

“粮油食品品质提升与安全控制” 特约专栏文章之五

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.02.005

米面制品中微生物的活但不可培养状态检测研究进展

徐振波¹, 林欣¹, 徐行勇¹, 李琳^{1,2}, 陈玲¹, 李晓奎¹, 苏健裕¹

(1. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心, 广东 广州 510640;
2. 东莞理工学院 化学工程与能源技术学院, 广东 东莞 523808)

摘要: 米面制品是我国主要的食品, 含有丰富的营养物质与充足的水分, 适合微生物生长繁殖。腐败微生物会引起食品货架期缩短或在保质期内腐败变质, 而致病微生物的存在则可引起食物中毒事件。近年来对食品微生物的快速检测技术主要包括传统法与核酸扩增法, 其中聚合酶螺旋反应(PSR)技术具有较高的灵敏度、特异性和重现性, 具有较大应用前景。此外, 活但不可培养状态(VBNC)因具有不可培养特性, 会造成微生物检测“金标准”培养法获得“假阴性”结果, 是食品微生物安全中的重要威胁。通过研究分析污染米面制品的主要微生物和相应快速检测方法, 以及活但不可培养状态的生物学特性和检测方法, 为进一步实现对米面制品中微生物安全控制提供重要依据。

关键词: 米面; 微生物致病菌; 聚合酶螺旋反应; 核酸检测; 活但不可培养状态

中图分类号: TS213 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2020)02-0030-06

Progress in the detection of viable but non-culturable microbes in rice and noodles

XU Zhen-bo¹, LIN Xin¹, XU Xing-yong¹, LI Lin^{1,2}, CHEN Ling¹, LI Xiao-xi¹, SU Jian-yu¹

(1. School of Food Science and Engineering, Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, Ministry of Education Engineering Research Center of Starch & Protein Processing, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: Rice and flour products are a type of major food in China, which is abundant in nutrients and humidity and thus is suitable for microbial growth. Spoilage microbes could shorten the shelf life of food, and pathogenic microbes could cause food poisoning cases. In recent years, rapid detection on food borne microbes includes traditional and nucleic acids amplification methods, of which PSR is advantageous on sensitivity, specificity and reproducibility, showing a promising application prospect. In addition, viable but non-culturable (VBNC) microbial cells is incapable of being detected by “Golden standard” culturing methodology, and thus becomes an important threat for food safety. This review has summarized the major microbes in rice and flour products, currently available detection methodologies, as well as the biological

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD04012021)

作者简介: 徐振波, 1982年出生, 男, 博士, 副教授, 研究方向为食源性致病微生物安全研究。

通讯作者: 李琳, 1962年出生, 男, 博士, 教授, 研究方向为食品加工学基础、碳水化合物修饰及多糖生物安全。

characteristics and detection method of VBNC, which will provide significant information on further safety control of microbes in rice and flour products.

Key words: rice and flour; microbial pathogens; PSR; nucleic acid detection; VBNC

米面制品是由大米、麦类、杂粮等经过加工制成的条丝块等形状的食品,是我国的主要食品^[1];由于我国地域差异较大,在南方以米制品为主而北方以面制品为主,以大米、小麦粉等为原料,基于各种食品加工技术,制成的常见米面制品包括米粉、米线、面条、饺子、年糕、河粉、馄饨、米发糕、包子、方便面、面包等^[1],成为老百姓的日常主食。其中,速冻米面食品,如速冻糕点、包子、馄饨、水饺等,则通过冷藏与冻藏等手段延长储藏期限,具有较大的消费市场。与其它食品相比,米面制品淀粉含量较高,含有丰富的营养物质,而为保证一定的口感,通常含有充足的水分,以上均为微生物生长与繁殖提供适宜的条件。腐败微生物的存在使得食品货架期缩短或在保质期内腐败变质,而致病微生物的存在则可引起食物中毒事件。因此,米面制品中的微生物安全问题日益引起重视,本文将对米面制品中的微生物现状进行综述。

1 米面制品中的微生物

1.1 微生物的污染来源

由于米面本身含有一定水分,同时储藏环境具有一定湿度,易于被霉菌污染,在加工及贮藏过程中进一步发生霉变^[1]。此外,米面原料中常存在其它微生物,例如芽孢杆菌能形成芽孢,具有较强的耐受性^[2];此外,乳酸菌、产气杆菌和非发酵用腐败酵母菌等发酵过程中的杂菌,能产酸产气并影响食品的最终性状。除米面外,米面制品中的其它食材原料,也易于带来微生物污染,例如鸡蛋易于受到沙门氏菌污染;油料种子榨油则可能带来霉菌及其毒素的污染;带馅料食品则可能含有各种动物肉类和坚果,也易带来不同的微生物污染。食品加工过程同样易存在微生物污染,如在面团制作、醒发、成型等操作中,工作人员卫生不佳或设备清洗不当,则对食品直接带来污染。在熟制过程中,以马铃薯杆菌为代表的黏

质菌,其芽孢可耐受 140 °C 高温,因此如果加热不充分,可引起丝状黏质菌污染,即使局部温度达 140 °C 左右也无法彻底杀灭该类型微生物^[3]。

1.2 米面制品中微生物的检出率

通过对各地区常见米面制品中微生物的检出率进行统计,可见大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌(以下简称“金葡菌”)、乳酸菌、蜡样芽孢杆菌与霉菌等,是米粉、蛋糕、面包、发糕等米面食品中主要的污染微生物^[1]。乳酸菌在米粉、发糕类食品初始相中为优势腐败菌,增长较快,可显著降低体系的 pH 值从而导致风味劣变。芽孢杆菌则对游离氧进行消耗并产生有机酸类,从而使得食品体系的 pH 值进一步降低,因此,大米类发酵食品多呈酸性^[1]。在米面制品中,微生物检测项目主要包括菌落总数(GB 4789.2)与大肠菌群(GB 4789.3 平板计数法),沙门氏菌(GB 4789.4)与金葡菌(GB 4789.10)等则为限量检出菌^[4]。2011 年黔南州报道显示:糕点及饼干中大肠菌群检出率达到 60%,大肠杆菌(O157)检出率为 20%,而速冻米面制品中金葡菌与大肠菌群检出率均达 33%^[5]。此外,有学者报道乳杆菌和芽孢杆菌是米发糕储藏过程中的优势腐败菌^[6]。

1.3 米面制品中主要污染微生物

1.3.1 大肠杆菌 O157:H7

大肠杆菌是最常见的食源性微生物,其中 O157 血清型菌株是典型的食源性致病菌,可污染生菜、生或者未全熟的牛肉产品、乳制品及隔夜的面制品等^[7-8]。O157 大肠杆菌可产生大量的(类)志贺毒素、耐热肠毒素和溶血素等,从而引起严重的食物中毒,包括血性结肠炎,溶血性尿毒综合征及血栓性血小板减少性紫癜^[9-12]。

1.3.2 金葡菌

金葡菌是食品中最常见的革兰氏阳性菌,常见于乳制品、肉制品、速冻食品等^[13-15],在美国

食物中毒致病菌中列前五位^[16]，在我国广州，2005—2012年间天河区由金葡菌引起的食物中毒则高达 26%^[17]。其引致的食物中毒一般由于致病菌株所产生的肠毒素所引起。

1.3.3 沙门氏菌

沙门氏菌是最常见的食源性致病菌之一，在食品中最常见的包括鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌等。由沙门氏菌引起的食物中毒在各种微生物中常居首位^[18]。2015年在 26 个欧洲国家共 4 362 起食源性疾病中，沙门氏菌占比高达 26.8%^[18]。沙门氏菌常见的污染源包括蛋、生肉、乳制品与肉制品等。其菌体在进入人体肠道增殖后可产生内毒素，引发一系列恶心、呕吐、腹泻等胃肠道疾病，严重时可导致死亡。

1.3.4 乳酸菌

乳酸菌作为主要的益生菌，常被用于乳制品、面制品等食品加工中的发酵剂^[1]。但是，乳酸菌由于其可产酸，大部分种属都较难培养，因此常引起果蔬、肉制品等腐败变质。例如干酪乳杆菌可发酵山梨醇和山梨糖，通过产酸与双乙酰导致食品变酸及风味改变从而腐败变质。

2 米面制品中的微生物检测

2.1 传统检测法

米面制品中传统的微生物检测法包括平板培养法与免疫法，其中前者是食品微生物常规检测的“金标准”方法，但一般耗时较长，可达 4~7 d。同时，对于活但不可培养（Viable but non-culturable state, VBNC）状态菌，其无法在平板上形成菌落，因此易获得“假阴性”结果，从而低估食品中微生物的数量，成为潜在的食品安全风险。对于后者，其原理均基于体外抗原与抗体的特异性结合，常见方法有酶联免疫检测法-ELISA、免疫层析技术-IC、乳胶凝集试验-LAT 及免疫印迹法等^[19]。其中，在食品检验中应用较广泛的检测方法是 ELISA 法。目前已开发出一系列具有较好效果的食物体系致病菌免疫检测试剂盒，包括大肠杆菌 O157: H7、单增李斯特菌、沙门氏菌等。然而，免疫法检测一般费用较昂贵，同时灵敏度与检出限低，无法在核酸水平上进行检测。

2.2 核酸检测法

近年来，探针法、多聚酶链式反应法（PCR）与新型核酸恒温扩增技术等核酸检测技术也被广泛应用于微生物的常规检测^[20]。

探针技术是基于核酸杂交原理，利用同位素等方法标记序列中已知的 DNA 或 RNA，通过碱基互补配对从而实现核酸片段的特异性检测，该技术特异性和灵敏度较高^[1]。然而，由于涉及探针设计与标记，同时杂交过程耗时较长，因此应用受到一定限制。PCR 技术则通过体外核酸复制，可特异性扩增靶点序列，在近二十多年来获得广泛应用。PCR 技术的灵敏度高、特异性强、操作简单快捷及成本低^[1]，但该反应的进行由于包括变性、复性与延伸步骤，因此需要变温装置。而且扩增产物一般需通过如电泳法等进行分离。荧光定量 PCR 技术一定程度上可克服以上缺点，但其设备一般较为昂贵，且所需荧光染料等耗材同样较昂贵，因此普及率受到一定影响。

近年来获得广泛关注的恒温核酸扩增技术，基于不同的恒温核酸扩增原理，与 PCR 技术相比可不受变温设备限制；同时，由于其扩增量一般较大，因此可通过不同显色反应对结果进行判读，不需进行电泳操作。目前，依赖核酸序列扩增技术、滚环扩增技术、环介导等温扩增技术、重组酶聚合酶扩增及聚合酶螺旋反应等已发展为成熟的核酸恒温扩增技术^[21-22]。其中依赖核酸序列扩增技术与滚环扩增技术并非严格意义上的等温扩增技术，因其需有重复加样过程，反应时间较长且反应体系复杂。环介导等温扩增技术由于特异性和灵敏度较高，所需时间较短，操作简单，在 2000 年首次报道后即获得广泛关注^[23]，但存在假阳性率高、易污染、扩增反应不稳定等缺点。而以 *Bst*DNA 聚合酶的链置换功能及热稳定性的为基础开发的聚合酶螺旋反应技术操作简便、效率高，现在已经在细菌、病毒和真菌的快速检测有广泛应用^[24-27]，且已经成为发展前景广阔的细菌快速检测方法。同环介导等温扩增技术相比，聚合酶螺旋反应技术反应仅需 2 条符合引物（图 1），设计难度大为下降，结果判读所需反应时间稍长

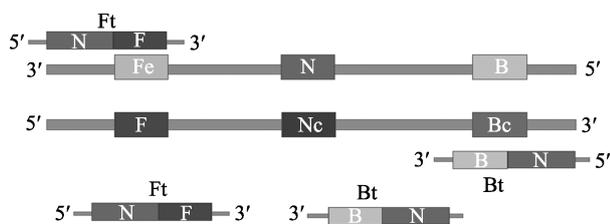


图 1 聚合酶螺旋反应反应中引物设计及结合位点
检测引物: Ft、Bt; 加速引物: IF、IB

(约 60 min), 但反应稳定性等显著提升。

2.3 VBNC 状态

在营养不足、储藏温度变化、渗透压变化等环境压力下, 非芽孢形成菌会进入最适生存状态, 即 VBNC 状态, 进入 VBNC 状态的细菌将在平板上将停止生长但是仍然具有一定的代谢能力, 从而导致食品腐败变质^[28-29]。食品在加工、运输和存储过程中的各种不良环境为其中微生物进入 VBNC 状态提供了条件, 已有研究表明低温储藏或紫外辐射等处理方式可使葡萄酒、乳制品、胡萝卜汁等中的微生物进入 VBNC 状态^[1]。对于米面食品, 其原料、加工及储藏条件较为复杂, NaCl 的添加、酸性环境的产生为微生物生存及进入 VBNC 状态提供了可能。若米面食品中含有 VBNC 状态的食源性微生物并流入市场, 由于微生物检测“金标准”的方法对 VBNC 状态菌株在的假阴性检测结果, 因此可引发相关的食品安全事故。

2.3.1 VBNC 状态形成的条件

自 1982 年首次发现 VBNC 状态微生物以来^[30], 许多微生物被报道可存在 VBNC 状态, 到目前为止, 已经发现 85 种可以进入 VBNC 状态的微生物 (18 种非致病菌与 67 种致病菌)^[1]。物理、化学和生物是微生物进入 VBNC 状态的三大主要因素。其中, 物理因素主要有营养程度、盐度、温度、pH、压力、光照和辐射等, 其中低温处理是目前诱导微生物进入 VBNC 状态的热点。在作者之前的研究中发现, -20 培养 28 d 后 *E.coli* O157:H7 会进入 VBNC 状态。微生物在进入 VBNC 状态所需要的时间对于不同种属以及菌株间具有较大差异性, 即使同一种属菌株在相同

处理条件下, 其进入 VBNC 状态所需时间也会有所差异, 这与菌株的自身特性有关。此外, 巴氏杀菌技术等常用的杀菌方式也会诱导微生物进入 VBNC 状态^[31], 大肠杆菌和铜绿假单胞菌在一定剂量的紫外辐射处理后也会进入 VBNC 状态^[32]。对于化学因素而言, 在食品加工中使用的消毒剂、防腐剂等均可促进微生物进入 VBNC 状态, 如未被消毒剂杀死肉制品加工设备表面的假单胞菌进入 VBNC 状态^[33], 加工废水中的 *Escherichia coli* 也可进入 VBNC 状态^[34]。关于生物因素, 环境中具有活性的其他生物对微生物进入 VBNC 状态具有一定的作用, 如浮游生物降低海水中 *V. cholerae* O1 进入 VBNC 状态的比例^[35], 不同生长期的铜绿微囊藻诱导蓝藻溶解菌进入 VBNC 状态的比例有所差异^[36]。

总而言之, 在食品加工及存储过程中, 存在着大量可诱导微生物进入 VBNC 状态的各种因素。除了与外界环境有关以外, 微生物进入 VBNC 状态的能力还与其自身特性有关, 如对环境压力的抵抗能力、生理状态、种类等。

2.3.2 VBNC 状态菌体的生物学特性

VBNC 状态菌体虽不可培养, 但与死亡细胞有较大差别, 其具有完整的细胞膜结构及一定的生物学特性, 包括细胞形态与组分、代谢活动与抗性、致病性与毒性等^[1]。

2.3.2.1 细胞形态与组分 从细胞形态与组分来看, 与正常状态的细菌相比, 处于 VBNC 状态的细菌的细胞形态变化明显: 其中大多数菌体皱缩为球形, 少数菌体体积变化不大或轻微延长^[37]; 此外, VBNC 状态菌体的细胞膜或者细胞壁也有所不同^[1]。

2.3.2.2 代谢活动与抗性 研究表明, 与正常状态的细菌相比, VBNC 状态的菌体代谢活性降低但仍具有一定活性, 支链氨基酸、脂肪、碳水化合物及聚羟基丁酸酯为代谢所需能量的来源^[1], 同时 VBNC 状态菌体细胞壁对环境压力 (高温、高盐、高酸等) 的抗性高于正常状态细菌^[1]。截止目前, 多种 VBNC 状态的食源性微生物已被证实对环境压力具有一定抗性, VBNC 状态的细

胞对特定加工、包装和储存等食品处理方式也会呈现抗性^[38]。

2.3.2.3 致病性和致毒性 进入 VBNC 状态后的微生物在代谢活动中会产生具有毒性及腐败性的代谢产物。与接种正常状态的乳杆菌的啤酒相比,含有 VBNC 状态的乳杆菌的啤酒 30 d 后变得浑浊^[39],且其中主要腐败因子乙酸、二乙酰含量显著降低^[39]。此外,有研究证实 VBNC 状态下的微生物的毒素基因能够稳定表达而具有潜在毒力。

2.3.3 VBNC 状态的检测

由于应用“金标准”培养法对 VBNC 状态菌体会获得“假阴性”结果,因此建立针对 VBNC 状态的食源性微生物有效且快速检测的方法较为迫切。VBNC 状态检测的常用方法有流式细胞仪、免疫学法、活菌直接计数法、死/活细菌检测试剂盒以及分子生物学法等^[1]。(1) 进入 VBNC 状态的微生物对某些抗原仍具有活性,因此可以利用 ELISA 技术进行快速检测^[1]。(2) 由于活细胞会吸收底物,活菌直接计数法通过对比活菌及可培养菌准确计数的差异判定 VBNC 状态菌的数量。

(3) 死/活细菌检测试剂盒技术利用核酸染料穿透完整细胞膜的能力检测 VBNC 状态菌。

3 结论

米面制品作为我国重要的主食食品,其微生物安全具有举足轻重的地位。通过研究分析污染米面制品的主要微生物及相关微生物的快速检测、活但不可培养状态的生物学特性和检测方法以及引起米面制品等食品腐败变质的机理,为进一步实现对米面制品中微生物的安全控制提供重要依据。

参考文献:

- [1] 徐行勇. 米面制品微生物 VBNC 状态的检测与控制消减[D]. 华南理工大学, 2019.
- [2] 何承云, 张永生, 靳艳红. 中国传统早餐食品油条的 HACCP 体系研究[J]. 江苏调味副食品, 2010, 27(3): 37-40.
- [3] 蒋予箭, 顾青. 面包、蛋糕质量控制的 HACCP 方式[J]. 粮油食品科技, 2000, 8(6): 32-34.
- [4] 食品安全国家标准 速冻面米制品: GB 19295—2011[S].
- [5] 王明祥, 姚明霞, 郭静, 等. 黔南州 2011 年部分食品中食源性致病菌监测分析[J]. 现代预防医学, 2014, 41(7): 1196-

1217.

- [6] 陈芳溶, 徐晓云, 张敏, 等. 米发糕储藏过程中微生物分析[J]. 食品科学, 2011(3): 186-190.
- [7] ZEINHOM M M A, WANG Y, SONG Y, et al. A portable smart-phone device for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157:H7 in Yoghurt and Egg[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 99(15): 479-485.
- [8] PATRICIA E, GLORIA S, AZNAR R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidiummonoazide and real-time PCR[J]. Food Control, 2012, 25(2): 704-708.
- [9] GRIFFIN P. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome[J]. Epidemiologic Reviews, 1991, 13(1): 60-98.
- [10] ROWE P C, ORRBINE E, WELLS G A, et al. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988[J]. Journal of Pediatrics, 1991, 119(2): 220-224.
- [11] FENG P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants[J]. Emerging Infectious Diseases, 1995, 1(2): 47-52.
- [12] NEIL K P, BIGGERSTAFF G, MACDONALD J K, et al. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough—United States, 2009[J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54(4): 511-518.
- [13] YOON J H, WEI S, OH D H. A highly selective enrichment broth combined with real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 94: 103-110.
- [14] RUBAB M, SHAHBAZ H M, OLAIMAT A N, et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 105: 49-57.
- [15] ZAHOOOR S, BHATIA A. Bacteria: silent killers in food[J]. Science Reporter, 2007: 33-34.
- [16] DINGES M M, ORWIN P M, SCHLIEVERT P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(1): 16-34.
- [17] 向辉, 刘钢, 李标, 等. 广州市天河区 2005—2012 年食源性疾病发生原因与流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(24): 71-73.
- [18] GUNASEKERA T S, ANDERS SØRENSEN, ATTFIELD P V, et al. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization[J]. Applied & Environmental

- Microbiology, 2002, 68(4): 1988-1993.
- [19] MAGLIULO M, SIMONI P, GUARDIGLI M, et al. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(13): 4933-4939.
- [20] LAW W F, ABMUTALIB N S, CHAN K G, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 5: 770.
- [21] DU X, ZANG Y, LIU H, et al. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for *Listeria monocytogenes* detection in food[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(4): 1041-1047.
- [22] LIU W, DONG D, YANG Z, et al. Polymerase spiral reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12723.
- [23] LIU W, ZOU D, HE X, et al. Development and application of a rapid *Mycobacterium tuberculosis* detection technique using polymerase spiral reaction[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 3003.
- [24] DONG D, ZOU D, LIU H, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *tox A* gene in intensive care unit patients from Beijing, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1100.
- [25] JIANG X, DONG D, LIHONGBIAN L, et al. Rapid detection of *Candida albicans* by polymerase spiral reaction assay in clinical blood samples[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 916.
- [26] GUPTA V, CHAKRAVARTI S, CHANDER V, et al. Polymerase spiral reaction (PSR): a novel, visual isothermal amplification method for detection of canine parvovirus 2 genomic DNA[J]. Archives of Virology, 2017, 162(7): 1995-2001.
- [27] MALLA J A, CHAKRAVARTI S, GUPTA V, et al. Novel polymerase spiral reaction (PSR) for rapid visual detection of *Bovine Herpesvirus 1* genomic DNA from aborted bovine fetus and semen[J]. Gene, 2017, 644: 107-112.
- [28] LIU J, LI L, LI B, et al. Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 257-261.
- [29] LIU J, ZHOU R, LI L, et al. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation[J]. Research in Microbiology, 2016, 168(3): 188-193.
- [30] XU H. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323.
- [31] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015[J/OL]. <http://10.2903/j.efsa.2016.4634>, 2016-09-16.
- [32] LINDEN K G, HULL N M, RODRIGUEZ R A. Comment on "UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*"[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(17): 10750-10751.
- [33] PENEAU S, CHASSAING D, CARPENTIER B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 2839-2846.
- [34] ZHAO L, MATTHEWS K R. Influence of starvation, temperature, and pH on culturability of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Food Safety, 2000, 20(3): 193-208.
- [35] CHOWDHURY M A R, HUQ A, XU B, et al. Effect of alum on free-living and copepod-associated *Vibrio cholerae* O1 and O139[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3323-3326.
- [36] CHEN H, FU L, LUO L, et al. Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(1): 64-73.
- [37] ZHAO X, ZHONG J, WEI C J, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 580.
- [38] AYRAPETYAN M, OLIVER J D. The viable non-culturable state and its relevance in food safety[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 8: 127-133.
- [39] LIU J, DENG Y, LI L, et al. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 11446. 

备注：本文的彩色图表可从本刊官网(<http://lyspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。

(审核：伍松陵)