

# 活的非可培养状态细菌的培养和复苏条件的研究

刘玉杰, 邵文泰, 张 浩, 鞠 宝\*

(烟台大学生命科学学院, 烟台 264003)

**摘 要: 目的** 研究食品常用的消杀条件对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进入活的非可培养状态(viable but nonculturable, VBNC)的诱导, 并探讨高温诱导的 VBNC 菌的复苏条件。**方法** 将对数生长长期的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌通过温度、盐度以及不同浓度的山梨酸钾处理进行诱导; 对高温条件诱导的 VBNC 菌液添加维生素类物质, 研究复苏 VBNC 菌的条件。**结果** 大肠杆菌在 $-20^{\circ}\text{C}$ 培养可形成 VBNC 菌, 在温度超过  $65^{\circ}\text{C}$ , 水浴 30 min 时存在 VBNC 菌; NaCl 浓度大于 15% 环境下培养 15 d 可诱导 VBNC 菌的形成; 山梨酸钾浓度高于 0.15% 即可诱导大肠杆菌进入 VBNC; 金黄色葡萄球菌在相同条件下诱导菌落数变化缓慢, 未出现 VBNC 菌。复苏研究中, 添加 0.10%~0.18% 范围的维生素 C 或 0.252% 的泛酸或 0.06% 生物素可使 VBNC 的大肠杆菌复苏; VBNC 的金黄色葡萄球菌复苏则需要添加 0.20%~0.25% 范围的维生素 C 或 0.248% 的泛酸或 0.06% 生物素。**结论** 食品常用的消杀条件均有形成 VBNC 菌的可能, VBNC 状态下的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在添加适量维生素类物质后可恢复培养能力。本研究有望为企业对食品的消杀处理以及检测、储藏运输等条件改善提供科学依据。

**关键词:** 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 活的非可培养状态; 诱导; 复苏

## Study on the culture and recovery conditions of viable but nonculturable bacteria

LIU Yu-Jie, SHAO Wen-Tai, ZHANG Hao, JU Bao\*

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264003, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the induction of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* into viable but nonculturable (VBNC) by commonly used food sterilization conditions, and explore the recovery conditions of high temperature-induced VBNC bacteria. **Methods** *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in logarithmic growth phase induced by temperature, salinity and different concentrations of potassium sorbate. Vitamins were added to the VBNC bacteria solution induced by high temperature to study the conditions for revival of VBNC bacteria. **Results** VBNC bacteria could be formed when *Escherichia coli* was cultured at  $-20^{\circ}\text{C}$  and when the temperature exceeds  $65^{\circ}\text{C}$  in a water bath for 30 min, the formation of VBNC bacteria could be induced by culturing for 15 days under the environment of NaCl concentration higher than 15%. It could be induced into VBNC by potassium sorbate concentration higher than 0.15%. *Staphylococcus aureus* induced a slow change in the number of colonies under the same conditions, and no VBNC bacteria appeared. In the resuscitation study, adding vitamin C in the range of

**基金项目:** 2020 年山东省专业学位研究生教学案例库项目、生物酶法制备脂肪酸甲酯的技术研究项目(黔科合支撑[2022]一般 034)

**Fund:** Supported by the 2020 Shandong Province Professional Degree Postgraduate Teaching Case Library, and the Technical Study on Preparation of Fatty Acid Methyl Ester by Biological Enzymatic Method (Qian Kehe Support [2022] General 034)

\*通信作者: 鞠宝, 副教授, 主要研究方向为应用微生物、酶工程。E-mail: jubao3075@163.com

\*Corresponding author: JU Bao, Associate Professor, College of Life Sciences, Yantai University, No.30, Qingquan Road, Laishan District, Yantai 264003, China. E-mail: jubao3075@163.com

0.10‰–0.18‰ or 0.252% pantothenic acid or 0.06‰ biotin could revive *Escherichia coli* of VBNC state. The recovery of *Staphylococcus aureus* of VBNC state required the addition of vitamin C in the range of 0.20‰–0.25‰ or 0.248% pantothenic acid or 0.06‰ biotin. **Conclusion** Commonly used food sterilization conditions may form VBNC bacteria and *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in VBNC state can recover their cultivation ability after adding proper amount of vitamins. This research is expected to provide a scientific basis for the improvement of conditions such as food disinfection, detection, storage and transportation in enterprises.

**KEY WORDS:** *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; viable but nonculturable; induction; recovery

## 0 引言

芽孢类微生物受外界环境胁迫会形成芽孢进入休眠状态,而在 20 世纪 80 年代由 XU 等<sup>[1]</sup>提出了关于非芽孢类微生物的休眠状态-活的非可培养状态(viable but nonculturable, VBNC),即非芽孢类微生物在不适条件下丧失自身可繁殖的能力,但仍具有代谢活性的一种存在状态。

目前,研究报道有 100 多种微生物可进入 VBNC 状态,其中包括革兰氏阳性细菌 33 个属,革兰氏阴性细菌 11 个属,有 3 种酵母也可进入 VBNC 状态<sup>[2–4]</sup>。已知低温、寡营养、渗透压变化、紫外照射等条件均可诱导微生物进入“VBNC”状态<sup>[5–9]</sup>,诱导机制是多因素协同参与,目前主要以严紧反应、毒素-抗毒素系统以及蛋白酶对抗毒素水解的诱导机制研究较多<sup>[9–12]</sup>。并且研究发现处于 VBNC 状态的微生物在环境中胁迫因素解除或添加复苏物质时,其可培养能力便会恢复,目前已知添加复苏因子(Rpf 蛋白)<sup>[13]</sup>、梯度升温<sup>[13–15]</sup>、丙酮酸<sup>[16–17]</sup>、吐温<sup>[18]</sup>、蛋白酶<sup>[19]</sup>等方法可使 VBNC 状态菌复苏。

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌是食品污染的主要致病菌,分别属革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,也是食品检测的重要检测对象<sup>[20–21]</sup>。烟台市芝罘区疾病预防控制中心对 2021 年烟台市水产品、水果蔬菜、调味品、鱼类 4 类食品受食源性病原菌污染情况的调查表明,除调味品类外其他 3 类的致病性微生物检出率均较高,500 份样本的检出率为 22.4%,其中沙门菌、金黄色葡萄球菌、致泻性大肠埃希菌为主要致病因子<sup>[22]</sup>。

食品微生物检测手段主要以平板涂布计数法、分子检测等<sup>[23–26]</sup>,对于“VBNC”状态的微生物检测方法有分子生物学法,如氮溴化丙锭-实时定量荧光检测法(propidium monoazide-fluorescence quantitative polymerase chain reaction, PMA-qPCR)、免疫学法、光学法(荧光显微镜观察)等<sup>[27–28]</sup>,目前的检测方法对 VBNC 菌无法做到准确检出。现有研究大都以低温形成 VBNC 菌为研究对象探究其复苏条件,PINTO 等<sup>[29]</sup>研究 4℃诱导大肠杆菌进入 VBNC 状态并使其复苏;DEBNATH 等<sup>[30]</sup>在 4℃下诱导霍乱弧菌形成 VBNC 菌可添加蛋白酶 K 复苏。但食品的主要消杀手段是采用高温灭菌,易形成 VBNC 菌且难以检出,以高温诱导实验菌

株形成 VBNC 菌并添加维生素类物质进行复苏的研究鲜有报道<sup>[31–33]</sup>。因此,本研究通过低温诱导、高温水浴、NaCl、山梨酸钾等条件诱导大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态,并对由高温诱导形成的 VBNC 状态菌添加维生素类物质进行复苏条件的研究,以期研究出高温诱导形成 VBNC 菌的复苏条件以应用于该消杀环境下的微生物 VBNC 菌检测,并期望由此可找到适合 VBNC 微生物的共同复苏因子,为食品保藏处理的条件选择及通过复苏后检测致病菌提供有效依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株及其培养基

该实验所用菌株为烟台大学生命科学学院实验室提供的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

Luria-Bertani 培养基(LB 培养基):蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g、去离子水 1 L,调节 pH 在 7.0~7.2。固体培养基是在上述培养基基础上添加 1.5%~2.0%的琼脂粉。LB 培养基为自制。

### 1.2 材料与试剂

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司); NaCl(分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司); 山梨酸钾(分析纯,天津市光复精细化工研究所); 维生素 C(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); D-泛酸钙(分析纯,上海蓝季科技发展有限公司); 生物素(分析纯,北京化工基地科学与技术研究院); 吡啶橙(分析纯,北京索莱宝科技有限公司); 碘化丙啶(纯度≥95%,上海源叶生物科技有限公司); 蛋白胨(分析纯,北京奥博星生物技术有限责任公司); 酵母浸粉(分析纯,北京双旋微生物培养基制品厂); 琼脂粉(分析纯,北京康倍斯科技有限公司)。

### 1.3 仪器与设备

HN-36S 电热恒温培养箱(上海力辰邦西仪器科技有限公司); THZ-82 气浴恒温振荡器(常州市亿能实验仪器厂); Allegra X-30R 高速冷冻离心机[贝克曼库尔特(美国)股份有限公司]; DM3000 LED 正置荧光显微镜(莱卡显微系统德国有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生长曲线的测定

由斜面保藏的菌种经无菌接种环转接至无菌 LB 液体培养基中, 放置恒温培养箱 37℃, 170 r/min 培养 12~18 h, 作为种子液备用。将菌液按照 2% 的接种量接种至无菌 LB 液体培养基并振荡混匀, 通过 10 倍梯度稀释该状态下的菌液后平板涂布, 记录初始菌落数。然后将菌液放置恒温培养箱 37℃, 170 r/min 培养, 每间隔 1 h 通过 10 倍梯度稀释该状态下的菌液后平板涂布以记录菌落数量的变化, 每组做 3 次平行实验。

1.4.2 诱导实验

取培养至对数生长阶段的微生物菌液 3 mL 接入至 27 mL 诱导培养基(诱导条件选择见表 1, 高温处理为水浴 30 min), 使诱导菌液菌落数在  $10^7$  CFU/mL。室温条件下诱导培养, 每间隔 5 d 通过平板涂布法获得该时间下的大肠杆菌可培养菌落数, 若可培养数量变化较小时可 10 d 记录一次可培养数量。当大肠杆菌可培养数低于检测线时, 通过荧光显微镜观察活菌、死菌的数量以确定是否存在进入 VBNC 状态菌, 每组做 3 次平行实验。

表 1 大肠杆菌进入 VBNC 状态的诱导因素  
Table 1 Inducing factors of *Escherichia coli* entering VBNC state

| 诱导因素   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 温度/℃   | -20    | 4      | 65     | 75     | 85     | 95     |
| 盐浓度/%  | 0.01   | 0.05   | 0.10   | 5.00   | 15.00  | 20.00  |
| 山梨酸钾/% | 0.0075 | 0.0500 | 0.0600 | 0.1000 | 0.1500 | 0.1000 |

1.4.3 荧光显微镜观察

取适量诱导菌液至无菌离心管, 8000×g 高速离心 5 min 去上清液。加入无菌生理盐水清洗菌体两次后加入 100 μL 生理盐水使菌体混匀, 分别加入吖啶橙和碘化丙啶各 5 μL, 混匀后冰上暗反应 15 min, 涂片后通过荧光显微镜观察。观察载玻片上涂片部位的上下左右中五部分, 观察并计数视野下荧光绿色的菌体。

1.4.4 复苏实验

以 20 mL 68℃高温水浴 30 min 丧失可培养能力的菌液为复苏的实验菌株, 添加维生素类物质(复苏物质的添加情况见表 2、3)在 37℃, 170 r/min 恒温培养通过观察培养基浑浊状况判断复苏情况, 并通过平板划线验证复苏菌是否为实验菌株。以不添加复苏物质的 VBNC 菌液作为空白对照, 同时均做 3 个平行实验。

表 2 VBNC 状态下大肠杆菌复苏条件探究  
Table 2 Study on resuscitation conditions of *Escherichia coli* under VBNC state

| 序号      | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 营养物质    |       |       |       |       |       |       |
| 维生素 C/% | 0.10  | 0.12  | 0.14  | 0.16  | 0.18  | 0.20  |
| 泛酸/%    | 0.246 | 0.248 | 0.250 | 0.252 | 0.254 | 0.256 |
| 生物素/%   | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.05  | 0.06  | 0.07  |

表 3 VBNC 状态下金黄色葡萄球菌复苏条件探究  
Table 3 Study on resuscitation condition of *Staphylococcus aureus* under VBNC state

| 序号      | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 营养物质    |       |       |       |       |       |       |
| 维生素 C/% | 0.05  | 0.10  | 0.15  | 0.20  | 0.25  | 0.30  |
| 泛酸/%    | 0.246 | 0.248 | 0.250 | 0.252 | 0.254 | 0.256 |
| 生物素/%   | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.05  | 0.06  | 0.07  |

1.5 数据处理

本研究测定数据进行 3 次重复, 实验数据经 Microsoft Excel 2021 软件进行汇总和分析, 由 SPSS 25 进行单因素方差分析和多重比较, Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的生长曲线

如图 1 所示, 在 1~4 h 进入对数生长期, 该阶段微生物繁殖能力强、自身酶系活跃、代谢旺盛。因此取对数期的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行 VBNC 状态菌的诱导, 并使初始菌落数在  $10^7$  CFU/mL 左右。

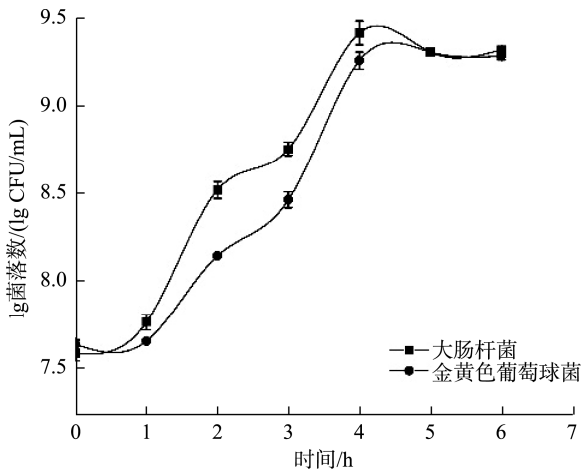


图 1 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的生长曲线  
Fig.1 Growth curves of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

2.2 不同条件诱导大肠杆菌、金黄色葡萄球菌形成 VBNC 状态菌

2.2.1 温度诱导大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 VBNC 状态菌的形成

在低温条件下诱导大肠杆菌其可培养菌落数呈现下降趋势(图 2a), 在 4℃条件下诱导可培养数降低缓慢; 当温度条件低至-20℃时, 可培养菌落数由初始  $5.87 \times 10^7$  CFU/mL 下降至  $1.13 \times 10^4$  CFU/mL。大肠杆菌在高温条件下诱导可培养菌落数变化显著(图 2b), 当大肠杆菌在高于 75℃高温条件下水浴 30 min 后, 其可培养菌落数

低于检出限; 在 65℃水浴 30 min 后大肠杆菌的可培养数下降至  $6.87\times10^5$  CFU/mL。

金黄色葡萄球菌对于温度的耐受力高于大肠杆菌, 在低温条件下培养 40 d 其可培养菌落数仍维持初始菌落数在  $10^7$  CFU/mL 左右(图 3a); 通过高温水浴条件下诱导金黄色葡萄球菌(图 3b), 在 75℃水浴 30 min 后可培养菌落数由初始  $1.4\times10^7$  CFU/mL 下降至 26 CFU/mL; 在 65℃水浴 30 min 后可培养菌落数下降至  $1.73\times10^4$  CFU/mL; 当水浴条件为 85 和 95℃金黄色葡萄球菌的可培养菌落数低于检出限。

食品在生产及运输保藏过程中常用的处理温度有 4℃冷藏、-20℃冷冻、高温条件下的巴氏杀菌处理。本研究中低温条件下大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在短期内微生物的可培养数变化较小, 高温短时间处理可有效诱导其进入 VBNC 状态, 但当高温条件解除并添加复苏物质即可恢复可培养状态, 通过大肠杆菌、金黄色葡萄球菌诱导结果比较可知不同菌株在诱导条件相同的情况下, 微生物进入 VBNC 状态所需的时间也会有所不同。食品的高温杀菌容易导致微生物进入“活的非可培养”状态, 并且通过常规微

生物检测方式难以检测出, 食品安全及人的生命健康安全都存在潜在风险。长时间处于低温环境的微生物可进入 VBNC 状态, WEI 等<sup>[34]</sup>通过-20 和 4℃低温诱导大肠杆菌发现微生物在富营养条件下对低温耐受性差于贫乏条件, 大肠杆菌在-20℃的 LB 液体培养基环境中培养 80 d 丧失可培养能力。因此食品的高温杀菌处理过程应保证食品受热均匀, 当中心温度在 75℃左右便可能会出现 VBNC 状态菌; 在食品储藏过程应保证无菌或者少菌状态, 当食品脱离低温状态就应尽快通过高温等方式进行杀菌处理, 从而保证食品安全。

2.2.2 NaCl 诱导大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态

不同盐浓度下诱导大肠杆菌进入 VBNC 状态的实验结果显示(图 4a), 将大肠杆菌在 NaCl 浓度高于 15%环境下培养 15 d 左右, 可看出大肠杆菌的可培养数低于检测范围; 在低浓度盐溶液中并未对大肠杆菌的可培养数产生显著性影响。金黄色葡萄球菌在低盐浓度和高盐浓度环境中可培养能力不受影响(图 4b), 金黄色葡萄球菌抵抗盐胁迫能力要强于大肠杆菌。

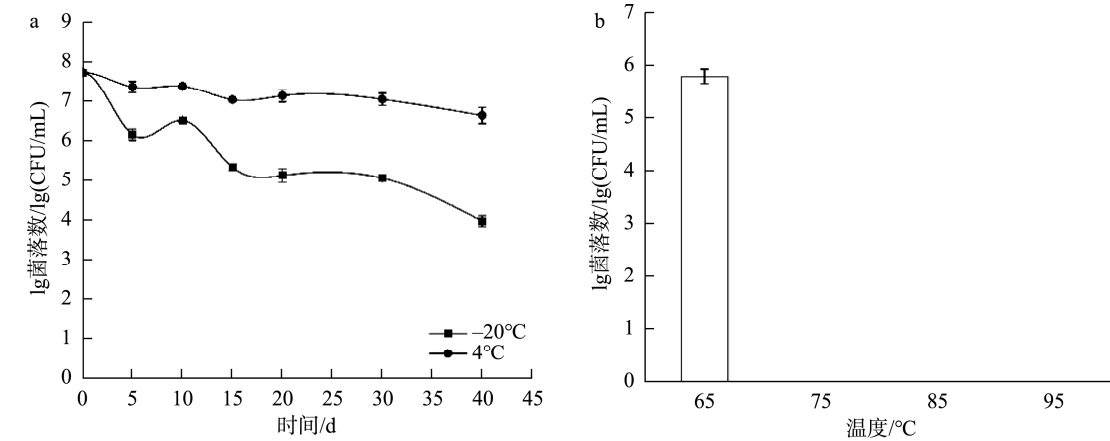


图 2 温度胁迫下大肠杆菌可培养菌落数变化  
Fig.2 Changes in the number of culturable colonies of *Escherichia coli* under temperature stress

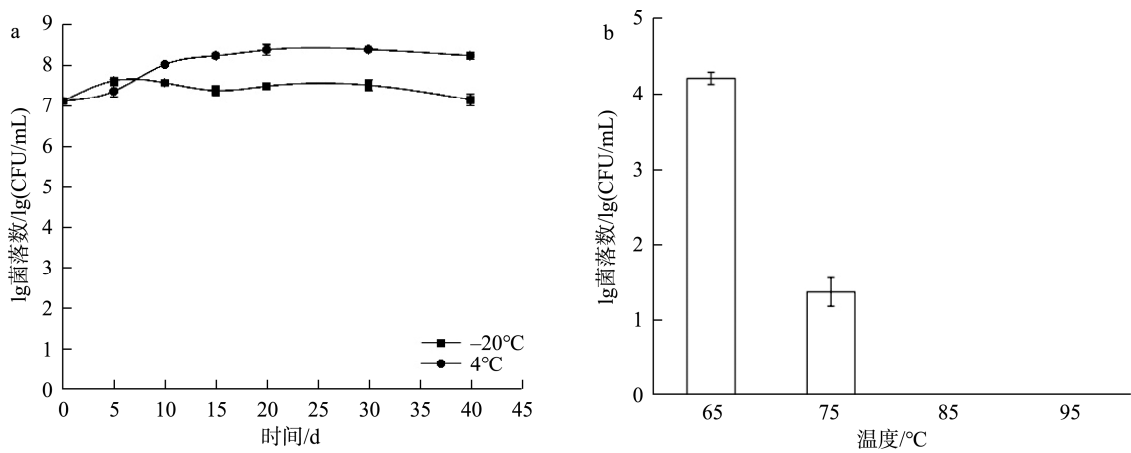


图 3 温度胁迫下金黄色葡萄球菌可培养菌落数变化  
Fig.3 Changes in the number of culturable colonies of *Staphylococcus aureus* under temperature stress

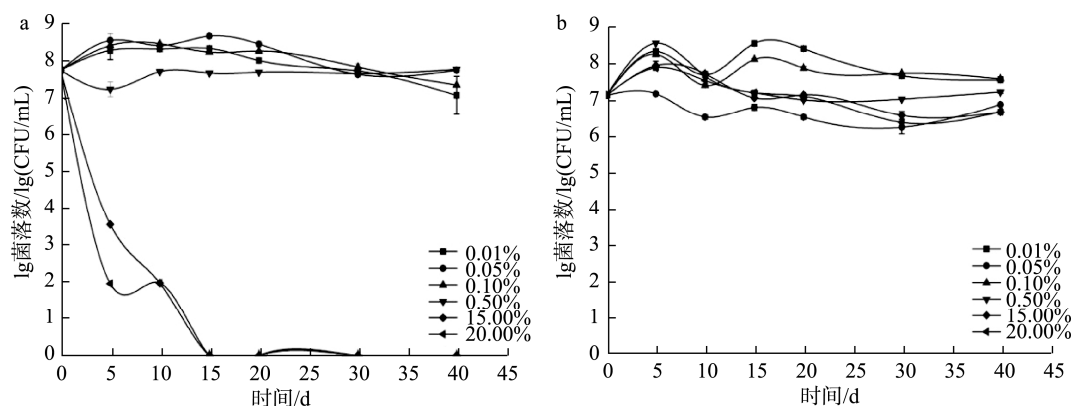


图 4 NaCl 诱导条件下大肠杆菌(a)和金黄色葡萄球菌(b)可培养菌落数变化

Fig.4 Changes in the number of culturable colonies of *Escherichia coli* (a) and *Staphylococcus aureus* (b) under NaCl induction conditions

大肠杆菌属革兰氏阴性菌,与金黄色葡萄球菌革兰氏阳性菌相比细胞膜成分简单易受渗透压影响,本研究中当培养环境中的 NaCl 浓度达到 15.00%以上便可以诱导大肠杆菌进入 VBNC 状态。KHEZRI 等<sup>[35]</sup>通过高盐胁迫诱导咸鱼中大肠杆菌,发现在无盐胁迫下大肠杆菌在水溶液和鱼肉中均保持可培养的能力,但在高盐胁迫下(10%、30%)大肠杆菌在水溶液中 4 d 便可丧失培养能力,在咸鱼肉中分别 9 和 5 d 丧失可培养能力。当长期处于高渗环境中,处于 VBNC 状态的大肠杆菌便会丧失复苏能力最终死亡。高渗处理食品进行食品保藏可有效起到杀菌抑菌效果,但不符合现代人低盐、低糖的饮食习惯,而且微生物在低渗透压环境中由于细胞壁的保护对自身影响较小,因此在选择适当盐浓度杀菌处理方式时,可结合其他杀菌处理(如高温处理)以保证食品安全性。

2.2.3 山梨酸钾诱导大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态

不同浓度的山梨酸钾诱导大肠杆菌可培养菌落数变化如图 5a 所示,低浓度的山梨酸钾可抑制菌体浓度的增长,随着山梨酸钾浓度的升高其抑菌效果显著,并且在高浓度山梨酸钾环境中培养大肠杆菌可使其丧失培养能力。GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中采用食品中山梨酸钾最大残留量诱导大肠杆菌,在该条件

下培养 20 d 大肠杆菌的可培养菌落数低于检出限;在含有山梨酸钾 0.1500%环境中培养大肠杆菌 30 d 即可丧失可培养能力。与大肠杆菌相比,金黄色葡萄球菌对山梨酸钾的耐受力要强,如图 5b 所示,山梨酸钾对金黄色葡萄球菌短期内仅发挥抑菌作用,并未使其丧失可培养能力。

山梨酸钾是食品中常用的一种作防腐剂,能够与微生物酶系统中的巯基结合从而破坏微生物。本研究中山梨酸钾使用量浓度按照国家食品添加剂添加标准,其中山梨酸钾的添加量超过 0.1500%会诱导大肠杆菌进入非可培养状态。日本研究者 OGANE 等<sup>[36]</sup>在研究食品添加剂对大肠杆菌诱导情况时发现山梨酸的质量浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  培养 15 d 左右,大肠杆菌的可培养数低于检出限(小于 100 CFU/mL),其他诱导因素苯甲酸和次氯酸钠在相同浓度下相同研究时间范围内均未出现同山梨酸相同效果。山梨酸杀菌效果会受到环境 pH 的影响,山梨酸  $\text{pK}_a$  为 4.76,低 pH 条件下易透过细胞膜从而影响生物活性<sup>[37]</sup>。与 OGANE 等<sup>[36]</sup>研究条件不同,前者山梨酸溶解于生理盐水并且 pH 为 5.6,本研究山梨酸溶于 LB 液体培养基并调至中性环境,因此本研究实验结果与日本研究者相比山梨酸钾浓度高,且诱导时间较长。将以该实验结果为基础,进一步研究酸性环境与山梨酸钾共同作用诱导微生物进入 VBNC 的情况。

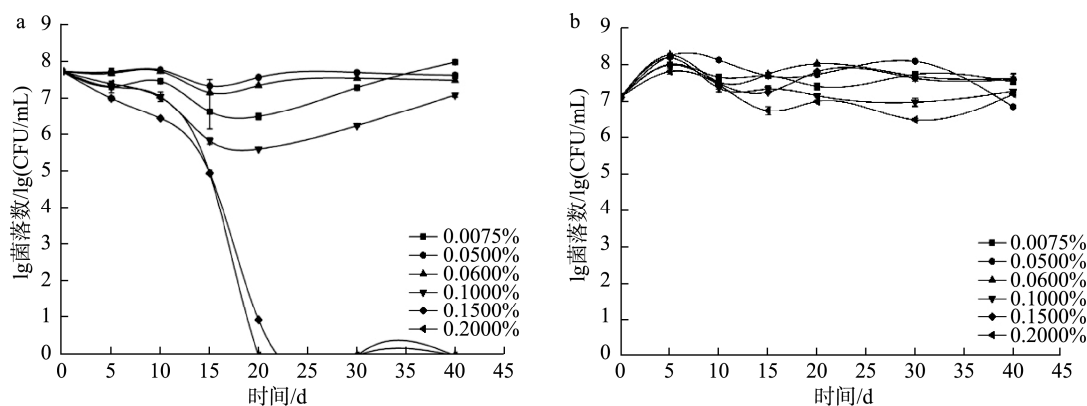


图 5 山梨酸钾诱导条件下大肠杆菌(a)和金黄色葡萄球菌(b)可培养菌落数变化

Fig.5 Changes in the number of culturable colonies of *Escherichia coli* (a) and *Staphylococcus aureus* (b) under the induction condition of potassium sorbate

2.3 荧光显微镜观察结果

经荧光染料染色后通过荧光显微镜观察, 以大肠杆菌 75℃水浴 30 min 的荧光显微镜结果为例, 如图 6 所示(a 是 b 与 c 的叠加图, b 图显示的是该视野下存在的总菌数量情况, c 图是该视野下的死菌数量, d 是明场下菌体分布状况)。大肠杆菌在 75℃水浴 30 min 后平板涂布计数低于检测值, 无法检出有活菌存在, 在荧光显微镜下可观察到活菌存在, 即在该诱导条件下大肠杆菌可进入 VBNC 状态。其他低于检出限的荧光显微镜观察同理。

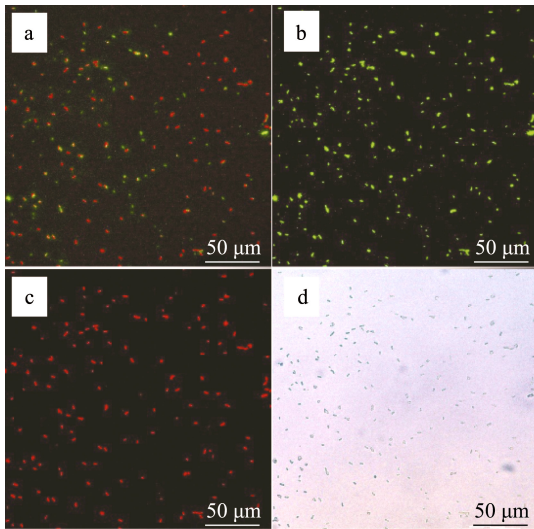


图 6 大肠杆菌的荧光显微镜照片  
Fig.6 Fluorescence microscope photo of *Escherichia coli*

2.4 VBNC 状态菌的复苏

由高温诱导形成 VBNC 状态的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌通过维生素类物质复苏结果如表 4、5 所示, 实验所选取的 3 种维生素在一定浓度下均可使 VBNC 状态下的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌复苏, 其中维生素 C 的复苏效果最佳。维生素 C 是一种抗氧化剂, 可有效保护机体免受氧化剂的威胁, 也可作为微生物生长因子, 因此可用于 VBNC 状态菌的复苏。维生素 C 添加量在 0.10‰~ 0.18‰均可使 VBNC 状态的大肠杆菌恢复可培养能力, 0.20‰~0.25‰可使 VBNC 状态的金黄色葡萄球菌复苏。VBNC 状态菌的复苏效果与维生素 C 浓度非正相关关系, 维生素 C 浓度过高会抑制 VBNC 状态菌的复苏, 并有实验表明维生素 C 对微生物有杀灭作用<sup>[38]</sup>。

泛酸在机体内以辅酶 A 的形式参与脂肪酸的代谢, 并且在细菌体内可用于构建细胞壁。泛酸的使用量在 0.252%可使 VBNC 状态的大肠杆菌复苏, 0.248%可使 VBNC 状态的金黄色葡萄球菌复苏。泛酸在食品中含量丰富, 在食品工业中可用作发色剂以保持肉色良好的状态, 也可作为食品强化剂应用于面包、糕点、乳制品等, 因此该类食品中进入 VBNC 状态的微生物极易通过泛酸复苏, 导致食品污染。

表 4 添加维生素类物质对 VBNC 状态大肠杆菌复苏的影响  
Table 4 Effects of vitamin supplementation on the recovery of *Escherichia coli* in VBNC state

| 序号<br>营养物质 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| 维生素 C/‰    | + | + | + | + | + | - |
| 泛酸/%       | - | - | - | + | - | - |
| 生物素/‰      | - | + | - | - | + | - |

注: +表示有菌落生长, -表示无菌落生长, 下同。

表 5 添加维生素类物质对 VBNC 状态金黄色葡萄球菌复苏的影响  
Table 5 Effects of vitamin supplementation on recovery of *Staphylococcus aureus* in VBNC state

| 序号<br>营养物质 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| 维生素 C/‰    | - | - | - | + | + | - |
| 泛酸/%       | - | + | - | - | - | - |
| 生物素/‰      | - | - | - | - | + | - |

生物素也称为辅酶 R, 广泛存在于自然界的各种生物中, 并且在食品中也广泛存在, 在机体内参与脂肪合成、糖异生等反应途径。实验结果表明生物素含量在 0.03‰、0.06‰可使 VBNC 状态的大肠杆菌复苏, 其中生物素含量为 0.06‰可在 18~24 h 恢复 VBNC 状态大肠杆菌的可培养能力, 添加 0.03‰生物素 VBNC 状态的大肠杆菌超过 48 h 后可培养能力才会恢复; 0.06‰可使 VBNC 状态下的金黄色葡萄球菌可培养能力恢复。

由以上可知相同诱导条件下进入 VBNC 状态的不同菌株, 通过相同条件复苏其复苏效果不同。食品中含有丰富的维生素类物质, 作为微生物生长因子可成为 VBNC 状态菌复苏的有效因素。因此为避免 VBNC 状态菌的复苏可降低或提高食品中维生素类物质的含量, 从而避免存在非可培养状态菌的复苏浓度, 以确保食品安全。

3 结 论

本研究以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为实验菌株通过低温处理(冷藏、冷冻)、高温水浴、盐浓度、添加食品防腐剂山梨酸钾诱导其进入 VBNC 状态, 以维生素类物质作为复苏因素探究 VBNC 菌的复苏条件。研究发现所述条件下均可出现 VBNC 菌, 一定含量的维生素可使 VBNC 菌复苏。

食品的消杀处理通常会采取研究中所用条件, 因此在消杀处理上可通过二次消杀或采取多种消杀方式处理以保证食品安全。活的非可培养状态菌在食品检测中难以检出, 可将复苏因素引入食品检测方法中, 改良检测技术以提高检测的准确性, 同时为确保食品安全性也可在贮存运

输过程中避免复苏条件的存在。期望本研究可以为食品消杀和食品微生物检测提供一定的参考依据,同时以本研究为基础,将进一步探索微生物进入 VBNC 状态的诱导机制和复苏过程的调控机制,从而为之后 VBNC 菌检测方法研究提供有效依据。

## 参考文献

- [1] XU HS, ROBERTS N, SINGLETON FL, *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment [J]. *Microb Ecol*, 1982, 8: 313–323.
- [2] LI Y, HUANG TY, MAO Y, *et al.* Study on the viable but non-culturable (VBNC) state formation of *Staphylococcus aureus* and its control in food system [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 2775.
- [3] MAERTENS L, MATROULE JY, VAN HOUDT R. Characteristics of the copper-induced viable-but-non-culturable state in bacteria [J]. *World J Microb Biot*, 2021, 37(3): 1–9.
- [4] NOLL M, TRUNZER K, VONDRAN A, *et al.* Benzalkonium chloride induces a VBNC state in *Listeria monocytogenes* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 184.
- [5] 王亚利, 包秋华, 王俊国, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种 ND02 活的非可培养态诱导和复苏[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 68–73.
- WANG YL, BAO QH, WANG JG, *et al.* Induction and resuscitation of viable but non-culturable state in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02 [J]. *Food Sci*, 2017, 38(6): 68–73.
- [6] 郑玉玺, 黄利华, 贾强, 等. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(14): 5546–5552.
- ZHENG YX, HUANG LH, JIA Q, *et al.* Formation and resuscitation process of viable but non-culturable state of foodborne pathogen *Salmonella enteritidis* induced by sodium hypochlorite [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(14): 5546–5552.
- [7] LI Y, HUANG TY, MAO Y, *et al.* Study on the viable but non-culturable (VBNC) state formation of *Staphylococcus aureus* and its control in food system [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 2775.
- [8] NOLL M, TRUNZER K, VONDRAN A, *et al.* Benzalkonium chloride induces a VBNC state in *Listeria monocytogenes* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 184.
- [9] 邓阳, 刘君彦, 房慧婧, 等. VBNC 状态啤酒易感乳杆菌的诱导及复苏[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4): 154–159.
- DENG Y, LIU JY, FANG HJ, *et al.* Induction and resuscitation of VBNC state beer-spoilage lactobacilli [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(4): 154–159.
- [10] CHEN S, LI X, WANG Y, *et al.* Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states [J]. *Water Res*, 2018, 142: 279–288.
- [11] MAERTENS L, MATROULE JY, HOUDT R. Characteristics of the copper-induced viable-but-non-culturable state in bacteria [J]. *World J Microb Biot*, 2021, 37(3): 1–9.
- [12] 李萌. 冷冻条件下金黄色葡萄球菌活的非可培养状态的形成及特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LI M. Formation of viable but nonculturable state of *Staphylococcus aureus* under frozen condition and its characteristics [D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [13] 张硕. 基于藤黄球菌 Rpf 的高效 PCBs 降解菌复苏培养及其降解特性研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2019.
- ZHANG S. Resuscitation culture and degradation characteristics of highefficiency PCBs degrading bacteria based on Rpf from micrococcus luteus [D]. Jinghua: Zhejiang Normal University, 2019.
- [14] ASHOUR HM, ELSHISHTAWY HM, ABDELLATIF GR, *et al.* First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction resuscitation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2791–2801.
- [15] RAO NV, SHASHIDHAR R, BANDEKAR JR. Induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* in artificial sea water [J]. *World J Microb Biot*, 2014, 30(8): 2205–2212.
- [16] VILHENA C, KAGANOVITCH E, GRÜNBERGER A, *et al.* Importance of pyruvate sensing and transport for the resuscitation of viable but nonculturable *Escherichia coli* K-12 [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(3): e00610–18.
- [17] AFARI GK, HUNG YC. Detection and verification of the viable but nonculturable (VBNC) state of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* using flow cytometry and standard plating [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(7): 1913–1920.
- [18] 刘德欣, 刘佩莹, 陈颖翹, 等. 金黄色葡萄球菌活的非可培养状态的诱导和复苏[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 163–167.
- LIU DX, LIU PY, CHEN YQ, *et al.* Induction and resuscitation of viable but non-culturable state of *Staphylococcus aureus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(3): 163–167.
- [19] ASHOUR HM, ELSHISHTAWY HM, ABDELLATIF GR, *et al.* First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction resuscitation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2791–2801.
- [20] 马雪婷, 冯雨欣, 耿冰雨, 等. 食源性大肠杆菌危害及其检测技术研究进展[J]. *广东化工*, 2021, 48(22): 191–193.
- MA XT, FENG YX, GENG BY, *et al.* Research progress on harm and detection technology of foodborne *Escherichia coli* [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2021, 48(22): 191–193.
- [21] 徐文娟. 常见的几种金黄色葡萄球菌快速检测技术[J]. *现代食品*, 2021, (20): 105–107.
- XU WJ. Analysis of several common rapid detection techniques for *staphylococcus aureus* [J]. *Mod Food*, 2021, (20): 105–107.
- [22] 王圣涵. 烟台市 2021 年食品风险微生物及致病因子污染现状分析[J]. *食品安全导刊*, 2021, (32): 113–115, 119.
- WANG SH. Analysis of the current situation of food risk microorganisms and pathogenic factors contamination in Yantai City in 2021 [J]. *China Food Saf Mag*, 2021, (32): 113–115, 119.
- [23] 王忠桂. PCR 技术在食品微生物检测中的运用[J]. *食品安全导刊*, 2022, (8): 155–157.

- WANG ZG. Application of PCR technology in the detection of food microorganisms [J]. China Food Saf Mag, 2022, (8): 155–157.
- [24] 熊义爱. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势[J]. 食品安全导刊, 2022, (17): 187–189.
- XIONG YAI. Microbial limit requirements in food and development trend of detection technology [J]. China Food Saf Mag, 2022, (17): 187–189.
- [25] 曹新红. 关于食品微生物检测问题的分析[J]. 现代食品, 2022, 28(2): 42–44.
- CAO XH. Analysis on the problems of food microbial detection[J]. Mod Food, 2022, 28(2): 42–44.
- [26] 王俊丽. 运用分子生物学技术进行食品微生物检测[J]. 食品安全导刊, 2022, (6): 187–189.
- WANG JL. Use molecular biology technology to detect food microbe [J]. China Food Saf Mag, 2022, (6): 187–189.
- [27] 刘锦涛, 夏静, 喻志学, 等. 食源性致病菌活的不可培养状态检测方法研究进展[J]. 农产品加工, 2020, (7): 65–67, 72.
- LIU JT, XIA J, YU ZX, *et al.* Research progress in detection methods for viable but non-culturable state of foodborne pathogens [J]. Farm Prod Process, 2020, (7): 65–67, 72.
- [28] 聂新颖, 张蕊蕊, 蒋丽芬, 等. 食源性微生物 VBNC 状态检测与分离方法的研究进展[J]. 现代食品科技, 2017, 33(9): 283–292.
- NIE XY, ZHANG RR, JIANG LF, *et al.* Research progress of detection and separation methods for foodborne microorganisms at VBNC state [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(9): 283–292.
- [29] PINTO D, ALMEIDA V, ALMEIDA SANTOS M, *et al.* Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli [J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(6): 1601–1611.
- [30] DEBNATH A, MIYOSHI S. The impact of protease during recovery from viable but non-culturable (VBNC) state in *Vibrio cholerae* [J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2618.
- [31] 张晓华, 钟浩辉, 陈吉祥. 细菌活的非可培养状态研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 153–160.
- ZHANG XH, ZHONG HH, CHEN JX. Research progress on viable but nonculturable state bacteria [J]. Period Ocean Univ China, 2020, 50(9): 153–160.
- [32] 张蕊蕊, 关翔宇. 自然环境中功能菌活的非可培养状态形成及复苏机制研究进展[J]. 环境化学, 2021, 40(4): 1243–1253.
- ZHANG RR, GUAN XY. Research progress on the formation and resuscitation mechanism of viable but non-culturable state of functional bacteria in natural environment [J]. Environ Chem, 2021, 40(4): 1243–1253.
- [33] 阚玉敏, 蒋娜, 白凯红, 等. 细菌有活力但不可培养状态及其机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 880–891.
- KAN YM, JIANG N, BAI KH, *et al.* Research progress on viable but non-culturable state of bacteria [J]. Microbiol China, 2020, 47(3): 880–891.
- [34] WEI C, ZHAO X. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by low temperature and its resuscitation [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2728.
- [35] KHEZRI M, REZAEI M, MOHABBATI MOBAREZ A, *et al.* Viable but non culturable state and expression of pathogenic genes of *Escherichia coli* O157:H7 in salted silver carp [J]. J Food Saf, 2020, 40(5): e12843.
- [36] OGANE H, SATO TA, SHINOKAWA C, *et al.* Low-concentration sorbic acid promotes the induction of *Escherichia coli* into a viable but nonculturable state [J]. Biocontrol Sci, 2019, 24(1): 67–71.
- [37] EKLUND T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels [J]. J Appl Bacteriol, 1983, 54(3): 383–389.
- [38] 杨荫华, 卓鉴波. 维生素 C 对微生物的杀灭作用[J]. 预防医学情报, 1986, (2): 73–77.
- YANG YH, ZHUO JB. The killing effect of vitamin C on microorganisms [J]. J Prev Med Inform, 1986, (2): 73–77.

(责任编辑: 黄周梅 张晓寒)

## 作者简介



刘玉杰, 硕士研究生, 主要研究方向为应用微生物。

E-mail: 18435996332@163.com



鞠 宝, 副教授, 主要研究方向为应用微生物、酶工程。

E-mail: jubao3075@163.com