

# 德氏乳杆菌保加利亚亚种ND02活的非可培养态诱导和复苏

王亚利, 包秋华\*, 王俊国, 张和平

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘 要:** 为有效提高乳酸菌发酵剂菌种在生产和应用过程中的活性, 对一株具有优良发酵特性的德氏乳杆菌保加利亚亚种ND02 (保加利亚乳杆菌ND02) 进行了活的非可培养 (viable but non-culturable, VBNC) 态诱导和复苏的初步研究。将活化的保加利亚乳杆菌ND02在不同复合条件下进行诱导, 同时采用平板计数法和荧光显微镜两种计数方法对其进行检测, 将诱导成功的样本通过改变温度及改变培养基成分进行复苏实验。结果表明: 保加利亚乳杆菌ND02在液体MRS中4℃诱导190 d便可以进入VBNC态, 并发现10%脱脂乳+0.1%酵母粉是有效的复苏方法。为保加利亚乳杆菌ND02在应用过程中避免VBNC态的产生及活性的提高提供一定的参考依据。

**关键词:** 保加利亚乳杆菌ND02; VBNC态; 诱导; 复苏

Induction and Resuscitation of Viable but Non-culturable State in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02

WANG Yali, BAO Qiuhua\*, WANG Junguo, ZHANG Heping

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** To improve the activity of lactic acid bacterial starter cultures during their production and application, we investigated the induction and resuscitation of viable but non-culturable (VBNC) state in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02 (*Lactobacillus bulgaricus* ND02), which had excellent fermentation characteristics. *Lactobacillus bulgaricus* ND02 was cultured under different conditions to induce the VBNC state. The plate count method and fluorescence microscope were used jointly to examine the VBNC state, and then the VBNC cells were resuscitated by varying temperature and medium components. The results showed that *Lactobacillus bulgaricus* ND02 in MRS at 4℃ could enter the VBNC state after 190 days. It was also found that skim milk (10%) plus yeast powder (0.1%) was effective for resuscitation. This study would provide a reference basis to prevent *Lactobacillus bulgaricus* ND02 from entering the VBNC state and thus to improve its activity for future work.

**Key words:** *Lactobacillus bulgaricus* ND02; viable but nonculturable (VBNC); induction; resuscitation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706011

中图分类号: TS252.54

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0068-06

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706011. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Yali, BAO Qiuhua, WANG Junguo, et al. Induction and resuscitation of viable but non-culturable state in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02[J]. Food Science, 2017, 38(6): 68-73. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706011. <http://www.spkx.net.cn>

1982年徐怀恕等<sup>[1]</sup>首次在4℃的人工海水中发现了活的但不可培养的霍乱弧菌和大肠杆菌, 并提出了细菌

“活的非可培养态 (viable but nonculturable, VBNC)” 的概念。细菌的VBNC态是指细菌在不良的外界条件下

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301516); 内蒙古博士科研启动基金项目 (BJ2013D-18); 内蒙古自然科学基金项目 (2015MS0306)

作者简介: 王亚利 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品微生物。E-mail: yaliaihg@163.com

\*通信作者: 包秋华 (1973—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为乳品微生物。E-mail: nmgbqh@126.com

会进入异常的生理状态,在此状态的细菌虽然依旧保持代谢活性,但在常规培养基上不能生长繁殖,当给予适宜的培养条件时则能复苏并恢复至可培养状态。许多环境压力或营养条件的改变,如温度、营养条件、pH值、渗透压、湿度等能使细菌进入VBNC态,而光照及紫外线强度、溶氧量、添加重金属的消毒剂等也能成功诱导出细菌的VBNC态<sup>[2-3]</sup>。目前细菌VBNC态的报道主要集中在医学、疫病流行病学及公共卫生学等方面<sup>[4]</sup>,截止到2016年3月,已发现了42个属的87种细菌存在VBNC态<sup>[5]</sup>。其中大部分为革兰氏阴性致病菌,而对革兰氏阳性菌的研究并不多见。

近年来,部分益生乳酸菌也被证明存在此状态<sup>[6-7]</sup>。益生乳酸菌是生产发酵乳制品、饲料等必不可少的菌种,其中保加利亚乳杆菌是生产酸乳生产中常用的发酵剂菌种之一<sup>[6]</sup>。然而,在发酵剂生产、贮存及应用中,保加利亚乳杆菌常常经历低温及真空冷冻干燥等过程,这些不但能影响保加利亚乳杆菌的活性,还会影响到其发酵制品的某些性能,导致产品的质量不稳定<sup>[9-10]</sup>。

本实验对一株具有优良发酵特性的酸乳发酵菌株——保加利亚乳杆菌ND02进行VBNC态诱导和复苏的初步研究。作为一株工业生产菌株,保加利亚乳杆菌ND02在2012年已经完成了全基因组测序(NC\_014727)<sup>[11]</sup>。通过多种条件的诱导,同时结合细菌VBNC态的检测方法,初步探究其在不良外界条件下是否存在VBNC态,并对诱导成功的VBNC态进行复苏实验,为提高保加利亚乳杆菌ND02的活性提供实验依据。旨在在乳酸菌发酵剂的生产和应用过程中,在降低成本的同时,也找到提高发酵剂的活性的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、材料与试剂

保加利亚乳杆菌ND02由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。保加利亚乳杆菌ND02的活化参照包维臣<sup>[12]</sup>的方法,在MRS液体培养基中,38℃恒温培养静置培养至对数生长期后待用。

MRS液体培养基、MRS琼脂培养基 英国Oxoid公司; LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit (L7012) 美国Molecular Probes公司; Tween20、Tween80、VB<sub>2</sub> 北京酷来博科技有限公司; 脱脂乳粉、全脂乳粉 恒天然有限公司。

### 1.2 仪器与设备

5810R高速低温离心机 德国Eppendorf公司; DM4000B正置荧光显微镜 德国Leica公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态诱导

表1 诱导保加利亚乳杆菌ND02进入VBNC态的方案  
Table 1 Experimental conditions to induce VBNC state in *Lactobacillus bulgaricus* ND02

方案	营养条件	温度/℃
1	灭菌生理盐水	4
2	MRS液体培养基	4
3	灭菌蒸馏水	常温
4	灭菌蒸馏水	4

本实验根据对保加利亚乳杆菌ND02生长有影响的因素,设计出相应的诱导方案(表1)。将活化的保加利亚乳杆菌ND02菌悬液1 000×g离心10 min,用灭菌生理盐水洗涤两次后得菌泥,用适量灭菌生理盐水重悬后接入到200 mL诱导液体中,并调节菌液的终浓度约10<sup>7</sup> CFU/mL。诱导过程中定期通过平板计数法和荧光显微镜检测法对其活性细胞进行检测,当平板上无保加利亚乳杆菌ND02的特征菌落出现且荧光显微镜下仍有绿色荧光的活性细胞存在时,则判断此时的保加利亚乳杆菌ND02完全进入了VBNC态。

#### 1.3.2 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态检测

保加利亚乳杆菌ND02可培养菌数的检测采用倾注平板计数法。当MRS琼脂平板上无保加利亚乳杆菌ND02特征菌落生长时,连续检测1~3次若仍无菌落生长,则认为此时保加利亚乳杆菌ND02可培养活菌数为零。然后采用LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit与荧光显微镜结合的方法进行VBNC态的验证<sup>[13-14]</sup>。取不同时期的诱导样品经试剂盒中两种染料(SYTO-9和碘化丙啶)染色后,在荧光显微镜下观察。当保加利亚乳杆菌ND02可培养活菌数为零,而显微镜视野中仍存在绿色荧光细胞时,则认为保加利亚乳杆菌ND02在此诱导条件下完全进入VBNC态;若视野中均为红色荧光细胞,而无绿色荧光细胞时,保加利亚乳杆菌ND02就直接进入了死亡态<sup>[15]</sup>。

#### 1.3.3 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态复苏

表2 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态复苏方法  
Table 2 Experimental conditions for resuscitation of VBNC state in *Lactobacillus bulgaricus* ND02

复苏方案	编号	方法
改变温度	A	瞬间升温法(45℃, 15 s)
	B	直接升温法(37℃, 24 h)
改变培养基成分	C	10%脱脂乳+0.1%酵母粉
	D	新鲜液体MRS+Tween20(6%)
	E	新鲜液体MRS+Tween80(7%)
	F	新鲜液体MRS+维生素(0.1%)

通过对金磊<sup>[16]</sup>、魏忠彬<sup>[17]</sup>等复苏VBNC态乳酸菌方法的借鉴,本实验从改变温度及改变培养基成分两种方案对成功诱导的保加利亚乳杆菌ND02 VBNC态进行复苏实验。设计的复苏方法如表2所示,复苏结果的确定

同样采用平板计数法和荧光显微镜检测法。当复苏后平板上有保加利亚乳杆菌ND02特征菌落出现且荧光显微镜下有大量绿色荧光的活性细胞存在时,则判断复苏成功。同时对影响保加利亚乳杆菌ND02复苏的因素做了初步的探究。

### 1.3.4 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态复苏后发酵活性测定

将正常态及VBNC态复苏后的保加利亚乳杆菌ND02以添加量 $5 \times 10^7$  CFU/mL分别接入全脂乳中<sup>[18]</sup>,放入42℃培养箱中恒温发酵至pH 4.5终止发酵,取乳样测定不同时间点的滴定酸度和pH值。

## 2 结果与分析

### 2.1 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态诱导及形态观察

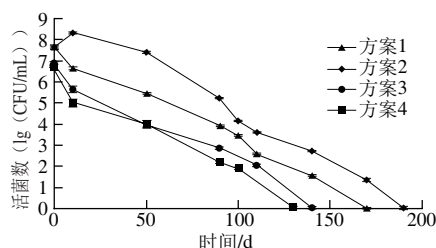
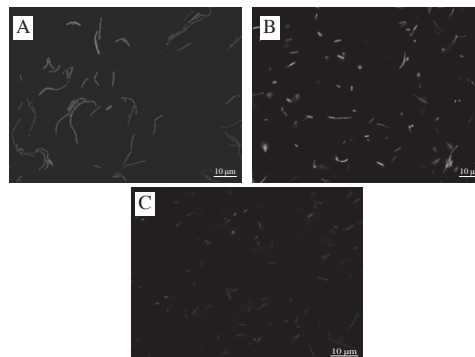


图1 保加利亚乳杆菌ND02的诱导曲线  
Fig. 1 Viable culturable counts of *Lactobacillus bulgaricus* ND02 under VBNC induction

保加利亚乳杆菌ND02在表1设计的诱导方案下进行平板计数法检测,结果如图1所示。保加利亚乳杆菌ND02在整个诱导过程中,通过平板计数法检测到其可培养活菌数在不断下降,4种诱导方案分别在第170、190、140、130天使保加利亚乳杆菌ND02的可培养活菌数降为零。同时结合荧光显微镜检测结果,发现只有方案2诱导的保加利亚乳杆菌ND02荧光图片中存在绿色荧光细胞(图2B),而其他条件诱导的荧光图片全为红色荧光细胞(图2C),表明只有在液体MRS中4℃诱导的保加利亚乳杆菌ND02在190 d时完全进入了VBNC态。实验还做过模拟人工胃液的相关诱导,保加利亚乳杆菌ND02在30 d内也是全部进入死亡态,并没有进入VBNC态。

菌体细胞经LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit试剂盒染色后,在荧光显微镜观察下发现,正常态(图2A)的保加利亚乳杆菌ND02细胞为长杆状,整体细胞排列较分散,绿色的活菌数量明显多于红色的死菌数量;而VBNC态的保加利亚乳杆菌ND02(图2B)仍保持杆状但细胞较聚集,只是长度有所缩短,绿色的活菌数量也远远少于红色死菌的数量;图2C为保加利亚乳杆菌全部进入死亡态的荧光图片,视

野中全为呈现红色荧光的死菌细胞,形态与VBNC态细胞相似。



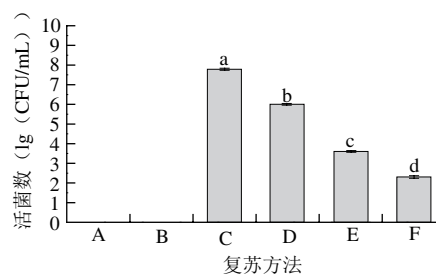
A.正常态; B.方案2诱导的VBNC态; C.其他方案诱导的死亡态。

图2 保加利亚乳杆菌ND02的荧光显微镜图片

Fig. 2 Fluorescence micrographs of *Lactobacillus bulgaricus* ND02

### 2.2 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态复苏

#### 2.2.1 复苏方法的影响



小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。A~F.对应表2编号。

图3 保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态复苏结果

Fig. 3 Comparison of resuscitation of *Lactobacillus bulgaricus* ND02 in VBNC state

对液体MRS中4℃诱导出的VBNC态保加利亚乳杆菌ND02进行了表2的一系列复苏实验,复苏结果如图3所示。10%脱脂乳+0.1%酵母粉及添加Tween20(6%)、Tween80(7%)和维生素(0.1%)的新鲜液体MRS能使VBNC态的保加利亚乳杆菌ND02复苏,且不同的复苏方法之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。添加了0.1%酵母粉的10%脱脂乳能使保加利亚乳杆菌ND02复苏后的可培养活菌数达到 $(7.78 \pm 0.03)$  (lg CFU/mL),而Tween20(6%)、Tween80(7%)和维生素(0.1%)的复苏可培养活菌数则远不及脱脂乳复苏结果;瞬间升温(45℃, 15 s)和直接升温(37℃, 24 h)两种温度改变的方法均不能使VBNC态的保加利亚乳杆菌ND02恢复到可培养态。本实验结果表明10%脱脂乳+0.1%酵母粉是复苏保加利亚乳杆菌ND02有效条件。

#### 2.2.2 进入VBNC态的时间对复苏的影响

从图4可以看出,随着保加利亚乳杆菌ND02进入VBNC态时间的延长,用10%脱脂乳+0.1%酵母粉复



苏的VBNC态可培养活菌数呈下降趋势,在进入VBNC态第3天时脱脂乳能复苏的可培养活菌数可以达到 $(7.77 \pm 0.03)$  ( $\lg$  (CFU/mL)),而在第24天降到了 $(6.80 \pm 0.05)$  ( $\lg$  (CFU/mL)),脱脂乳能复苏的可培养活菌数直至VBNC态的第50天降为零(此部分数据未给出)。表明了细菌进入VBNC态的时间会影响到VBNC态的复苏,在进入VBNC态初期脱脂乳复苏能达到较高的活菌数,长时间保持VBNC态的细菌很难被复苏,甚至不能再被复苏。

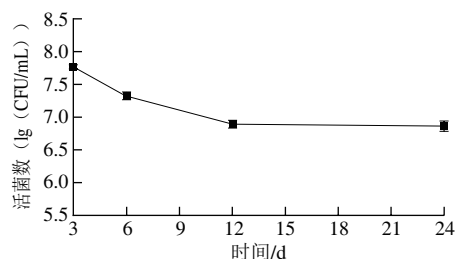


图4 VBNC态保加利亚乳杆菌ND02不同时间10%脱脂乳+0.1%酵母粉复苏结果

Fig. 4 Resuscitation with 10% skim milk plus 0.1% yeast powder in different ages of VBNC state

## 2.2.3 复苏后的保加利亚乳杆菌ND02发酵特性

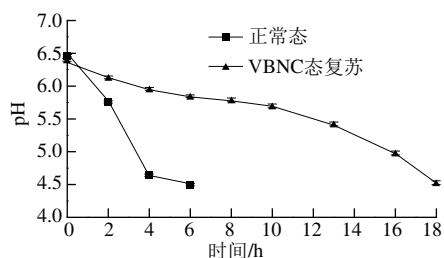


图5 正常态和VBNC态复苏保加利亚乳杆菌ND02在发酵期间pH值变化  
Fig. 5 Changes in pH value during culture of normal and resuscitated cells

图5为发酵期间正常态和VBNC态复苏的pH值变化,从发酵起点开始正常态和VBNC态复苏pH值下降明显,随着发酵时间的延长,正常态比VBNC态复苏下降的速度要快,在6 h测得的pH值降到了4.5,而VBNC态复苏在发酵的18 h才能到达发酵终点。

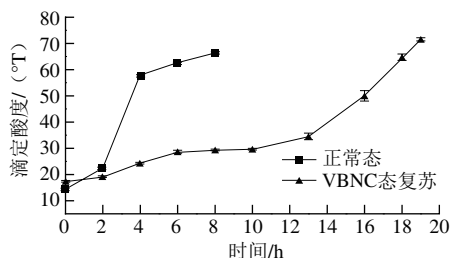


图6 正常态和VBNC态复苏保加利亚乳杆菌ND02在发酵期间滴定酸度变化

Fig. 6 Changes in titratable acidity in fermentation between normal and resuscitation cells

从图6可以看出,发酵开始时正常态和VBNC态复苏的酸度值均在20 °T以下,随着发酵时间的延长,正常态在2~4 h内酸度值快速增长,并在8 h酸度值达到 $(70.0 \pm 0.4)$  °T,而VBNC态复苏在12 h内则呈缓缓上升趋势,在此之后才快速增长,直至19 h酸度值才能达到 $(71.2 \pm 0.8)$  °T。发酵期间pH值和滴定酸度变化结果表明VBNC态复苏的保加利亚乳杆菌ND02发酵性能不及正常态。

## 3 讨论与结论

研究表明许多细菌都能进入VBNC态,而不同细菌进入VBNC态所需的时间也各有不同<sup>[19]</sup>。魏忠彬<sup>[20]</sup>在研究乳酸杆菌VBNC态时,悬浮于液体MRS (pH 2.0~3.0) 中,置于4 °C的低温条件下厌氧静止培养,3株乳酸杆菌R1、R2及R3分别第35、41、46天进入VBNC态;相比之下,本实验在研究保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态时发现,在MRS中4 °C培养190 d后保加利亚乳杆菌ND02才会完全进入VBNC态。保加利亚乳杆菌ND02比R1、R2和R3进入VBNC态所需时间更长,可能是由于保加利亚乳杆菌ND02是从本实验室菌种资源库中筛选出来的工业发酵剂菌株,对不利环境的适应性更强。

VBNC态的细菌会在生理生化方面发生一定变化,并在形态上有所体现。金磊等<sup>[16]</sup>研究发现VBNC态的植物乳杆菌不但体积会缩小,还会由原来的杆状趋于球形;许婷<sup>[21]</sup>发现进入VBNC态的双歧杆菌细胞会变细拉长,随着时间延长还会变成链杆状、球杆状、短杆状;而本实验发现,保加利亚乳杆菌ND02在VBNC态时既不会像双歧杆菌有轻微的伸长也不会像植物乳杆菌趋于球形,而是继续保持杆状,只是长度上缩短变粗。

VBNC态细胞最重要的特征就是“可复苏”,虽然目前研究结果表明只有一部分VBNC态细胞可以复苏,但并不代表其他细菌不能被复苏<sup>[22]</sup>。在复苏VBNC态细胞时,众多研究者遇到的一个难点是不能准确地区分VBNC态细胞的复苏和活细胞的再次生长,所以在VBNC态复苏的最佳时间点是样品中无正常态细胞的生长<sup>[23]</sup>。所以本实验在复苏保加利亚乳杆菌ND02的VBNC态时,是确定了平板检测可培养活菌细胞数量为零时,待保加利亚乳杆菌ND02完全进入VBNC态后才进行一系列复苏实验。通常认为消除诱导因素便可使细菌VBNC态复苏,如增加营养物质、改变环境温度、取消光照条件等。但由于菌种不同,甚至同种细菌品系的不同,复苏方法也有差异,某些复苏还很难实现<sup>[24-25]</sup>。

许多研究发现通过添加Tween80等物质改变培养基成分能使VBNC态细菌复苏<sup>[26]</sup>。添加Tween80等物质在

刺激乳酸菌生长的同时,还可以降解代谢产生的副产物,从而促进细胞恢复活性。虽然本实验也同样用添加了7% Tween80的液体MRS成功复苏了保加利亚乳杆菌ND02,但是相比本实验其他复苏条件的结果,发现添加了0.1%酵母粉+10%脱脂乳是复苏VBNC态保加利亚乳杆菌ND02的有效条件。

Pinto等<sup>[27]</sup>首次指出了VBNC态细胞具有在一定时期内保持复苏的能力,所以长时间保持VBNC态的细胞会渐渐丧失复苏的能力,直接表现为复苏的可培养细胞数量的减少。Senoh等<sup>[28]</sup>发现*Vibrio cholerae*进入VBNC态的第74~91天复苏的细胞数量会逐渐减少;Lleó等<sup>[29]</sup>也发现*Enterococcus faecalis*在VBNC态复苏过程中,复苏后的细胞数随着时间延长而呈现下降趋势;目前对乳酸菌VBNC态的报道并没有类似的发现,而本研究却在复苏保加利亚乳杆菌的VBNC态时发现,保加利亚乳杆菌ND02在VBNC态第3天比第24天复苏的可培养活菌数高,而在第50天时VBNC态不能再被10%脱脂乳+0.1%酵母粉复苏,这与Pinto<sup>[27]</sup>和Senoh<sup>[28]</sup>等观点相符。

从VBNC态复苏后的保加利亚乳杆菌ND02虽然可培养活菌数能有所提高,作为优良的乳酸菌发酵剂菌株,本实验还对其复苏后发酵活性进行了检测<sup>[30]</sup>。在发酵全脂乳过程中测定pH值和滴定酸度发现,VBNC态复苏后的保加利亚乳杆菌ND02发酵活性远不及正常态,这可能是由于VBNC态复苏后某些特定基因的表达受到抑制,所以对VBNC态保加利亚乳杆菌ND02复苏后发酵活性还需更进一步的研究。

本实验证实了乳酸菌发酵剂——保加利亚乳杆菌ND02在MRS中4℃培养190 d后能进入VBNC态,但能通过10%脱脂乳+0.1%酵母粉及添加了Tween20(6%)、Tween80(7%)和维生素(0.1%)的液体MRS复苏,同时发现10%脱脂乳+0.1%酵母粉是复苏保加利亚乳杆菌ND02的有效条件,不但证实了VBNC态初期比长时间保持VBNC态更容易被复苏,也发现保加利亚乳杆菌ND02 VBNC态复苏的发酵活性不及正常态。本实验只是初步探究了保加利亚乳杆菌ND02的诱导条件和复苏方法,对于保加利亚乳杆菌ND02进入VBNC态的机理、刺激其复苏的因素及提高发酵活力的方法还有待进一步的研究,可以为乳酸菌发酵剂生产和应用过程中改善活性提供一定的参考依据。

#### 参考文献:

- [1] XU H S, ROBERTS N, SINGLETON F L, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313-323. DOI:10.1007/BF02010671.
- [2] TREVORS J T. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(2): 266-273. DOI:10.1016/j.mimet.2011.04.018.
- [3] WONG H C, WANG P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(2): 359-366. DOI:10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x.
- [4] LI L, MENDIS N, TRIGUI H, et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens[J]. *Bacterial Pathogens in the Non-Clinical Environment*, 2015, 258: 72. DOI:10.3389/fmicb.2014.00258.
- [5] 蒋娜. 番茄溃疡病菌VBNC状态的诱导、复苏及机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [6] GANESAN B, STUART M R, WEIMER B C, et al. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2498-2512. DOI:10.1128/AEM.01832-06.
- [7] LAHTINEN S J, AHOKOSKI H, REINIKAINEN J P, et al. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(6): 693-698. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02374.
- [8] 刘娜. 德氏乳杆菌保加利亚种优良菌株的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [9] 姚国强, 高鹏飞. 乳酸菌发酵剂在生产存储及使用中的活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(21): 131-136. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.21.037.
- [10] SHAO Y Y, GAO S R, GUO H L, et al. Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(3): 1270-1280. DOI:10.3168/jds.2013-7536.
- [11] SUN Z H, CHEN X, WANG J C, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND02[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(13): 3426-3427. DOI:10.1128/JB.05004-11.
- [12] 包维臣. 德氏乳杆菌保加利亚种ND02高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [13] CHEN H R, FU L X, LUO L X, 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. DOI:10.1007/s00248-011-9928-2.
- [14] 李影, 段锐. “活的非可培养状态”细菌荧光显微镜检测技术[J]. *中国动物检疫*, 2010(2): 43-45. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2010.02.023.
- [15] STIEFEL P, SCHMIDT-EMRICH S, MANIURA-WEBER K, et al. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 36. DOI:10.1186/s12866-015-0376-x.
- [16] 金磊, 王丽, 钟青萍. 植物乳杆菌活的非可培养状态的初步研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(16): 187-190. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.16.007.
- [17] 魏忠彬, 李影, 钱爱东, 等. VBNC状态乳酸杆菌的复苏[J]. *中国饲料*, 2006(18): 27-28. DOI:10.3969/j.issn.1004-3314.
- [18] 扎木苏, 秦艳婷, 任艳, 等. 分离自蒙古国发酵乳制品的保加利亚乳杆菌产酸特性及发酵乳的酸组分[J]. *乳业科学与技术*, 2014, 37(1): 6-10. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2014.01.005.

- [19] DU M, CHEN J X, ZHANG X H, et al. Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283[J]. Archives of Microbiology, 2007, 188(3): 283-288. DOI:10.1007/s00203-007-0246-5.
- [20] 魏忠彬. 乳酸杆菌活的非可培养状态的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007. DOI:10.7666/d.y1199016.
- [21] 许婷. 双歧杆菌活的非可培养状态的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008. DOI:10.7666/d.y1511884.
- [22] 田聪, 余以刚, 肖性龙, 等. 活的非可培养状态大肠杆菌 O157:H7 的复苏研究[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 218-221. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201311047.
- [23] CHAVEERACH P, TER HUURNE A, LIPMAN L J A, et al. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 711-714.
- [24] VATTAKAVEN T, BOND P, BRADLEY G, et al. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10): 6508-6513. DOI:10.1128/AEM.00798-06.
- [25] 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. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.03.012.
- [26] 王亚利, 包秋华, 王俊国, 等. 乳酸菌活的非可培养态的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(3): 41-45.
- [27] 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]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6): 1601-1611. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05016.
- [28] SENOH M, GHOSH BANERJEE J, RAMAMURTHY T, et al. Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by coculture with eukaryotic cells[J]. Microbiology and Immunology, 2010, 54(9): 502-507. DOI:10.1111/j.1348-0421.
- [29] LLEO M M, BONATO B, TAFI M C, et al. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(6): 1095-1102.
- [30] 杨一冲, 蔡丹. 保加利亚乳杆菌发酵特性的研究[J]. 吉林农业科学, 2012, 37(5): 71-74.