

# 不同处理方法对芽苗菜表面微生物的控制和消除

魏超, 代晓航, 郭灵安

(四川省农业科学院分析测试中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(成都), 四川成都 610066)

**摘要:** 为了深入研究即食蔬菜在不同处理下微生物的消长变化及种群结构变化规律, 本实验从芽苗菜入手, 采用水洗, 辐照、冷热激, 含氯消毒剂、有标识杀菌成分的清洗剂等5种方法对芽苗菜进行处理, 建立微生物总数动态生长模型, 利用微生物宏基因组学的方法调查处理前后的微生物种群丰度变化, 选择性培养后采用基质辅助电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)对优势种群进行鉴定。实验结果表明即食芽苗菜微生物总数稳定在一个数量级(5~6 lg CFU/g), 处理会将微生物种群结构平衡打破, 但经过一段时间微生物总量会恢复之前稳定水平。其中辐照方法影响最为明显; 水活性方法(水洗, 冷热激, 有标识杀菌成分的清洗剂清洗)影响相对较小且恢复较快, 但内含不同成分, 微生物控制效果稍有差异。实验结论为处理原理的差异是影响微生物种群结构的主要原因。此外辐照方法会将芽苗菜优势种群假单胞菌属和乳酸菌属改变为芽孢菌属, 并在其中检出蜡样芽孢杆菌, 增加了食用安全风险, 就是说即食蔬菜微生物的控制最有效的方法并不一定是最安全的方法。在即食果蔬微生物控制中不仅要考虑微生物总量的降低也需要综合微生物微观生态学的其他因素。

**关键词:** 芽苗菜; 清洗; 辐照; 宏基因组; 微生物预测模型; 基质辅助电离飞行时间质谱

文章编号: 1673-9078(2018)08-240-245

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.035

## Different Methods to Control and Eliminate the Microorganisms on the Surface of Sprouts

WEI Chao, DAI Xiao-hang, GUO Ling-an

(Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Agricultural Products Quality and Safety Risk Assessment Laboratory of Ministry of Agriculture (Chengdu), Chengdu 610066, China)

**Abstract:** This research started with five different treatments of sprouts i.e. water washing, irradiation, cold and heat shocks, application of chlorine-containing disinfectant or cleaning agent with a labelled bactericidal component, to investigate in depth the changing trends of the microbial growth and decline and the population structure of microorganisms in the ready-to-eat vegetables under different treatments. The dynamic growth models for the total amount of microorganisms were then established. The changes in the abundance of microbial populations before and after the individual treatment were investigated by metagenomics, and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to identify the dominant population after selective culture. The experimental results showed that the total number of microorganisms in the ready-to-eat sprouts remained constant at an order of magnitude (5-6 lg CFU/g). The treatments broke the balance of the microbial population structure, however, the total number of microorganisms would return to the previous stable level after a certain period of time. Among the different treatments, irradiation exhibited the most obvious influence. The methods capable of altering water activity (i.e. water washing, cold and heat shocks and cleaning agent with a labelled bactericidal component) seemed less effective causing quicker recovery of microbial amounts, with the effect on microorganisms slightly varying with the different labelled bactericidal component. It was concluded that the differences in the working mechanisms underlying the treatments accounted mainly for the changes in microbial population structure. In addition, the irradiation method could change the dominant population in the sprouts, *Pseudomonas Sp.* and *Lactobacillus Sp.*, into *Bacillus Sp.* (with *Bacillus cereus* detected), which increased food poisoning risk with its consumption. That is, the most effective method of suppressing the microorganisms in the ready-to-eat vegetables is not necessarily the safest method. In the control of microorganisms in ready-to-eat fruits and vegetables, not only the reduction of the total microbial amount but also other factors related to the microecology of microorganisms must be considered.

收稿日期: 2018-02-05

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP 2017013)

作者简介: 魏超 (1985-), 女, 助理研究员, 硕士研究生, 研究方向: 食品及农产品微生物检测及相关风险评估

**Key words:** Sprouts; Cleaning; Irradiation; Metagenome; Prediction model; MALDI-TOF MS

我国是生产和食用芽苗菜最早的国家,通常情况下,植物在芽苗期的营养成分优于种子和成熟期<sup>[1]</sup>。芽苗菜被认为是一种自然健康的食品,但由于芽苗菜是生食的,所以自1973年以来,在美国和其他一些国家多次爆发了因为食用芽苗菜而引发的食源性疾病<sup>[2]</sup>。蔬菜产品中长期存活和生长着各种微生物,竞争或互利微生物的群落状况与蔬菜产品的环境条件及加工处理方法有关,学者建议使用竞争微生物来提高最小化加工食品的安全性<sup>[3]</sup>。有研究表明芽菜中典型的需氧菌总数在 $10^7 \sim 10^9$ 范围<sup>[4]</sup>,在商业操作下有污染的种子在萌芽和生长过程中病原菌会增加几个对数单位<sup>[5]</sup>,芽苗菜食用安全风险隐患较高,对其表面微生物的调查、控制成为研究的热点<sup>[6-8]</sup>。预测微生物学是数量化描述微生物的学科,它对食品的保鲜期做出合理预测,从而成为监测储藏、流通和零售过程安全性评估的有效手段<sup>[9-12]</sup>。宏基因组(Metagenome)(也称微生物环境基因组 Microbial Environmental Genome, 或元基因组),是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,以功能基因筛选和/或测序分析为研究手段,可以了解微生物多样性、种群结构、进化关系等的微生物研究方法<sup>[13,14]</sup>。

本研究采用多种物理化学等清洗手段对芽苗菜表面微生物进行清除,采用宏基因组学的方法研究清洗前后微生物的种群变化,建立清洗后芽苗菜的微生物生长模型,对特征微生物进行MALDI-TOF MS鉴定,本文旨在对不同方法处理下的芽苗菜微观微生物生态学进行研究,并评价不同清除方法对芽苗菜微生物风险控制能力,旨在为芽苗菜生产和食用安全风险监控提供理论保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

材料:麻子豆苗,成都某生产基地购得。

试剂:平板计数琼脂培养基、营养琼脂培养基、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP),北京陆桥生物科技有限公司; $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸(2-cyano-3-(3-hydroxyphenyl)-CHCA),美国SIGMA公司;乙腈、乙醇,美国Fisher Scientific公司;甲酸,美国TEDIA公司;含氯消毒剂(主要成分为二氯异氰尿酸钠),四川久荣化工;果蔬清洗剂(主要成分:阴离子表面活性剂,两性离子表面活性剂,某天然杀菌成分),法国优龙纳特公司;小量DNA提取试剂盒

E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit, 美国OMEGA公司, Qubit3.0 DNA检测试剂盒, 美国Life公司, 2×Taq Master Mix, 美国Vazyme公司。

### 1.2 仪器与设备

GXZ 智能光照培养箱, 宁波江南仪器厂; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS), 日本岛津公司; HF-safe-1200 生物安全柜, 上海立申仪器设备有限公司; YM75Z 高压灭菌锅, 上海三申仪器设备有限公司; 菌落计数器, 杭州迅数数码科技公司; Pico-21 台式离心机, Thermo Fisher 公司; 凝胶成像系统, 美国UVP; 100TM Thermal Cycler PCR 仪, BIO-RAD 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 微生物总DNA的提取与测序分析

总DNA提取:取15 g芽苗菜样品加入25 mL 1×PBS 溶液中强烈震荡,使样品表面菌体能够被洗到液体中,取适量震荡液体分多次加入无菌离心管12000 r/min 离心2 min,弃上清,留取沉淀进行提取。DNA提取方法具体提取步骤参照E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit的试剂盒使用说明书<sup>[15]</sup>。

16S rDNA 扩增: V3-V4 引物: 341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', 805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'; 扩增程序: 第一次扩增预变性94℃ 4 min; 94℃ 30 s、45℃ 20 s、65℃ 30 s, 进行5个循环; 94℃ 20 s、55℃ 20 s、72℃ 30 s, 进行20个循环; 延伸72℃ 7 min。第二轮扩增引入Illumina 桥式PCR 兼容引物, 预变性95℃ 3 min; 94℃ 20 s、55℃ 20 s、72℃ 30 s, 共进行5个循环; 延伸72℃ 7 min。PCR 结束后, PCR 产物进行琼脂糖电泳检测, 结果见图1。测序由上海生工完成。

数据分析:通过barcode 区分样品序列,去除非特异性扩增序列及嵌合体,根据序列之间的距离采用UPORSE 软件进行聚类,构建操作分类单元(OTU),在RDP classifier 和NCBI blast+软件相应数据库下对OUT 进行比对,并进行Alpha 多样性分析,计算物种丰度。

#### 1.3.2 芽苗菜微生物消除方法

处理方法分别为:①水洗,自来水冲洗5 min; ②辐照,辐照剂量3.5 kgy; ③冷热激,80℃ 无菌水浸泡5 s, 4℃ 冰水浸泡30 min, 反复一次; ④含氯消毒剂,配置浓度 $\phi=1.0\%$ 水溶液,样品浸泡1 min,自来



水冲洗 1 min; ⑤果蔬清洗剂, 配置浓度  $\phi=1.0\%$  水溶液, 样品浸泡 1 min, 自来水冲洗 1 min。未经任何处理芽苗菜为空白对照。

### 1.3.3 微生物预测模型的建立

1.3.2 中清洗后芽苗菜无菌分装于无菌均质袋中, 放入 30 °C 培养箱培养 120 h, 分别在培养的不同时间设点取单独包装样品进行细菌总数检测, 检测方法为 GB 4789.2<sup>[16]</sup>, 细菌总数和时间计数结果导入 Combase 软件进行拟合, 拟合方法为 Baranyi and Roberts 模型, 见公式 1、2。获得芽苗菜表面微生物生长一级模型。

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\exp[\mu_{\max} A(t) - 1]}{\exp(Y_{\max} - Y_0)} \right\} \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln [\exp(-\mu_{\max} t + \exp(-h_0)) - \exp(-\mu_{\max} t) - h_0] \quad (2)$$

式中:  $t$  为时间, h;  $Y(t)$  为  $t$  时的菌数, CFU/g;  $Y_0$  为初始菌数, CFU/g;  $Y_{\max}$  为最大菌数 CFU/g;  $\mu_{\max}$  为最大比生长速率;  $h_0$  为模型的参数。

### 1.3.4 微生物的选择性培养及鉴定

将芽苗样于生理盐水中进行 1:10 稀释, 稀释液继续进行 1:10, 1:100 倍稀释, 取 0.25 mL 稀释液后涂布于营养琼脂、MYP 培养基, 单菌落纯化后质谱法进行鉴定。

前处理方法: 接种环取菌适量加入 1.0 mL  $\phi=70\%$  乙醇水溶液中, 震荡 30 s, 离心 1 min 弃上清液, 加入  $\phi=75\%$  乙酸水溶液 70  $\mu$ L 震荡 20 s, 常温超声 10 min, 加入 70  $\mu$ L 乙腈震荡均匀, 离心 1 min 取上清液 1  $\mu$ L 点至靶板, 加入 1  $\mu$ L CHCA, 晾干。

质谱条件: 固定聚焦 337 nm, 检测器线性阳模式, MALDI 离子源, 激光束能频 73~78 Hz, 收集范围 2000~20000 ( $m/z$ ), 校准品 ATCC 8739 大肠杆菌。

数据分析: 分离微生物获得的质谱峰图数据导入 MALDI-TOF/SARAMIS 微生物鉴定系统与其中的超级谱图中特征性标识峰的质核比( $m/z$ )进行多重比较, 特征峰(相对相差 $<0.08\%$ )加权后计算相关系数以获得相应微生物的鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 芽苗菜处理实验结果及清洗后微生物生长状况分析

芽苗菜中微生物总体数量约为  $1.27 \times 10^6$  CFU/g, 换成对数单位为 6.104 lgCFU/g, 对数单位可以表现微生物污染的数量级, 是比较通用的微生物计数单位。不同清洗方法对芽苗菜的微生物的去除量见表 1, 处

理后芽苗菜样品微生物生长点线图见图 1, 不同方法拟合后微生物增值模式图见图 2。

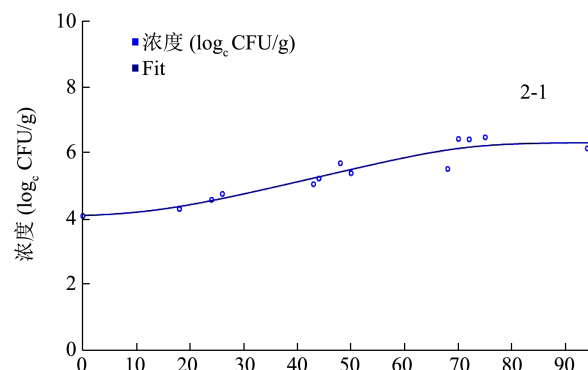


图 1 Combase 拟合辐照处理后微生物生长模型 (1 级)

Fig.1 Microbial growth model after radiation treatment by Combase (Class I)

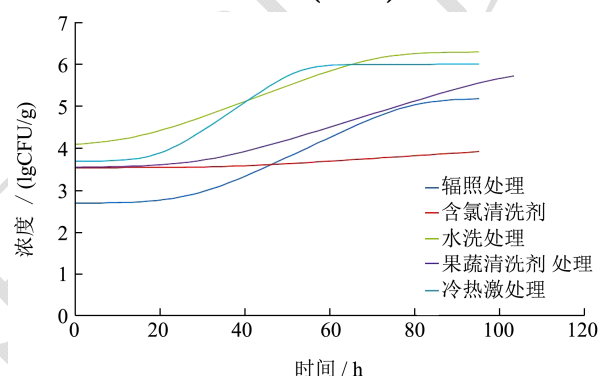


图 2 不同处理方法微生物生长预测模型

Fig.2 Microbial growth prediction models for different treatments

由图 2 可以看出辐照对微生物的祛除量最高, 此数值是在辐照剂量 3.5 kgy 下获得, 低辐照剂量对微生物去除量极低, 较高的辐照剂量又可使芽苗菜杀青变熟<sup>[17]</sup>, 3.5 kgy 为本实验处理中杀青的临界剂量, 辐照过后样品中微生物生长的延滞期为  $27.333 \pm 10.558$  h, 最大生长速率为  $0.0485 \pm 0.0109$ , 在 90 h 左右后进入稳定期, 最大浓度值为  $5.202 \pm 0.215$  lgCFU/g; 含氯消毒剂的在 5 种处理中微生物祛除效果第二名, 其生长模型中, 微生物的数量得到一定水平的控制, 但处理过后样品保有明显的氯气味道, 影响其食用品质; 冷热激的稳定最大浓度为  $5.853 \pm 0.131$  lgCFU/g, 较其他方法微生物的最大浓度最低, 但此种方法处理不好也会使芽苗菜杀青, 影响食用品质。

另外水洗和冷热激处理中微生物最大比生长速率 ( $\mu_{\max}$ ) 较接近, 这与两种处理都未添加外源药剂仅改变芽苗菜的水分活度有关。比生长速率为单位小时单位质量的菌体所增加的菌体量, 它是表征微生物生长速率的一个参数, 同种微生物在同种培养基的条件下最大比生长速率基本相同, 这与微生物特性有关

[18], 实验中微生物计数为多种群计数, 虽然培养温度、水分活度等基本相同, 但微生物群落结构略有差异, 结合实验产生误差, 最大比生长速率仍有一定差异, 但总体差异较小。

本实验中对芽苗菜微生物预测模型整体  $\mu_{\max}$  都较低且延滞期波动明显, 可能由于微生物在芽苗菜的外

表面生长, 除水分活度外, 没添加营养培养基, 微生物营养来自于植物组织破坏后的汁液外溢为贫瘠营养条件, 所以微生物预测模型中微生物的总体  $\mu_{\max}$  都较低, 但除了含氯消毒剂对微生物的整体生长有后续影响外, 其余方法都在一定时间内恢复到清洗前的初始数量级。

表 1 不同清洗方法对芽苗菜微生物的祛除量及最大比生长速率

| 处理                             | 空白        | ①水洗                 | ②辐照                 | ③冷热激                | ④含氯消毒剂    | ⑤果蔬清洗剂              |
|--------------------------------|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|---------------------|
| 细菌总数/(log <sub>10</sub> CFU/g) | 6.10±0.01 | 4.09±0.01           | 2.90±0.01           | 3.78±0.01           | 3.52±0.01 | 3.60±0.01           |
| 降低量/(log <sub>10</sub> CFU/g)  | --        | 2.01±0.01           | 3.20±0.01           | 2.32±0.01           | 2.59±0.01 | 2.50±0.01           |
| $\mu_{\max}/(h^{-1})$          | --        | $3.81\times10^{-2}$ | $4.85\times10^{-2}$ | $3.65\times10^{-2}$ | --        | $3.18\times10^{-2}$ |

2.2 芽苗菜微生物污染及清洗后污染调查

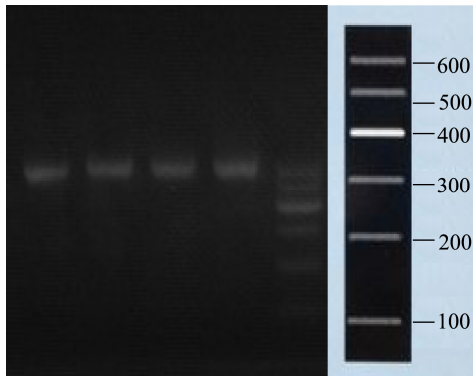


图 3 PCR 扩增产物

Fig.3 Procedure for PCR-Amplification

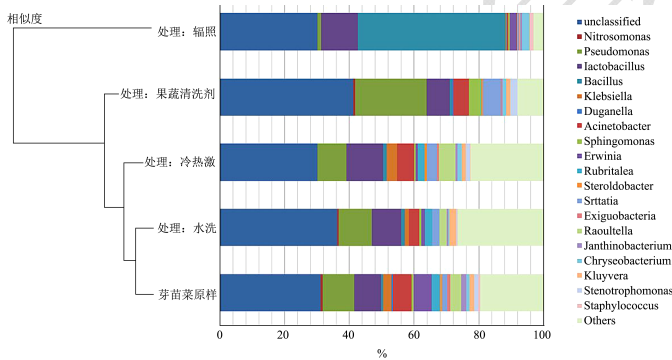


图 4 不同处理的微生物属级丰度及聚类图

Fig.4 Genus abundance and cluster dendrogram on different treatment

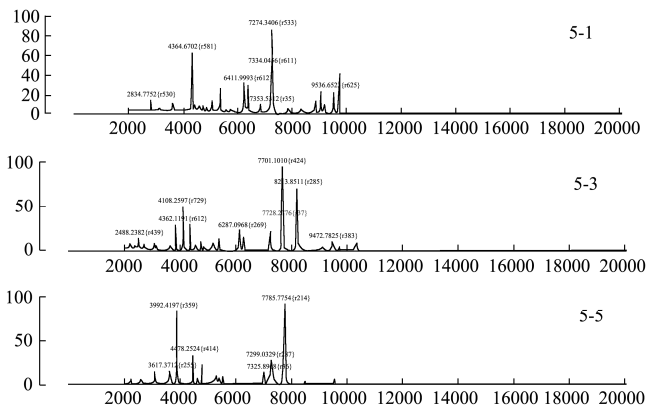
采用宏基因组区域 V3-V4 区测序的方法获得芽苗菜表面的微生物种群丰度, 微生物总 DNA 提取图见图 3, 芽苗菜处理过后对其进行宏基因组的调查结果及相应物种丰度进行聚类分析图见图 4, 由图 4 可以看出水洗处理对微生物的群落状况影响较小, 其次是冷热激处理, 两种处理与芽苗菜原样中可辨优势群落为假单胞菌属和乳杆菌属; 果蔬清洗剂处理过后不可辨微生物种类与假单胞菌属微生物占比增多, 可能

与果蔬清洗剂中外源药剂有关; 芽苗菜整体群落结构与原样差异最大的为辐照处理, 辐照处理后优势可辨菌群为芽孢菌属, 芽孢菌属细菌有其独特的结构可耐一定剂量的辐照[19], 当辐照对其他微生物进行祛除后, 具有特殊抵抗能力的芽孢菌属为优势菌群, 在合适的培养条件下继续增殖。

宏基因组测序结果中仍有一部分微生物为不可识别, 可能与样品处理方法有关。综合考虑芽苗菜微生物整体的群落变化和微生物生长模型中的最大比生长速率的值可以看出, 虽然调查微生物生长模型为混合种群数据, 但种群结构的变化仍旧反应在最大比生长速率的差异, 即微生物种群结构相似, 最大比速率值接近。

2.3 优势种群微生物的鉴定

采用选择性培养方法对芽苗菜样品中优势菌群微生物进行分离和质谱鉴定, 质谱图见图 5, 芽孢菌属的微生物鉴定为蜡样芽孢菌; 克雷伯菌属的细菌为产酸克雷伯菌和肺炎克雷伯菌; 假单胞菌属的细菌为铜绿假单胞菌; 乳杆菌属为产酸乳杆菌; 沙雷菌属为褪色沙雷菌。由于样品种群结构较复杂, 同一属中可能包括多个种, 鉴定中没有分开, 但已有鉴定结果也可印证宏基因组实验对微生物种类丰度分析的准确性。



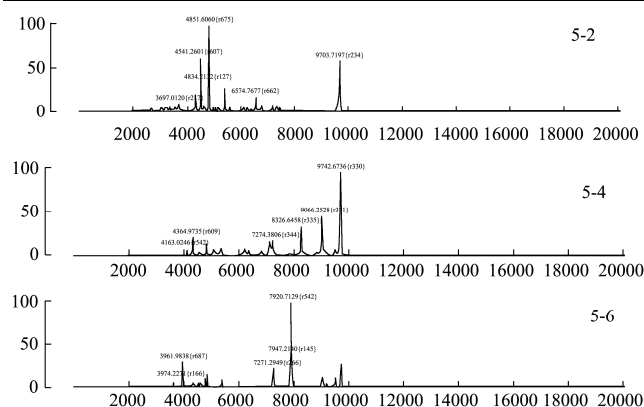


图5 微生物鉴定质谱图

Fig.5 Microorganism masspectrum of MALDI-TOF MS

注: 5-1 标准大肠 ATCC8739, 5-2 蜡样芽孢杆菌, 5-3 铜绿假单胞菌, 5-4 肺炎克雷伯菌, 5-5 产酸乳杆菌, 5-6 褪色沙雷菌。

### 3 讨论

#### 3.1 不同处理方法对芽苗菜微生物消除效果评价

实验针对微生物的污染采用的指标为细菌总数计数, 细菌总数虽然不能代表食源性致病微生物可量化的安全风险, 但可以反映样品受微生物污染的总体情况, 为卫生指标。从不同处理方法对微生物细菌总数的降低水平上来看, 辐照方法对微生物的消杀能力最强, 然后依次为含氯清洗剂、果蔬清洗剂、冷热激和水洗, 但没有一种方法可以完全祛除芽苗菜表面的全部微生物, 这与蔬菜表面的凹凸结构和微生物特性有关, 果蔬表面有一些微观疏水区<sup>[20]</sup>, 在清洗过程中一部分微生物附着在此区间内, 此外蔬菜损伤部位、气孔、毛孔等会使微生物内化, 清洗过程无法完全将其除去<sup>[21,22]</sup>。

试验中芽苗菜处理后未清除的细菌会在水分活度升高和损伤汁液外溢的条件下继续增殖恢复清洗前的数量级。有研究表明, 在果蔬表面微生物的相互作用非常复杂, 细菌存活、生长与对蔬菜的处理方法有关<sup>[23,24]</sup>。本试验的处理改变了芽苗菜原有微生物的菌群格局, 在继续增值的过程中, 生长较快且抗逆性较强的微生物成为优势种群。实验结果可以看出与水分活度有关的消除方法对微生物总体种类影响较小, 含氯清洗剂和果蔬清洗剂因其残留对微生物的种类的丰度有所影响, 但影响较辐照处理相差较多。辐照方法虽然对微生物的消杀效果最显著, 但此种方法对芽孢菌属无效果, 在改变菌群结构后, 芽孢菌群占领主要生

态位。经质谱法鉴定分离芽孢菌属细菌, 为食源致病菌蜡样芽孢杆菌, 反而提高了其食用安全风险。且最早报道芽苗菜引起的卫生事件是由产肠毒素的蜡样芽孢杆菌引起<sup>[25]</sup>。可见对芽苗菜微生物的控制最有效的方法未必是最合适的方法。

#### 3.2 芽苗菜蔬菜微生物食用安全评价

即食生鲜蔬菜食用过程未经过热加工处理, 一方面保留了蔬菜的原有口感和营养成分, 另一方面也为病原微生物进入体内开辟了绿色通道。根据美国 FDA、CDC、FSIS 的报告显示, 2016~2017 年美国的食源性疾病暴发以及食品污染导致的食品召回事件, 其主要原因均由食源性致病菌而引起, FAD 向消费者发布了许多有关食用生芽菜类食品的风险<sup>[26]</sup>, 另外 FDA 在食品法规中, 生芽菜食品被认为是一种“潜在危险食品”<sup>[27]</sup>。本实验中成都产芽苗菜中确实存在多种微生物的附着, 但条件致病菌等为优势菌群, 处理过程可以降低食用风险, 但处理后随保藏时间延长, 依然会提高其食用风险, 建议消费这个在消费芽苗菜的过程中尽量在处理合理时间段食用。此外不合理的微生物的消除方法反而才会升高其食用风险, 建议产业质量控制部门对产品后续处理进行研究和规范, 尽量规避风险。

#### 参考文献

- [1] 崔瑾. 芽苗菜最新生产技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015  
CUI Jin. Sprout new production technology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015
- [2] Gerald M Sapers, James R Gorny, Ahmes E Yousef. Microbiology of Fruits and Vegetables [M]. CRC: Taylor & Francis, 2011
- [3] Holzapfel W H, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 24(3): 343-362
- [4] Thunberg R L, Tran T T, Bennett R W, et al. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets [J]. Journal of Food Protection, 2002, 65(4): 677
- [5] Stewart D S, Reineke K F, Ulaszek J M, et al. Growth of *Salmonella* during sprouting of alfalfa seeds associated with salmonellosis outbreaks [J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(5): 618
- [6] Abadias M, Usall J, Anguera M, et al. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments [J]. International

- Journal of Food Microbiology, 2008, 123(1-2): 121
- [7] Jeddi M Z, Yunesian M, Gorji M E, et al. Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets [J]. Journal of Health Population & Nutrition, 2014, 32(3): 391. PMID: PMC4221445
- [8] Bertholdpluta A, Garbowska M, Stefańska I, et al. Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter spp.* [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 221-230
- [9] McMeekin T A, Olley J, Ratkowsky D A, et al. Predictive microbiology: towards the interface and beyond [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73: 395-407
- [10] 周康,刘寿春,李平兰,等.食品微生物生长预测模型研究新进展[J].微生物学通报,2008,35(4):589-594.  
ZHOU Kang, LIU Shou-chun, LI Ping-lan, et al. New advances in predictive food microbial growth model [J]. Microbiology China, 2008, 35(4): 589-594
- [11] 李柏林,郭剑飞,欧杰.预测微生物学数学建模的方法构建[J].食品科学,2004,25(11):52-57.  
LI Bo-lin, GUO Jian-fei, OU Jie. Research approach of microbial modeling on predictive microbiology [J]. Food Science, 2004, 25(11): 52-57
- [12] 王军,董庆利,丁甜.预测微生物模型的评价方法[J].食品科学,2011,32(21):268-272  
WANG Jun, DONG Qing-li, DING Tian. An overview of evaluation methods for predictive microbial growth models [J]. Food Science, 2011, 32(21): 268-272
- [13] H andelsm an J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): 245-249
- [14] 贺纪正,张丽梅,沈菊培,等.宏基因组学(Metagenomics)的研究现状和发展趋势[J].环境科学学报,2008,28(2):209-218  
HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei, SHEN Ju-pei, et al. Advances and perspectives of metagenomics [J]. Acta Scientie Circumstantiae, 2008, 28(2): 209-218
- [15] <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2018/02/stool-DNA-1-23.pdf>
- [16] GB 4789.2-2016, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]  
GB 4789.2-2016, National food safety standard Food microbiological examination: Aerobic plate count [S]
- [17] Schoeller N P, Ingham S C, Ingham B H. Assessment of the potential for *Listeria monocytogenes* survival and growth during alfalfa sprout production and use of ionizing radiation as a potential intervention treatment [J]. Journal of Food Protection, 2002, 65(8): 125
- [18] Greer G G, Gill C O, Dilts B D. Evaluation of the bacteriological consequences of the temperature regimes experienced by fresh chilled meat during retail display [J]. International Food Research, 1994, 27: 371-377
- [19] 柳增善,任洪林,孙鸿斌.食品病原微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2007  
LIU Zeng-shan, REN Hong-lin, SUN Hong-bin. Food pathogenic microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [20] Goodburn C, Wallace C A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review [J]. Food Control, 2013, 32(2): 418-427.
- [21] Dong Y, Iniguez A L, Ahmer B M M, et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of medicago sativa and medicago truncatula [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1783-1790
- [22] Mattos F R, Fasina O O, Reina L D, et al. Heat transfer and microbial kinetics modeling to determine the location of microorganisms within cucumber fruit [J]. Journal of Food Science, 2010, 70(5): E324-E330
- [23] Francis G A, Thomas C, O'Beirne D. The microbiological safety of minimally processed vegetables [J]. International Journal of Food Science & Technology, 1999, 34(1): 1-22
- [24] Sant'Ana A S, Barbosa M S, Destro M T, et al. Growth potential of *Salmonella, spp.* and *Listeria monocytogenes*, in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(1): 52-58
- [25] Stephen J Forsythe. Microbiological risk assessment of food [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2002
- [26] U.S. Food and Drug Administration, 2013 Food Code
- [27] U.S. Food and Drug Administration, Since 1995 raw seed sprouts have emerged as a recognized source of food borne illness in the United States