Control, 2016, 60: 505–510.
- [24] 董建军, 史媛英, 贾士儒. 胞内 pH 法评价酵母活性的研究[J]. 酿酒, 2004, 31(4): 67–69.
DONG JJ, SHI YY, JIA SR. Method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular Ph [J]. Liquor Making, 2004, 31(4): 67–69.
- [25] GANESAN B, STUART MR, WEIMER BC. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(8): 2498–2512.
- [26] SUQUET C, WARREN JJ, SETH N, *et al.* Comparative study of HOCl-inflicted damage to bacterial DNA ex vivo and within cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 493(2): 135–142.
- [27] HIGHMORE CJ, WARNER JC, ROTHWELL SD, *et al.* Viable-but-nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious [J]. Mbio, 2018, 9(2): 1–12.
- [28] PIENAAR JA, SINGH A, BARNARD TG. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review [J]. African J Lab Med, 2016, 5(1): 1–9.
- [29] FERNANDES E, MARTINS VC, NÓBREGA C, *et al.* A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 52: 239–246.
- [30] PASQUAROLI S, ZANDRI G, VIGNAROLI C, *et al.* Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms [J]. J Antimicrob Chemoth, 2013, 68: 1812–1817.
- [31] MORISHIGE Y, FUJIMORI K, AMANO F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella* [J]. Microbes Environ, 2013, 28: 180–186.
- [32] LIU J, LI L, LI B, *et al.* Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum* [J]. Microb Pathogenesis, 2017, 110: 257–261.
- [33] 董飒爽, 王凯利, 黄现青, 等. 肉鸡屠宰过程中预冷减菌工艺研究现状 [J]. 肉类工业, 2017, (5): 40–47.
DONG SS, WANG KL, HUANG XQ, *et al.* Research status of pre-cooling and bacteria-reducing technology in the process of broilers slaughtering [J]. Meat Ind, 2017, (5): 40–47.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



郑玉玺, 硕士, 实验师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: icefox1984@aliyun.com



董 蕾, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: 23024458@qq.com