

研究报告

氧化压力下沙门氏菌可培养性检测及其活的非可培养状态形成情况

张玲娜, 廖红梅*

江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

张玲娜, 廖红梅. 氧化压力下沙门氏菌可培养性检测及其活的非可培养状态形成情况[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1678-1689

Zhang Lingna, Liao Hongmei. Detection of culturable *Salmonella* and its formation of a viable but non-culturable state under oxidative stresses[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1678-1689

摘要:【背景】氧化压力会导致细菌进入活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态, 菌落形成能力可能受到亚致死损伤的影响。目前对于 VBNC 态细菌的定量检测是基于活菌数与可培养数的差值, 因此可培养数的检测对于 VBNC 态定量研究很关键, 培养基组成不合适可能会造成漏检。【目的】分析培养基组成对氧化压力下亚致死损伤细菌检测的重要影响; 探究常见食源性致病菌肠炎沙门氏菌在氧化压力下形成 VBNC 态的情况。【方法】分别采用 Luria-Bertani (LB)、beef peptone yeast (BPY)和 *Salmonella Shigella* (SS)培养基检测并比较肠炎沙门氏菌的可培养数; 采用 RT-qPCR、荧光染色-激光共聚焦显微镜观测氧化压力下肠炎沙门氏菌形成 VBNC 态的情况。【结果】非选择性培养基 LB 和 BPY 能检出亚致死细菌, SS 培养基中牛胆盐导致可培养数减少; 肠炎沙门氏菌经 53 °C 过氧化氢处理 1.5 h 后进入 VBNC 态的比例显著高于 53 °C 过氧化氢+亚铁离子和过氧化氢+柠檬酸处理($P<0.05$)。【结论】在对 VBNC 态的检测中应选择合适的固体培养基检测可培养菌; 氧化压力下沙门氏菌进入 VBNC 态, 这对以过氧化氢为消毒剂的处理提出了挑战, 应尽量避免该特殊亚致死状态的形成。

关键词: 肠炎沙门氏菌; 氧化压力; 活的非可培养状态; 培养基优化

基金项目: 国家自然科学基金(32172351, 31471714, 31101360)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172351, 31471714, 31101360)

*Corresponding author: E-mail: hmeiliao@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-08-23; Accepted: 2021-10-11; Published online: 2022-01-19

Detection of culturable *Salmonella* and its formation of a viable but non-culturable state under oxidative stresses

ZHANG Lingna, LIAO Hongmei*

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Bacteria would enter a viable but non-culturable (VBNC) state under oxidative stress, and their colony forming ability may be affected by sublethal injury that imposed on bacterial cells. Currently, the quantitative detection of VBNC bacteria is based on the difference between the viable and culturable counts. Therefore, the accurate detection of culturable counts is critical to quantitating the number of VBNC cells. In addition, a proper growth medium might avoid the missing detection of viable pathogenic bacteria. [Objective] To analyze the effect of medium composition on the detection of bacteria exposed to sublethal injury caused by oxidative stresses, and to explore the formation of VBNC state of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under oxidative stresses. [Methods] The culturable cells in Luria-Bertani (LB), beef peptone yeast (BPY), and *Salmonella Shigella* (SS) medium were counted and compared. The formation of VBNC *S. enterica* serovar Enteritidis was quantified respectively with RT-qPCR and fluorescent staining under confocal laser microscope. [Results] The sublethal injured cells under oxidative stress could be detected with non-selective LB and BPY medium, and the counts of culturable cells reduced in SS medium because of bile salt. The formation rate of VBNC *S. enterica* serovar Enteritidis exposed to H₂O₂ at 53 °C for 1.5 h was significantly higher than that in the other two cases ($P < 0.05$). [Conclusion] For the detection of VBNC state, a suitable medium should be selected to detect culturable cells. Oxidative stress would induce the VBNC state of food-borne pathogens, which deserves special attention as H₂O₂ is widely used as a disinfectant in food processing and medical treatment.

Keywords: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis; oxidative stress; viable but non-culturable state; culture medium optimization

食品安全是公共卫生安全中的热点, 其中对食源性致病菌的防控更是关键点之一。为有效防控食源性致病菌, 对其精准检测甚为基础。细菌暴露于物理或化学处理会引起亚致死损伤, 其细胞结构受到可逆损伤并伴随部分功能丧失^[1]。通常致病菌检测会采取平板计数方法, 受到亚致死损伤的细菌只能在非选择性培养基上生长, 严重受损时会进入活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态, 造成漏检^[2]。VBNC 状态是微生物在不利环境中失去繁殖能力, 但合适条件下可复苏并恢复可培养

性的一种特殊休眠状态^[3]。与正常细菌相比, VBNC 态细菌具有更强的物理、化学和抗生素耐受性。例如, VBNC 态创伤弧菌能耐受抗生素、有毒重金属、高温、高盐、乙醇和酸等多种压力^[4]。此外, VBNC 态致病菌复苏后仍具有致病性。例如 Sun 等研究表明 VBNC 态哈维氏弧菌复苏后恢复其致病性和感染能力^[5]。因此 VBNC 态细菌尤其是致病菌的存在, 会给食品、医药和农业生产等领域带来潜在威胁。

目前对 VBNC 态细菌的定量检测一般通过活菌数与可培养菌数之间的差值而间接定量。

一般认为活菌具有可培养性、完整的细胞膜及代谢活性和转录活性；根据以上特征，常用于检测活菌的方法有直接计数法、活菌染色法、呼吸检测法和分子生物学法等^[6]。由于 VBNC 态的存在会使平板计数法检测结果偏低，因此需要采用其他方法检测活菌，如荧光染色和 RT-qPCR 检测等。为了定量检测 VBNC 态细菌，如何准确定量可培养菌和活菌很重要，其中，选择合适的固体培养基对可培养菌的检测十分关键。

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是一类肠道菌群，主要在人体和各种温血动物体内寄生，也可存在于土壤、水及一些含粪便的淤泥里^[7]。虽然随着杀菌技术的提升，沙门氏菌致病事件已大幅减少，但沙门氏菌仍处于威胁食品安全的微生物榜首^[8]。食源性沙门氏菌病主要特征是腹泻与胃肠紊乱，一般表现出的症状为腹部痉挛、腹泻、恶心呕吐和发热等^[9]。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Enteritidis)是最常见的沙门氏菌之一，在我国因肠炎沙门氏菌导致的食物中毒事件多发，是一种主要的食源性致病菌^[10]。

研究表明，细菌可培养性与具有抗氧化能力的烷基氢过氧化物还原酶亚基 C、蛋白羧基化和抗氧化酶的表达有关，氧化压力可造成细菌可培养性缺失^[11-13]。已有研究报道沙门氏菌在氧化压力作用下会进入 VBNC 态，抑制氧化还原调节酶中过氧化氢酶活性也导致大肠杆菌 VBNC 态形成，因此氧化压力可能是导致细菌进入 VBNC 态的一个重要因素^[14-16]。一些杀菌/消毒方式都与活性氧的作用紧密关联，例如含氯消毒剂、抗生素妥布霉素及包括等离子体、超声波等处理均能诱导活性氧产生^[14-15,17]。此外，VBNC 态细菌对抗生素、消毒剂及防腐剂

等处理不敏感^[18]。近年来已发现广泛存在于猪肉等食品中的沙门氏菌对消毒剂的耐受性显著增加^[19]，因此应特别重视对沙门氏菌尤其是 VBNC 态沙门氏菌的检测和防控。

目前，国内主要参照国家标准 GB 4789—2016^[20]检测食源性致病菌，依据菌株分离、培养、鉴定和最大可能数法，但该方法无法检出 VBNC 态致病菌。本文以肠炎沙门氏菌为研究对象，分析培养基组成对氧化压力下其培养性的影响，评价以 H₂O₂ 处理为代表的氧化压力对细菌进入 VBNC 态的影响，以期为更好地检测和防控食源性致病菌提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

肠炎沙门氏菌 CMCC 50041，中国食品药品检定所(National Institutes for Food and Drug Control, NIFDC)，使用 beef peptone yeast (BPY) 液体培养基^[21]供病原菌培养，在 37 °C 下培养 10 h，调整菌液浓度为(1-9)×10⁷ CFU/mL 备用。细菌可培养菌数检测使用的固体培养基成分如表 1 所示。

1.2 主要试剂和仪器

氯化钠、葡萄糖、乳糖、硫代硫酸钠、牛胆盐、柠檬酸铁铵、枸橼酸钠、中性红、亮绿、30% H₂O₂、盐酸、酵母粉、琼脂粉、硫酸亚铁、柠檬酸、氢氧化钠、乙二胺四乙酸、无水乙醇，上海国药集团化学试剂有限公司；蛋白胨、牛肉膏，北京奥博星生物科技有限公司；过氧化氢酶，碧云天生物科技有限公司；DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；RNA 提取试剂盒，杭州博日科技有限公司；LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 试剂盒，Molecular Probes

表 1 固体培养基配制表

Table 1 Solid medium configuration table

生长培养基	培养基成分
Growth medium	Medium components (g/L)
BPY	Beef extract 5.0, peptone 10.0, NaCl 5.0, yeast extract powder 5.0, glucose 5.0, agar 15.0
Luria-Bertani (LB)	LB broth 32.0 (purchased from AOBOX): according to QB/ABX02-137 standard formula configuration
<i>Salmonella Shigella</i> (SS)	SS agar 62.5 (purchased from AOBOX): peptone 5.0, beef exact 5.0, lactose 10.0, sodium thiosulfate 8.5, bile salt 8.5, ammonium ferric citrate 1.0, sodium citrate 8.5, neutral red 2.5×10^{-2} , agar 16.0, brilliant green 3.3×10^{-4}
SS-laboratory-made	Peptone 5.0, beef exact 5.0, lactose 10.0, sodium thiosulfate 8.5, bile salt 8.5, ammonium ferric citrate 1.0, sodium citrate 8.5, neutral red 2.5×10^{-2} , agar 16.0, brilliant green 3.3×10^{-4}
SS-lactose	SS-laboratory-made without lactose
SS-sodium thiosulfate	SS-laboratory-made without sodium thiosulfate
SS-bile salt	SS-laboratory-made without bile salt
SS-ammonium ferric citrate	SS-laboratory-made without ammonium ferric citrate
SS-sodium citrate	SS-laboratory-made without sodium citrate
SS-neutral red	SS-laboratory-made without neutral red
SS-brilliant green	SS-laboratory-made without brilliant green

公司; QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒, Qiagen 公司; SYBR[®] Premix Ex Taq II 试剂盒、PrimeScript^{RT} Reagent Kit with gRNA Eraser[®], TaKaRa 公司。

高通量实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 普通 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 激光共聚焦荧光显微镜, Carl Zeiss 公司; 超微紫外分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; pH 计, 梅特勒-多利托仪器有限公司; 恒温水浴槽, CTI 公司。

1.3 方法

1.3.1 活性氧处理方法

活性氧处理方式参考聂新颖等^[21]的方法加以修改。菌悬液在 4 °C、5 500 r/min 离心 10 min, 用生理盐水清洗 2 次后重悬于等体积的无菌水中。氧化压力条件为: 53 °C 下 0.2 mmol/L H₂O₂、53 °C 下 0.2 mmol/L H₂O₂+0.2 mmol/L Fe²⁺ (芬顿反应)和 53 °C 下 0.2 mmol/L H₂O₂+pH 4.0 (用 0.1 mol/L 柠檬酸调节 pH), 反应结束后立即加

入 4 mg/L 过氧化氢酶以终止反应, 并用等体积无菌生理盐水洗涤, 重悬菌体以备后续检测。

1.3.2 可培养菌数检测

可培养菌数检测方法参照国标 GB 4789—2016^[20]。样品使用无菌 0.85%生理盐水进行 10 倍梯度稀释并选择 3 个适合的稀释梯度进行平板计数^[22]。取 1 mL 合适浓度菌液于培养皿中并加入培养基, 待培养基完全凝固后倒置于 37 °C 培养箱培养 24 h, 记录可培养菌数并以 Log₁₀ (CFU/mL)表示。为了降低检测限, 采用离心浓缩的方法检测样品, 具体操作为: 取 10 mL 待测菌液 4 °C、5 500 r/min 离心 10 min, 重悬于 1 mL 0.85%生理盐水以获得 10 倍浓缩样品; 随后取该 10 倍浓缩样品进行平板计数培养, 并记录可培养菌数。

1.3.3 总菌数和活菌数定量检测

分别采用 qPCR 和 RT-qPCR 检测总菌数和活菌数, 具体操作参考 Liao 等^[23]。使用细菌 DNA 提取试剂盒提取 1 mL 菌液基因组 DNA,

采用 QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒进行 qPCR 反应, 建立平板计数(y)与 $C_T(x)$ 值对应的标准曲线定量总菌数: $y = -0.31x + 11.21$ ($R^2 = 0.9966$); 使用 RNA 提取试剂盒提取 1 mL 菌液 mRNA, 立即使用 PrimeScript^{RT} Reagent Kit with gRNA Eraser[®] 进行逆转录形成互补脱氧核糖核酸(cDNA), 采用 SYBR[®] Premix Ex Taq II 试剂盒进行 RT-qPCR 反应, 建立平板计数与 C_T 值对应的标准曲线定量活菌数: $y = -0.33x + 13.704$ ($R^2 = 0.9983$)。其中, qPCR 和 RT-qPCR 以基因 *invA* 为基础, 引物 F (5'-GTGA AATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3') 和 R (5'-T CATCGCACCGTCAAAGGAACC-3') 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 扩增片段大小为 284 bp^[24]。

1.3.4 VBNC 态细菌定量方法

VBNC 态细菌定量为活菌数和可培养菌数的差值^[23]。VBNC 态细菌数计算公式(1)和其占比计算公式(2)如下:

$$\text{VBNC 态菌数} = \text{活菌数} - \text{可培养菌数} \quad (1)$$

$$\text{VBNC 态占比} = \text{VBNC 态菌数} / \text{总菌数} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 LIVE/DEAD[®]BacLight[™] 试剂盒镜检活菌

采用 LIVE/DEAD[®]BacLight[™] 试剂盒镜检活菌, 试剂盒含有 2 种核酸荧光染料: SYTO 9 可以透过细胞膜与 DNA 结合, 激发后呈绿色荧光; 而碘化丙啶(propidium iodide, PI) 只能透过受损的细胞膜并与 SYTO 9 竞争结合位点, 激发后产生红色荧光。因此经试剂盒荧光染色后, 有完整细胞膜的活细胞呈绿色荧光, 细胞膜受损的细胞呈红色荧光^[21]。SYTO 9 激发和发射波长分别是 480 nm 和 500 nm, PI 激发和发射波长分别是 490 nm 和 635 nm。具体操作参照 Liao 等^[23]的方法: 将染料以 1:1 等体积混合, 取 1.5 μL 混合染料染色 0.5 mL 菌液, 37 $^\circ\text{C}$ 下暗处反应

15 min 后待检。取 5 μL 菌液置于载玻片, 盖上盖玻片, 倒置在激光共聚焦扫描显微镜上观察, 显微镜观察时选择对应波长的滤光片, 通过计算绿色细菌占总菌的比例得到活菌所占百分比; 若无可培养菌, 活菌占比即为 VBNC 态细菌的占比。

1.3.6 数据整理与分析

每个处理组均设置 3 个生物学重复。利用 Excel 统计分析所有数据, 并计算标准偏差。使用 SPSS 23.0 进行方差分析(analysis of variance, ANOVA), 采用 Waller-Duncan 检验, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。使用 Origin 9.0 绘制数据图。

2 结果与分析

2.1 培养基及其组成对氧化压力下肠炎沙门氏菌可培养性的影响

采用 BPY、LB 和 SS 固体培养基检测肠炎沙门氏菌, 未处理组三者检测结果无差异。经过 53 $^\circ\text{C}$ 0.2 mmol/L H_2O_2 处理后, 肠炎沙门氏菌的可培养数量逐渐降低; 当处理时间延长至 90 min 时, 3 种培养基均未检出可培养菌(图 1A)。在 3 种培养基之间, LB 和 BPY 培养基检测结果无显著性差异($P > 0.05$), SS 培养基检测结果显著低于其他 2 组($P < 0.05$)。通过观察平板, 在相同数量级肠炎沙门氏菌存在情况下, LB 上菌落较 BPY 上的菌落更大, 而且形态特征明显, 更易检出(图 1B)。

进一步通过单一成分缺失分析 SS 培养基中影响 H_2O_2 处理所致氧化压力对肠炎沙门氏菌菌落形成能力的关键组分。由图 1C 可知, SS-bile salt 培养基检测出的可培养菌数显著高于 SS-laboratory-made 培养基, SS-sodium citrate 培养基检测出的可培养菌数显著低于 SS-laboratory-made ($P < 0.05$); 其他单一成分缺失培养基的结果与 SS-laboratory-made 培养基并无显著差异($P > 0.05$)。

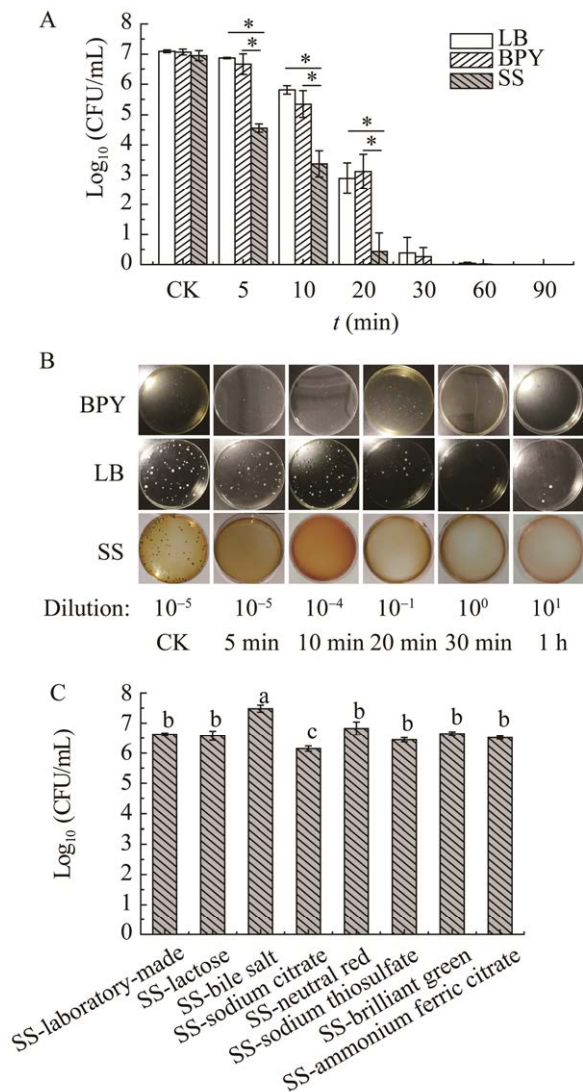


图 1 培养基对 53 °C 0.2 mmol/L H₂O₂ 处理后肠炎沙门氏菌可培养数的影响 A: LB、BPY 和 SS 固体培养基检测可培养菌数。B: 固体培养基平板。C: 单一成分缺失的 SS 培养基检测可培养菌数。*: $P < 0.05$; 不同小写字母表示可培养菌数在 0.05 水平下差异显著

Figure 1 Effect of growth medium on detection of culturable *S. enterica* serovar Enteritidis that treated with 0.2 mmol/L H₂O₂ at 53 °C. A: Detection of the culturable bacteria with LB, BPY and SS solid medium. B: Solid medium plate. C: Detection of the culturable bacteria with single component deletion medium (based on SS medium). *: $P < 0.05$; Different lowercase letters indicate that the culturable bacteria are significantly different at 0.05 level.

上述结果表明, SS 培养基中胆盐影响氧化压力下肠炎沙门氏菌可培养性的检测结果, 使得可培养菌数量显著低于 LB 和 BPY ($P < 0.05$); LB 培养基适合于检测其可培养性, 因此后续实验均采用 LB 培养基检测可培养菌。

2.2 氧化压力对 VBNC 态肠炎沙门氏菌形成的影响

氧化压力对 VBNC 态肠炎沙门氏菌形成的影响如图 2 所示。60 min 内各处理组的可培养数快速降低, 当可培养菌低于检测限(0.1 CFU/mL)时, 3 个处理组均能检出活菌, 表明在氧化压力下肠炎沙门氏菌进入了 VBNC 态。经计算后发现, 53 °C 处理相同时间(90 min)后, 可培养菌低于检测限(0.1 CFU/mL), H₂O₂ 处理组 VBNC 态菌数显著高于其他 2 组($P < 0.05$)。

因此, 不同氧化压力下肠炎沙门氏菌均会进入 VBNC 态; 53 °C 处理 90 min 后, H₂O₂ 处理组形成的 VBNC 态细菌数量显著高于 H₂O₂+Fe²⁺ 和 H₂O₂+高酸(pH 4.0)处理组($P < 0.05$)。

2.3 氧化压力下 VBNC 态沙门氏菌占比

氧化压力下 VBNC 态沙门氏菌占比及荧光染色镜检验证 VBNC 态细菌检测结果如图 3 所示。处理 1.5 h 后, 样品可培养菌数低于检测限(0.1 CFU/mL), 各处理组均存在 VBNC 态细菌, 53 °C H₂O₂ 处理 1.5 h 形成的 VBNC 态细菌占比显著高于其他 3 组; 荧光染色镜检结果也验证了这一结果, 并且检测可观测到绿色沙门氏菌细胞, 表明依然存在活菌, 其中 53 °C H₂O₂ 处理样品能清楚区分活菌与死菌, H₂O₂+高酸处理后细菌细胞较多呈现介于红色荧光和绿色荧光之间的橙色, 荧光染色镜检检测结果显著高于 RT-qPCR 检测结果($P < 0.05$)。

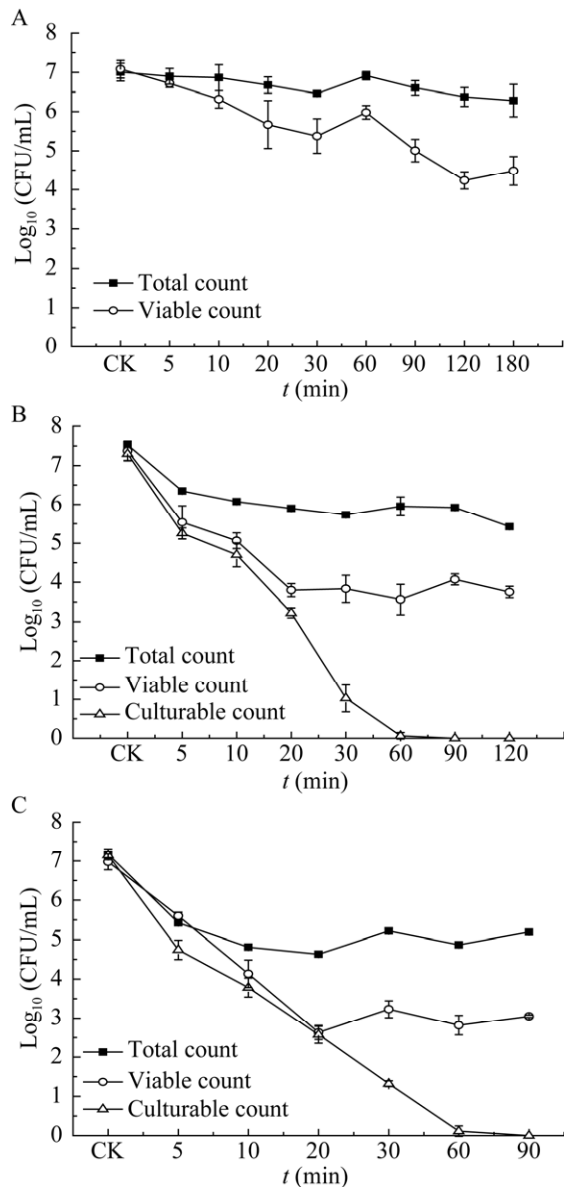


图 2 氧化压力下肠炎沙门氏菌总菌数、活菌数和可培养菌数 A: 0.2 mmol/L H_2O_2 +53 °C 处理; B: 0.2 mmol/L H_2O_2 +0.2 mmol/L Fe^{2+} +53 °C 处理; C: 0.2 mmol/L H_2O_2 +pH 4.0+53 °C; pH 由 0.1 mmol/L 柠檬酸调节

Figure 2 Variation of the total, viable and culturable count of *S. enterica* serovar Enteritidis under oxidative stresses. A: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 at 53 °C; B: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 and 0.2 mmol/L Fe^{2+} at 53 °C; C: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 and pH 4.0 at 53 °C; pH were adjusted with 0.1 mol/L citric acid.

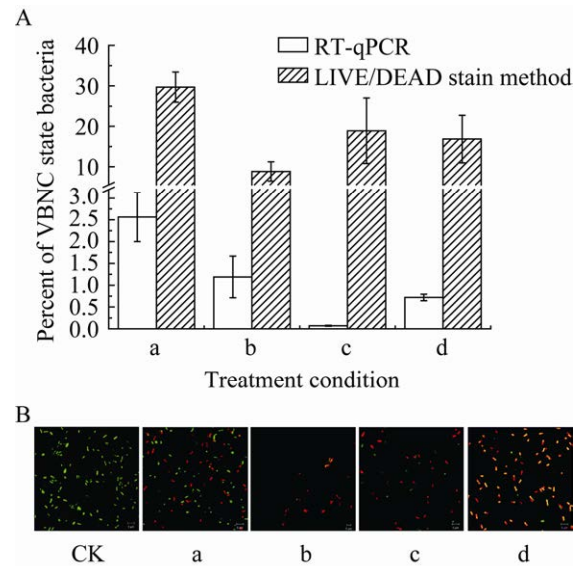


图 3 氧化压力下 VBNC 态肠炎沙门氏菌占比 A: VBNC 态沙门氏菌占比(分别采用 RT-qPCR 和荧光染色镜检测活菌)。B: LIVE/DEAD 荧光染色活菌镜检。CK: 未处理组; a: 53 °C 下 0.2 mmol/L H_2O_2 处理 1.5 h; b: 53 °C 下 0.2 mmol/L H_2O_2 +0.2 mmol/L Fe^{2+} 处理 1.5 h; c: 53 °C 下高酸(pH 4.0)处理 1.5 h; d: 53 °C 下 0.2 mmol/L H_2O_2 +高酸(pH 4.0)处理 1.5 h; 其中用 0.1 mol/L 柠檬酸调节 pH

Figure 3 Percentage of *S. enterica* serovar Enteritidis in VBNC state under oxidative stress. A: Percentage of *S. enterica* serovar Enteritidis in VBNC state under oxidative stress (Detected by RT-qPCR and fluorescent staining). B: LIVE/DEAD fluorescent staining and microscopy. CK: Without treatment; a: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 at 53 °C for 1.5 h; b: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 and 0.2 mmol/L Fe^{2+} at 53 °C for 1.5 h; c: Treated with pH 4.0 at 53 °C for 1.5 h; d: Treated with 0.2 mmol/L H_2O_2 and pH 4.0 at 53 °C for 1.5 h; pH adjusted by 0.1 mol/L citric acid.

3 讨论与结论

常规食品致病菌检测主要是通过平板计数法, 然而食品加工过程中不同程度的应力可能会使细菌受到亚致死损伤, 细菌功能和结构发生了可逆变化^[25]。部分亚致死受损细菌, 因受

损程度较小, 在营养丰富的培养基上能复原, 但严重受损的细菌包括 VBNC 态细菌, 需要更严格的复苏条件^[8]。为了更有效地定量 VBNC 态细菌, 可培养菌数的检测是关键点。因此首先探究培养基成分对菌落形成能力的影响, 使用不同培养基检测氧化压力下沙门氏菌的可培养菌数, 检测结果发现 BPY 和 LB 这两类营养丰富的培养基检测结果显著高于 SS 选择性培养基($P<0.05$)。这与 Wuytack 等的研究结果一致, 亚致死性鼠伤寒沙门氏菌能在营养丰富的胰蛋白大豆肉汤琼脂中生长, 但在紫罗兰色胆盐葡萄糖琼脂中无法检出^[25]。这可能与部分处于轻度损伤的细菌能在营养丰富的环境下发生修复有关, 与未受损伤的细菌相比, 受损伤的细菌可能会表现出迟缓期延长的现象, 以修复损伤并合成生长所需的蛋白质和核酸, 但选择性培养基中一般会含有部分抑菌物质, 例如牛胆盐, 不利于细菌修复^[26-27]。有研究表明受到亚致死性热损伤的沙门氏菌不能在含胆盐类物质的培养基上生长^[28]。胆盐作为一种抑菌物质, 会破坏细胞膜、使蛋白质变性并导致 DNA 氧化损伤^[29]。因此在营养丰富的非选择性培养基上, 亚致死细菌可能会发生修复, 但非选择性培养基中的胆盐可能会抑制亚致死细菌的修复能力, 食品体系的致病菌若用选择性培养基检测可能会出现漏检的现象。为了更准确地定量 VBNC 态细菌, 根据其不可培养的特性, 应该更有效地检出可培养细菌, 所以合适培养基的选择十分重要。

为了研究以 H_2O_2 为代表的氧化压力对 VBNC 态沙门氏菌形成的影响, 通过在 $53\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, H_2O_2 单独作用、添加 Fe^{2+} 和高酸(pH 4.0) 处理肠炎沙门氏菌。 H_2O_2 和羟基自由基($\cdot OH$) 是代表性的活性氧, 尤其是 $\cdot OH$ 具有高氧化性。 H_2O_2 和 Fe^{2+} 能发生芬顿反应形成 $\cdot OH$, 化学反

应系数比为 1:1^[30]。因此添加同浓度的 Fe^{2+} 以形成 $\cdot OH$ 研究其对 VBNC 态沙门氏菌形成的影响。

研究发现在氧化压力下, $H_2O_2+53\text{ }^\circ\text{C}$ 处理 1.5 h, 肠炎沙门氏菌形成 VBNC 态细菌数量和 VBNC 态细菌占比显著高于添加 Fe^{2+} 和高酸(pH 4.0)处理组($P<0.05$)。与聂新颖等的研究一致, 鼠伤寒沙门氏菌在氧化压力作用下会进入 VBNC 态^[21]。氧化压力是由活性氧过量或因为细菌自身抗氧化能力降低, 超过细菌调节能力, 导致氧化还原失衡引起, 会导致细菌 DNA、脂质和蛋白质损伤, 甚至死亡^[31-33]。 H_2O_2 是一种具有高渗透性的活性氧, 具有强氧化性, 能破坏细胞成分, 特别是细胞膜, 对多种细菌、酵母和霉菌等都有杀菌作用^[34], 然而在氧化压力下, 会有部分细菌进入 VBNC 态。

在 $53\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, $H_2O_2+Fe^{2+}$ 处理 1.5 h 后, 活菌数和总菌数显著低于 H_2O_2 处理组($P<0.05$), 并且总菌数下降了 1-2 个数量级。Zhang 等研究表明, 高铁酸盐可诱导大肠杆菌进入 VBNC 状态, 但是随着处理时间的延长, 高水平的高铁酸盐可以杀死 VBNC 态细菌, 并造成严重的膜损伤^[35]。 $\cdot OH$ 具有强氧化性, 几乎能与胞内所有分子反应, 损伤蛋白质和脂质, 并造成 DNA 链断裂^[36-37]。总菌数的检测基于提取细菌 DNA 进行 qPCR, 细菌总菌数的下降可能是由于芬顿反应破坏了细菌的 DNA。

在 $53\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, H_2O_2 和 $H_2O_2+pH\ 4.0$ (pH 由 0.1 mol/L 柠檬酸调节)处理 1.5 h 均无可培养菌存在, 但酸性条件处理后 VBNC 态细菌占比显著低于 H_2O_2 处理($P<0.05$)。Kang 等表示柠檬酸和热处理协同作用会导致 SOD 酶活性降低, 并且产生活性氧使细胞膜受损, 最终导致细胞失活, 但也会有部分亚致死细菌存活^[38]。有研究表明, 寡营养条件下, 添加 0.7%或 1.0%乙酸低温存储 3 d 后, 肠炎沙门氏菌无法进入 VBNC

态^[39]。因此在 53 °C 条件下, H₂O₂ 与仅高酸处理诱导相比更容易导致细菌进入 VBNC 态。53 °C 处理 1.5 h 后, H₂O₂+pH 4.0 总菌数显著低于 H₂O₂ 处理组($P<0.05$), 表明酸性条件破坏了细菌 DNA 结构。Wu 等研究表明酸处理会导致细菌 DNA 和 RNA 结构的变性^[40]。

实验发现附加条件的增加例如酸性环境及 Fe²⁺作用, 会使杀菌效果增加, 这与多因素组合能提供更好的杀菌效果有关。因一种因素使细菌亚致死损伤后, 会对其他因子更为敏感^[8]。然而氧化压力的诱导方式均使细菌部分进入 VBNC 态, 这表明 VBNC 态的形成与活性氧施加的氧化压力有关。因此在对食品安全的监管过程中, 需要重视对 VBNC 态细菌的防控。

目前对于 VBNC 态细菌的研究对象多为混合体系, 包括 VBNC 态、可培养菌或死菌、难以分离或诱导形成纯 VBNC 态群体, 这对 VBNC 态细菌的生理特征、形成机制及复苏机制造成了干扰, 因此对 VBNC 态细菌的准确定量十分重要。根据 VBNC 态细菌的定义, 理论上可以检测 VBNC 态细菌复苏后的可培养菌数来确定 VBNC 态细菌数量, 但是由于 VBNC 态细菌复苏不仅与菌株有关, 还与诱导条件相关, 难以确定能完全复苏样品中 VBNC 态细菌的条件。目前主要的 VBNC 态细菌定量检测有直接计数法、荧光染色法及分子生物学 RT-qPCR 法和叠氮氯化丙锭(propidium monoazide chlorine, PMA)-qPCR 法^[9]。直接计数法是根据 VBNC 态细菌在抗生素作用下会伸长细胞, 再借助显微镜观察计数; 但不同细菌检测中能获得最佳细胞伸长率所需的抗生素浓度不同, 且不同细菌孵育时间不同^[41]。荧光氧化还原探针 5-氨基-2,3-二甲苯基四氮唑常用于检测 VBNC 态细菌, 其原理基于氧化还原探针被电子传递系统还原形成红色的荧光沉淀物; 但由于

VBNC 态细菌氧化代谢活性是否降低尚不清楚, 该方法存在争议且该探针具有毒性, 可能会导致对活菌的低估^[42]。RT-qPCR 是近年来一种普遍用于检测活菌的方法, 其原理基于 mRNA 半衰期短, 死菌 mRNA 降解后则仅能检测到活菌的 mRNA, 可有效区别活菌和死菌; 但该法的缺点是 mRNA 易降解, 要求实验操作熟练、迅速且需在冰上进行^[43]。PMA-qPCR 检测 VBNC 态细菌是基于活菌完整的细胞膜, PMA 通过渗透作用进入膜受损的细胞, 其具有光敏性的叠氮基团在卤素灯照射下激活分解产生具有高活性的氮烯中间体, 后者通过共价氮碳键交联沉淀 DNA, 并在 DNA 提取过程中被去除, 从而确保抑制死菌 DNA 的扩增仅检测到活菌, 但 PMA 作用效果受反应浓度、暗处孵育时间及曝光时间的影响, 对不同微生物作用存在差异^[44]。

综上, 部分亚致死细菌能在无选择性的营养琼脂上修复损伤, SS 选择性培养基中的胆盐限制了亚致死菌的修复, 造成致病菌漏检, VBNC 态检测应注意选择合适的营养琼脂检测可培养菌数; 常见食源性致病菌在氧化压力下会进入 VBNC 状态, 与酸性环境或添加 Fe²⁺相比, 53 °C H₂O₂ 处理导致肠炎沙门氏菌更多进入 VBNC 态而存活。因此在食品加工过程中应注意致病菌的防控, 需要重视杀菌措施中氧化压力导致的 VBNC 态细菌的形成, 但目前缺乏迅速、精准、直接的检测方法, 而且对细菌 VBNC 态形成的机制了解有限, 需要更深层次的研究并开发快速检测方法。

REFERENCES

- [1] Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(5): 1121-1138

- [2] Schottroff F, Fröhling A, Zunabovic-Pichler M, Krottenthaler A, Schlüter O, Jäger H. Sublethal injury and viable but non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2773
- [3] Pinto D, Santos MA, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 41(1): 61-76
- [4] Nowakowska J, Oliver JD. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(1): 213-222
- [5] Sun FR, Chen JX, Zhong LH, Zhang XH, Wang R, Guo QR, Dong Y. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(1): 37-44
- [6] 於颖. PMA-qPCR 定量检测畜禽肉类中食源性致病菌活菌的研究[D]. 上海: 东华大学硕士学位论文, 2015
Yu Y. Development of a quantitative method to detect viable *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* by PMA-qPCR in livestock and poultry meat[D]. Shanghai: Master's Thesis of Donghua University, 2015 (in Chinese)
- [7] 孙玉梅. 沙门氏菌简述[J]. 兽医导刊, 2015(14): 123
Sun YM. Brief introduction of *Salmonella*[J]. *Veterinary Orientation*, 2015(14): 123 (in Chinese)
- [8] Bibek R, Arun B. 基础食品微生物学[M]. 江汉湖, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 2014: 85, 265, 407
Bibek R, Arun B. *Fundamental Food Microbiology*[M]. Jiang HH, etc. trans. Beijing: China Light Industry Press, 2014: 85, 265, 407 (in Chinese)
- [9] 李欣, 俞佳莉, 乔雪飞, 吴佳瑾, 安娜, 夏瑜洁, 吴健灏. 沙门氏菌在食品与食源性疾病中分布及病原特征分析[J]. *实用预防医学*, 2020, 27(7): 801-806
Li X, Yu JL, Qiao XF, Wu JJ, An N, Xia YJ, Wu JH. Distribution and pathogenic characteristics of *Salmonella* in food and foodborne diseases[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2020, 27(7): 801-806 (in Chinese)
- [10] 蔡秀英, 聂秀敏, 杨守丽. 一起肠炎沙门氏菌引起的食物中毒[J]. *中华卫生监督与健康*, 2005, 11(4): 46-47
Cai XY, Nie XM, Yang SL. A case of food poisoning caused by *Salmonella enterica*[J]. *Chinese Journal of Sanitary Supervision and Health*, 2005, 11(4): 46-47 (in Chinese)
- [11] Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(20): 1-15
- [12] 邸聪聪, 胡平, 胡章立, 陈辉蓉. 细菌活的非可培养(VBNC)状态及其机理研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(6): 1124-1131
Di CC, Hu P, Hu ZL, Chen HR. Research progress of viable but non-culturable state of aquatic bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(6): 1124-1131 (in Chinese)
- [13] Wang HW, Chung CH, Ma TY, Wong HC. Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(12): 3734-3743
- [14] Zhang LN, Jiang LF, Nie XY, Liao HM. Factors affecting the occurrence of viable but non-culturable state in *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* during thermosonication and prevent it with sodium pyruvate[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 56(5): 2244-2254
- [15] Gage L, Nixon B, Bodine K. Impact of food disinfectants on formation of VBNC cells in *Salmonella*[J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(Suppl. A): 258
- [16] Noor R, Murata M, Yamada M. Oxidative stress as a trigger for growth phase-specific sigmaE-dependent cell lysis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17(4): 177-187
- [17] Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, Riccardi G, Boon N, Nelis HJ, Mahenthiralingam E, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): 1-12
- [18] Robben C, Witte AK, Schoder D, Stessl B, Rossmann P, Mester P. A fast and easy ATP-based approach enables MIC testing for non-resuscitating VBNC pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1365
- [19] Hong S, Rovira A, Davies P, Ahlstrom C, Muellner P, Rendahl A, Olsen K, Bender JB, Wells S, Perez A, et al. Serotypes and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* recovered from clinical samples from cattle and swine in Minnesota, 2006 to 2015[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): 1-20
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789—2016 食品安全国家标准食品微生物学检验[S]. 北京: 中国质检出版社, 2016
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 4789—2016 National

- food safety standard food microbiology examination[S]. Beijing: China Quality and Standards publishing & Media Co., Ltd, 2016 (in Chinese)
- [21] 聂新颖, 廖红梅, 刘元法. 过氧化氢处理中鼠伤寒沙门氏菌 VBNC 态形成及其机制解析[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 67-73
Nie XY, Liao HM, Liu YF. Exploration of the formation and mechanism of VBNC state of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during hydrogen peroxide disinfection[J]. Food & Machinery, 2019, 35(7): 67-73 (in Chinese)
- [22] Zhao F, Bi XF, Hao YL, Liao XJ. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure CO₂ and its characteristics[J]. PLoS One, 2013, 8(4): 1-9
- [23] Liao HM, Jiang LF, Zhang RR. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella* Typhimurium by thermosonication and factors affecting resuscitation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(2): 1-11
- [24] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R III, Gyles CL III. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(4): 271-279
- [25] Wuytack EY, Phuong LDT, Aertsen A, Reyns KMF, Marquenie D, De Ketelaere B, Masschalck B, Van Opstal I, Diels AMJ, Michiels CW. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments[J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(1): 31-37
- [26] 王永志. 沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌共增和同时检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2013
Wang YZ. Study on the selective enrichment and concurrent detection of *Salmonella enteritidis*, *Shigellosis bogdii* and *Staphylococcus aureus*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2013 (in Chinese)
- [27] Shintani H. Importance of considering injured microorganisms in sterilization validation[J]. Biocontrol Science, 2006, 11(3): 91-106
- [28] Kobayashi H, Miyamoto T, Hashimoto Y, Kiriki M, Motomatsu AI, Honjoh KI, Iio M. Identification of factors involved in recovery of heat-injured *Salmonella* Enteritidis[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(5): 932-941
- [29] Urdaneta V, Casadesús J. Adaptation of *Salmonella enterica* to bile: essential role of AcrAB-mediated efflux[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(4): 1405-1418
- [30] 汪昆平, 杨林, 汪春艳, 赵越, 郭劲松. Fenton 氧化体系·OH、ORP、H₂O₂和Fe²⁺变化特征[J]. 水处理技术, 2011, 37(12): 36-41
Wang KP, Yang L, Wang CY, Zhao Y, Guo JS. ·OH, ORP, H₂O₂ and Fe²⁺ variation characteristics of Fenton's oxidation system[J]. Technology of Water Treatment, 2011, 37(12): 36-41 (in Chinese)
- [31] 王建波. 谷氨酸棒状杆菌中 Ohr 抗有机氧化物胁迫的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
Wang JB. Ohr protects *Corynebacterium glutamicum* against organic hydroperoxide induced oxidative stress[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2015 (in Chinese)
- [32] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84
- [33] 张玲娜, 董丽, 廖红梅. 细菌响应过量活性氧的存活策略及相关研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1249-1259
Zhang LN, Dong L, Liao HM. Survival strategies of bacteria in response to excessive reactive oxygen species: a review[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1249-1259 (in Chinese)
- [34] Raffellini S, Schenk M, Guerrero S, Alzamora SM. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations[J]. Food Control, 2011, 22(6): 920-932
- [35] Zhang YT, Zhang ML, Ye CS, Feng MB, Wan K, Lin WF, Sharma VK, Yu X. Mechanistic insight of simultaneous removal of tetracycline and its related antibiotic resistance bacteria and genes by ferrate(VI)[J]. Science of the Total Environment, 2021, 786: 1-11
- [36] Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 97: 55-74
- [37] Singh V, Fedeles BI, Li DY, Delaney JC, Kozekov ID, Kozekova A, Marnett LJ, Rizzo CJ, Essigmann JM. Mechanism of repair of acrolein- and malondialdehyde-derived exocyclic guanine adducts by the α -ketoglutarate/Fe(II) dioxygenase AlkB[J]. Chemical Research in Toxicology, 2014, 27(9): 1619-1631
- [38] Kang JW, Lee HY, Kang DH. Synergistic bactericidal

- effect of hot water with citric acid against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formed on stainless steel[J]. *Food Microbiology*, 2021, 95: 1-8
- [39] Li YM, Huang TY, Bai CY, Fu J, Chen L, Liang Y, Wang K, Liu J, Gong XJ, Liu JY. Reduction, prevention, and control of *Salmonella enterica* viable but non-culturable cells in flour food[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1-11
- [40] Wu D, Rasco B, Vixie KR, Ünlü G, Swanson B, Liu YY. Using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy to detect sublethally- or lethally-stressed *Listeria innocua* treated with acetic acid[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2013, 54(2): 456-462
- [41] Besnard V, Federighi M, Cappelier JM. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(1): 77-81
- [42] Créach V, Baudoux AC, Bertru G, Rouzic BL. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(1): 19-28
- [43] Jiang Q, Fu B, Chen Y, Wang Y, Liu H. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge[J]. *Environmental biotechnology*, 2013, 97(13): 6043-6050
- [44] Vondrakova L, Turonova H, Scholtz V, Pazlarova J, Demnerova K. Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy[J]. *Food Control*, 2018, 85: 23-28