

# 食源性微生物 VBNC 状态检测与分离方法的研究进展

聂新颖, 张蕊蕊, 蒋丽芬, 李群英, 夏必帮, 廖红梅

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 在环境胁迫下, 部分食源性微生物(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌和酵母等)会进入活的非可培养状态(Viable but non-culturable, VBNC)得以存活。进入 VBNC 状态的微生物在细胞形态、代谢活性以及致病性等方面发生了变化, 并且不能用常规的方法将其检出, 因此给食品质量与安全带来了极大的挑战。本文总结了食源性微生物 VBNC 状态的发展趋势; 简单介绍了食源性微生物 VBNC 状态的各种环境诱导因素、生理生化特性和复苏条件; 着重论述了应用于食源性微生物 VBNC 状态的分子检测技术和噬菌体检测法, 并讨论了方法的优缺点及优化方案。此外, 本文还总结了分离和纯化 VBNC 状态微生物的方法并分析了方法的可行性, 以期为进一步探究食源性微生物 VBNC 状态的生理特性, 研发更加快速、简便和高效的检测分离方法提供参考。

**关键词:** 活的非可培养状态(VBNC); 复苏条件; 检测方法; 分离方法

文章编号: 1673-9078(2017)9-283-292

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.042

## Research Progress of Detection and Separation Methods for Foodborne Microorganisms at VBNC State

NIE Xin-ying, ZHANG Rui-rui, JIANG Li-fen, LI Qun-ying, XIA Bi-bang, LIAO Hong-mei

(College of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Under environmental stress, some food-borne microorganisms (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, lactic acid bacteria, yeast, and others) can stay alive by entering a viable but non-culturable (VBNC) state. Microorganisms entering the VBNC state change in terms of cell morphology, metabolic activity, and pathogenicity, and cannot be detected by conventional methods, thus posing great challenges to food quality and safety. In this study, the development trends of foodborne microorganisms in the VBNC state were summarized and the various environmental induction factors, physiological and biochemical characteristics, and recovery conditions were briefly introduced. The molecular detection technology and phage detection methods that are applied to food-borne microorganisms at VBNC state were mainly discussed, and the advantages and disadvantages of these methods and possible optimization protocol were examined. In addition, the detection and separation methods for microorganisms at VBNC state were summarized and the feasibility of these methods was analyzed. The purpose of this paper was to provide a reference for the further investigations of the physiological characteristics of foodborne microorganisms at VBNC state, and the development of faster, simpler, and more efficient detection methods.

**Key words:** viable but non-culturable (VBNC) state; recovery conditions; detection methods; separation methods

微生物活的非可培养(Viable but non-culturable, VBNC)状态是指微生物失去了在传统培养基上生长繁殖的能力, 但在合适条件下又可复苏并恢复可培养性的一种特殊休眠状态<sup>[1]</sup>。由于微生物的这种特殊状态用常规的方法检测不出, 在实际检测中容易造成漏检, 因此给食品安全和人类健康带来了潜在的威胁。

食品中主要的致病微生物包括大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等。

收稿日期: 2017-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471714); 国家重点研发计划项目(2016YFD0400300); 常州市科技支撑计划(农业)项目(CE20162013)

作者简介: 聂新颖(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工

通讯作者: 廖红梅(1983-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品加工

当前, 食源性疾病是食品安全的主要问题。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计, 现今每年全球大约有15亿腹泻病人, 其中因食用微生物污染的食品引起的约占70%<sup>[2]</sup>。腐败微生物能够引起食品的变质, 常见的食品腐败微生物有细菌、酵母菌和霉菌。在食品加工过程中, 一些致病和腐败微生物为了适应不良环境如低温、高渗透压和防腐剂等会进入活的非可培养状态得以存活, 一些致病菌甚至仍然保留毒力。因此, 杀灭食品中的致病菌和腐败菌以防止其污染, 研发简便、高效、低成本的技术以检测食源性微生物的种类和数量一直都是食品生产者和食品质量监管部门期望解决的问题。然而, 食源性微生物的 VBNC 状态却给食品生产者和监管部门带来很大

的挑战。本文简单介绍了食源性微生物 VBNC 状态的研究趋势、诱导因素、生理生化特性、复苏条件并详细论述应用于食源性微生物 VBNC 状态的分子检测技术、噬菌体检测法以及分离和纯化 VBNC 细胞的方法,并讨论了方法的优缺点及优化方案,以期为进一步探究食源性微生物 VBNC 状态的生理特性,研发更加快速、简便和高效的检测分离方法提供参考。

### 1 VBNC 状态研究现状

1982 年徐怀恕等首次在河口和海洋环境中发现生存但不可培养的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) [3], 1985 年 Colwell 正式提出 VBNC 概念[4], 此后越来越多的学者报道了关于 VBNC 状态的研究 (图 1)。目前,已经报道有 33 个属的革兰氏阳性细菌, 11 个属的革兰氏阴性细菌[5]和部分酵母菌能够进入 VBNC 状态。表 1 总结了近五年

部分食源性致病菌和腐败微生物 VBNC 状态的研究状况,从表中可以发现随着研究者对这种特殊状态的深入了解,越来越多的学者更加注重对 VBNC 状态检测方法的研究。

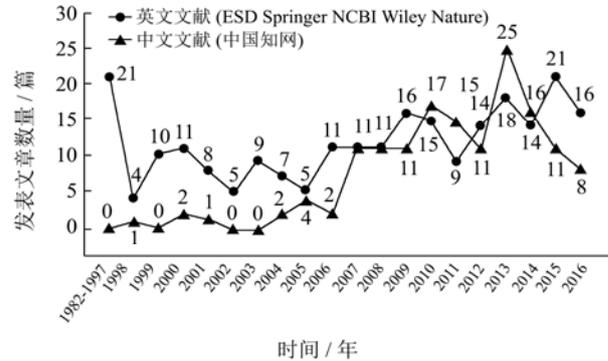


图 1 关于 VBNC 状态发表的文献情况

Fig. 1 Published studies about VBNC state

表 1 近五年 VBNC 状态的研究状况

Table 1 Research status of VBNC state in the past five years

时间/年	菌种	诱导因素	复苏方法	检测方法	参考文献
2011	副溶血性弧菌	4 °C、寡营养、富营养	升温、加营养物等	RT-PCR	[6]
2012	酿酒酵母	硫酸盐	调节 pH	qPCR	[7,8]
2013	金黄色葡萄球菌	4 °C、15% (m/V) NaCl、0.3%(V/V)乙酸的营养肉汤培养基	8%无菌 Tween80	PMA-qPCR	[9]
2013	大肠杆菌	8 °C	-	PMA-qPCR	[10]
2013	粪肠球菌、分枝杆菌	再生水系统	时间、余氯量、营养元素	PMA-qPCR 和 Q-RT-PCR	[11]
2014	单增李斯特菌	2 °C、pH 6.0	-	PMA-qPCR	[12]
2015	沙门氏菌和痢疾志贺氏菌	高温厌氧消化	离心脱水	RT-qPCR	[13]
2015	丁香假单胞菌	外醛醛树脂, 乙酰丁香酮	-	流式细胞术	[14]
2015	霍乱弧菌	4 °C	-	PMA-PCR	[15]
2016	乳酸菌	温度, pH 值, 营养成分, 培养时间	改变温度加营养物	试剂盒法	[16]
2016	酿酒酵母	亚硫酸盐 (SO <sub>2</sub> )	除去 SO <sub>2</sub>	流式细胞术	[17]

#### 1.1 VBNC 状态的诱导因素

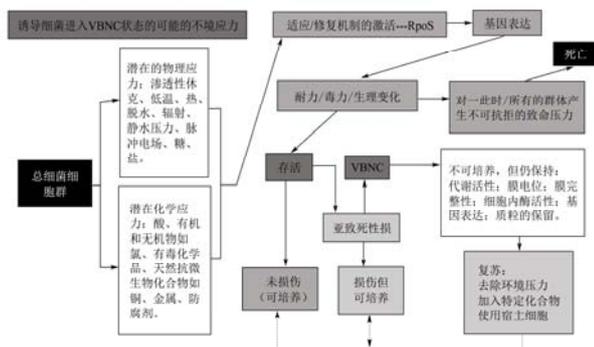


图 2 细菌 VBNC 状态的形成过程[18]

Fig. 2 Formation of the VBNC state in bacteria [18]

当细菌暴露于各种应激环境时,存在细胞修复机制的激活。由于环境应力的类型和程度不同,部分细菌会进入 VBNC 状态[18] (图 2)。已知诱导细菌进入 VBNC 状态的环境因素主要有不适宜温度、渗透压、氧气、寡营养、食品防腐剂、重金属、射线(紫外线、可见光)和白光曝照等[19,20]。其中,温度是诱导 VBNC 状态的主要因素,包括低温诱导和高温诱导,一般弧菌易受到低温诱导,而其它菌如金黄色葡萄球菌易受高温诱导[21]。

#### 1.2 VBNC 状态的理化特性

进入 VBNC 状态的微生物在细胞形态、代谢活性、致病性和基因表达等方面与正常细胞相比发生了

一定的变化。例如此状态的细菌通常表现出矮化现象,形态变为球状<sup>[18]</sup>。有研究表明处于指数期的 VBNC 态棒状溶血性弧菌在初始阶段形成异常形状的细胞,而 Su 等<sup>[22]</sup>认为形成不规则形状的细胞可能是弧菌 VBNC 状态的共同特征。当微生物进入 VBNC 状态时其代谢活性表现出显著的变化。这种状态的微生物细胞壁合成或代谢仍然维持;膜电位高,膜脂肪酸含量增加;细胞质浓缩,核糖体及染色质核酸物质密度明显降低,蛋白质和脂质总量下降,但微生物在开始进

入非可培养状态时,一般会合成一些新的蛋白质<sup>[23]</sup>。众多研究结果表明 VBNC 状态的致病性是否保留与致病菌的种类有关。一般情况下,病原体在 VBNC 状态不能引发疾病,但是保留毒力,并且可以在它们复苏至活跃代谢状态后开始感染。处于 VBNC 状态或复苏时的基因(包括参与细胞膜/壁生物合成、中枢代谢、脂质和脂肪酸代谢和毒力因子等)表达情况也一直受到研究者的关注(表 2),其中大肠杆菌 VBNC 状态的蛋白组学变化研究的已经比较深入。

表 2 VBNC 细菌中的某些基因的表达情况

Table 2 Expression of certain genes in VBNC bacteria

细菌名称	基因的表达	参考文献
创伤弧菌	<i>RpoS</i> (主要应激因子)的持续表达; <i>vvhA</i> (溶血素)停止在 707o 菌株中的表达。	[24]
副溶血弧菌	<i>mreB</i> (细胞骨架蛋白)在稳定期和饥饿存活条件下的表达下降	[25]
大肠杆菌 O157:H7	<i>rjbE</i> (脂多糖)和 <i>fliC</i> (H7 鞭毛蛋白)表达下降	[26]
大肠杆菌 O157MP37	<i>OmpW</i> (外膜蛋白)表达增加	[27]
粪肠球菌	<i>PBP5</i> (青霉素结合蛋白肽聚糖生物合成最终阶段的基因)在 3 个月内正常表达,超过 3 个月表达降低	[28]
幽门螺杆菌	<i>CagA</i> 培养 40 d 后表达, <i>VacA</i> 和 <i>UreA</i> (毒力因子)持续表达	[29]
结核分支杆菌	抗原 <i>85B</i> 基因大量持续表达	[30]

### 1.3 VBNC 状态的复苏

处于 VBNC 状态的食源性微生物一旦复苏,将会严重影响食品的质构和安全性,因此给食用者的健康带来潜在危险。研究表明温度、体内培养、复苏促进因子(resuscitation-promoting factors, Rpf s)、生长自动诱导剂等能够促进 VBNC 状态的复苏(表 3)。其中 Rpf s 的化学本质是蛋白质,生长自动诱导剂对热稳定,然而这两大类复苏因子究竟包括哪些物质目前并没有明确。

## 2 VBNC 状态的检测方法

由于处于 VBNC 状态的微生物不能用传统培养

方法进行检测,因而建立高效准确的检测方法成为本研究领域的一个重要方向。通常,通过检测以下指标评估 VBNC 状态微生物的存活力:细胞膜的完整性、代谢活性、特异性基因(例如 16S 核糖体 RNA)的表达和特异性蛋白质的差异表达(例如大肠杆菌中的主要外膜蛋白 Omp)(表 4)。当前检测 VBNC 状态微生物的方法包括活菌直接计数法、放射自显影检测法、核酸染料检测法、呼吸检测法、流式细胞仪检测法、免疫学法、分子生物学法和噬菌体检测法等(表 5)。以下主要对应用于食源性微生物 VBNC 状态的分子检测技术和噬菌体检测法进行综述,并讨论了方法的优缺点及优化方案。

表 3 VBNC 细菌主要的复苏因子

Table 3 Major recovery factors of VBNC bacteria

复苏因子	细菌	研究内容
温度	副溶血性弧菌 <sup>[31]</sup>	温度能够控制副溶血性弧菌的 VBNC 状态
	创伤弧菌 <sup>[32]</sup>	升高温度可以使 VBNC 细菌真正的复苏
体内培养	嗜肺军团菌 <sup>[33]</sup>	在原生动物的棘阿米巴多藻中能够复苏
	增生李斯特氏菌 <sup>[34]</sup>	接种到胚胎卵的卵黄囊中可以复苏
Rpf s	结核分支杆菌 <sup>[35]</sup>	Rpf s 不仅能够促进复苏而且还具有毒力
	哈氏弧菌 <sup>[36]</sup>	<i>YeaZ</i> 蛋白可以促进野生型和突变细胞的哈氏弧菌从 VBNC 状态复苏到可培养状态
生长自动诱导剂	鼠伤寒沙门氏菌 <sup>[37]</sup>	培养过细菌的培养基能导致细菌复苏
	肠出血性大肠杆菌 <sup>[38]</sup>	新型群体感应系统 AI-3 能够激活肠出血性大肠杆菌毒力基因表达

表 4 大肠杆菌 VBNC 状态的蛋白组变化

Table 4 Reported proteomic changes in VBNC *Escherichia coli*

蛋白质/mRNA	变化	可能的意义	参考文献
延伸因子 (TU)	保持表达	表明维持蛋白质合成	[39,40]
烯醇酶	持续表达	糖酵解的维持	[40]
$\delta$ -3-磷酸甘油酸脱氢酶	持续表达	维持氨基酸合成	[40]
苏氨酸合成酶	持续表达	维持氨基酸合成	[40]
二氨基庚二酸 (DAP)	交联增加	可能是 VBNC 的条件下产生肽聚糖交联的有利方法, 其中缺乏五肽供体	[41]
神经肽 (含三肽)	增加	与形状转变有关	[41]
糖链	长度减少	与形状转变有关	[41]
青霉素结合蛋白	不存在	阻断或减少肽聚糖装配和生长	[41]
OmpW	增加体内传代	对应激敏感 (增加应激反应)	[39,42]
rpoS (检测 mRNA 水平)	持续表达	表明 rpoS 基因 (和蛋白质) 参与 VBNC 状态下大肠杆菌的持久性	[43]
gapA (检测 mRNA 水平)	持续/增加	糖酵解的维持	[44]
16S RNA	持续/增加	维持核糖体功能	[44]

表 5 VBNC 细菌的检测方法

Table 5 Detection methods for VBNC bacteria

方法	功能/指示	方法的优缺点	参考文献
活菌直接计数法	细菌形态变化	优点: 简便、直接。 缺点: 准确性差。	[58]
流式细胞仪	膜电位, 膜完整性, 酶活性	优点: 准确, 快速的结果, 灵敏, 复用。 缺点: 设备昂贵, 技术熟练的操作人员。	[59]
免疫学方法	抗原性, 与其特异性抗体相结合	优点: 简便、特异性好、重复性强、敏感性高。 缺点: 影响准确性。	[60]
PMA-qPCR	核酸染料, 膜完整性	优点: 快速、易于操作。 缺点: 对待检测样本的灭菌方法有要求。	[50]
RT-PCR	16S 核糖体 RNA 的定量	优点: 灵敏, 具体, 快速的效果。 缺点: mRNA 易于降解且提取过程复杂	[61,62]
PMA-RF-LAMP	荧光染料, DNA 扩增	优点: 高特异性, 灵敏度和快速性, 成本低, 操作简便。 缺点: 应用较少。	[52]
噬菌体	活细胞的溶解活性	优点: 生产方便, 价格低廉, 特异性强, 耐用。 缺点: 细菌中固有物质的潜在抑制作用。	[56]

## 2.1 基于外源绿色荧光蛋白的检测

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 最早是在 1962 年由下村修等人在水母中发现。其基因所产生的蛋白质, 在蓝色波长范围的光线激发下, 会发出绿色荧光。由于这种特殊的蛋白质对细胞没有毒性且荧光性稳定, 其标记系统不需要外源性底物及辅助因子就能在单细胞中表达 GFP 基因, 经紫外光照射后可直接观察, 在分子生物学和细胞生物学领域得到广泛应用。经 GFP 标记的细胞和未标记的细胞在 VBNC 状态下表现相似的生理特征, 但是 VBNC 状态

下的细胞可以保持荧光, 而死细胞由于细胞膜不完整, 没有荧光可见。利用 GFP 基因作为报告基因在活细胞中诱导表达, 能够有效的区分死活细胞, 因此可以作为检测 VBNC 细胞的方法。

Lowder 等<sup>[45]</sup>用天然 (稳定) GFP 标记假单胞菌, 其 VBNC 细胞在 37.5 °C 饥饿环境下可以保持荧光 6 个月, 而饥饿细胞在 30 °C 可以保持荧光至少 11 个月。随后, 他们又研究了使用具有短半衰期的绿色荧光蛋白变体作为检测 VBNC 细胞的潜力<sup>[46]</sup>。然而, 不同于具有天然 (稳定) GFP 的菌株, 用修饰的不稳定 GFP 标记的恶臭假单胞菌菌株在饥饿环境下其 VBNC 细

胞快速丧失 GFP 荧光。在不稳定的 GFP 菌株中荧光的损失是由于饥饿和 VBNC 条件代谢活动被抑制, GFP 的蛋白水解并缺乏连续的 GFP 合成。因此, 使用修饰的不稳定 GFP 能够用于指示细胞进入 VBNC 状态。根据此研究结果, 他们认为 GFP 标记也应指示细胞退出 VBNC 状态时的代谢活性。然而, 遗憾的是当时他们尝试复苏 VBNC 状态假单胞菌的实验并没有成功。之后研究者将 VBNC 状态微生物检测方法的研究重点转移至基于 DNA 染料结合其他技术的探究中, 对于绿色荧光蛋白标记检测法的相关文献报道较少。

## 2.2 基于微生物 mRNA 的检测

当微生物处于 VBNC 态时仍有一些基因被表达, 而 mRNA 与微生物的活性直接相关, 一些研究者应用逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)技术对 VBNC 态微生物进行检测。16S 核糖体 RNA 已经用于 VBNC 状态定量的研究, 因为这些细胞维持核糖体 RNA 的水平与正常细胞一样高, 并保持还原酶活性(活细胞必需的)<sup>[18]</sup>。以 RT-PCR 为基础扩增 mRNA, 能客观而准确地评价食源性微生物 VBNC 态的潜在危害, 是目前使用的主要方法之一。

李影等<sup>[47]</sup>依据 VBNC 状态时高量表达的沙门氏菌特异性基因设计两种引物 C1 和 C5, 并运用 RT-PCR 技术进行检测。结果表明, 引物 C1 和 C5 具有较好的特异性和敏感性, 可用于建立 VBNC 沙门菌的检测方法。González-Escalona 等<sup>[48]</sup>为了检测 VBNC 状态下的霍乱弧菌, 对 *tuf*, *rpoS* 和 *relA* 的 16S rRNA 和 mRNA 进行靶标, 结果表明, 基于选定的 RNA 靶标的新的 Q-RT-PCR 方法可以成功地用于霍乱弧菌的鉴定和环境中其代谢活性的评估。但是微生物 mRNA 非常不稳定极易被降解, 在提取过程中要求具有严格的无酶环境且提取过程复杂, 因此有待探索更加准确、快速和简便的方法以检测 VBNC 状态的食源性微生物。

## 2.3 基于 DNA 染料 (EMA/PMA) 的检测

为了弥补 PCR 技术无法将 DNA 与死细胞和活细胞区分开这一缺点, 研究人员利用生物染料如叠氮溴化乙啶 (edthidiummonoazide bromide, EMB) 和叠氮溴化丙啶 (propidiummonoazide bromide, PMA) 在 DNA 提取前对样品进行预处理, 将 EMA 或 PMA 插入死细胞的 DNA 中, 然后进行常规 DNA 提取和 qPCR。EMA/PMA 的作用机制可能是由于以下因素的结合: (1) 当将 EMA 或 PMA 溶液加入到完整膜和膜受损细胞的混合物中时, 充分混匀孵育一段时间, 该化学物质可以选择性地仅进入受损细胞; (2)

EMA/PMA 一旦进入细胞内, 便会插入膜受损细胞的 DNA 中; (3) 强可见光照射使 EMA/PMA 分解产生一种氮烯类物质, 其可以与膜受损细胞内附近的任何有机分子反应, 包括结合的 DNA; (4) 该修饰强烈地抑制 PCR 中 DNA 扩增的顺序; (5) 同时, 溶液中残留的过量染料在强光照射后与水分子反应, 所得羟胺不再具有反应性, 因此来自具有完整膜细胞的 DNA 在提取中未被修饰。通过这种方法, 最终使死亡细胞中的 DNA 在核酸纯化中被选择性的剔除, 在随后的 PCR 中只扩增活细胞的 DNA<sup>[49,50]</sup>。

虽然 EMA-qPCR 和 PMA-qPCR 技术应用广泛, 但在实际样品检测时, 两种染料各有优缺点。EMA 不仅能进入破损的细胞膜, 对完整的细胞膜也有一定的渗透性, 而 PMA 对完整的和破损的细胞膜的渗透能力均不如 EMA, 因此用 PMA 处理样品时经常会产生假阳性结果。实际应用时, 两种染料的选择需考虑许多因素, 例如染料的浓度、孵育时间、光源选择、样品中死亡细胞的数量、反应液的盐浓度、反应液的 pH 以及目的基因的长度等。庞贝妮等<sup>[51]</sup>将 EMA 和 PMA 与 qPCR 技术相结合, 通过对曝光时间、染料浓度进行优化, 对比 2 种试剂的作用效果, 确定最为适宜的预处理方式是使用浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EMA, 曝 15 min。对于相同浓度的菌悬液, PMA 则无法保证与热致死菌 DNA 分子的有效交联, 对于死菌扩增的抑制效果不理想。因此 EMA-qPCR 更适宜作为沙门氏菌检测的一种初筛方式。

最近 Zhong 等<sup>[52]</sup>研究出一种新的检测方法即基于 PMA 的实时荧光环介导等温扩增技术(PMA treatment with real-time fluorescent loopmediated isothermal amplification, PMA-RF-LAMP), 该方法是将不同状态的细胞(死细胞, VBNC 细胞和指数期细胞)用一定浓度的 PMA 处理后在暗处室温条件下孵育 5 min, 然后在冰浴环境下打开离心管盖并置于距离 650 W 卤素灯 15 cm 处曝光 5 min。随后收集细胞, 提取 DNA 并通过 RF-LAMP 进行扩增。LAMP 产物的检测操作简便, 不需要进行繁琐的电泳, 可以直接使用荧光染料对目标序列产物是否得到扩增进行定性判断, 效果最好的荧光染料是 SYTO-9。研究结果表明该技术特异性强, 灵敏度高, 操作时间短且成本较低。因此, 在 VBNC 状态的检测方面其优于 PCR, 将会成为快速检测食源性致病菌和腐败菌 VBNC 状态的有力工具。

然而基于 DNA 染料检测方法的理论基础是以细胞膜的完整性判断细菌的死/活状态。在自然状态下, 细胞膜的裂解可能是细胞死亡的最极端也是最后一个过程。由于不同的灭菌或消毒方法作用机理不同, 造

成细胞死亡的最主要因素不同。理论上,因细胞膜损伤而死亡的细菌其 DNA 才能被 EMA/PMA 结合从而从复杂样本中去除,如 UV 照射可造成细菌迅速死亡,失去繁殖能力,但是 UV 杀菌主要是因为射线穿过细胞膜直接破坏了细菌 DNA 的结构,细菌的遗传物质不能被复制,并不涉及细胞膜的损伤。随着广大学者对此缺点的认识,已经有研究者提出解决这些问题的办法。例如 Soejima<sup>[53]</sup>等建议使用铂化合物,因为铂金属可以被哺乳动物细胞中的核酸配体螯合,不受光照影响且价格便宜。Wang 等<sup>[54]</sup>和 Li 等<sup>[55]</sup>试图向 PMA 溶液中添加十二烷基肌氨酸,结果发现 0.2% 的十二烷基肌氨酸可以增加 PMA 对死细胞的渗透,并且对活细胞几乎没有影响。但是这些优化方案也是基于死亡细胞和活细胞细胞膜的完整性而提出的,因此该检测方法的使用仍然受到灭菌方式的限制。

#### 2.4 噬菌体检测法

基于传统培养方法无法检测 VBNC 状态的微生物,而 PCR 几乎不区分死亡细胞,RT-PCR 中 mRNA 提取繁琐且环境条件要求高和基于 DNA 染料检测法对灭菌方式有要求的缺陷,一些研究者提出用特异性噬菌体检测 VBNC 细胞的方法。其原理是 VBNC 细胞能够引起噬菌体的复制,且处于不同状态的细菌释放后代噬菌体的量也不相同,通过建立噬菌体释放量和灭菌时间的标准曲线定量活菌细胞。例如 Ben 等<sup>[56]</sup>提出并验证了一种基于大肠杆菌特异性噬菌体(Q $\beta$ 噬菌体)的微生物检测法来检测和评估 VBNC 细胞。研究人员用 Q $\beta$ 噬菌体感染被 UV 照射的大肠杆菌,通过不同吸附动力学常数的比较和分析,确定了不同状态下大肠杆菌 ATCC 13965 和后代噬菌体释放量之间的关系。噬菌体感染水平和成熟 Q $\beta$ 后代噬菌体的释放量与活细菌量成正比。研究发现,基于大肠杆菌的 UV 灭活动力学曲线,细菌暴露于 45 mJ/cm<sup>2</sup> 紫外线可以使 99.99% 的细菌失活;当 UV 剂量为 60 mJ/cm<sup>2</sup> 和 90 mJ/cm<sup>2</sup> 时大肠杆菌进入 VBNC 状态;当 UV 剂量高达 120 mJ/cm<sup>2</sup> 时细菌已经进入亚致死状态,表明裂解噬菌体可以检测持续存在于辐照悬浮液中细菌的活性。因此 Q $\beta$ 噬菌体释放量可以作为检测紫外线照射后大肠杆菌 VBNC 状态的指标。

然而,另一种方法是用噬菌体磁阻生物芯片来评估细胞活力。这种固定化噬菌体可以有效吸附活菌。例如 Fernandes 等<sup>[57]</sup>将磁阻传感器与噬菌体探针组合使用以检测 VBNC 生理状态的肠炎沙门氏菌细胞,并通过细胞培养,流式细胞术和荧光显微镜评价。结果表明噬菌体检测法可以清楚地检测到死沙门氏菌细胞

中的活菌。其原理是溶液中游离的噬菌体对热致死细胞和 VBNC 细胞的识别能力不同,感染 VBNC 状态细胞的噬菌体没有裂解。这种能力证实了金表面上的固定化噬菌体检测信号的强弱与 VBNC 态的细胞浓度具有相同的趋势。在磁阻生物传感器平台中测试噬菌体探针,定量检测和鉴别死细胞、活细胞和 VBNC 细胞,具有高灵敏度。与没有区分死细胞的 PCR 技术相比,细胞识别中的噬菌体最大限度地减少了通常与大多数检测方法相关的假阴性和假阳性结果。

#### 3 VBNC 细胞的分离

随着人们对 VBNC 状态的了解,越来越多的研究者关注如何将 VBNC 细胞从正常的细胞中分离出来。关于该方面的文献较少,最近报道了两种不同的方法用于这种特殊状态细胞的分离。

第一种方法是在复苏因子作用的前提下,将其与 MPN 法相结合从而达到分离的目的。例如金夷<sup>[63]</sup>利用 Rpf (通过加热或胰蛋白酶水解可失活的由藤黄微球菌分泌的一种蛋白质)对 VBNC 细菌的复苏作用,设计 MPN 培养系,通过计数 MPN 值获得样品细菌可培养数,不但验证了 Rpf 对 VBNC 菌种的复苏促进作用,而且从印染废水与制药废水处理系统中成功分离出处于 VBNC 状态的菌群。类似的,Senoh 等<sup>[64]</sup>将 VBNC 状态的霍乱弧菌接种到含复苏因子的培养基和不含复苏因子的培养基上通过对比实验成功分离 VBNC 状态的霍乱弧菌。其原理是可培养的霍乱弧菌在硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose, TCBS)上能够形成典型的黄色菌落,处于 VBNC 状态的霍乱弧菌在复苏因子(a factor converting VBNC *V. cholerae* into a culturable state, FCVC)的作用下转化为可培养状态。如果在 F-TCBS 上出现黄色菌落,TCBS 上没有菌落形成,则表明此时的霍乱弧菌处于 VBNC 状态。但是实验会出现三种结果,其中 F-TCBS 上出现的黄色菌落数大于 TCBS 上的菌落数应该普遍存在,Senoh 等的实验结果是一个理想状态,难以达到快速分离 VBNC 状态的目的。此外,该方法最大的限制是要确定微生物 VBNC 状态的复苏因子。然而,对于不同的微生物和不同的生存体系其复苏因子可能不同,因此如果能够找到 VBNC 态微生物的共同特性,进而探究出它们共同的复苏因子便会简化分离过程。

第二种方法是基于 VBNC 状态与正常状态微生物分裂能力的不同探究的分离方法。例如 Wang 等<sup>[65]</sup>对氯诱导的 VBNC 态大肠杆菌进行研究,使用聚烯丙胺盐酸盐(Poly-allylamine hydrochloride, PAH)包被

磁性纳米颗粒 (Magnetic nanoparticles, MNPs) 捕获和释放细菌细胞。其原理是 VBNC 细菌不分裂, 正常细菌分裂能力较强, 在一定数量的 MNPs 下, VBNC 状态的细菌表面 MNPs 多, 被磁铁吸引到磁体表面, 再通过引入带负电荷的聚 4-苯乙烯磺酸钠 (Polysodium 4-styrenesulfonate, PSS) 后 MNPs 与 PSS 结合并吸附在磁体表面, VBNC 状态的细菌被释放从而得以分离。但是该方法分离的 VBNC 状态菌可能包含死菌, 其可行性还需进一步探究。

#### 4 展望

食源性微生物 VBNC 状态的不可培养性、潜在致病性以及可复苏性使其成为食品安全的重大隐患。因此, 选择合适的方法将其检出并从正常的菌群中分离出来是研究这类微生物的必要工作。随着分子生物学的快速发展, PCR 技术及其衍生技术已成为国内外食源性致病菌和腐败菌检测领域的研究热点, 但是这些技术仍然存在一定的缺陷, 例如 PMA-qPCR 技术对待检测样品的灭菌方法有要求, RT-PCR 技术中 mRNA 易于降解且提取过程复杂等。新研究的 PMA-RF-LAMP 技术虽然报道具有高特异性, 灵敏性和快速性, 但是该方法目前并没有广泛应用于 VBNC 状态的检测, 而且 PMA 的使用是基于细胞膜的完整性, 然而 VBNC 状态微生物的细胞膜也有可能只有部分被破坏, 基于噬菌体的微生物检测法受到细菌中固有物质的潜在抑制作用。此外, 现在也没有成熟的技术对 VBNC 状态的微生物进行分离和纯化, 已经报道的方法也存在不足之处。例如 Senoh 等利用含复苏因子的培养基和不含复苏因子的培养基通过对比试验进行分离的方法虽然简单, 但是前期要确定微生物 VBNC 状态的复苏促进因子。然而, 对于不同的微生物和不同的生存体系其复苏促进因子可能不同, 很难用于复杂样品的分离检测, 若能研究出适合所有微生物 VBNC 状态复苏的共同复苏促进因子, 分离方法便可简化。因此, 目前迫切需要研究能够快速、精确且成本较低的方法以检测和分离 VBNC 状态的食源性微生物, 从而为食品行业的健康快速发展做出贡献。

#### 参考文献

- [1] Pinto D, Santos M A, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 6
- [2] 李茂军. 食品中食源性致病菌污染状况分析[J]. 科技创新导报, 2015, 10: 20-21  
LI Mao-jun. Pollution analysis of foodborne pathogenic bacteria in food [J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2015, 10: 20-21
- [3] Huai-Shu Xu, N Roberts, F L Singleton, 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
- [4] R R Colwell. Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms [J]. *Nature Biotechnology*, 1985, 3(9): 817-820
- [5] 姜谦. 污泥厌氧消化工艺中病原菌 VBNC 状态的发生与复苏研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013  
JIANG Qian. Study on the occurrence and resuscitation of VBNC state in pathogen of sludge anaerobic digestion [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [6] 郝小斌. 副溶血性弧菌活的非可培养状态的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011  
HAO Xiao-bin. Study on non-culturable state of *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011
- [7] Serpaggi V, Remize F, Recorbet G, et al. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces* [J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(2): 438-447
- [8] Willenburg E, Divol B. Quantitative PCR: an appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 160(2): 131-136
- [9] 田聪, 余以刚, 肖性龙, 等. 金黄色葡萄球菌活的非可培养状态复苏及 PMA-qPCR 检测[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1390-1394  
TIAN Cong, YU Yi-gang, XIAO Xing-long, et al. Non-culturable state recovery and PMA-qPCR detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6): 1390-1394
- [10] Laura-Dorina Dinu, Suan Bach. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays [J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 268-273
- [11] 林怡雯. 再生水系统中 VBNC 病原菌复活特性与风险的研究[D]. 北京: 清华大学, 2013  
LIN Yi-wen. Study on the characteristics and risk of resurrection of VBNC pathogens in reclaimed water system [D]. Beijing: Tsinghua University, 2013

- [12] 黄韵,余以刚,黄秀丽,等.单增李斯特菌非可培养状态的诱导与PMA-qPCR检测[J].食品工业科技,2014,35(1):137-140  
HUANG Yun, YU Yi-gang, HUANG Xiu-li, et al. Induction and PMA-qPCR detection of non-culturable state of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Science and Technology, 2014, 35(1): 137-149
- [13] Fu B, Jiang Q, Liu H, et al. Quantification of viable but nonculturable *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. during sludge anaerobic digestion and their reactivation during cake storage [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(4): 1138-1147
- [14] Mock N M, Baker C J, Aver'Yanov A A. Induction of a viable but not culturable (VBNC) state in some *Pseudomonas syringae*, pathovars upon exposure to oxidation of an apoplastic phenolic, acetosyringone [J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 2015, 89: 16-24
- [15] Wu B, Liang W, Kan B. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholera* using propidiummonoazide combined with quantitative PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 115: 147-152
- [16] 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  
WANG Ya-li, BAO Qiu-hua, WANG Jun-guo, et al. Study on non-cultivable state of lactic acid bacteria [J]. China Dairy Industry, 2016, 44(3): 41-45
- [17] Capozzi V, Toro M R D, Grieco F, et al. Viable but not culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach [J]. Food Microbiology, 2016, 59: 196-204
- [18] Pienaar Jennifer A, Singh A, Barnard T G. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: a general review: review article [J]. African Journal of Laboratory Medicine, 2016, 5(1): 1-9
- [19] Oliver J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(4): 415-25
- [20] 马晓茜,张旭光,封永辉,等.细菌非可培养状态复苏方法的研究进展[J].安徽农业科学,2013,41(13):5644-5652  
MA Xiao-qian, ZHANG Xu-guang, FENG Yong-hui, et al. Advances in the resuscitation methods of viable but non-culturable state bacteria [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(13): 5644-5645
- [21] 余以刚,田聪,肖性龙,等.金黄色葡萄球菌 VBNC 状态的诱导条件和 EMA-qPCR 检测[J].华南理工大学学报(自然科学版),2013,41(1):127-132  
YU Yi-gang, TIAN Cong, XIAO Xing-long, et al. Study on the induction condition and EMA-qPCR detection of VBNC state of *Staphylococcus aureus* [J]. South China University of Technology (Natural Science Edition), 2013, 41(1): 127-132
- [22] Su C P, Jane W N, Wong H C. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 360-366
- [23] V P McGovern, J D Oliver. Induction of cold-responsive proteins in *Vibrio vulnificus* [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(14): 4131-4133
- [24] Smith Ben, Oliver James D. In situ gene expression by *Vibrio vulnificus* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 2244-2246
- [25] Shen-Wen Chiu, Shau-Yan Chen, Hin-chung Wong. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2008, 74(22): 7016-7022
- [26] Yanming Liu, Ainslie Gilchrist, Jing Zhang, et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1502-1507
- [27] Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, et al. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state [J]. Research in Microbiology, 2008, 159(9-10): 709-717
- [28] Lleò M D M, Pierobon S, Tafi M C, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(10): 4564-4567
- [29] Nilsson H O, Blom J, Abualsoud W, et al. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 11-19
- [30] Pai S R, Actor J K, Sepulveda E, et al. Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA [J]. Microbial Pathogenesis, 2000, 28(6): 335-342
- [31] Bates Tonya C, Oliver James D. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Microbiology, 2004, 42(2): 74-79

- [32] Nilsson L, Oliver J D, Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1991, 63(3): 1002-1005
- [33] GarcíaMaríaTeresa, Jones Snake, Pelaz Carmen, et al. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(5): 1267-1277
- [34] Cappelier Jean Michel, Besnard Valérie, Roche Sylvie M, et al. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery [J]. Veterinary Research, 2007, 38(4): 573-583
- [35] Kana Bavesh D, Gordhan Bhavna G, Downing Katrina J, et al. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro [J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(3): 672-684
- [36] Li Y, Chen J, Zhao M, et al. Promoting resuscitation of viable but non-culturable cells of *Vibrio harveyi* by a resuscitation promoting factor-like protein YeaZ [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017
- [37] Reissbrodt R, Rienaeker I, Romanova J M, et al. Resuscitation of *Salmonella* enterica serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4788-4794
- [38] Sperandio Vanessa, Torres Alfredo G, Jarvis Bruce, et al. Bacteria-host communication: the language of hormones [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(15): 8951-8956
- [39] Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, et al. Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxygen-induced viable but non-culturable state [J]. Microbiol. Immunol., 2007, 51(9): 875-881
- [40] Muela A, Seco C, Camafeita E, et al. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2008, 64(1): 28-36
- [41] Signoreto C, Lleò M, Canepari P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state [J]. Curr Microbiol., 2002, 44(2): 125-131
- [42] Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, et al. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state [J]. Res. Microbiol., 2008, 159(9-10): 709-717
- [43] Boaretti M, Lleò M M, Bonato B, et al. Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state [J]. Environ. Microbiol., 2003, 5(10): 986-996
- [44] Makino S-I, Kii T, Asakura H, et al. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(12): 5536-5539
- [45] Lower M, Unge A, Maraha N, et al. Effect of starvation and the viable but nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3160-3065
- [46] Lowder M, Oliver J D. The Use of modified GFP as a reporter for metabolic activity in *Pseudomonas putida* [J]. Microbiol. Ecology., 2001, 41(4): 310-313
- [47] 李影, 王伟利, 孟庆峰, 等. 活的非可培养状态沙门菌 RT-PCR 检测 [J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(1): 98-100  
LI Ying, WANG Wei-li, MENG Qing-feng, et al. RT-PCR for viable but non-culturable *Salmonella* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2013, 34(1): 98-100
- [48] González-Escalona N, Fey A, Höfle M G, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(4): 658-666
- [49] Zeng D, Chen Z, Jiang Y, et al. Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(2090)
- [50] 李聪聪. PMA-qPCR 活菌检测方法的建立与应用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012  
LI Cong-cong. Establishment and application of PMA- qPCR detection method [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [51] 庞贝妮, 顾文佳, 徐琼, 等. EMA/PMA-qPCR 技术检测活肠炎沙门氏菌方法的对比研究 [J]. 食品科技, 2014, 6: 298-302  
PANG Bei-ni, GU Wen-jia, XU Qiong, et al. Comparison of propidium monoazide-qPCR with ethidium monoazide-qPCR for differentiation of live vs. dead *Salmonella enteritidis* [J]. Food Science and Technology, 2014, 6: 298-302
- [52] Zhong Q, Tian J, Wang B, et al. PMA based real-time fluorescent LAMP for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state [J]. Food Control, 2016, 63:

- 230-238
- [53] Soejima T, Minami J, Xiao J, et al. Innovative use of platinum compounds to selectively detect live microorganisms by polymerase chain reaction [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2016, 113(2): 301-310
- [54] Wang H, Gill C O, Yang X. Use of sodium lauroylsarcosinate (sarkosyl) in viable real-time PCR for enumeration of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98(1): 89-93
- [55] Li H, Xin H, Li S F Y. Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable legionella pneumophila, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(24): 14249
- [56] Ben S M, Masahiro O, Hassen A. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage [J]. *Annals of Microbiology*, 2010, 60(1): 121-127
- [57] Fernandes E, Martins V C, Nóbrega C, et al. A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 52C(52C): 239-246
- [58] K Kogure, U Simidu, N Taga. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25(3): 415-420
- [59] Khan M M, Pyle B H, Camper A K. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 5088-96
- [60] 黄金林,焦新安,潘志明,等.直接酶联免疫吸附法和聚合酶链反应联合检测沙门菌的应用[J]. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(5): 331-334
- HUANG Jin-lin, JIAO Xin-an, PAN Zhi-ming, et al. Application of direct enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction in the detection of *Salmonella* [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2004, 38(5): 331-334
- [61] Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani G P, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria [J]. *Frontiers in Public Health*, 2014, 2: 103
- [62] Fakruddin M, Mannan K S, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective [J]. *Isrn Microbiology*, 2012, 2013(8113): 703813
- [63] 金夷.基于 Rpf 污水处理生物反应器中 VBNC 菌的分离与系统学研究[D].金华:浙江师范大学,2014
- JIN Yi. Solation and phylogentic studies of viable but non-culturable bacteria from sewage treatment bioreactor based on resuscitation promoting factor [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2014
- [64] Senoh, Mitsutoshi, Ghoshbanerjee J, Mizuno T, et al. Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state [J]. *Microbiology Open*, 2014, 3(2): 239-246
- [65] Wang C, Lin H, Ye C. Functional magnetic nanoparticles for facile viable but nonculturable bacteria separation and purification [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2016, 10(6): 8