VBNC 状态啤酒易感乳杆菌的诱导及复苏

邓阳[1,2]，刘君彦[1]，房慧婧[2]，陈江[2]，李惠萍[2]，李琳[1]，涂京霞[2]，刘静[2]，冯智坚[2]
（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510641）
（2.广州珠江啤酒集团有限公司技术中心，广东广州 510308）

摘要：本文研究了一种典型的难培养啤酒易感乳杆菌-耐酸乳杆菌（*Lactobacillus acetotolerans*）形成“活的但不可培养”（VBNC）的诱导方式，以及从此状态复苏至可培养状态的方法。将培养至对数期的耐酸乳杆菌 2011-11 菌株采用啤酒内连续传代驯化法还原其在啤酒酿造过程中的实际生存状况，并通过荧光染料染色对诱导后的耐酸乳杆菌细胞进行活性检测；利用逐步升温和添加促进物法对 VBNC 菌进行复苏试验。当连续传代至第 19 代，MRS 检测平板上可培养菌数降为零，此时菌体多数仍存在呈现绿色荧光的活细胞，表明耐酸乳杆菌已形成 VBNC 状态，且仍具有污染啤酒能力；将刚进入 VBNC 状态的耐酸乳杆菌菌悬液经过氧化氢酶处理后涂布于 MRS 平板，于 26 ℃厌氧培养，可使耐酸乳杆菌复苏至可培养状态。本研究证实，可通过啤酒内连续传代诱导获得 VBNC 状态耐酸乳杆菌，而添加过氧化氢酶改良常规 MRS 平板是一种有效的复苏方法。

关键词：耐酸乳杆菌；活的但不可培养；诱导；过氧化氢酶；复苏
文章篇号：1673-9078(2014)4-154-159

Induction and Resuscitation of VBNC State Beer-spoilage *Lactobacilli*

DENG Yang[1,2], LIU Jun-yan[1], FANG Hui-jing[2], CHEN Jiang[2], LI Hui-ping[2], LI Lin[1], TU Jing-xia[2], LIU Jing[2], FENG Zhi-jian[2]
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Technical Center, Zhujiang brewery co., Ltd, Guangzhou 510308, China)

Abstract: In this study, the induction and resuscitation of viable but non-culturable state (VBNC) of a typical hard-to-culture beer-spoilage *Lactobacillus acetotolerans* were investigated. *Lb. acetotolerans* strain 2011-11 in the exponential growth phase was repeatedly subcultured in degassed beer to reappear the survival situation in the actual beer brewing process, and the culturability on MRS agar media was examined. The viable cells were monitored based on the DNA-binding fluorescent dye (SYTO-9 and PI) plus the fluorescent microscopy assay and flow cytometry technology. Moreover, the beer-spoilage ability of VBNC cells was determined. Secondly, the effects of up shifting the temperature and adding the cytokine on resuscitation of VBNC state *Lb. acetotolerans* were observed. After 19 generations of culture in degassed beer, *Lb. acetotolerans* strain was found to be no longer detected on MRS agar despite the presence of major viable cells appearing green fluorescence, indicating that a large population of *Lb. acetotolerans* 2011-11 cells had entered into the VBNC state. Meanwhile, VBNC cells still exhibited the beer-spoilage ability. In addition, addition of catalase enabled cells to become culturable again before plating the MRS agar under anaerobic incubation at 26 ℃. Taken together, VBNC strain was successfully obtained from beer-spoilage *Lb. acetotolerans* by the prolonged adaptation to beer. It was also shown that addition of catalase in the culture media was an effective resuscitation method for the VBNC cells of *Lb. acetotolerans* strain.

Key words: *Lactobacillus acetotolerans*; viable but non-culturable; induction; catalase; resuscitation

据国家统计局公布的数据显示，2012 年我国啤酒产量累计达 4902 万千升，同比增长 3.1%，我国的啤酒工业已发展成为一个具有现代化规模的工业体系，在国民经济中占有举足轻重的地位。

虽然啤酒业近几十年来的发展势头良好，但是易感微生物依然是困扰国内外各大啤酒酿造企业的一大难题。啤酒易感微生物是指其代谢产物能够对啤酒的风味和口感产生损害，或者通过形成混浊、沉淀等使啤酒外观发生变化的微生物的总称。耐酸乳杆菌（*Lactobacillus acetotolerans*）为一种典型的难

收稿日期：2013-12-04
基金项目：中国博士后科学基金资助项目（2013M542182）；中央高校基本科研业务费专项资金资助（2013ZB0021）；广东省科技计划项目（2011B05040034）；广州市科技计划项目（2012J5100036）
作者简介：邓阳（1986-），男，博士，在站博士后，助理研究员，研究方向：食品微生物及生物技术
通讯作者：李惠萍（1961-），女，高级工程师（教授级），研究方向：啤酒酿造；李琳（1962-），男，教授，博士，研究方向：食品科学

培养啤酒易感微生物，目前只在低苦味值和低酒精度的啤酒中出现，该菌最大的特点是在 MRS 平板首次检测时一般需 14 d 才肉眼可见[1~2]。

2006 年，Suzuki 等[3]发现，*Lb. lindneri* 和 *Lb. paracollinoides* 可通过形成“活的但不可培养”（VBNC）状态以适应啤酒环境，使用常规的平板培养法难以检测出。细菌 VBNC 状态是由 Xu 等 1982 年正式提出[4]，指可培养的不产孢子的细菌遇到环境压力后，在琼脂培养基上形成的菌落数不断下降直至完全消失，但此期间细胞总数基本恒定，这些细胞仍然是“活”的，条件适宜后能够再次回到可培养状态[5~6]。此状态下细菌仍具有细胞的完整性，并保持低水平的呼吸作用及代谢活性。

当细菌处于 VBNC 状态时，经过一定的条件后即可以复苏，保持原菌的活性。目前，对于 VBNC 菌的复苏研究普遍集中于弧菌和大肠杆菌上[7~10]，而针对乳酸杆菌尤其是在啤酒酿造过程中形成 VBNC 状态后的复苏国内外还未见报道。对于低温诱导的 VBNC 菌，大多数学者在研究其复苏条件时，采用逐步恢复至最适生长温度的方法。如 Vattakaven 等[7]将低温与寡营养条件联合诱导 *Vibrio shiloi* 和 *V. tasmaniensis* 进入 VBNC 状态，当逐步回温至 20 ℃后，两种菌均能恢复为可培养状态。但是，逐步升温法并不是对于所有 VBNC 菌的复苏都适合，某些情况下需添加一定的促进因子。处于 VBNC 状态的 *V. harveyi* 添加维生素 B 和吐温 20 后在 28 ℃条件下复苏为可培养状态，复苏后的细胞形态、大小均与正常状态下相同，复苏细胞的生理生化特征没有明显改变[8]。

本研究利用简单的复苏方法，对诱导进入 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 体外复苏，复苏试验成功同时可作为 VBNC 状态诱导成功的佐证。通过对 VBNC 状态啤酒易感乳杆菌的诱导及复苏研究，有助于提高啤酒检测效率和结果的准确性，为深入了解和认识 VBNC 状态啤酒易感乳杆菌奠定基础，从而对建立完善的啤酒酿造过程微生物监控体系起到积极作用。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

正常状态下的 *Lb. acetotolerans* 2011-11，为本公司技术中心分离保存[2]。

1.2 试剂和仪器

脱气的市售 600mL 10°P 啤酒；MRS 培养基，美国 Merck 公司；吖啶橙、苏丹黑，美国 Amresco 公司；吐温 20、吐温 80，美国 Sigma 公司；溶菌酶、细菌基因组提取试剂盒，日本 TAKARA 公司；过氧化氢酶，美国 Sigma 公司；LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit，美国 Molecular Probes 公司；0.45 μm 微孔滤膜，美国 Millipore 公司；荧光显微镜 BH-2，日本 Olympus 公司；Guava EasyCyte 流式细胞仪，美国 Merck 公司；离子交换色谱仪 ICS-1000，美国 Dionex 公司；Metrosep Organic Acid 250 分析柱、RP Guard 保护柱，瑞士万通中国有限公司。

1.3 VBNC 状态耐酸乳杆菌的诱导

Lb. acetotolerans 2011-11 采用 MRS 固体培养基进行纯化复壮，挑取平板上较大的菌落接种于液体 MRS 培养基中，26 ℃厌氧培养 3 d。以此时活化培养至对数生长期的的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 培养物（约 10^7 cfu/mL）作为 0 代种（$0^{\#}$），取 1 mL 的 $0^{\#}$培养物接种于 10 mL 灭菌后的脱气啤酒中，26 ℃厌氧培养 6 d 至出现混浊或沉淀，即作为第 1 代（$1^{\#}$）。再取 1 mL 的 $1^{\#}$培养物接于 10 mL 灭菌后的脱气啤酒，26 ℃培养 6 d，另外，吸取 100 μL 的 $1^{\#}$培养物涂布于 MRS 固体平板上进行细菌计数，重复上述操作，直至计数平板 26 ℃厌氧培养 14 d 无单菌落出现，可认为实验中的细菌不可培养，诱导结束。

1.4 VBNC 状态菌的检测

当可培养数为零时，进行细菌总数和活菌数测定。首先选用吖啶橙荧光显微镜计数法（Acridine orange direct count，AODC）直接计数测定细菌总数，吖啶橙能与 RNA 或单螺旋 DNA 结合发出红色荧光，与双螺旋 DNA 结合发出绿色荧光，并且能使染色的细胞与背景分开，用于测定总菌数，具体操作方法参见文献[11]。将微孔滤膜浸泡于 0.2%苏丹黑溶液中 24 h 备用。取出 *Lb. acetotolerans* 2011-11 菌体，放入无菌箱中，用缓冲液以十倍倍比稀释至适宜浓度。吸取其中 1 mL 稀释菌液，滴加 0.1%的吖啶橙 0.1 mL 染色 5 min，染色后的样品滴加至孔径为 0.2 μm、直径为 25 mm 的微孔滤膜上。将滤膜置于载玻片上，盖上盖玻片，用手动压片方式排净滤膜与盖玻片之间的空气。用荧光显微镜 Olympus BH-2 观察。观察时随机选择 10 个不同视野，对视野中细菌计数，取平均值。

细菌活性检测采用由 Molecular Probes 公司生产的活菌染色试剂盒，该试剂盒由两种专染核酸染料组成：一种是绿色荧光染料 SYTO-9，能渗入完整细胞膜结构的菌体内；一种是红色染料 PI，仅能渗到细胞

膜破损的菌体内，并且与 SYTO-9 竞争核酸着染位点，两种染料均按要求配制成工作浓度于-20 ℃保存。经此试剂盒染色后，活细胞呈现绿色荧光，而死细胞则呈现红色荧光。取 1 mL 可培养数为零的培养物于 7000 *g* 离心 5 min，用无菌生理盐水洗涤两次，加入 50 μL 的无菌生理盐水重悬菌体沉淀，加入各 25 μL 的 SYTO-9 和 PI，吹吸混匀后避光染色 20 min。

1.4.1 荧光显微镜观察

取适量荧光样品滴于无自发荧光的载玻片上，盖上载玻片，并在载玻片上滴一滴无自发荧光的香柏油，用荧光显微镜 Olympus BH-2 于暗室中观察，随机选择 10 个不同视野，对视野中细菌计数，并取平均值。

1.4.2 流式细胞仪分析

选择检测程序后吸入空白管，然后取 1 mL 荧光样品移入流式管中。以细胞流速为 300 个粒子/秒，激发光波长为 480 nm，发射光波长为 610 nm 的检测参数对样品进行分析测试。

1.5 污染啤酒能力评价

1.5.1 接酒试验及有机酸含量测定

有机酸分析采用 Metrosep Organic Acid 250 分析柱和 Metrosep RP Guard 保护柱，并以 0.3 mM H_2SO_4+15%丙酮作为淋洗液，以 10 mM LiCl 为抑制液，进样体积为 20 μL，流速为 0.3 mL/min，检测器波长为 215 nm。为避免保护柱和分析柱堵塞，啤酒样品需用淋洗液稀释 10 倍再真空抽滤，稀释后样品经 0.22 μm 水相滤膜过滤后进样，淋洗液上机前也需用 0.22 μm 有机相滤膜过滤。

用淋洗液分别配制 10 ppm、50 ppm、100 ppm、200 ppm 以及 500 ppm 的乳酸和乙酸标准溶液，上机通过离子交换色谱分别测定其在 215 nm 波长处的吸光值，做三个平行。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标分别绘制标准曲线，结果如图 1 所示。

将 1×10^6 个/mL 的正常状态和进入 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 分别以 1:10（*V/V*）接种于新鲜啤酒中，置于 26 ℃静置培养 30 d，观察啤酒浑浊情况，并在第 7 d 时通过离子交换色谱检测样品中乳酸和乙酸两种有机酸的含量，同时以不接菌的啤酒作为对照。样品测量得到的峰面积用外标法根据标准曲线计算得到所含各有机酸浓度。

1.5.2 耐酒花基因检测

Sami 等人[12]于 1997 年在具有抗啤酒花性能的 *Lb. brevis* ABBC45 菌株中分离得到一个新奇的携带多药抗性基因的质粒 pRH45，其中含有一种与酒花抗性相关的基因 horA。研究还发现，基于这段基因序列进行 PCR 检测啤酒易感乳杆菌，结果与抗酒花能力有较好的同一性，能引起啤酒腐败的乳酸杆菌几乎均含有类似 horA 基因，且啤酒易感乳杆菌中 horA 基因的质粒拷贝数与酒花抗性大小的增减性保持一致，这些都说明基因 horA 与易感乳杆菌的酒花抗性有着密切关系[12]。本文作者的前期研究表明，正常状态下的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 具有抗酒花基因 horA[2]。通过检测处于 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 中抗酒花基因的变化，来进一步验证此状态下 *Lb. acetotolerans* 污染啤酒的能力。

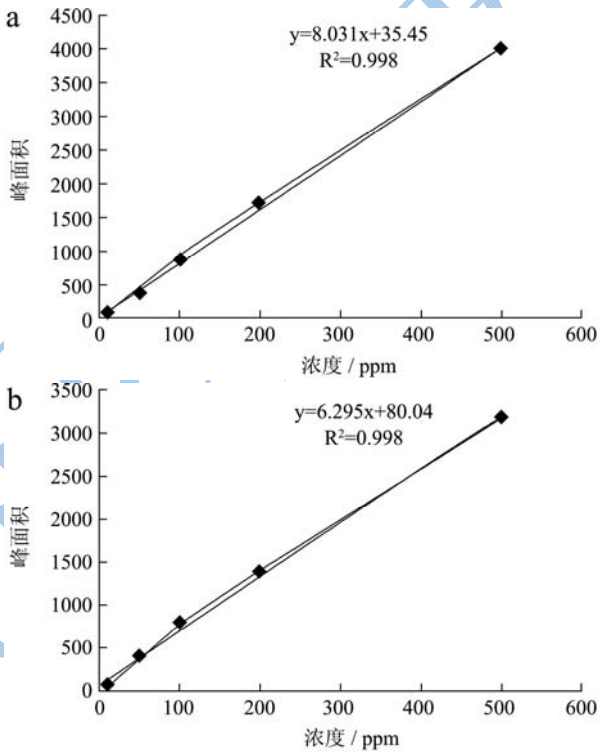


图 1 乳酸（a）和乙酸（b）含量测定的标准曲线

Fig.1 Standard curves of lactic acid (a) and acetic acid (b) determination

分别取 2 mL 处于正常和 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 的新鲜培养物，5000 r/min 离心 20 min，弃上清，向菌体沉淀中加入 50 μL 溶菌酶溶液（20 mg/mL）悬浮细胞，于 37 ℃处理 30 min 以上，然后按照细菌基因组提取试剂盒使用说明提取 DNA。以基因组 DNA 为模版，设计 *horA* 基因的上游引物 LbHC-1（5’-ATCCGGCGGTGGCAAATCA-3’）和下游引物 LbHC-2（5’-AATCGCCAATCGTTGGCG-3’）进行 PCR 扩增反应，基因理论大小为 343 bp。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 3 min，然后 94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 40 s 进行 30 个循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，于凝胶成像系统下观察并拍照记录结果。PCR 产物通过电泳，利用 TaKaRa 公司 Gel Extraction Kit 试剂盒割胶

回收纯化，送至广州锐博生物科技有限公司测序。

1.6 复苏条件的筛选

1.6.1 梯度升温法

取 100 μL、10^6 活菌数/mL 刚诱导进入 VBNC 状态的菌悬液加入到灭菌的离心管中，置于水浴锅中，温度时间参数设定如下，分别在不同时段取适量样品涂布于 MRS 琼脂平板上，26 ℃厌氧培养。同时以不作处理的 VBNC 菌悬液作为对照。本试验重复三次。

20 ℃，1 h；25 ℃，1 h；30 ℃，1 h；35 ℃，1 h；37 ℃，1 h。

1.6.2 添加化学物质

取 100 μL、10^6 活菌数/mL 刚诱导进入 VBNC 状态的菌悬液中加入无菌的吐温 20、吐温 80 以及过氧化氢酶液，混匀并于 26 ℃静置 2 h 后涂布于 MRS 平板上。同时以不添加上述化学物质的 VBNC 菌悬液作为对照。本试验重复三次。

2 结果与讨论

2.1 VBNC 菌的诱导

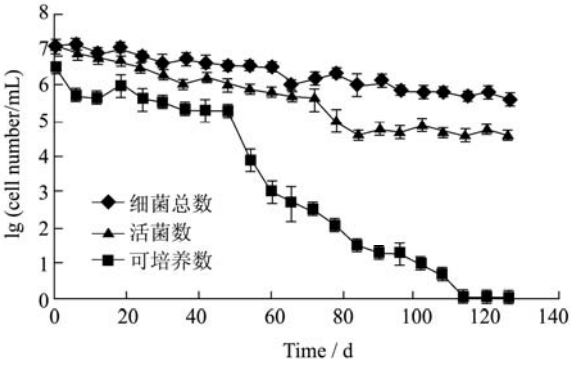


图 2 啤酒内连续传代法诱导 *Lactobacillus acetotolerans* 2011-11 进入 VBNC 状态的生长曲线

Fig.2 Entry into the VBNC state of *Lactobacillus acetotolerans* 2011-11 using prolonged beer adaptation

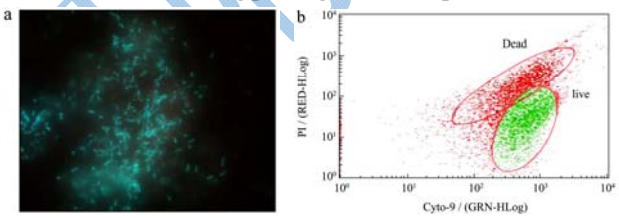


图 3 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 2011-11 的荧光显微镜（a）和流式细胞仪（b）检测结果

Fig.3 Analysis of the VBNC state of *Lb. acetotolerans* 2011-11 by fluorescent microscopy (a) and flow cytometry (b)

由于正常状态下 *Lb. acetotolerans* 或多或少恢复了一定程度的可培养性，为了更好地还原啤酒酿造过程中易感乳杆菌的生理状态，首先需通过适当的理化因素诱导其进入 VBNC 状态。本研究采用啤酒内连续传代培养法对啤酒易感乳杆菌-*Lb. acetotolerans* 2011-11 进行不断驯化，初始浓度为 1×10^7 cfu/mL 的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 菌液经过啤酒环境条件下诱导后，可培养菌数在连续传代至第 19 代时降为 0（图 2）。同时，通过 AODC 法检测的细菌总数在整个诱导过程中基本保持稳定，而荧光染色法测得的活菌数缓慢降低，至诱导结束时活菌数下降 1~2 个数量级（图 2 和 3）。此时，如图 3a 所示，通过荧光显微镜仍可观察到较多的绿色活菌存在，且数量多于红色荧光的死菌数；同样地，通过流式细胞仪分析也可得到相似的结果（图 3b），活菌数保持在 10^5 cfu/mL 以上。

结合 AODC、平板培养计数和荧光染色法检测结果，可绘制出啤酒内连续传代法诱导 *Lb. acetotolerans* 2011-11 进入 VBNC 状态过程细菌总数、可培养数以及活菌数的变化曲线，见图 2。结果表明，*Lb. acetotolerans* 2011-11 经过诱导可进入 VBNC 状态。

2.2 污染啤酒能力评价

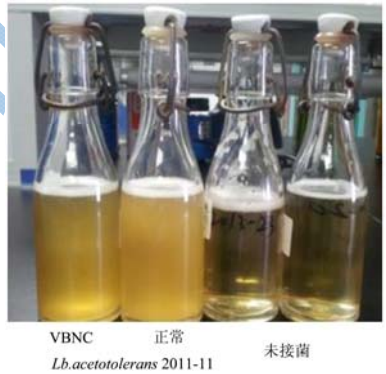


图 4 处于正常和 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 2011-11 的接酒试验结果

Fig.4 Evaluation of beer-spoilage ability of the standard and VBNC *Lb. acetotolerans* 2011-11 using the traditional growth in beer test

通过接酒试验可知，处于正常对数生长期和 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 在一个月内均能引起新鲜啤酒形成混浊或沉淀（图 4），说明处于 VBNC 状态下的 *Lb. acetotolerans* 仍具有污染啤酒的能力。另外，由表 1 可知，对接菌一周后的啤酒样品进行有机酸含量检测发现，两种状态下 *Lb. acetotolerans* 2011-11 均可产生乳酸和乙酸，使得啤酒内二者的含量显著上升。结果进一步证实，处于 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 仍具有与正常状态下相同的有机酸代谢活性，可引起啤酒感官和风味变化。

将处理好的啤酒样品重复进样 5 次，计算标准偏

差（SD）与相对标准偏差（RSD），结果见表 1。各有机酸的相对标准偏差在 0.5~2.0%之间，可见此方法的精确度较好。

表 1 不同状态下 *Lb. acetotolerans* 2011-11 对成品啤酒有机酸含量的影响

Table 1 Effects of *Lb. acetotolerans* 2011-11 on the contents of organic acids

菌株		浑浊	乳酸含量/(mg/L)	SD	RSD/%	乙酸含量/(mg/L)	SD	RSD/%
CK		-	63.12[a]	1.1644	1.5	97.19[a]	0.5899	0.5
2011-11	正常	+	319.53[b]	1.3753	1.6	190.73[b]	0.6677	0.7
	VBNC	+	188.18[c]	1.2844	1.5	171.86[c]	0.6321	0.6

注：“+”：结果阳性；“-”：结果阴性；表中同一列不同字母表示显著性差异（$p<0.05$）。

为了检验进入 VBNC 状态后的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 是否存在 horA 基因，以细菌基因组 DNA 为模版，进行 horA 基因部分序列的扩增，扩增产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳检测。如图 4 所示，得到与预期大小相同的片段，测序结果与 *Lb. paracollinoides*（AB178589.1，GI:57864210）的 horA 基因部分序列之间存在 100%同源性。以上结果说明，此状态下该菌仍保留有 horA 基因，即存在污染啤酒的能力。

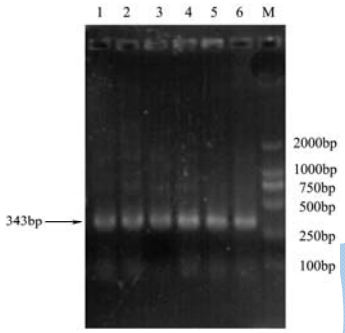


图 5 正常和 VBNC 状态的耐酸乳杆菌 2011-11 中 *horA* 基因的扩增图谱

Fig.5 Determination for presence of *horA* gene in *Lb. acetotolerans* 2011-11

注：M: DNA Marker(DS^{TM}2000)；1~3：正常状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11；4~6：VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11。

2.3 VBNC 状态 Lb. acetotolerans 2011-11 的复苏

取刚进入 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 2011-11 立即进行复苏试验。常规的复苏方法是尝试诱导过程的逆过程，即去除环境中的不利因素。本研究尝试用逐步升温法和添加复苏促进物的方法考察各种环境和生物因素对 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 复苏至可培养状态的影响，从而找到快速且有效的复苏手段。

2.3.1 温度对复苏的影响

如表 2 所示，采用梯度升温法并未能使处于 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 恢复为可培养状态，即厌氧培养 14 d 后 MRS 平板上无单菌落生长，重复三次结果相同。

表 2 梯度升温法对 VBNC 菌复苏的影响

Table 2 Resuscitation of VBNC *Lb. acetotolerans* using temperature upshift method

温度/℃	时间/h[a]	MRS 琼脂
CK	0	-
20	1	-
25	2	-
30	3	-
35	4	-
37	5	-

注：a：样品梯度升温处理总时间；“-”：未见菌落生长。

2.3.2 添加化学物质对复苏的影响

通过过氧化氢酶处理后的 VBNC 菌液涂布于 MRS 平板，26 ℃培养约 6 d 后出现单菌落，且对照组相同条件培养 14 d 无菌落生长（表 3）。结果表明，添加过氧化氢酶可以使处于 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans* 2011-11 恢复至可培养状态，使其得到复苏。而添加吐温 20 和吐温 80 的处理组样品在 MRS 平板培养 14 d 后均无菌落长出，结果说明这两种化学物质对 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 2011-11 的复苏无影响。

表 3 添加不同化学物质对 VBNC 菌复苏的影响

Table 3 Resuscitation of VBNC *Lb. acetotolerans* 2011-11 by adding various compounds

添加物	添加量	MRS 琼脂
CK	0	-
吐温 20	10 μL	-
吐温 80	10 μL	-
过氧化氢酶	1000 U	+

注：“+”：有菌落生长；“-”：无菌落生长。

过氧化氢酶能使 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 成功复苏至可培养状态的原因可能是，在常规啤酒检测中，突然将啤酒易感乳杆菌从饥饿和低温等不良环境转移到营养丰富、温度适宜的琼脂培养基上，会造成

其代谢失衡，瞬时产生大量过氧化物和自由基。由于其不具备表型适应能力，VBNC 菌细胞不能解除过氧化物的毒性，结果是部分或全部细胞死亡。复苏过程是 VBNC 状态菌的一个重要特征，成功复苏证明 *Lb. acetotolerans* 存在 VBNC 状态，同时也说明 VBNC 状态 *Lb. acetotolerans* 诱导成功。

3 结论

众所周知，啤酒易感乳杆菌一旦进入 VBNC 状态常会造成漏检，影响产品质量并造成重大的经济损失[13]。本研究采用啤酒内连续传代诱导法还原易感乳杆菌在啤酒酿造过程中的实际生存状态，获得处于 VBNC 状态的 *Lb. acetotolerans*，并利用过氧化氢酶处理促进其复苏至正常可培养状态。后续可将过氧化氢酶引入日常检测方法中，改良常规平板检测技术，从而提高平板检测效率。目前，关于啤酒易感乳杆菌 VBNC 状态的研究在国内外仍处于起步阶段，应受到越来越多的关注。通过对啤酒易感乳杆菌尤其是难培养菌 VBNC 状态的研究，可以找到逃避检测的“隐形”污染源，提高啤酒检测结果的准确性和检测效率，为啤酒易感乳杆菌的预防和监控奠定基础，可推广应用到整个啤酒行业，提升中国啤酒行业的微生物控制水平，具有重要的学术价值及生产指导意义。

参考文献

[1] 方贵权,李惠萍,涂京霞,等.中国啤酒易感微生物的研究[J].啤酒科技,2011,2:25-28
FANG Gui-quan, LI Hui-ping, TU Jing-xia, et al,. Study on the beer-spoilage microorganisms in China [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 2: 25-28

[2] Deng Y, Liu J Y, Li H P, et al. An improved plate culture procedure for rapid detection of beer-spoilage *lactic acid bacteria* [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2013, accepted

[3] Suzuki K, Iijima K, Asano S. Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage *lactic acid bacteria* [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2006, 112(4): 295-301

[4] 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: 313-323

[5] Colwell R R., Brayton P R, Grimes D J, et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment implication for release of genetically engineered microorganisms [J]. Nature Biotechnology, 1985, 3: 817-820

[6] Whitesides M D, Oliver J D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 1002-1005

[7] 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

[8] Sun F, Chen J, Zhong L, et al. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 64(1): 37-44

[9] Cuny C, Lesbats M, Dukan S. Induction of a global stress response during the first step of *Escherichia coli* plate growth [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73(3): 885-889

[10] Liu Y M, Wang C, Tyrrell G, et al.. Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation [J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(2): 155-161

[11] 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

[12] Sami M, Yamashita H. A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of Lactobacilli [J]. American Society of Brewing Chemists, 1997, 55(4): 137-140

[13] Suzuki K, Asano S, Iijima K, et al. Development of detection medium for hard-to-culture beer spoilage lactic acid bacteria [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(5): 1458-1470