

Food

A Series of Food Science
& Technology Textbooks

食品科技
系列

普通高等教育“十三五”规划教材

食品微生物 检验

李凤梅 主编

化学工业出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

食品微生物检验

李凤梅 主编



化学工业出版社

·北京·

本书是普通高等教育“十三五”教材规划和全国高等农林院校规划教材，书中全面、系统地了对食品微生物检验进行了阐述。教材以食品微生物学理论为基础，以食品安全为切入点，深入浅出地阐述食品微生物检验基础共性内容，又有机地结合了实践和国内外最新微生物检验标准。每章有本章提要、思考与练习等。本书是食品质量与安全专业、食品科学与工程专业、预防医学专业和各相关专业的教材，也可供从事食品微生物检验、传染病学和公共卫生学以及食品生产、科研和管理等工作等相关人员参阅。



图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检验/李凤梅主编. — 北京: 化学工业出版社, 2015.8

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-122-24532-8

I. ①食… II. ①李… III. ①食品微生物-食品检验-高等学校-教材 IV. ①TS207.4

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第151423号

责任编辑: 赵玉清
责任校对: 宋 玮

文字编辑: 何 芳
装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张21 字数529千字 2015年10月北京第1版第1次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 42.00 元

版权所有 违者必究

《食品微生物检验》编写人员

主 编 李凤梅

副 主 编 刘 玲

李有文

朱英莲

编 者 (按拼音排序)

都启晶 青岛农业大学

李凤梅 青岛农业大学

李有文 新疆塔里木大学

刘 玲 沈阳农业大学

杨 宁 山西农业大学

赵宏坤 青岛农业大学

朱英莲 青岛农业大学

前言

食品安全是全球性公共卫生问题，无论在发达国家还是在发展中国家，由食品安全问题导致的食源性疾病都是一个严峻的挑战，人人都面临着患食源性疾病的危险。据世界卫生组织统计，全世界每年数以亿计的食源性疾病患者中，70%是由于各种病原生物污染的食品和饮用水引起的，可见食品微生物检验在食品安全中的重要意义。

食品微生物检验是利用微生物的技术和方法对食品中影响食品安全的微生物进行检验、鉴定，以保证食品安全。由于食品千差万别，食品中污染的微生物种类也多种多样，检验、鉴定方法也各有所异。经过与编写人员和相关人员的反复研究、讨论，借鉴国内外相关学科的理论体系，我们构建了食品微生物检验的基本框架。在各位编者的努力和配合下，《食品微生物检验》教材面世了，它在食源性病原菌与食品安全和人类健康关系的基础上，全面、系统地介绍了食品常规检测项目和常见的病原菌的国家标准和部分相关国际标准的检测方法，并介绍了不同食品中重点监测的微生物指标和检测方法。全书共7章，前2章为总论，后5章为各论。本书介绍了各种食源性病原菌的基础知识及其与食源性疾病的对应关系、相关的食品微生物检验标准。本书不是对不同微生物检测步骤和检测要求的简单罗列，而是针对食品微生物实验课时多理论课时少的特点，既重视基础知识的阐述，又深入浅出地加强了对检测方法理论性内容的阐述，既有机地结合实践，又尽可能地与当前最新研究成果结合，汇总了最新食品安全国家标准和国际标准，并提供了大量的图片，增强学生对检测微生物的直观性。本教材不仅可以作为高等学校食品质量与安全专业及其相关专业的教材或教学参考书，还可供从事食品安全、卫生检验和食品科学研究及加工等领域的专业人员参阅。

食品微生物检验涉及食品微生物学、食品安全学、病原生物学和食品科学等学科知识，是这些学科有机融合的产物。本教材的编者多年从事相关学科教学与科研的工作，并在各自的领域取得一定的业绩。付出辛勤劳动参与本书编写的主要作者有：青岛农业大学李凤梅（第1章、第2章第2~4、6节和第4章第1~9节、13节、第5章第2节部分及附录）、山西农业大学杨宁（第2章第1、5节和第5章第1、3节）、新疆塔里木大学李有文（第3章）、青岛农业大学朱英莲（第4章第10~12节和第6章第1、2、5、6节）和都启晶（第6章第3、4节和第4章第14节）、沈阳农业大学刘玲（第7章）。本教材的出版是各位编者共同协作、集体智慧的结晶。青岛农业大学食品科学与工程学院赵宏坤教授为此教材的出版提出了宝贵的建议，山东省出入境检验检疫局食品农产品检验中心的雷质文研究员在书稿材料方面提供了帮助，化学工业出版社的编辑们为本书的出版付出了辛勤的努力，在此，一并向他们表示真诚的感谢！同时还要感谢在本教材编写过程中理解、支持和鼓励我们的所有人，向他们表示最崇高的敬意。

尽管参加本书编写的所有作者为写好本书付出了艰辛的劳作，但作为食品微生物检验的

第一版教材，由于涉及领域广泛、编写水平有限，加之编写过程仓促，书中难免有不足和疏漏之处。我们打算在本教材使用后，广泛征集广大授课教师、学生和其他读者的使用意见，对本教材加以修改，敬请广大同行和读者提出批评和建议，以便我们今后修订、补充和进一步完善本部教材。

青岛农业大学 李凤梅
2015年4月

目 录

第1章 概论

1

1.1 食品腐败菌和致病菌	2
1.1.1 食品的腐败及腐败菌	2
1.1.2 优势腐败菌	2
1.1.3 食品卫生指示菌	3
1.2 细菌活的非可培养状态	3
1.2.1 概念	3
1.2.2 VBNC 状态细菌培养性的恢复	4
1.2.3 VBNC 状态细菌数的检验方法	5
1.2.4 研究意义	6
1.3 致病菌和食物中毒	6
1.3.1 致病菌及食品中各种主要致病菌的来源	6
1.3.2 细菌性食物中毒	6
1.3.3 引起细菌性食物中毒的致病菌潜伏期及发症菌量	8
1.4 食品微生物检验特点和相关标准	9
思考与练习	11

第2章 食品微生物检验基本技术及技能

12

2.1 微生物形态结构和培养特性观察	13
2.1.1 细菌简单染色	13
2.1.2 革兰氏染色	13
2.1.3 细菌培养特征的观察	15
2.1.4 放线菌培养特征的观察	17
2.1.5 酵母菌培养特征的观察	18
2.1.6 霉菌培养特征的观察	19
2.2 微生物生长的测定	21
2.2.1 微生物生长的定义	21
2.2.2 微生物数目的测定	21
2.2.3 微生物生长量的测定	22
2.3 细菌生理特征试验	22
2.3.1 耐热试验	22
2.3.2 最高、最低和最适生长温度试验	23

2.3.3	耐渗试验	23
2.3.4	耐盐和需盐试验	23
2.3.5	嗜酸碱试验	23
2.3.6	紫外线杀菌试验	24
2.3.7	抑菌剂抑菌试验	24
2.3.8	细菌受伤试验及受伤菌恢复试验	25
2.3.9	动力试验	25
2.3.10	需氧/厌氧性试验	25
2.4	细菌生化试验	26
2.4.1	糖类代谢试验	26
2.4.2	蛋白质及氨基酸代谢试验	31
2.4.3	呼吸酶类试验	34
2.4.4	碳盐和氮盐利用试验	38
2.4.5	毒性酶试验	40
2.4.6	其他实验	43
2.5	样品的采集与制备	45
2.5.1	样品的采集	45
2.5.2	样品的制备	49
2.6	其他检验技术与基本技能	50
2.6.1	培养基的制备	50
2.6.2	消毒与灭菌技术	53
2.6.3	微生物接种、分离和培养	55
2.6.4	血清学反应	59
	思考与练习	62

第3章 食品微生物常规检验

63

3.1	概述	64
3.1.1	食品微生物检验的指标	64
3.1.2	食品微生物常规检验的标准和方法	64
3.2	食品中菌落总数的测定	64
3.2.1	基本知识	64
3.2.2	国家标准菌落总数检验方法	65
3.2.3	ISO 4833-1:2013 菌落总数测定	70
3.2.4	AOAC 菌落总数测定方法	71
3.2.5	GB、ISO 和 AOAC 三个标准菌落总数测定方法比较	73
3.3	食品中大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希氏菌的检验	73
3.3.1	基本知识简介	73
3.3.2	大肠菌群检验方法	76
3.3.3	粪大肠菌群检验方法	80
3.3.4	大肠埃希氏菌检验方法	81

3.3.5	ISO 大肠菌群和大肠埃希氏菌测定方法	84
3.3.6	AOAC 大肠菌群和大肠埃希氏菌类测定方法	87
3.3.7	GB、ISO 和 AOAC 三大标准检测方法的差异比较	88
3.4	食品中肠球菌的检验	89
3.4.1	基本知识简介	89
3.4.2	食品中肠球菌的计数	91
3.4.3	ISO 7899-2:2000 水中肠球菌的检验	94
	思考与练习	94

第 4 章 食品中常见致病菌检验

96

4.1	食品中致病菌分离	97
4.1.1	受伤菌及其恢复生长	97
4.1.2	食品微生物检验中常用的抑菌物质	99
4.1.3	致病菌分离	105
	思考与练习	107
4.2	食品中沙门氏菌检验	107
4.2.1	基础知识	108
4.2.2	常用检验培养基及检测原理	108
4.2.3	国家标准检验方法	112
4.2.4	FDA/BAM (肉制品、肉副产品、动物产品) 沙门氏菌检验流程	116
4.2.5	ISO 6579:2002 沙门氏菌检测的基准方法	116
	思考与练习	118
4.3	食品中志贺氏菌检验	119
4.3.1	基础知识	119
4.3.2	常用检验培养基	122
4.3.3	国家标准检验方法	123
4.3.4	ISO 21567:2004 志贺氏菌检测方法	125
	思考与练习	127
4.4	食品中大肠埃希氏菌 O157:H7 的检验	127
4.4.1	基础知识	128
4.4.2	常用检验培养基及检测原理	129
4.4.3	国家标准检验方法	129
4.4.4	FDA、USDA 大肠埃希氏菌 O157:H7 检测流程	130
4.4.5	ISO 16654:2001 大肠埃希氏菌 O157 检测基准方法	131
	思考与练习	132
4.5	食品中副溶血性弧菌的检验	132
4.5.1	基础知识	132
4.5.2	常用检验培养基及检测原理	135
4.5.3	国家标准检验方法	136
	思考与练习	139

4.6 食品中金黄色葡萄球菌检验	139
4.6.1 基础知识	139
4.6.2 常用检验培养基及检验原理	140
4.6.3 国家标准检验方法	141
4.6.4 ISO 6888-3:2003 法	144
4.6.5 FDA/BAM 金黄色葡萄球菌检验——MPN 法	144
思考与练习	145
4.7 食品中溶血性链球菌检验	145
4.7.1 基础知识	146
4.7.2 国家标准检验方法	147
思考与练习	148
4.8 食品中产气荚膜梭菌的检测	148
4.8.1 基本知识	149
4.8.2 常用培养基及检测原理	150
4.8.3 国家标准检验方法	151
思考与练习	153
4.9 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验	153
4.9.1 基础知识	153
4.9.2 常用检验培养基及检测原理	155
4.9.3 国家标准检验方法	157
4.9.4 FDA/BAM 单核细胞增生李斯特氏菌检验	160
4.9.5 ISO 11290-1:1996/And. 1:2004 (E) 方法	160
思考与练习	162
4.10 食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验	162
4.10.1 基础知识	162
4.10.2 常用检验培养基及检测原理	163
4.10.3 国家标准检验方法	163
4.10.4 FDA/BAM 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验	165
思考与练习	166
4.11 食品中蜡样芽孢杆菌检验	166
4.11.1 基础知识	166
4.11.2 常用检验培养基及检测原理	167
4.11.3 国家标准蜡样芽孢杆菌检测方法	167
4.11.4 FDA/BAM 蜡样芽孢杆菌检测	169
思考与练习	170
4.12 食品中空肠弯曲菌检验	170
4.12.1 基础知识	170
4.12.2 常用检验培养基及检测原理	171
4.12.3 国家标准检测方法	171
4.12.4 ISO 10272-1:2006 弯曲杆菌属检测和计数用水平方法	174

思考与练习	175
4.13 食品中肉毒梭状芽孢杆菌检验	175
4.13.1 基础知识	175
4.13.2 国家标准检验方法	177
思考与练习	179
4.14 常见细菌毒素检测	179
4.14.1 细菌毒素分类	179
4.14.2 细菌毒素的分析方法	180
4.14.3 葡萄球菌肠毒素检验——ELISA 试剂盒检测	180
思考与练习	182

第 5 章 食品中真菌检验及其毒素检测

183

5.1 霉菌和酵母菌计数	184
5.1.1 霉菌和酵母计数（倾注法）	184
5.1.2 霉菌直接镜检计数法	185
5.2 常见产毒霉菌的分离与鉴定	186
5.2.1 样品的采集	187
5.2.2 霉菌的分离	187
5.2.3 霉菌的鉴定	189
5.3 真菌毒素中毒及其检测	196
5.3.1 真菌毒素的分类及其毒性分级	196
5.3.2 食品中常见真菌毒素及其致病性	197
5.3.3 真菌毒素的常用检验方法	198
思考与练习	201

第 6 章 食品微生物快速检验

202

6.1 基于免疫学的检验方法	203
6.1.1 免疫标记技术概述	203
6.1.2 酶联免疫反应	203
6.1.3 其他免疫学检验方法	206
6.2 基于酶学的检验方法	207
6.2.1 酶触反应及应用	207
6.2.2 显色培养基及应用	208
6.2.3 3M Petrifilm™ 测试片及应用	209
6.3 基于分子生物学的检验方法	210
6.3.1 PCR 技术	210
6.3.2 实时荧光定量 PCR 技术	212
6.3.3 核酸杂交法	213
6.3.4 基因芯片技术	214
6.3.5 环介导等温扩增	215

6.4	基于生物传感器的检验方法	217
6.4.1	生物传感器技术分类及原理	217
6.4.2	生物传感器技术在食品微生物检测中的应用	219
6.5	微生物自动化仪器检测	220
6.5.1	Mini-VIDAS 微生物自动酶标检测仪	220
6.5.2	ATB new 半自动细菌鉴定和药敏分析系统	222
6.5.3	全自动微生物鉴定及药敏分析系统 VITEK	222
6.5.4	BD BBL Crystal™ 细菌鉴定系统	224
6.5.5	自动化血培养检测和分析系统	226
6.5.6	全自动抗原抗体检测系统	227
6.6	现代食品微生物检测技术的发展趋势	227
	思考与练习	229

第7章 常见食品的微生物检验

230

7.1	饮用水的微生物学检验	231
7.1.1	菌落总数和大肠菌群检验	232
7.1.2	瓶装水中铜绿假单胞菌的检验	234
7.2	肉与肉制品的检验	237
7.2.1	肉的腐败变质	237
7.2.2	鲜肉中的微生物及其检验	238
7.2.3	冷藏肉中的微生物及其检验	240
7.2.4	肉制品中的微生物及其检验	241
7.3	乳及乳制品的检验	242
7.3.1	鲜乳中的微生物	243
7.3.2	乳制品中的微生物	244
7.3.3	婴儿乳粉中阪崎肠杆菌的检验	245
7.3.4	双歧杆菌的检验	247
7.3.5	乳酸菌的检验	250
7.3.6	鲜乳中抗生素残留的检验	251
7.4	蛋及蛋制品的检验	256
7.4.1	鲜蛋的腐败变质	257
7.4.2	鲜蛋的检验	257
7.5	水产食品的检验	258
7.5.1	样品的采集	258
7.5.2	检样的处理	259
7.5.3	水产食品检验	259
7.6	罐头食品的检验	259
7.6.1	罐头食品微生物污染的来源	260
7.6.2	罐头食品污染的微生物种类	260
7.6.3	罐头食品的微生物检验	261

附录 **267**

附录 1 每克(每毫升)样品中最可能数(MPN)检索 268

附录 2 染色剂和指示剂配制 269

附录 3 生化试验培养基和试剂 271

附录 4 食品微生物检验实验用试剂及培养基 281

附录 5 食品质量与安全有关网站 318

附录 6 美国 FDA 细菌学分析手册(BAM)第 8 版修订版 A 目录 319

参考文献 **321**

第 1 章 概论

● [本章提要]

本章介绍了食品腐败菌、致病菌及指示菌含义，食品中各种主要致病菌的来源，引入了细菌 VBNC 状态概念，并简单介绍了细菌性食物中毒及引起中毒的细菌特性。

1.1 食品腐败菌和致病菌

一般食品工厂环境中存在各种微生物，食品自身也可能带微生物，微生物在适宜条件下就会迅速增殖，形成一种或几种主要的微生物菌相。经过一定时间，不同的食品中就会形成不同食品各自特有的菌相。

1.1.1 食品的腐败及腐败菌

(1) 食品的腐败变质 食品的腐败变质广义是指食品受到各种内外因素的影响，造成其原有化学性质或物理性质和感官性状发生变化，降低或失去其营养价值和商品价值的过程。

一般来说，食品发生腐败变质与食品本身的性质、污染微生物的种类和数量以及食品所处的环境等因素有着密切的关系。它们三者相互作用、相互影响。造成食品腐败变质的原因很多，有物理因素、化学因素以及生物性因素。微生物的污染是导致食品腐败变质的最重要的根源。

食品的腐败变质狭义是指食品在一定的环境因素影响下，在以微生物为主的多种因素作用下所发生的食品失去或降低食用价值的一切变化，包括食品成分和感官性质的各种变化，从而使食品失去食用价值。

由微生物引起蛋白质食品发生的变质，通常称为腐败，引起脂肪发生的变质称为酸败，引起的糖类物质发生的变质，习惯上称为发酵或降解。

(2) 腐败菌 是指能降解蛋白质，并产生如氨、硫化氢、胺、吲哚和酚类物质等恶臭性物质的一类细菌。其产生的这些废物不但是恶臭，更严重的是它有损人体健康，以致诱发肿瘤及促使衰老。在人体抵抗力差或微生态失调时，这些菌群肆虐，大量繁殖并释放毒素，造成痢疾、腹泻、炎症等。人体的腐败菌有梭状芽孢杆菌、类杆菌、链球菌、韦荣球菌、大肠埃希氏菌等。

1.1.2 优势腐败菌

细菌菌相是指共存于食品中的细菌种类及其相对数量的构成，其中数量较大的细菌为优势菌。

食品腐败时一小部分微生物先在其中优势生长，该小部分微生物群便成为食品腐败的主要原因菌。在食品正常储存过程中导致食品腐败而占优势生长的菌称为优势腐败菌。

食品中优势腐败菌一般有假单胞菌属、黄杆菌属、微球菌属、产碱菌属、乳杆菌属、芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、肠球菌属、大肠埃希氏菌属、变形杆菌属以及霉菌和酵母菌等。假单胞菌属具有很强的利用各种碳源的能力，是大多数食品的主要腐败菌。产碱菌属能利用不同的有机酸和氨基酸为碳源，常与高蛋白食品变质有关。棒杆菌在新鲜食物中经常出现，但不新鲜时失去踪影。

冷却肉能够最大限度地保持肉品风味和营养价值，导致肉类腐败的优势腐败菌中猪肉、羊肉和牛肉最常检出的是假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.)、气单胞菌 (*Aeromonas* spp.)、肠杆菌 (*Enterobacteriaceae* spp.) 和热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*)。腐败菌产生的生物胺是冷却猪肉的主要腐败产物，其中又以尸胺变化较为显著。

优势菌的变化取决于以下条件。

① 环境因素：环境温度、湿度变化、氧气有无及气体组成、氧化还原电位的变化等。

② 食品因素：食品化学成分、水分活度、酸碱度的改变。

③ 已定居的微生物之间及已定居的微生物与环境之间拮抗、竞争、共生等相互作用。

如在食用肉中，需氧菌的生长导致氧化还原电位的下降，使沙门氏菌、大肠埃希氏菌、变形杆菌等兼性厌氧菌快速生长，10℃以下时李斯特氏菌可能成为优势菌。若以63℃ 30min处理食品后，剩余菌一般为球菌和产芽孢菌。

如图1-1所示，菌落总数和优势腐败菌在冷藏第5天后显著增长，与第5天前差异显著 $P < 0.05$ 。优势腐败菌中肠杆菌增长最快，热杀索丝菌相对最慢。优势腐败菌是导致冷却猪肉菌落总数快速上升并发生腐败的作用微生物。

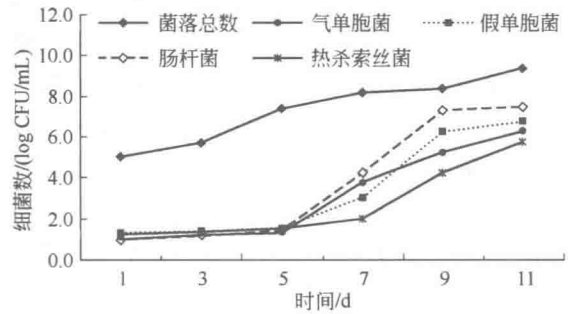


图 1-1 冷却猪肉冷藏过程中菌落总数和优势腐败菌的变化

1.1.3 食品卫生指示菌

在环境中病原微生物数量少、种类多、生物学性状多样，检验和鉴定的方法比较复杂，食品中直接检测目的病原微生物有一定的难度，因此需要寻找某些带有指示性的微生物。

食品卫生指示菌 (hygienic indicator bacteria) 是在常规安全卫生检测中，用以指示检验样品卫生状况及安全性的指示性微生物。检验指示菌的目的，主要是以指示菌在检品中存在与否以及数量多少为依据，对照国家卫生标准，对检品的饮用、食用或使用的安全性做出评价。

食品卫生指示菌可分为三种类型。

(1) 评价被检样品的一般卫生质量、污染程度以及安全性，最常用的指标是菌落总数、霉菌数和酵母菌数。

(2) 特指粪便污染的指示菌 一般认为，作为食品被粪便污染的理想指示菌应具备以下特征。

① 来自于人或动物的肠道，并在肠道中占有极高的数量。

② 在肠道以外的环境中，具有与肠道病原菌相同的对外界不良因素的抵抗力，能生存一定时间，生存时间应与肠道致病菌大致相同或稍长。

③ 培养、分离、鉴定比较容易。

一般将大肠菌群、粪链球菌、产气荚膜杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等作为粪便污染指示菌。其中以大肠菌群最常使用，他们的检出标志着样品受过人、畜粪便的污染，而且有肠道病原微生物存在的可能性。

(3) 其他指示菌 由于不同食物的生态环境不同，其腐败的优势菌也不同，因此可以选择一些微生物作为特定食品的指示菌。如明串珠菌常出现在高糖食物。假单胞菌、乳酸杆菌经常出现在肉类食品中，可以选作食用肉新鲜度的指示菌。

1.2 细菌活的非可培养状态

1.2.1 概念

美国 Colwell 实验室在 1982 年提出活的非可培养 (viable but non culturable, VBNC)

状态微生物概念，他们发现将霍乱弧菌和大肠埃希氏菌转到不含营养物质的盐水 M9 盐溶液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.7g, KH_2PO_4 3.0g, NaCl 5g, NH_4Cl 1.0g, 蒸馏水 1000mL) 中，经长时间的低温保存，细菌会进入一种有代谢活力但在正常实验室培养条件下不能形成菌落的状态，称为活的非可培养状态，即 VBNC 状态。图 1-2 是用于研究 VBNC 状态细菌的装置，用于定期取样检查 M9 盐溶液中细菌的存活状态。

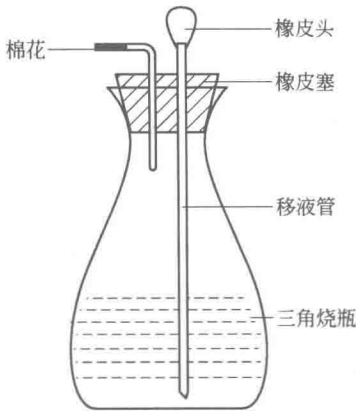


图 1-2 用于研究 VBNC 状态细菌的装置

VBNC 状态是微生物在自然界中生存的一种状态，是指那些存活而不增殖的微生物，它们在受到外界压力刺激后，通过一系列类似分化的遗传程序而使自身处于一种能抵抗饥饿和压力的状态。处于 VBNC 状态下的微生物不能在普通的培养基上形成菌落或只能形成肉眼不可见的微小菌落，但如果给予合适条件又能够恢复生长繁殖。

样品中有致病菌存在，但有可能培养不出来，如在冬天 5°C 以下的海水中很难分离到副溶血性弧菌，但在夏天很容易分离到；在普通培养基上不生长的带耐药性标记的霍乱弧菌，能在游离于腹腔的结扎的兔肠管中生长等。这种现象在沙门氏菌、大肠埃希氏菌、空肠弯曲菌、霍乱弧菌等许多细菌的试验中也得到了证实。进入这种状态的原因可能是由于其生存环境的变化，如营养、渗透压、水分活度的改变等。经实验证明，霍乱弧菌、大肠埃希氏菌 O157、副溶血性弧菌在低温和营养贫乏的状态下经过几十天至 100 多天后，人工进入 VBNC 状态。经测定表明，进入 VBNC 状态后，细菌的脂肪酸组成发生明显改变。

一些实验结果表明，自然界中约 90% 以上的细菌用常规方法是培养不出来的，有大量 VBNC 状态（活的但是培养不出来）的细菌存在。用微量酵母膏试液加萘啶酮酸，然后接种大肠埃希氏菌。此时发现菌体细胞变大、伸长，但因萘啶酮酸的作用，菌体无法分裂增殖。由此判断自然界中有许多细菌有增殖能力，但不能培养，因为有抑制其细胞分裂的物质存在。有人用特殊方法观察到土壤稀释液培养的菌落计数平板中有许多 $10\sim 20$ 个细菌菌体组成的微菌落存在，但目前还没有办法使这些微菌落培养成肉眼可见的菌落。这些微菌落在适当的培养基中有可能形成正常大菌落。

大体上可以把 VBNC 细菌分成两类：一类是常见的已知的细菌，如霍乱弧菌等，它们在某些条件下能够进入不可培养状态；另一类是未知的至今还未曾获得分离培养的细菌，其存在一般通过其 16S rRNA 的 PCR 扩增和测序来确定。

1.2.2 VBNC 状态细菌培养性的恢复

某些 VBNC 状态的微生物在合适条件下是可以恢复培养性的。例如将对数期后期的大肠埃希氏菌 E32511/HSC 菌株接种在无菌蒸馏水中， 4°C 条件下培养 21d，再将其涂到普通平板培养基上，发现菌落数由 $3 \times 10^6 \text{CFU/mL}$ 下降到 0.1CFU/mL ，但如果在平板培养基上加入能降解过氧化氢的物质如过氧化氢酶、丙酮酸钠或 α -酮戊二酸，则可使菌落数在 48h 内达到 $10^4 \sim 10^5 \text{CFU/mL}$ 。对此现象的成因，Bloomfield 等推测那些由于营养缺乏而进入 VBNC 状态的微生物，所产生的一个变化就是营养基质与转运途径之间亲和力大大提高了，当重新接种到营养丰富的培养基上时，由于过量营养物质的摄入，基质会迅速氧化导致过多的自由基和超氧化物的产生，损害了细胞甚至能导致细胞死亡。而加入具有除氧性质的物质