

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240708004

常见消毒储存条件的细菌活的非可培养状态 诱导与复苏研究进展

张毓羚¹, 杨溢轩¹, 张铮傲¹, 井天源¹, 张子龙², 张 灿^{3*}, 张明露^{1*}

(1. 北京工商大学轻工科学与工程学院, 北京 100048; 2. 上海国际旅行卫生保健中心, 上海 200335;
3. 中国检验检疫科学研究院卫生检验与检疫研究所, 北京 100176)

摘 要: 活的非可培养(viable but non cultivable, VBNC)状态是某些细菌在不良环境胁迫下的一种生存策略, 在一定的条件下, 进入 VBNC 状态的细菌可以复苏, 重新恢复可培养的能力, 致病菌也会恢复其致病性。由于微生物培养法和常规分子生物学手段都无法检测到 VBNC 状态细菌, 因此容易对食品安全和公共卫生造成潜在威胁。本文首先简要阐述了 VBNC 状态细菌的最新研究进展, 揭露出 VBNC 状态细菌的风险和威胁; 其次系统介绍了 VBNC 状态细菌的形成和复苏机制, 重点总结了在水、乳制品和肉制品这 3 种基质中自然存在的细菌被诱导进入 VBNC 状态细菌的条件, 以及 VBNC 状态细菌复苏的条件和方法。了解细菌在水和食品基质中进入 VBNC 状态的条件范围能够指导食品加工处理过程中如何避免 VBNC 状态细菌的产生, 对于水和食品的安全风险防控具有重要意义。

关键词: 饮用水; 乳制品; 肉制品; 活的非可培养状态; 诱导; 复苏

Research progress on the induction and resuscitation of viable but non cultivable state bacteria in common sterilization and storage conditions

ZHANG Yu-Ling¹, YANG Yi-Xuan¹, ZHANG Zheng-Ao¹, JING Tian-Yuan¹,
ZHANG Zi-Long², ZHANG Can^{3*}, ZHANG Ming-Lu^{1*}

(1. School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2. Shanghai International Travel Healthcare Center, Shanghai 200335, China; 3. Institute of Health Inspection and Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Viable but non cultivable (VBNC) state is a survival strategy employed by certain bacteria under adverse environmental conditions. Under specific conditions, bacteria that enter the viable but non-culturable (VBNC) state can be revived, regaining their ability to grow in culture. Additionally, pathogenic bacteria can also

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC2302800)、国家自然科学基金项目(52070193)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2302800), and the National Natural Science Foundation of China (52070193)

*通信作者: 张 灿, 研究员, 主要研究方向为饮用水水质安全。E-mail: zhangcancqu@163.com

张明露, 博士, 教授, 主要研究方向为环境微生物。E-mail: zhangminglu@th.btbu.edu.cn

*Corresponding author: ZHANG Can, Professor, Institute of Health Inspection and Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Institute of Health Inspection and Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China. E-mail: zhangcancqu@163.com

ZHANG Ming-Lu, Ph.D, Professor, School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China. E-mail: zhangminglu@th.btbu.edu.cn

restore their pathogenicity during this process. Because microbial cultivation methods and conventional molecular biology techniques cannot detect VBNC bacteria, they can easily pose a potential threat to food safety and public health. This paper first briefly summarized the latest research progress of VBNC state bacteria, revealing the risks and threats of VBNC state bacteria. Secondly, it systematically introduced the formation and recovery mechanisms of VBNC state bacteria, focusing on the conditions under which naturally occurring bacteria in water, dairy products, and meat products were induced into VBNC state bacteria, as well as the conditions and methods for VBNC state bacteria to recover. Understanding the range of conditions under which bacteria enter VBNC state in water and food matrices can guide the food processing industry on how to avoid the formation of VBNC state bacteria, which has significant implications for the control of water and food safety risks.

KEY WORDS: drinking water; dairy products; meat products; viable but non cultivable state; induce; recovery

0 引言

活的非可培养状态(viable but non cultivable state, VBNC)是某些细菌的一种特殊存活形式,在不良环境胁迫的条件下形成的一种休眠状态,在常规培养条件下无法培养,但仍然保持较低的代谢活性。XU 等^[1]在 1982 年首先发现并提出了 VBNC 概念,VBNC 状态已经作为一种普遍生存策略,以利于细菌在不良的环境条件下长期生存^[2]。例如,进入 VBNC 状态后,细胞的呼吸速率、养分运输和大分子合成都会随之下降,同时却仍保持活力和较高的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量^[3]。更为重要的是,VBNC 状态细菌仍能保留毒力,例如研究表明 VBNC 状态的大肠杆菌 O157:H7^[4-5]、单增李斯特菌^[6]、迟发性爱德华氏菌^[7]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[8]的毒力基因仍然表达,且保留致病性。目前,研究报道有 100 多种微生物可进入 VBNC 状态,其中有 80 余种细菌,包括革兰氏阳性细菌 33 个属和革兰氏阴性细菌 11 个属^[9-10]。在饮用水消毒、运输及食品加工和保藏过程中很多极限环境条件可诱导病原菌进入 VBNC 状态,如极端温度、干燥、辐照、脉冲电场,以及添加防腐剂和消毒剂。若存在于常见基质(如饮用水、乳制品、肉制品)中的细菌进入 VBNC 状态,其无法在常规培养条件下生长,但细菌细胞仍完整有活力,能进行代谢更新,而且在适当条件下能复苏为可培养状态。因此,VBNC 状态下的病原体可能会引起食源性疾病的暴发,对食品安全和公众健康构成严重威胁^[11]。本文针对目前对于在食物中诱导细菌的 VBNC 状态研究较少的现状,从饮用水、乳制品和肉制品 3 种基质中自然存在的 VBNC 细菌的诱导、复苏和机制方面进行总结,对避免细菌进入 VBNC 状态以逃避常规检测、减少 VBNC 状态细菌引发的安全风险、保障人类健康有积极的作用。

1 食源性 VBNC 细菌的检出及风险

目前,饮用水和食品领域通常使用基于培养的方法

监测指示细菌,以确认符合质量标准。然而细菌在遇到环境胁迫时会进入 VBNC 状态,通过常规方法检测出无可培养细菌的情况,并不代表着不存在健康风险,而是细菌可能以 VBNC 状态存在导致无法检出,因此仅仅依赖于传统的培养方法会造成对微生物安全风险的低估。现如今,随着国内外对 VBNC 状态细菌的研究及检测技术的进步,饮用水和食品 VBNC 状态细菌的隐藏风险也逐渐暴露出来,研究人员在饮用水、乳制品和肉制品中均已发现 VBNC 致病菌的存在,且 VBNC 状态的病原菌占总菌数量的比例很高。

GUO 等^[12]在饮用水处理厂的水质中检测到 VBNC 状态大肠杆菌、粪肠杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌和志贺氏菌的水平为 $0\sim 10^3$ 个细菌细胞/100 mL,氯化水中检测到 $0\sim 10^2$ 个细胞/100 mL,生物活性炭(biological activated carbon, BAC)生物膜中检测到 $0\sim 10^3$ 个细胞/g;在之后的实验中,他们又在公共场所中采集样本,发现可培养菌仅占 16S rRNA 活菌总数的 0%~17.51%,表明大部分活菌处于未培养或 VBNC 状态。一些条件致病菌如大肠埃希菌、粪肠杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌、志贺氏菌等主要以 VBNC 细胞形式检出^[13]。FU 等^[14]也在饮用水分配系统生物膜上检测出处在 VBNC 状态大肠杆菌的浓度范围为 $4.28\sim 4.55 \log_{10}$ 细胞当量/cm²,沙门氏菌的浓度范围为 $3.43\sim 3.49 \log_{10}$ 细胞当量/cm²,铜绿假单胞菌和霍乱弧菌的浓度范围为 $2.26\sim 2.66 \log_{10}$ 细胞当量/cm²和 $3.06\sim 3.42 \log_{10}$ 细胞当量/cm²;BAUDART 等^[15]采集北美饮用水处理厂及饮用水分配系统(drinking water distribution system, DWDS)的水样,发现随着温度的升高, DWDS 中 VBNC 状态的肠杆菌科细胞可能越来越多,从而增加 DWDS 污染的潜在风险;HWANG 等^[16]模拟饮用水条件(50 mL, pH 7.0 和 25 °C)对嗜肺乳杆菌进行研究,发现孵育 30 d 内处于可培养状态的嗜肺乳杆菌数量迅速减少至检出限以下(减少了 5.0 个数量级),且代谢活性也大大降低,证明完全进入了 VBNC 状态。

HU 等^[17]对河北省个体奶农的 60 个原料奶样品进行检测,平板计数法未检出活菌,但单叠氮化丙啶结合环介

导的等温扩增(propidium monoazide-quantitative loop-mediated isothermal amplification, PMA-qLAMP)对 VBNC 状态阪崎克罗诺杆菌阳性样品的检出率达到 13%。WULSTEN 等^[18]对原料奶中的空肠弯曲杆菌进行标准平板计数和实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)两种方法检测时,通过 qPCR 检测到的总基因组拷贝数约为 $(6.02 \pm 0.08) \log_{10}/\text{mL}$,相比 CFU 计数增加了约 10 倍,说明原料奶中的大部分空肠弯曲杆菌处入 VBNC 状态。CALDERA 等^[19]对乳品厂的马苏里拉奶酪样品的假单胞菌进行可培养细胞、死亡细胞和 VBNC 细胞的定量,对同一批次生产的马苏里拉奶酪样品进行了 7 组采样,其中有 3 组的数据可培养细胞与 VBNC 细胞总和为 (1.94 ± 0.1) 、 (2.32 ± 0.1) 和 $(2.94 \pm 0.3) \log \text{CFU/g}$,而可培养细胞数分别为 <1 、1.81 和 2.79 $\log \text{CFU/g}$,证实该 3 组样品中假单胞菌已进入 VBNC 状态。说明在马苏里拉奶酪生产过程中,环境条件有可能诱导其中的假单胞菌进入 VBNC 状态。

REICHEL 等^[20]对肉鸡场的样品进行了检测,前 3 次在培养或通过活力 PCR (viability qPCR, v-qPCR)在肉鸡养殖场环境中未检测到弯曲杆菌,然而在第 4 次检测中检测到了 VBNC 状态的弯曲杆菌。VBNC 状态弯曲杆菌在环境样本中的总体患病率为 15.9%,弯曲杆菌 DNA 患病率为 62.2%。El-AZIZ 等^[21]对当地超市中的生肉样品进行 PMA-qPCR 和平板计数,并且能在 90.48%的平板计数阴性样本中检测到 VBNC 状态细胞。SAAD 等^[22]对各地不同超市收集的 500 个样本(包含 300 个生肉和 200 个生牛奶样本)采用常规培养和 PMA-qPCR 方法检测,通过生化和血清学鉴定确认阳性培养样品,再对经鉴定的阴性培养样品进行常规 PCR 和 PMA 结合 SYBR(R) GREEN I NUCLEIC ACID GEL STAIN (SYBR green)实时荧光定量 PCR 进行 VBNC 大肠杆菌 O157:H7 检测。结果表明,对于 10 个测试样本和 475 个阴性培养样本,常规方法检测到的大肠杆菌 O157:H7 的发病率为 3%,而 PMA 和 SYBR Green 实时 PCR 检测到的 VBNC 大肠杆菌 O157:H7 的发病率分别为 10%和 0.21%。

2 VBNC 状态细菌的形成和复苏机制

2.1 VBNC 状态细菌的形成机制

温度^[23]、营养物质^[24-25]、盐度^[26]、抗菌剂^[27]、抗生素^[28]、紫外线^[29]、氧气浓度^[30]、酸度^[31]等环境因素会诱导细菌进入 VBNC 状态,使细菌细胞在形状、细胞壁及膜组成、生理生化、基因表达等方面都会发生一系列的变化^[9,32-33]。迄今为止,国内外已有不少关于 VBNC 状态细菌的形成机制的研究,最开始关于细菌细胞的 VBNC 状态形成机制的问题分为两个假说,第一个假说是“细胞衰退理论”,即当细菌细胞处于恶劣环境中时,如营养物

质匮乏、温度过高/过低或渗透压过高等,细菌细胞会氧化损伤,出现细胞质降解、细胞活力下降等情况,若细菌细胞被损伤过度,则无法恢复正常状态,最终细胞会走向凋亡^[34-35]。然而这一假说却与 VBNC“可存活但不可培养”这一概念相悖。另一个假说是“基因调控理论”,即 VBNC 状态是经由细菌细胞内的基因调控而形成的,当非孢子菌处于不利环境中时,会进入 VBNC 状态以应对恶劣条件,VBNC 状态下的细胞仍会进行正常代谢活动,这是细菌细胞适应环境的一种策略^[34,36]。从理论上来说,后一种假设更贴切,因此“基因调控理论”也成为了细菌细胞进入 VBNC 状态广为接受的理论。其中,两种基本的应激调节因子 *RpoS* 和 *OxyR* 在调控过程中起着重要作用^[2]。*RpoS* 是 RNA 聚合酶的替代 σ 因子,主要存在于 β 和 γ -细菌中。替代 σ 因子对毒力的贡献可以通过调节毒力基因的表达直接产生,也可以通过提高对宿主防御和其他应激条件的存活率间接贡献^[37]。*OxyR* 是 *LysR* 型转录调节因子的一种,大多数细菌通过 H_2O_2 反应性反式激活因子 *OxyR* 控制氧化应激,可激活防御性基因的表达^[38]。“基因调控理论”作为主流的假说,为研究 VBNC 状态细菌的形成机制奠定了基础。

就目前研究来看,VBNC 状态细菌的形成机制主要分为 6 种,分别为: 严紧反应、毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统、氧化应激、基因调控、蛋白质聚集调控、ATP 调控^[39]。严紧反应是细菌在氨基酸饥饿条件下通过减缓增长速度来增加氨基酸合成的一种反应机制^[40]。其在细菌或植物接收到由警报酮、鸟苷五磷酸或鸟苷四磷酸[(p)ppGpp]介导的氨基酸饥饿信号后产生应答^[41]。严紧反应调控过程为:当细菌经历氨基酸饥饿时,*RelA* 或 *SpoT* 会发挥作用,增加(p)ppGpp 的合成或减少(p)ppGpp 的降解。(p)ppGpp 抑制外切聚磷酸酶降解多磷酸盐,从而导致多磷酸盐的积累,这些多磷酸盐能够激活 Lon 蛋白酶,从而影响与 TA 系统相关的基因的表达,通过增加细菌细胞中游离毒素的量来抑制翻译过程和细菌生长和分裂,从而调节 VBNC 状态的形成^[40]。有研究证明了抗生素抑菌和杀菌活性之间的差异可以归因于严紧反应,且发现抗生素会在不能产生(p)ppGpp 的枯草芽孢杆菌突变体中具有杀菌作用^[42]。TA 系统由编码毒素和编码抗毒素两个共同表达的基因组成,毒素可能抑制细菌生长,而抗毒素可以中和毒素抑制其发挥毒性作用^[43]。TA 系统参与 VBNC 状态的形成可以部分解释 VBNC 细胞和持久细胞之间的密切关系^[3]。KIM 等^[44]研究表明氧化应激的增加会诱导空肠杆菌和创伤弧菌进入 VBNC 状态,此外补充 H_2O_2 降解酶和活性氧清除化合物,可增强大肠杆菌 O157 和创伤弧菌从 VBNC 状态的复苏,说明减少氧化应激能促进 VBNC 状态细菌复苏。此外,基因调控在 VBNC 状态形成过程中也至关重要,ZHANG 等^[39]鉴定出 97 个基因和 56 个蛋白质在进入

VBNC 状态时发生显著改变, 主要涉及与膜转运、代谢、DNA 复制和细胞分裂相关的基因和蛋白质, 导致细胞进入低代谢活性的 VBNC 状态。在回顾 VBNC 状态的形成机制过程中, PAN 等^[45]发现内源性蛋白质聚集是细菌进入 VBNC 状态的普遍策略。在压力条件下, 蛋白质可能形成不溶性聚集体以关闭不必要的生理途径, 以维持低能量状态以维持生存。蛋白质的聚集会驱动细胞休眠发育这一假说已得到证实, 且聚集强度与休眠深度之间的相关性意味着可能存在一般休眠程序, 渐进式蛋白质聚集可以诱导从细胞易感状态转变为持久状态以及从持久状态转变为 VBNC 状态^[46]。ATP 含量的变化取决于各种应激因素和细菌种类, 细胞内 ATP 水平越低, 细菌进入休眠状态的程度就越深, 且当 ATP 耗尽时能观察到蛋白质聚集, 因此 VBNC 状态也受到 ATP 的调控^[39,47]。

2.2 VBNC 状态细菌的复苏机制

当环境条件变得适宜时, 如升高温度^[47]、添加复苏因子(resuscitation promoting factor, Rpf)^[48]、添加营养物质^[49]、丙酮酸^[50]等可让 VBNC 状态的细胞复苏。目前有关 VBNC 细菌复苏机制的研究主要涉及自诱导因子和 Rpf 的调控^[51]。在此过程中, 来源于黄色微球菌上清液中的 Rpf 作为一种分泌蛋白, 成为了调控复苏的应用最广泛、最关键的因素^[52]。其作用机制是复苏促进因子作用于细菌细胞壁, 降解 VBNC 细胞的细胞壁肽聚糖, 从而触发复苏。研究表明, Rpf 和其他 Rpf 同源物均能使革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的 VBNC 状态细胞复苏^[53]。

3 消毒、储存条件下食源性细菌 VBNC 状态的诱导

3.1 饮用水中细菌 VBNC 状态的诱导

饮用水中的细菌进入 VBNC 状态往往是由于其消毒工艺所导致。饮用水的消毒分为化学方法和物理方法, 化学方法包括氯、二氧化氯、臭氧和过氧乙酸消毒等, 物理方法主要是紫外线消毒^[54]。自提出饮用水中 VBNC 状态细菌的发生以来, 已有大量的文献报道研究 VBNC 状态细菌在饮用水系统中的存在, 包括常见的致病菌嗜肺军团菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌属等, 而作为水质微生物指标的大肠杆菌也被多次报道在饮用水中进入 VBNC 状态^[55]。有研究证明, 在经过一定量的氯处理后, 水中大部分细菌细胞受损, 以往绝大部分研究默认细胞膜一旦受损, 就意味着细胞死亡。然而进一步研究细胞活性时发现, 受损细菌维持着低代谢活性, 而这一特点与其转变为 VBNC 状态有密切的联系^[56]。TURETGEN^[57]研究发发现用 1 ppm 和 1.5 ppm 的单氯胺给饮用水消毒 24 h 后, 其中的嗜肺乳杆菌可培养性降低。经研究实验证明, 用于消毒的氯和氯胺应该分别维持在高于 0.91 mg/L 和 0.35 mg/L, 才能有效杀灭大

肠杆菌, 避免更多细菌进入 VBNC 状态^[58]。在饮用水的过氧乙酸消毒过程中, 有文献报道 30 mg/L 的过氧乙酸能降低漂洗水中大肠杆菌 O157:H7 和单核增生乳杆菌的数量, 在后续的研究中加大剂量至 80 mg/L, 也无法完全灭活细菌^[59]。微生物在饮用水处理过程中可能逃避氯消毒进入饮用水分配系统中, 由于它们具有很强的抵抗力, 因此需要有余氯的存在以确保能够持续消毒, 而 DWDS 中的氯会诱导水中生物膜上的细菌进入 VBNC 状态^[60]。有研究对 DWDS 进行水采样, 再将无色杆菌加入进采样处理的水中, 分别用 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mg/L 质量浓度梯度的氯处理 1 h, 发现从 1.2 mg/L 开始完整细胞数下降了 2 个数量级, 表明氯处理对细菌造成膜损伤。但完整细胞数与活菌计数之间存在明显差异, 其表明在中间状态下存在活的受伤无色杆菌; 当质量浓度提升到 5 mg/L 时, 活菌数下降 97.7%, 在流式细胞图上, 细胞群从中间区域转向受损细胞区, 表明此时细菌细胞才真正失活^[56]。

相较于化学消毒方式来说, 物理的紫外线消毒方式不会产生消毒副产物, 且短波长紫外线对耐氯微生物具有出色的灭活功效^[61], 但有时也不能完全渗透和杀灭微生物, 反而成为部分细菌进入 VBNC 状态的原因。如使用 0~300 mJ/cm² 剂量的紫外线辐射处理能诱导大肠杆菌和铜绿假单胞菌进入 VBNC 状态。因缺乏持续消毒能力, 细菌在紫外线处理后易被诱导进入 VBNC 状态^[55], 再者经紫外线消毒处理的细胞几乎完好, 因此消毒后的受损细胞可能进行暗修复, 即在黑暗中表现出选择性复活优势^[62]。例如在用剂量为 3.3 mJ/cm² 的低压紫外线灯处理后, 在黑暗中 8 h 的再激活时间内发生 3%~5% 的大肠杆菌复活。同时, 在用剂量为 0.14 mJ/cm² 的紫外线发光二极管处理后, 在黑暗中 24 h 的再激活时间内没有复活的肺炎克雷伯菌^[62]。因此紫外线发光二极管处理能更彻底破坏细菌 DNA 片段、抑制细菌暗活化过程。将紫外线消毒和氯消毒二者结合的紫外线/氯消毒工艺引起国内外越来越多研究者的关注, 虽然仍会有部分细菌被诱导进入 VBNC 状态, 但活性氯可以选择性地与含氮官能团发生反应, 从而使 VBNC 状态细胞失活并消除基因组 DNA 和质粒等遗传物质^[63]。CHEN 等^[64]的研究证明紫外/氯消毒工艺显著提高了对金黄色葡萄球菌的灭活功效, 抑制了金黄色葡萄球菌的光活化, 这归因于反应性物质的产生。氯和氯胺对饮用水消毒将细菌诱导进入 VBNC 状态的时长普遍较短, 且诱导条件不超过 4 mg/L, 高浓度的氯和氯胺更容易彻底灭活细菌, 却对人体有危害。根据饮用水厂消毒剂常规指标及要求规定, 游离氯在出水中检出限值为 4 mg/L, 总氯则为 3 mg/L。若想在规定限值内尽可能彻底消毒, 需要对消毒时间进行严格的把控。而紫外线消毒因无法持续消毒而有受损细胞在消毒后修复导致复活的情况, 将紫外线和氯/氯胺消毒相结合, 尽管会有部分细菌进入 VBNC 状态, 但

也会致使其失活,提升消毒效率。

除了对饮用水进行传统的化学消毒和物理消毒能诱导细菌的 VBNC 状态以外,其寡营养条件也能诱导细菌进入 VBNC 状态。例如灭菌处理后的瓶装水,人工污染大肠杆菌和金黄色葡萄球菌后,在 4 °C 冷藏条件下,部分细菌在 150 d 内进入 VBNC 状态,而在 -20 °C 冷冻条件下,两种菌分别在 15 d 和 20 d 完全进入 VBNC 状态^[65]。DIETERSDORFER 等^[66]研究将嗜肺军团菌加入高压灭菌过的超纯水中,并置于 45 °C 条件下,创造饥饿条件,从统计结果来看,在 14 d 内丧失了可培养性。饮用水中不同细菌进入 VBNC 状态的条件见表 1。可见灭菌后的水能为细菌提供寡营养环境,应该尽量避免灭菌后的瓶装饮用水被污染。

3.2 乳制品中细菌 VBNC 状态的诱导条件

乳制品的制作加工和运输储存过程中都存在着被微生物污染的风险,其可能受到不同来源的污染,包括,奶牛群、挤奶工以及牧场饲料、粪便、空气和水等环境来源,而且原料奶本身的致病菌和腐败菌群也是复杂多样的^[69]。同时在这些环节中,微生物很有可能受到不利环境胁迫,如巴氏消毒、酸奶发酵过程而进入 VBNC 状态。

微生物对乳制品的污染可能存在于原料奶中,也可以通过加工和包装系统表面的生物膜进入乳制品。假单胞菌、葡萄球菌、链球菌、微球菌和乳酸菌等生物最常见于从奶牛乳房无菌提取的牛奶中^[70]。经过消毒杀菌过程[主要分为巴氏灭菌和超高温技术 (ultra-high temperature instantaneous sterilization, UHT) 灭菌],乳制品中的细菌被诱导进入 VBNC 状态。巴氏灭菌作为一种普遍应用于乳制品的热处理技术,将牛奶加热到 72 °C (161°F) 持续 15 s,以达到将乳制品中微生物降低到不会对人构成健康风险的水平。有研究证明巴氏灭菌法是诱导乳制品中细菌进入 VBNC 状态的原因,且经过其处理后的乳制品中仍存在 *blaZ*, *mecC* 和 *tetK* 这 3 种耐抗菌药物 (anti-microbial

resistance, AMR) 基因的高流行率,即巴氏灭菌对减少这 3 种 AMR 基因的拷贝数效果不显著,并且为了适应巴氏灭菌的高温环境,乳制品中的金黄色葡萄球菌更可能会进入 VBNC 状态^[71-72]。UHT 则是将牛奶加热到 >135 °C 持续 2~5 s,2020 年有研究提及 UHT 处理可将细菌灭活,因此不太可能诱导细菌进入 VBNC 状态,由此 UHT 处理被认为是更为安全有效的乳制品消毒方式^[71]。但 2023 年有研究结果证明,若原料乳制品中原本含有弯曲杆菌,即使经过 UHT 处理也不能完全将其杀灭,且会将其诱导进入 VBNC 状态^[73]。由此可见,无论是传统上被认为安全的巴氏灭菌或是 UHT 灭菌都存在将细菌诱导进 VBNC 状态的安全隐患,并不是毫无风险。且在经过 UHT 和巴氏灭菌处理的牛奶中加入空肠弯曲杆菌样品,4 °C 保存以探究低温牛奶对细菌 VBNC 状态的诱导,在第 42 d 时冷藏 UHT 牛奶中无法检测到可培养菌,而巴氏灭菌的牛奶中的细菌保持可培养性,且第 21 d 可培养细胞数量在 1.5~5 log CFU/mL 之间,但在此过程中活细胞数量几乎保持稳定,说明空肠弯曲杆菌在低温牛奶中进入了 VBNC 状态^[74]。这也提醒了灭菌牛奶在储存过程中需注意避免被细菌二次污染。

除了灭菌过程会诱导细菌的 VBNC 状态,食品的包装方式对其也会产生影响。将单增李斯特菌接种到切碎的长硬奶酪中,再分别采用活性包装 (active packaging, AP)、改性气氛包装 (modified atmosphere packaging, MAP)、真空包装 (vacuum packing, VP) 和密封包装 (sealed packaging, SP),在 6 °C 条件下保存 3 个月,结果表明各个包装中的单增李斯特菌都不同程度地进入 VBNC 状态,VP 最多,MAP 中最少^[75]。此外,也有文献报道称在酸奶发酵过程形成了酸性环境,从而诱导细菌进入 VBNC 状态。如保加利亚乳杆菌常用于酸奶发酵,将其与阪崎克罗诺杆菌共同加入牛奶中,成功将阪崎克罗诺杆菌诱导进入 VBNC 状态,因此证明了牛奶发酵过程能诱导阪崎克罗诺杆菌进入 VBNC 状态^[76]。同样有研究表明,在发酵乳基质中,乳酸菌群的

表 1 饮用水中不同细菌进入 VBNC 状态的诱导条件

Table 1 Conditions for different bacteria in drinking water substrate to enter the VBNC state

细菌种类	其他条件	时间	文献
无色杆菌	氯质量浓度 1.2 mg/L	1 h	[56]
	氯质量浓度 1 mg/L	60 min	[58]
	氯质量浓度 4 mg/L	5 min	[58]
大肠杆菌	氯胺质量浓度 0.5 mg/L	6 h	[58]
	氯胺质量浓度 4 mg/L	15 min	[58]
	氯质量浓度 0.1、0.5、1.0 mg/L	10d	[60]
铜绿假单胞菌	紫外线 (360 mJ/cm ²)/氯化 (1 mg/L)	30 min	[63]
	经过高压灭菌的瓶装矿泉水; -20 °C	15 d	[56]
嗜肺军团菌	单氯胺 1.0、1.5 ppm	24 h	[57]
	高压灭菌的超纯水; 45 °C	14 d	[67]
	热预处理	(30±2) min	[68]
	酸预处理	(5±0.5) min	[68]

存在会对乳制品中的弯曲杆菌产生拮抗作用, 也会诱导其进入 VBNC 状态^[73]。但乳制品发酵过程中产生的有机酸对抑制微生物进入 VBNC 状态有一定效果。乳制品基质中不同细菌进入 VBNC 状态的条件见表 2。对于不同微生物, 同样的酸浓度对其抑制程度也不相同, 因此需要更进一步针对不同种的细菌探究出适合的抑制进入 VBNC 状态的有机酸浓度, 以此避免在酸奶发酵过程中诱导细菌进入 VBNC 状态。

3.3 肉制品中细菌 VBNC 状态的诱导

因运输储存方式需要冷藏或冷冻, 肉制品中携带的致病菌也可能在此过程中进入 VBNC 状态, 从而避开常规检测, 给消费者带来巨大的健康风险。有研究在新鲜羊肉中接种大肠弯曲杆菌, 放置于 4 °C 冰箱中, 监测在 0~8 d 内的可培养数和活菌数, 在监测期间可培养数不断下降, 在第 8 d 用 PMA-qPCR 计算的活菌数比改良 CCD 琼脂平板涂布的高 1.42~3.99 log₁₀^[77]。也有将大肠杆菌 O157:H7 接种到速冻牛肉丸中, 置于 -20 °C 冰箱中 152 d 后可培养数小于平板计数检出限^[78]。低温诱导致病菌进入 VBNC 状态已成为常见的诱导手段, 有研究证明, 甚至不需要达到低温条件, 金黄色葡萄球菌从 37 °C 营养肉汤接种到 21 °C±10 °C 的鸡肉基质中 5 h 后, 平板计数法检出减少两个数量级, 而活力和培养能力相对保持不变, 从而证明了金黄色葡萄球菌因为营养物质和温度发生变化而进入 VBNC 状态^[79]。也有研究发现模拟鸡肉运输过程中反复冻融的状态, 在检测活菌量和可培养量后发现沙门氏菌被诱导进入 VBNC 状态^[80]。证明污染肉制品的致病菌进入 VBNC 状态的原因主要是不适宜的温度环境, 包括低温和温度的变化。肉制品的储存往往发生在 4 °C 或 -20 °C, 而两者都已被证明能诱导细菌进入 VBNC 状态, 在常温运输过程中若污染了细菌, 其也有可能因为营养物质的变化而进入 VBNC 状态。冷藏或冷冻诱导周期一般都较长, 因此需要也注意肉制品的储存时间, 同时也需避免肉制品的反复冻融。

除了温度因素以外, 食品包装方式也是诱导某些病原菌进入 VBNC 状态的原因之一。研究发现若携带弯曲杆菌的鸡肉 MAP 包装放置于 4 °C 和 10 °C 中储存, 在放置 13 d 后可培养数都会减少大约 2 log₁₀ CFU/g, 而定量 PCR 的结果却观察不到弯曲杆菌数量的减少^[81], 由此推测弯曲杆菌进入了 VBNC 状态。肉制品前处理步骤中, 用于微生物去污的中性电解水(neutral electrolyzed water, NEO)也被证明能诱导细菌的 VBNC 状态, 将猪肉样品接种大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森菌, 用不同浓度的 NEO 水处理猪肉样品数分钟。3% NEO 水处理时, 大约 68.31% 的肠炎沙门氏菌细胞变成了 VBNC。用 6% NEO 水处理后, 大约 56% 的大肠杆菌 O157: H7 细胞和 58% 的小肠结肠炎耶尔森菌细胞变成 VBNC。当用 25% 的 NEO 水处理培养物时, 只有不到 10% 的细菌细胞保持活力^[82]。因此在前处理和包装的过程都存在着 VBNC 状态细菌风险, 最好在肉制品处理步骤前对细菌量进行检测, 考虑到现实情况下污染肉制品的细菌含量本就不高, 若在后续步骤中诱导进入 VBNC 状态中则更难检出。肉制品基质中不同细菌进入 VBNC 状态的条件见表 3。

因此要求在运输和储存肉制品的过程中, 一方面需要找出较为合适且恒定的温度, 另一方面需要注意食品包装方式, 尽可能少地诱导病原菌进入 VBNC 状态, 使其利用常规检测方法就能检出, 减少潜在风险。

3.4 其他食物基质中细菌 VBNC 状态的诱导

除了饮用水、牛奶、肉制品以外, 目前也有一些研究是细菌在其他食物基质中进入 VBNC 状态的。如用大肠杆菌 O157:H7 和单核增生李斯特菌接种到葡萄柚汁中, 24 h 内单核增生李斯特菌的细胞活力和可培养性降低为 0, 并且不具有复苏能力, 而大肠杆菌 O157:H7 活力降低 1 个数量级且丧失可培养性, 进入 VBNC 状态^[83]; 将沙门氏菌分别接种到液态蛋清(liquid egg white, LEW)、液态蛋黄(liquid egg yolk, LEY)和液态全蛋(liquid whole egg, LWE)中, 在轻度高温(59.5~63.5 °C)条件下, 沙门氏菌可培养细

表 2 乳制品基质中不同细菌进入 VBNC 状态的条件
Table 2 Conditions for different bacteria to enter the VBNC state in dairy substrate

细菌种类	温度/°C	其他条件	时间	文献
大肠杆菌	72	巴氏灭菌	15 s	[72]
金黄色葡萄球菌	72	巴氏灭菌	15 s	[72]
链球菌	72	巴氏灭菌	15 s	[72]
弯曲杆菌	4	UHT 全脂牛奶(乳酸条件下)	90 h	[73]
	12	UHT 全脂牛奶(乳酸条件下)	66 h	[73]
空肠弯曲杆菌	4	巴氏杀菌牛奶	> 21 d	[74]
	4	UHT 牛奶	42 d	[74]
单增李斯特菌	6	长熟硬奶酪	90 d	[75]
阪崎克罗诺杆菌	37	牛奶 95 °C 热处理 15 min	48 h	[76]

表 3 肉制品基质中不同细菌进入 VBNC 状态的条件
Table 3 Conditions for different bacteria to enter the VBNC state in meat product substrate

细菌种类	温度/°C	其他条件	时间	文献
大肠弯曲杆菌	4	接种于新鲜羊肉	8 d	[77]
大肠杆菌 O157:H7	-20	速冻牛肉丸	152 d	[78]
	-	1%、3%、6%、10%、15%的 NEO 浓度处理	2~10 min	[82]
金黄色葡萄球菌	20±1	新鲜鸡肉	5 h	[79]
弯曲杆菌	4/10	鸡胸肉; MAP 或真空包装	13 d	[81]
小肠结肠炎耶尔森菌	-	1%、3%、6%、10%、15%的 NEO 浓度处理	2~10 min	[82]
肠炎沙门氏菌	-	1%、3%、6%、10%、15%的 NEO 浓度处理	2~10 min	[82]

注: -为文献未提及。

胞数量分别减少 4.15、2.66 和 4.03 \log_{10} 个细胞/mL; 然而, 但 PMA-qPCR 检测出在 LEW, LEY 和 LWE 中, 剩余的活细胞计数分别约为 7.08, 7.29 和 7.16 \log_{10} 细胞/mL, 可说明部分沙门氏菌进入了 VBNC 状态^[84]。研究证明一般在酸性、低温或高温、寡营养条件下能诱导细菌进入 VBNC 状态, 因此需要注意食物的生产和保存条件。

4 自然条件下细菌 VBNC 状态的复苏

有研究发现 VBNC 状态的复苏可以通过解除环境中的胁迫因素达到^[10], 但有报道称 VBNC 状态的复苏的过程并不只是简单去除胁迫条件就能诱发的, 而需要添加化学物质或营养物质才能实现^[82]。VBNC 状态的复苏也并不是普遍能发生在 VBNC 状态病原菌中的, 仍存在一些病原菌进入 VBNC 状态后无法被复苏, 也可能是因为这类 VBNC 状态病原菌的复苏条件还未被探索出来。

目前研究对 VBNC 状态细菌的复苏方法有物理刺激、化学刺激、活性蛋白或宿主共培养等^[85], 有时根据菌种不同, 复苏方法之间也会存在一些差异。绝大部分研究是将纯培养液中或基质中的 VBNC 状态细菌在温度适宜条件下添加到营养条件充足的培养基中, 又或是添加化学物质(如丙酮酸、自诱导剂)、活性蛋白(如 Rpf、过氧化氢酶、YeaZ), 以达到复苏 VBNC 状态细菌的目的。

研究发现在饮用水和食品中自然存在的 VBNC 状态细菌可以在食物、水中或在宿主体内复苏, 恢复到正常状态的情况。如将二氧化氯消毒过的洗涤水清洗新鲜蔬菜, 可观察到单核细胞增生李斯特菌的 VBNC 状态细胞在切碎的生菜和切成丁的洋葱中发生了自然复苏^[59]。也有经过温度变换后恢复可培养状态的例子: HU 等^[56]研究表明经氯消毒处理的饮用水, 其中的无色杆菌会进入 VBNC 状态, 在 28 °C 下的无菌饮用水中, 32 h 后 VBNC 无色杆菌出现复苏。研究的复苏温度与夏季室内温度相差无几, 若在饮用水消毒过程中存在诱导细菌进入 VBNC 状态的情况, 则后续将其复苏也是可能发生的。这揭示了饮用水存在的风险隐患, 饮用水作为与生活日常环环相扣的一部分, 其风险

防控尤为重要。

KNIPPER 等^[86]在 5、8、12 °C 下成功诱导了生乳样品中的空肠杆菌进入 VBNC 状态, 后续通过制造 37 °C 下极低氧分压的环境, 发现在 3 个温度下进入 VBNC 状态的空肠杆菌都有复苏现象的发生。该研究并未对能复苏空肠杆菌的氧分压区间进行更深的研究和讨论, 生活中密闭储存空间会提供低氧分压的环境, 可能会将进入 VBNC 状态的空肠杆菌重新复苏, 因此需要进一步研究明确氧分压复苏 VBNC 状态空肠杆菌的范围。LLEÒ 等^[87]对 VBNC 状态肠球菌的复苏条件进行研究, 模拟粪便肠球菌在低温条件下被释放到淡水、海水等营养贫乏的环境中, 并可能通过后续被人类或动物摄入在肠道恢复活力。如果环境、水或食物中的 VBNC 状态细菌因未被检测出被人体摄入, 可能会在体内与宿主共培养复苏, 从而造成各种疾病, 引起安全风险。另外, 在宿主信号的帮助下, 诸如空肠梭菌、致病性和非致病性大肠杆菌、迟缓爱德华菌、幽门螺杆菌、单核增生乳杆菌、肠链球菌、福氏链球菌、霍乱弧菌和副溶血性弧菌等菌种可以从 VBNC 状态恢复到可培养状态。在宿主细胞中的自然复苏可通过与真核细胞共培养、在受精卵中孵育或通过宿主来实现^[88]。

因此即使细菌在基质中进入 VBNC 状态后, 没有处于最适宜生长的环境下, VBNC 状态细菌也有可能复苏到可培养状态, 这为 VBNC 状态的复苏提供了新思路, 不再局限于富营养、复苏因子、化学物质的刺激。同时也提出了一种潜在风险, 即 VBNC 状态随着基质被人体摄入后, 在肠道环境中复苏。

5 结束语

VBNC 状态是部分细菌应对恶劣环境条件的一种生存策略, 随着对 VBNC 研究的深入, 其带给人类的健康风险也逐渐揭露出来, 尤其是致病菌在进入 VBNC 状态后, 它的风险会被大大低估。因此掌握和了解 VBNC 状态的形成和复苏的方法和基质对控制其带来的威胁有积极影响和作用。对于有可能进入 VBNC 状态的细菌来说, 需要注意

在食物储存或加工前是否有细菌污染的情况发生, 食物储存或加工过程会产生不利于细菌生存的环境胁迫, 容易诱导细菌进入 VBNC 状态从而逃避常规检测。本文对 VBNC 状态细菌的形成和复苏机制、在食物和水中自然存在的细菌诱导和和复苏 VBNC 的方法进行了综述。就目前的文献报道来看, 大部分存在于食物和水中的细菌在经过常规贮存运输、消毒处理后会进入 VBNC 状态, 对于不同种类的细菌在食物或水环境基质中进入 VBNC 状态的研究, 需要进一步设置梯度条件, 得出诱导 VBNC 状态发生的条件区间。掌握细菌在食物和水中进入 VBNC 状态的条件范围, 就能避免其在今后的生产加工处理运输等过程中进入 VBNC 状态, 从而保障食品和饮用水的安全卫生。针对在食物中进入 VBNC 状态后在环境条件改变后仍能自发复苏的细菌而言, 有必要探索一种灭菌方法消灭食物中潜在的 VBNC 状态细菌, 以防止在细菌复苏后带来健康风险。

参考文献

- [1] XU HS, ROBERTS N, SINGLETON F, *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *Microb Ecol*, 1982, 8(4): 313–323.
- [2] BODOR A, BOUNEDJOUR N, VINCZE GE, *et al.* Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives [J]. *Rev Environ Sci Bio Technol*, 2020, 19(1): 1–22.
- [3] DONG K, PAN HX, YANG D, *et al.* Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(1): 149–183.
- [4] DINU LD, BACH S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 in the phyllosphere of lettuce: A food safety risk factor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(23): 8295–8302.
- [5] LIU Y, WANG C, TYRRELL G, *et al.* Production of *Shiga*-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Water Res*, 2010, 44(3): 711–718.
- [6] ZOLFAGHARI M, REZAEI M, MOHABBATI MA, *et al.* Virulence genes expression in viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in fish meat [Z]. 2020.
- [7] DU M, CHEN JX, ZHANG XH, *et al.* Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1349–1354.
- [8] JIANG H, WANG K, YAN MX, *et al.* Pathogenic and virulence factor detection on viable but non-culturable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Front Microbiol*, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.630053
- [9] 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.
- [10] 刘玉杰, 邵文泰, 张浩, 等. 活的非可培养状态细菌的培养和复苏条件的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(24): 8144–8151.
LIU YJ, SHAO WT, ZHANG H, *et al.* Study on the culture and recovery conditions of viable but nonculturable bacteria [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(24): 8144–8151.
- [11] PAN HX, DONG K, RAO L, *et al.* Quantitative detection of viable but nonculturable state *Escherichia coli* O157: H7 by ddPCR combined with propidium monoazide [J]. *Food Control*, 2020, 112: 107140.
- [12] GUO LZ, WAN K, ZHU JW, *et al.* Detection and distribution of vbnc/viable pathogenic bacteria in full-scale drinking water treatment plants [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 406: 124335.
- [13] GUO LZ, XIAO XY, CHABI K, *et al.* Occurrence of viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria in tap water of public places [J]. *Front Environ Sci Eng*, 2023, 18: 1–15.
- [14] FU YL, PENG HX, LIU JQ, *et al.* Occurrence and quantification of culturable and viable but non-culturable (VBNC) pathogens in biofilm on different pipes from a metropolitan drinking water distribution system [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 764: 142851.
- [15] BAUDART J, OLAIZOLA A, COALLIER J, *et al.* Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(2): 405–409.
- [16] HWANG MG, KATAYAMA H, OHGAKI S. Effect of intracellular resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphage* cells on the antimicrobial properties of silver and copper [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(23): 7434–7439.
- [17] HU LX, ZHANG SF, XUE YL, *et al.* Quantitative detection of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* using photosensitive nucleic acid dye PMA combined with isothermal amplification LAMP in raw milk [J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2653.
- [18] WULSTEN IF, ALIBEK G, STINGL K. Underestimated survival of campylobacter in raw milk highlighted by viability real-time PCR and growth recovery [J]. *Front Microbiol*, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01107
- [19] CALDERA L, ARIOLI S, STUKNYTĖ M, *et al.* Setup of a rapid method to distinguish among dead, alive, and viable but not cultivable cells of *Pseudomonas* spp. in mozzarella cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(12): 8368–8374.
- [20] REICHEL T, SZOTT V, STINGL K, *et al.* Detection of viable but non-culturable (VBNC)-campylobacter in the environment of broiler farms: Innovative insights delivered by propidium monoazide (PMA)-v-qPCR analysis [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(10): 2492.
- [21] EL-AZIZ NKA, TARTOR YH, EL-AZIZ GHARIB AA, *et al.* Propidium monoazide quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of some viable but nonculturable foodborne bacteria in meat and meat products [J]. *Foodborne Pathogens Dis*, 2018, 15(4): 226–234.
- [22] SAAD A, HUSSEIN AE, DTARABEES R. Real time PCR versus conventional methods for detection of viable but non culturable *E.coli* O157 isolated from food of animal origin [J]. *J Curr Veter*, 2023. DOI: 10.21608/jcvr.2023.320433
- [23] ZHONG JL, ZHAO XH. Transcriptomic analysis of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 formation induced by low temperature [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12): 634.
- [24] MIOTTO M, BARRETTA C, OSSAI SO, *et al.* Optimization of a

- propidium monoazide-qPCR method for *Escherichia coli* quantification in raw seafood [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 318: 108467.
- [25] BAI KH, JIANG N, CHEN X, *et al.* RNA-Seq analysis discovers the critical role of *rel* in ppGpp synthesis, pathogenicity, and the VBNC state of *Clavibacter michiganensis* [J]. *Phytopathology*, 2022, 112(9): 1844–1858.
- [26] WONG HC, WANG P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses [J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 96(2): 359–366.
- [27] CHENG S, SU RY, SONG LY, *et al.* Citral and trans-cinnamaldehyde, two plant-derived antimicrobial agents can induce *Staphylococcus aureus* into VBNC state with different characteristics [J]. *Food Microbiol*, 2023, 112: 104241.
- [28] YADAV M, SINGHAL C, BABBAR S, *et al.* Antibiotics and surface disinfectant induce VBNC and emergence of resistance in hospital-associated pathogens [J]. *Int J Infect Dis*, 2023, 130: S98.
- [29] GUO LZ, YE CS, CUI L, *et al.* Population and single cell metabolic activity of UV-induced VBNC bacteria determined by CTC-FCM and D₂O-labeled Raman spectroscopy [J]. *Environ Int*, 2019, 130: 104883.
- [30] YAGI S, OKADA A, INOSHIMA Y. Role of temperature, nutrition, oxygen, osmolality, and bacterial strain in inducing a viable but non-culturable state in *Campylobacter jejuni* [J]. *J Microbiol Methods*, 2022, 195: 106456.
- [31] BAI H, ZHAO F, LI M, *et al.* Citric acid can force *Staphylococcus aureus* into viable but nonculturable state and its characteristics [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 305: 108254.
- [32] 包秋华, 刘倩宇. 基于 Web of Science 细菌活的非可培养状态研究文献的可视化分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(5): 248–256.
BAO QH, LIU QY. Visual analysis of research literature on viable but non-culturable state in bacteria based on Web of Science [J]. *Food Sci*, 2023, 44(5): 248–256.
- [33] PINTO D, SANTOS M, ACHAMBEL L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2015, 41(1): 61–76.
- [34] DONG K, PAN HX, YANG D, *et al.* Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(1): 149–183.
- [35] LI YM, YANG L, FU J, *et al.* The novel loop-mediated isothermal amplification based confirmation methodology on the bacteria in viable but non-culturable (VBNC) state [J]. *Microbial Pathog*, 2017, 111: 280–284.
- [36] 张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1331–1339.
ZHANG S, DING LX, SU XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2018, 58(8): 1331–1339.
- [37] DONG T, SCHELLHORN HE. Role of RpoS in virulence of pathogens [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 887–897.
- [38] WEI Q, LE-MINH PN, DÖTSCH A, *et al.* Global regulation of gene expression by *OxyR* in an important human opportunistic pathogen [J]. *Nucl Acids Res*, 2012, 40(10): 4320–4333.
- [39] ZHANG JW, YANG HQ, LI J, *et al.* Current perspectives on viable but non-culturable foodborne pathogenic bacteria: A review [J]. *Foods*, 2023, 12(6): 1179.
- [40] 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.
- [41] CAI YW, LIU JY, LI GY, *et al.* Formation mechanisms of viable but nonculturable bacteria through induction by light-based disinfection and their antibiotic resistance gene transfer risk: A review [J]. *Critical Rev Environ Sci Technol*, 2022, 52(20): 3651–3688.
- [42] YANG J, BARRA JT, FUNG DK, *et al.* *Bacillus subtilis* produces (p)ppGpp in response to the bacteriostatic antibiotic chloramphenicol to prevent its potential bactericidal effect [J]. *mLife*, 2022, 1(2): 101–113.
- [43] 张铁华, 孟玲玲, 赵凤. 毒素-抗毒素系统对微生物活的非可培养状态形成的影响研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 275–282.
ZHANG TH, MENG LL, ZHAO F. Progress in research on the effect of toxin-antitoxin systems on the formation of the viable but non-culturable state of microorganisms [J]. *Food Sci*, 2022, 43(15): 275–282.
- [44] KIM JC, OH EN, KIM JY, *et al.* Regulation of oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*, a microaerophilic foodborne pathogen [J]. *Front Microbiol*, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00751
- [45] PAN HX, YANG D, WANG YT, *et al.* Acid shock protein Asr induces protein aggregation to promote *E. coli* O157: H7 entering viable but non-culturable state under high pressure carbon dioxide stress [J]. *Food Microbiol*, 2023, 109: 104136.
- [46] BOLLEN C, DEWACHTER L, MICHIELS J. Protein aggregation as a bacterial strategy to survive antibiotic treatment [J]. *Front Mol Biosci*, 2021. DOI: 10.3389/fmolb.2021.669664
- [47] PINTO D, ALMEIDA V, ALMEIDA MS, *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.
- [48] SU XM, WANG YY, XUE BB, *et al.* Resuscitation of functional bacterial community for enhancing biodegradation of phenol under high salinity conditions based on Rpf [J]. *Bioresour Technol*, 2018, 261: 394–402.
- [49] CHEN HR, FU LX, LUO LX, *et al.* Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom [J]. *Microb Ecol*, 2012, 63(1): 64–73.
- [50] YOON JH, BAE YM, JO SY, *et al.* Optimization of resuscitation-promoting broths for the revival of *Vibrio parahaemolyticus* from a viable but nonculturable state [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021, 30(1): 159–169.
- [51] YANG D, WANG WX, ZHAO L, *et al.* Resuscitation of viable but nonculturable bacteria promoted by ATP-mediated NAD⁺ synthesis [J]. *J Adv Res*, 2023. DOI: 10.1016/j.jare.2023.08.002
- [52] SCHOTTROFF F, FRÖHLING A, ZUNABOVIC-PICHLER M, *et al.* Sublethal injury and viable but non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes [Z]. 2018.
- [53] YE Z, LI HX, JIA YY, *et al.* Supplementing resuscitation-promoting factor

- (Rpf) enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Rhodococcus biphenylivorans* strain TG9T [J]. *Environ Pollut*, 2020, 263: 114488.
- [54] COLLIVIGNARELLI MC, ABBÀ A, BENIGNA I, *et al.* Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants [J]. *Sustainability*, 2018, 10(1): 86.
- [55] YE CS, CHEN CL, FENG MB, *et al.* Emerging contaminants in the water environment: Disinfection-induced viable but non-culturable waterborne pathogens [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 461: 132666.
- [56] HU ZY, BAI XH. Self-repair and resuscitation of viable injured bacteria in chlorinated drinking water: *Achromobacter* as an example [J]. *Water Res*, 2023, 245: 120585.
- [57] TURETGEN I. Induction of viable but nonculturable (VBNC) state and the effect of multiple subculturing on the survival of *Legionella pneumophila* strains in the presence of monochloramine [J]. *Annals Microbiol*, 2008, 58(1): 153–156.
- [58] CHEN S, ZENG J, WANG YH, *et al.* Modelling the effect of chlorination/chloramination on induction of viable but non-culturable (VBNC) *Escherichia coli* [J]. *Environ Technol*, 2020, 41(26): 3443–3455.
- [59] TRUCHADO P, GIL MI, ALLENDE A. Peroxyacetic acid and chlorine dioxide unlike chlorine induce viable but non-culturable (VBNC) stage of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in wash water [J]. *Food Microbiol*, 2021, 100: 103866.
- [60] GUO LZ, YE CS, YU X, *et al.* Induction of bacteria in biofilm into a VBNC state by chlorine and monitoring of biofilm structure changes by means of OCT [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 891: 164294.
- [61] WANG JS, BU LJ, WU YT, *et al.* Disinfection profiles and mechanisms of *E. coli*, *S. aureus*, and *B. subtilis* in UV365/chlorine process: Inactivation, reactivation, and DBP formation [J]. *Separat Purific Technol*, 2022, 287: 120584.
- [62] CHEN PF, ZHANG RJ, HUANG SB, *et al.* UV dose effects on the revival characteristics of microorganisms in darkness after UV disinfection: Evidence from a pilot study [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 713: 136582.
- [63] WANG LP, YE CS, GUO LZ, *et al.* Assessment of the UV/chlorine process in the disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*: Efficiency and mechanism [J]. *Environ Sci Technol*, 2021, 55(13): 9221–9230.
- [64] CHEN XW, CHEN Z, LIU H, *et al.* Synergistic effects of UV and chlorine in bacterial inactivation for sustainable water reclamation and reuse [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 845: 157320.
- [65] 曹小红, 杨政, 鲁梅芳, *et al.* 两种卫生指标菌在瓶装水中“活的非可培养状态”的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(11): 197–201.
- CAO XH, YANG Z, LU MF, *et al.* Study on viable but non-culturable state of two species of health-indicator bacteria in bottled water [J]. *Food Sci*, 2009, 30(11): 197–201.
- [66] DIETERSDORFER E, KIRSCHNER A, SCHRÄMMEL B, *et al.* Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages [J]. *Water Res*, 2018, 141: 428–438.
- [67] NISAR MA, ROSS KE, BROWN MH, *et al.* Detection and quantification of viable but non-culturable *Legionella pneumophila* from water samples using flow cytometry-cell sorting and quantitative PCR [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1094877.
- [68] QI Y, LI ST, ZHANG YL, *et al.* Recent advances in viability detection of foodborne pathogens in milk and dairy products [J]. *Food Control*, 2024, 160: 110314.
- [69] PAL M, MULU S, TEKLE M, *et al.* Bacterial contamination of dairy products [J]. *Bever Food World*, 2016, 43: 40–43.
- [70] TAHER EM, HEMMATZADEH F, ALY SA, *et al.* Molecular characterization of antimicrobial resistance genes on farms and in commercial milk with emphasis on the effect of currently practiced heat treatments on viable but nonculturable formation [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(11): 9936–9945.
- [71] TAHER EM, HEMMATZADEH F, ALY SA, *et al.* Survival of staphylococci and transmissibility of their antimicrobial resistance genes in milk after heat treatments [J]. *LWT*, 2020, 129: 109584.
- [72] ROSSI F, DEL-MATTO I, MANOCCHIO P, *et al.* Occurrence and survival of *Campylobacter* spp. in dairy matrices investigated by viability qPCR [J]. *Int J Dairy Technol*, 2023, 76(3): 572–582.
- [73] ZHANG JB, LU XN. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to stressors in agrifood systems and induction of a viable-but-nonculturable state [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2023, 89(5): e00096–23.
- [74] OLSZEWSKA MA, PANFIL-KUNCEWICZ H, ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł. Detection of viable but nonculturable cells of *Listeria monocytogenes* with the use of direct epifluorescent filter technique [J]. *J Food Saf*, 2015, 35(1): 86–90.
- [75] 曹怡芳, 周爱莲, 白泓, 等. 牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌可形成活的非可培养状态[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(3): 56–62, 124.
- CAO YF, ZHOU AIL, BAI H, *et al.* Formation of viable but non-culturable state of *Cronobacter sakazakii* during milk fermentation [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2022, 38(3): 56–62, 124.
- [76] LAZOU TP, GELASAKIS AI, CHAINTOUTIS SC, *et al.* Method-dependent implications in foodborne pathogen quantification: The case of *Campylobacter coli* survival on meat as comparatively assessed by colony count and viability PCR [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 604933.
- [77] 钟俊良. 速冻牛肉丸中大肠杆菌 O157: H7 活的不可培养状态形成机制的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2018.
- ZHONG JL. Study on the formation mechanism of viable non-culturable state of *Escherichia coli* O157: H7 in frozen beef pellets [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology. 2018.
- [78] ABDULLAEVA AM, BLINKOVA LP, PAKHOMOV YD, *et al.* Chicken mince as a substrate for dangerous viable but nonculturable bacterial cell [J]. *J Hyg Eng Design*, 2010, 38: 58–64.
- [79] CHEN H, ZHONG C, ZHANG TT, *et al.* Rapid and sensitive detection of viable but non-culturable salmonella induced by low temperature from chicken using EMA-Rti-LAMP combined with BCAC [J]. *Food Anal Method*, 2020, 13(2): 313–324.
- [80] BETERAMS A, TOLKSDORF T, MARTIN A, *et al.* Change of *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* counts in packaged broiler breast meat stored under modified atmosphere and vacuum conditions at 4 and 10 °C based on cultural and molecular biological quantification [J]. *Food Control*, 2023, 145: 109337.
- [81] HAN D, HUNG YC, WANG LX. Evaluation of the antimicrobial efficacy

- of neutral electrolyzed water on pork products and the formation of viable but nonculturable (VBNC) pathogens [J]. *Food Microbiol*, 2018, 73: 227–236.
- [82] 赵青, 刘欣, 牛洪梅, 等. 食源性致病菌活的不可培养状态诱导、复苏及检测的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(21): 377–385.
ZHAO Q, LIU X, NIU HM, *et al.* Progress in induction, resuscitation and detection of food-borne pathogenic bacteria VBNC [J]. *Food Sci*, 2023, 44(21): 377–385.
- [83] NICOLÒ MS, GIOFFRÈ A, CARNAZZA S, *et al.* Viable but nonculturable state of foodborne pathogens in grapefruit juice: A study of laboratory [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2011, 8(1): 11–17.
- [84] ZHANG Y, LIAO X, FENG J, *et al.* Induction of viable but nonculturable *Salmonella* spp. in liquid eggs by mild heat and subsequent resuscitation [J]. *Food Microbiol*, 2023, 109: 104127.
- [85] ZHANG XH, AHMAD W, ZHU XY, *et al.* Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: Implications for cultivating uncultured marine microorganisms [J]. *Mar Life Sci Technol*, 2021, 3(2): 189–203.
- [86] KNIPPER AD, PLAZA-RODRÍGUEZ C, FILTER M, *et al.* Modeling the survival of *Campylobacter jejuni* in raw milk considering the viable but non-culturable cells (VBNC) [J]. *J Food Saf*, 2023, 43(6): e13077.
- [87] LLEÒ MM, BONATO B, TAFI MC, *et al.* Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 91(6): 1095–1102.
- [88] GÖING S, JUNG K. Viable but nonculturable gastrointestinal bacteria and their resuscitation [J]. *Arch Gastroenterol Res*, 2021. DOI: 10.33696/gastroenterology.2.027

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)

作者简介



张毓羚, 硕士, 主要研究方向为环境微生物。

E-mail: zyyyyyl310@126.com

张 灿, 研究员, 主要研究方向为饮用水水质安全。

E-mail: zhangcancqu@163.com



张明露, 博士, 教授, 主要研究方向为环境微生物。

E-mail: zhangminglu@th.btbu.edu.cn