

肉禽及其制品中沙门氏菌失活建模的研究进展

熊晓辉, 刘若雨, 张帅, 林丽军, 崔晓文*

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211899)

摘要: 沙门氏菌是常见的食源性致病菌, 可引起人类的胃肠炎、败血症等疾病, 严重者会危及生命安全。肉禽及其制品是消费者餐桌上必不可少的食材, 然而在肉禽类的生长、运输、屠宰及其制品的加工、贮藏、销售过程中, 极易受到沙门氏菌的污染, 威胁消费者舌尖上的安全。预测微生物学中的失活模型能反映出传统的热处理、新兴的杀菌技术对肉禽及其制品中沙门氏菌的灭活效果。该研究首先对肉禽及其制品中沙门氏菌传统热失活、非热失活模型的最新研究进行论述; 其次, 考虑了亚致死损伤沙门氏菌的存在对失活模型建立的影响; 再次, 对单细胞失活的概率模型进行讨论; 最后, 对沙门氏菌在失活模型中的研究进行总结并提出建议, 以期对未来制定食品质量和安全管理方法提供理论参考。

关键词: 沙门氏菌; 失活模型; 亚致死; 单细胞; 肉禽及其制品

文章编号: 1673-9078(2021)12-309-318

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0287

Research Progress on Inactivation Modeling of *Salmonella* spp. in Poultry Meat and Its Derived Products

XIONG Xiaohui, LIU Ruoyu, ZHANG Shuai, LIN Lijun, CUI Xiaowen*

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211899, China)

Abstract: *Salmonella* spp. is a common food-borne pathogen that can cause diseases in humans such as gastroenteritis and sepsis, and in severe cases, can endanger the life and safety. Poultrymeat and its derived products are indispensable food materials on consumers' tables. However, poultrymeat and its derived products are extremely susceptible to *Salmonella* spp. contamination during the growth, transportation and slaughter of poultry, as well as the processing, storage and sales of poultrymeat and its derived products, which is a threat to the safety of consumers. The inactivation model in predictive microbiology can reflect the inactivation effect of traditional heat treatment and emerging sterilization technologies on *Salmonella* spp. in poultrymeat and its derived products. This review firstly discussed the latest research on traditional thermal inactivation and non-thermal inactivation models of *Salmonella* spp. In poultry meat and its derived products. Secondly, the effects of the occurrence of sublethally injured *Salmonella* spp. on the establishment of the inactivation models were considered. Thirdly, the probability models of single cell inactivation were discussed. Finally, the research progress on inactivation models of *Salmonella* spp. in poultrymeat and its derived products is summarized then some suggestions are present, in order to provide a theoretical reference for the development of food quality and safety management methods in the future.

Key words: *Salmonella*; inactivation modeling; sublethal; single cell; meat and poultry and their derived products

引文格式:

熊晓辉,刘若雨,张帅,等.肉禽及其制品中沙门氏菌失活建模的研究进展[J].现代食品科技,2021,37(12):309-318

XIONG Xiaohui, LIU Ruoyu, ZHANG Shuai, et al. Research progress on inactivation modeling of *Salmonella* spp. in poultry meat and its derived products [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 309-318

收稿日期: 2021-03-17

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(20KJB550001); 南京工业大学引进人才科研启动专项经费资助; 江苏省“双创博士”项目 2020(30539)

作者简介: 熊晓辉(1964-), 男, 博士, 教授、博士生导师, 研究方向: 食品微生物安全与控制, E-mail: xxh@njtech.edu.cn

通讯作者: 崔晓文(1989-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性致病菌, E-mail: cxw0534@163.com

食源性致病菌是指食品在加工和流通过程中引入的病原菌, 这些病原菌在食品中不断生长代谢导致食品受到污染, 从而引发人类的各种疾病。据世界卫生组织(WHO)报道, 全球每10人中就有1人因摄入被污染的食物罹患食源性疾病, 并且每年有42万人死于食源性疾病的并发症, 其中5岁以下的儿童占40%^[1]。沙门氏菌是最常见的食源性病原菌, 国际食品微生物标准委员会(International Commission for

Biological Control, ICMSF) 将其健康危害等级评为严重危害^[2], 它无芽孢和荚膜, 是一种需氧或兼性厌氧的革兰氏阴性短杆菌。该菌对外界不利因素的抵抗力较强, 在 7~45 °C 的条件下繁殖, 存活时间较长。人类一旦感染沙门氏菌, 主要表现为以下三种形式的疾病: 第一种是胃肠炎, 包括恶心、发热、呕吐与腹泻(非伤寒沙门氏菌); 第二种主要是由伤寒沙门氏菌引起的伤寒; 第三种是败血症, 其表现为发热、寒战、贫血和内脏器官的局部病变^[3]。我国近年来微生物性食物中毒事件的数量占有所有食物中毒事件数量的 50% 左右, 其中由沙门氏菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的 70%~80%^[4]。在不同类别的食品中, 肉禽及其制品作为媒介引发的食物中毒事件超过 90%^[5]。因此, 在食品工业中应当对肉禽及其制品中的沙门氏菌进行风险评估工作, 以降低食源性疾病暴发的风险。

微生物风险评估 (Microbiological Risk Assessment, MRA) 主要包括危害识别、危害特征描述、暴露评估和风险特征描述四个部分^[6]。当食品中的微生物暴露于特定条件下时, 由于食品预测微生物学 (Predictive Food Microbiology, PFM) 可以提供微生物种群的预期变化, 所以它在暴露评估过程中具有重要的作用。推动食品预测微生物学的发展, 可以合理地预测食品货架期, 为食品安全风险评估提供了重要依据。预测模型有很多分类方法, 传统上将模型分为动力学模型和概率模型, 也可以根据统计学分为确定性模型和随机性模型。目前大家普遍认可的是 Whiting 和 Buchanan 于 1993 年提出的模型分类法, 即生长模型和失活模型, 这两个模型又各有 3 个不同层次的模型水平, 分别为一级模型、二级模型和三级模型。

采取有效的杀菌技术结合预测微生物学建立沙门氏菌失活模型的研究已有报道。然而, 食品工业中的沙门氏菌失活比实验室水平复杂得多, 不同的环境变量、食品自身理化性质等都会影响失活效果, 尤其是在肉类的缓慢蒸煮过程中, 沙门氏菌通过合成热休克蛋白 (heat shock proteins) 来适应亚致死温度, 增强自身耐热性, 造成持续污染。传统的热失活模型无法解释沙门氏菌的亚致死状态, 导致了过高估计的致死率, 这是对建模方法的一大挑战。而且, 虽然有大量模型可以用来描述各种失活曲线, 但对于曲线上的“肩部” (“shoulder”) 和“拖尾” (“tailing”) 现象却没有一个满意的统一解释。此外, 沙门氏菌在单细胞水平上的失活建模已成为近些年的研究热点之一。其原因有两点: 第一, 实际生产流通过程中的食品在经历多重消毒杀菌处理后, 还有部分沙门氏菌以单细胞或者较

低数量级的水平残留于食品基质中, 并且在适宜条件下, 这些残留的沙门氏菌进一步生长繁殖, 对食品安全造成威胁; 第二, 由于单细胞的行为存在极大的变异性, 所以基于种群开发的确定性模型难以用于描述沙门氏菌单细胞的失活动力学。因此, 许多学者借助基于概率理论的随机模型对沙门氏菌单细胞的失活展开研究。

综上所述, 虽然现阶段关于沙门氏菌失活模型的研究较多, 但是缺乏较为全面的概括和总结。因此, 本文针对肉禽及其制品中沙门氏菌的传统热失活模型、非热失活模型进行阐述, 并重点论述了亚致死状态及单细胞水平下沙门氏菌预测建模的最新研究进展。可对未来沙门氏菌的定量风险评估工作提供理论依据, 保障食品安全及消费者健康。

1 沙门氏菌的失活模型

借助预测微生物学可以研究不同环境条件下 (温度、pH、压力等) 沙门氏菌的失活模型, 失活模型及其参数反映了不同处理条件对沙门氏菌的灭活程度。在食品工业中, 热处理是灭活沙门氏菌的最有效方法之一。由于过度高温会对食品的新鲜程度及营养物质的丰富程度产生不利影响, 所以出现了一系列的非热技术被应用于灭活微生物。因此, 下文从热失活和非热失活两方面, 对肉禽及其制品中沙门氏菌的失活模型进行总结。

1.1 一级模型

一级模型是基础模型, 它用来描述微生物量与时间之间的函数关系。

1.1.1 热失活

1.1.1.1 经典线性模型

最初描述微生物失活的一阶动力学模型是由 Madsen 等^[7]提出的, 其表达式为:

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (1)$$

式中:

N_0 ——初始细胞数;

N ——热处理后的细胞数;

k ——一阶动力学参数。

后来, Ball 等^[8]用 D 值表示十进制减少时间, 失活模型由 Katzin 等^[9]重新定义。在等温条件下, 热失活过程由式 (2) (3) 的对数线性方程表示。

$$\log(N) = \log(N_0) - \frac{t}{D} \quad (2)$$

$$\log(D) = \log(D_0) - \frac{T}{Z} \quad (3)$$

式中：
 N_0 ——微生物初始浓度；
 N —— t 时间微生物浓度；
 D ——等温条件下每杀死 90%的原有微生物所需时间；
 Z —— D 值降低 90%所需要升高的温度。

对数线性模型表达微生物浓度 (N) 与处理时间 (t) 的线性关系, k 值与处理时间 (t) 无关。换言之, 在不同的致死压力下, 种群中的所有微生物细胞均表现出相同的抗性, 这是对数线性模型使用的前提条件。部分沙门氏菌热失活的参数值 (D 值) 如表 1 所示。

表 1 部分食品基质中的 D 值

Table 1 D value of partial food matrices

菌种	食品基质	温度/°C	D 值/min	参考文献
4 种血清型混合菌株	冷却牛肉	55	9.09	[10]
		57.5	3.86	
		60	2.35	
		62.5	1.17	
		65	0.29	
5 种血清型混合菌株	鸡胸肉	55	47.65±3.68	[11]
		57.5	12.01±0.51	
		60	7.48±0.12	
S.typhimurium 112	生鸡胸肉	54	12.44	[12]
		56	3.92	
		58	1.30	
		60	0.49	
5 种血清型混合菌株	香肠	54.4	20.48±6.54	[13]
		60	1.74±0.10	
		65.6	0.26±0.06	
		71.1	0.06±0.01	
8 种血清型混合菌株	猪肉	58	6.37±0.01	[14]
		60	6.60±0.04	
		62.5	1.57±0.05	
		65	0.73±0.08	

大量研究表明, 式 (2)、(3) 中的参数 D 值和 Z 值受到多种因素的影响, 包括食品基质、菌株类型、 pH 值和抗菌剂等。首先, 在肉禽及其制品中, 可能含有不同数量的天然或人工添加的脂肪, 脂肪含量被视为影响沙门氏菌耐热性的主要因素之一。Gurman 等^[15]发现猪肉肉饼的脂肪含量越高, D 值越大, 这与 Juneja 等^[14]在研究脂肪含量对绞碎猪肉、牛肉、鸡肉 D 值影响的结果相同。由于脂肪的水分活度低、传热性差^[16-17], 所以脂肪中的沙门氏菌能够在更高温度下存活更长时间。但是, 影响到 D 值的脂肪含量可能存在数值界限, 如 Juneja 等^[18]研究表明, 当脂肪含量低于 9% 时, 沙门氏菌未表现出较强的耐热性。其次, 对于含有蛋白质的食品基质, 其对沙门氏菌的缓冲保护作用不可忽略, 如张佩佩等^[19]在研究不同的食品基质对甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi* A) 耐热性的影响时, 发现熏煮火腿中细菌失活的 D 值高于营养肉汤中的 D 值。而且, 已有研究报道, 在微酸化处理的

实验室培养基中病原体具有最大耐热性, 但是与普通培养基相比, 沙门氏菌在营养丰富的实际食品基质中具有更高的耐热性。因此, 在实际食品基质中建立的失活模型的预测准确性更高。另外, Gurman 等^[15]、惠利娜等^[20]研究了不同血清型沙门氏菌在营养肉汤及实际食品基质 (碎猪肉、熏煮火腿等) 中的存活率差异; Wang 等^[21]探究了肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 在不同 pH 及 $NaCl$ 浓度的 BHI 培养基中的存活时间差异; Ajit 等^[22]、Suo 等^[23]发现抗菌剂 (酸化的亚氯酸钠、香芹酚、肉桂醛) 的添加能有效降低 D 值。最后, 虽然 D 值、 Z 值与多种因素相关, 但是温度依然是导致这两个参数值发生变化的最重要因素。

由以上研究结果看出, 针对肉禽及其制品而言, 尤其在高脂肪含量 (猪肉)、高蛋白含量 (牛肉、鸡胸肉等) 等实际食品基质中建立热失活模型时, 已有文献中报道的 D 值和 Z 值只能起参考作用, 确定最终参

数值还需结合实际, 严格评估实验条件和判断菌株类型等。另外, 虽然对数线性模型的参数受多种因素的影响, 但是并不影响热处理对沙门氏菌的灭活作用。

1.1.1.2 非线性模型

经典的对数线性模型在世界范围内得到了广泛使用, 一般这种模型只有在细菌死亡速度较快的情况下才能较好地拟合失活数据, 然而沙门氏菌的失活并不总是遵循传统的对数线性关系, D 值和 Z 值无法解释出现的凸型、凹型、S 型等非线性曲线问题。在大多数情况下, 微生物失活的非线性曲线有以下三个特征: 第一, 灭活前出现“肩部”或“延迟 (L)”现象; 第二, 处于最大失活率期 (k_{max}), 可看作对数线性阶段; 第

三, 趋向于微生物负荷的渐进值 (也可理解为“亚群 (N_{res})”或“拖尾”现象)^[24]。其中, L、 k_{max} 、 N_{res} 均是一级动力学模型的参数。

对于“肩部”和“拖尾”现象, 已有许多学者作出了解释, 其中 Cerf^[25]解释“拖尾”现象的两大理论占据主导地位 (如表 2 所示)。“活力论 (vitalistic)”认为每个细菌细胞在热处理过程中都表现出相同的抗热性, 并且在特定时间死亡, 所以失活曲线出现凸型或 S 型; “机械论 (mechanistic)”假设细菌在反应中的抵抗能力与损伤程度相同, “拖尾”现象与观测假相、微生物的失活机制和抵抗机制有关。这两大理论与 Stringer^[26]等对非线性曲线的解释类似。

表 2 “拖尾”现象的解释

Table 2 The elucidation of the tailing phenomenon

理论	“拖尾”现象的解释	亚群 (N_{res}) 表现
活力论	微生物的正常特征	非常耐热
机械论 1	微生物的正常特征	加热过程传热效果差, 无法达到热处理的致死条件
		适应热处理温度
机械论 2	假相 (artifacts)	基因上更具抵抗能力
		处理条件不同
		没有完全失活
		残存细胞数量极少, 可变性很大

目前, 较多非线性模型已经被成功地运用到失活曲线的拟合过程中, 如带有“肩部”/“拖尾”的对数线性模型、指数模型、双相模型等。在肉禽及其制品中, 一般采用 Logistic、Weibull 等概率分布模型拟合沙门氏菌的失活曲线。Suo 等^[23]采用 Logistic 模型拟合碎猪肉中肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 混合菌株的热失活模型。Zhu 等^[27]利用 Weibull 模型建立了牛肉中混合血清型沙门氏菌的热失活模型。Grzegorz 等^[28]在研究鸡肉粉中沙门氏菌的失活曲线时, 对比了对数线性模型与 Weibull 模型的拟合效果, 由于对数线性模型无法考虑到细菌失活前的“肩部”现象, 所以不如 Weibull 模型的拟合效果好。Xiao 等^[29]采用概率模型模拟鸡胸肉中的沙门氏菌的失活规律, 研究发现相比于指数模型和对数线性模型, Weibull 模型的拟合度最好。综合以上分析, Weibull 分布函数的应用 (式 (4)、(5) 均为其常见形式) 更加灵活, 尤其在非等温加热过程、复杂环境条件下的拟合效果更优。

$$\log N_t = \log N_0 - bt^n \tag{4}$$

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\left(\frac{1}{2.303}\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right) \tag{5}$$

式中:

N_0 —未经处理前样品中沙门氏菌的菌落数, CFU/g;

N_t —经热处理后样品中沙门氏菌的菌落数, CFU/g;

b 或 α —与数量规模相关的参数 (b 或 α 受温度的影响, 其值越大, 沙门氏菌的瞬时死亡率越高);

n 或 β —与分布曲线形状相关的参数 ($n > 1$ 或 $\beta > 1$, 凸曲线; $n < 1$ 或 $\beta < 1$, 凹曲线)。

除了 Weibull 模型, 双重 Weibull 模型见式 (6)、(7), 也可以很好地对沙门氏菌的失活数据进行拟合。如 Milkiewicz^[30]等采用该模型拟合鸡肉中沙门氏菌的失活模型。建立双重 Weibull 模型基于以下假设: 种群包含两个抗性不同的亚种群, 并且这两个亚种群的失活动力学都遵循 Weibull 分布^[31]。

$$\log_{10}\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = \log_{10}\left(\frac{1}{1+10^\alpha}\right) + \log_{10}\left(10^{-\alpha\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^\beta} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^\beta}\right) \tag{6}$$

$$\alpha = \log_{10}\left(\frac{f}{1-f}\right) \tag{7}$$

式中:

N_0 —微生物初始浓度;

N_t — t 时间微生物浓度;

δ_1 、 δ_2 —具有不同应激敏感性的两个亚群出现第一次对数性降低的时间;

α —与数量规模有关的参数;

f —对热处理更敏感的亚群所占比例 (当 $\delta_1 < \delta_2$ 时);

n —与曲线形状相关的参数 ($n > 1$, 凸曲线; $n < 1$, 凹曲线; $n = 1$, 线性曲线)。

虽然双重 Weibull 模型具有五个参数,但是其中只有三个参数 (δ_1 、 δ_2 和 α) 与细胞的生理状态和环境条件有关。此外, Geeraerd 等^[32]开发的失活模型拟合工具 GInaFiT 为使用模型提供了便利的手段。该工具涵盖了对数线性模型、带有“肩部”/“拖尾”+对数线性模型、Weibull 模型、Weibull+“拖尾”模型、双相模型及双相+肩部模型。

1.1.2 非热失活

除了传统的热处理,近年来紫外线 (UV-C)、超声波 (ultrasound)、强脉冲光 (intense pulsed light)、超高压 (high pressure processing) 等非热技术也不断发展。描述微生物失活的数学模型是评估食品安全性和提高质量的有用工具。相比于经典的对数线性模型,非线性模型及其参数能更加精确地展现新技术对微生物的作用效果。Mutz 等^[33]采用 Weibull 模型拟合短波紫外线对干制发酵香肠中鼠伤寒沙门氏菌的灭活效果。Bonah 等^[34]利用超声波技术研究了鼠伤寒沙门氏菌在猪肉中的失活情况,采用 Weibull 模型拟合 20 kHz 条件下的细菌失活数据,并且评估了模型的动力学参数值 β 的变化。由于超声波的空化作用造成了细菌细胞的损伤积累,所以参数值 $\beta < 1$ 。Hwang 等^[35]采用双重 Weibull 模型拟合 800~1800 V 脉冲强光变化下的肠炎沙门氏菌的失活曲线,结果表明形状参数 n 值的变化与电压大小有关,而 α 值不受电压变化的影响。但是,有研究发现双重 Weibull 模型的数量参数 α 的大小可能受到外部环境条件的影响。如 Coroller 等^[31]认为 α 值与鼠伤寒沙门氏菌的初始细胞状态和酸性胁迫

有关。除了利用非线性模型拟合失活数据外, Lytoun 等^[36]还基于概率方法开发了一种生长/失活界面模型,该模型能用于预测经有机酸处理后腌制鸡胸肉中沙门氏菌的生长和失活行为。针对食源性致病菌而言,由于食品中存在任何一部分的病原体都会为消费者的安全埋下隐患,所以在了解致病菌失活动力学参数的基础之上,还需要深入探究并控制致病菌的生长能力。在利用不同的方法确定生长/失活界面模型的界面后,不仅可以判断致病菌的生长能力,还能利用栅栏技术得到失活条件,同时估计该条件下灭活致病菌的成功概率。因此,建立界面模型对食品生产加工环节、食品安全质量管理和食品安全风险评估具有重要意义。

1.2 二级模型

二级模型是在一级模型 (对数线性模型、Weibull 模型等) 的基础上,通过响应面分析或者逐步回归分析来预测 D 值、数量参数 α 、形状参数 β 、7 个对数数量减少所需的时间 ($\ln t_{7.0}$) 等^[37],如 Suo 等^[38]基于 Logistic 模型的参数进行二次回归分析,从而预测 $\ln t_{7.0}$ 的最佳独立参数。针对多环境因素对沙门氏菌失活情况的影响,在表 3 中对部分二级模型进行了归纳。由于多项式模型能较为全面地囊括不同的环境参数及阐述其相互作用,而且适于统计学上多元线性回归的试验数据,所以得到了广泛的应用。但是,多项式模型包含许多没有生物学意义的系数,如 Roh 等^[39]采用了 6 个系数模拟 2 个环境参数的影响。此外,神经网络在失活模型中的应用很少,且该模型没有系数和参数形式。

表 3 部分二级模型

Table 3 Partial secondary models

菌种	食品基质	处理方法	二级模型	环境因素	参考文献
<i>Salmonella</i> spp.	鸡肉	热处理	二次多项式模型	温度、脂肪含量	[30]
<i>S. enteritidis</i> 、 <i>S. typhimurium</i>	鸡胸肉	冷等离子体	二次多项式模型	电压、时间	[39]
8 种血清型混合菌株	鸡肉	热处理	二次多项式模型	温度、没食子酸、丁香酚	[40]
2 种血清型混合菌株	猪肉	热处理	二次回归模型	温度、时间、肉桂醛浓度	[38]
<i>S. typhimurium</i>	鸡肉	热处理	神经网络	-	[41]
<i>S. enteritidis</i>	干腌火腿	超高压	二次多项式模型	压力、时间、初始流体温度	[42]
<i>S. typhimurium</i>	里脊肉	紫外线、乳酸联合处理	二次多项式模型	紫外线照射剂量、乳酸浓度	[43]

综合以上分析,经典的对数线性模型通常适于拟合等温条件下沙门氏菌的热失活行为。大部分非线性模型用三个及以上的参数来表达失活曲线,由于 Weibull 模型只含有两个参数,所以被广泛用于热失活和非热失活的研究中。因为非线性模型的种类众多,所以选择合适的模型主要依据以下两点:第一,遵循

简单原则;第二,借助残差平方和 (RSS)、赤池信息量准则 (AIC)、贝叶斯信息量 (BIC) 等指标来综合评价模型的拟合优度,见式 (8)、(9)、(10)。其中, RSS 和 AIC 的值越小,模型的拟合效果越好。AIC 指标能有效降低过拟合的可能性 (若模型中的参数尽可能少),而 BIC 指标能避免出现模型复杂度过高现象。

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (8)$$

$$AIC = n \ln \left(\frac{RSS}{n} \right) + 2(m+1) + \frac{2(m+1)(m+2)}{n-m-2} \quad (9)$$

$$BIC = n \ln \left(\frac{RSS}{n} \right) + m \ln(n) \quad (10)$$

式中:

n —数据的总数;

y_i —第 i 小时测定的试验数据;

\hat{y}_i —第 i 小时的拟合数据;

RSS —残差平方和;

m —模型中参数的个数。

2 沙门氏菌的亚致死损伤

在肉禽及其制品的加工过程中,由于食品自身的理化性质及栅栏技术的应用,沙门氏菌还可能受到一定程度的亚致死损害。早在 1977 年, Hurst 将亚致死状态定义为:施加于微生物的轻微物理、化学胁迫不足以破坏及杀死微生物,致使其结构受损、功能短暂丧失^[44]。处于亚致死状态的细胞会产生一些适应性应激反应,改变自身的细胞结构、生理特性及基因表达,最终形成协同保护作用,从而增强细菌对其它应激条件的抵抗能力。相较于无损伤的细胞,亚致死状态的细胞对培养基的成分变化更敏感。研究表明,亚致死损伤细胞在含有选择性试剂(如氯化钠、胆盐、抗生素、有机酸及无机酸、脂肪酸等)的培养基中不能形成可见的细菌菌落,但能在营养丰富的非选择性培养基中恢复到正常的生理状态^[45],因此,许多研究将亚致死损伤细胞数量定义为非选择性培养基与选择性培养基中沙门氏菌的数量差值,见式(a)^[46]。

$$\text{sublethal injury}(\%) = \frac{N_{\text{nonselective}}(t) - N_{\text{selective}}(t)}{N_{\text{nonselective}}(t)} \times 100 \quad (a)$$

式中:

t —处理时间;

$N_{\text{nonselective}}(t)$ — t 时间非选择性培养基中的细胞数量;

$N_{\text{selective}}(t)$ — t 时间选择性培养基中的细胞数量。

此外,可通过式(b)定义的时间-平均损伤细胞系数(TICC)量化亚致死细胞的数量。

$$TICC = \frac{\int_{t_{\text{initial}}}^{t_{\text{final}}} \% \text{Sublethal Injury}(t) dt}{t_{\text{final}} - t_{\text{initial}}} \quad (b)$$

式中:

t —处理时间;

t_{initial} 到 t_{final} —整个处理过程的热处理时间。

Smith 等^[47]还定义了培养基中的恢复抑制系数(RIC),见式(c)。该系数介于负数和零之间,其值

越大表明培养基中受损细胞的恢复能力越好。

$$RIC = \int_0^{t_{\text{total}}} \log(CFU(t))_{\text{selective}} dt - \int_0^{t_{\text{total}}} \log(CFU(t))_{\text{nonselective}} dt \quad (c)$$

式中:

t_{total} —总处理时间。

在建立失活模型的过程中,由于使用选择性培养基无法检出亚致死损伤细胞,所以易出现假阴性结果。在特定环境条件下,若这些亚致死损伤细胞逐步恢复到正常的生理状态,并且进一步生长、繁殖,会对食品安全构成潜在的威胁。

沙门氏菌受到亚致死损伤的程度与多种因素相关,如血清型、生长阶段、培养基质等。Wang 等^[48]指出,经热处理后,肉汤中的肠炎沙门氏菌亚致死损伤率高于琼脂中的损伤率。Suo 等^[49]发现处于指数生长期的鼠伤寒沙门氏菌更易受到热损伤。因此,在构建沙门氏菌死亡或亚致死损伤的预测模型时,需要考虑细胞特征、细胞密度、代谢产物等因素。同时,受损伤沙门氏菌的恢复能力与环境因素密切相关。Chambliss 等^[50]研究发现,鸡肉中受热损伤的肠炎沙门氏菌群体能在 TSA 培养基(非选择性培养基)中完成自身修复,并且修复速度与培养温度、酸碱度、培养基中氯化钠浓度有关。温度越高,受损伤的沙门氏菌恢复更快,但是增加酸碱度及氯化钠浓度,会抑制沙门氏菌的热损伤修复机制。

现在关于亚致死损伤的模型主要分为两类:损伤模型和修复模型。在增加破坏力的情况下,定量评估细胞受损伤的程度,从而建立损伤模型。然而,修复模型的建立是为了预测受损细胞恢复生存能力所需的时间。如 Saldaña 等^[51]在应用脉冲电场(pulsed electric fields, PEF)对沙门氏菌进行灭活处理时,不仅建立了 pH 及电场强度对沙门氏菌细胞的损伤模型,还首次将 Weibull 模型用于描述选择性培养基中受损沙门氏菌的生存曲线,从而量化 PEF 对沙门氏菌造成的损伤程度。此外,以往研究发现,沙门氏菌的耐热性与加热速率密切相关,因此,一些研究将温度升高速率作为沙门氏菌失活模型的研究变量^[52-53]。实际上,当沙门氏菌在特定的温度下,它的适应性是随着时间的变化而变化,并不是温度变化速率的函数^[54-55]。正如 Marks 等^[56]、Breslin 等^[57]在开发火鸡、牛肉、猪肉中混合血清型沙门氏菌的热失活模型时,采用关于温度、时间的积分表达式来量化细菌的亚致死细胞数量。

综上,为了建立更加准确的失活模型,在建模前不仅需要考虑到影响亚致死损伤程度、恢复程度的因素,还应正确处理亚致死状态与温度、时间之间的关系。目前,关于沙门氏菌亚致死损伤程度影响因素的

研究颇多,但是很少将其量化为数学表达式应用到失活模型中,因此还需要更加深入地进行研究。

3 沙门氏菌的单细胞失活

沙门氏菌的失活模型大多都是基于较高的初始种群(通常由数百万个细胞组成)而建立的,然而已有实验证实,一级动力学模型中的D值只适用于大群体,当群体细胞数量低于100时,D值显示出高度可变性。再者,在食品的实际流通过程中,污染都是由较低接种量的微生物引起。在处理少量的沙门氏菌时,单细胞行为和初始细胞数量的影响被无限放大,利用确定性模型预测整个种群的失活动力学受到了限制。因此,部分学者对单细胞的异质性行为展开研究,这对进一步完善沙门氏菌失活建模的工作非常必要。

关于单细胞水平上的建模大部分使用概率方法,Weibull、Gamma等概率分布模型都将失活曲线看作是种群抗逆性失活致死的积累分布形式,这也从侧面反映了失活模型都以某种方式体现出单细胞异质性对群体行为可变性的影响。单细胞的异质性行为主要通过单个细胞的失活时间来表现^[58]。Aspridou等^[59]采用基于概率分布的Gamma模型,见式(11),对单细胞的失活时间进行统计建模。然后,在具有不同初始细胞数量(初始细胞数量等于单细胞热失活的次数)的条件下,利用蒙特卡洛模拟(Monte Carlo Simulation)预测细菌的失活情况。其中,模拟的次数代表了种群失活行为的可变性。模拟结果显示,单细胞的异质性随着群体细胞数量的增加而被逐步掩盖。

$$N_i = N_0 - \text{Rank}(t_i), t_i \sim \text{Gamma}(1.256, 7.667), i = 1, 2, 3, \dots, N_0 \quad (11)$$

式中:

t_i ——从单细胞失活时间的概率分布中随机选择的时间;

N_0 ——初始细胞数量;

N_i —— t_i 时间的细胞数量。

此外,Koyoma等^[60]开发了一种预测模型,将泊松分布(式(12)(13))与Weibull模型相结合,来描述沙门氏菌存活细胞数量的可变性及在单细胞水平下的存活概率。

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k \times e^{-\lambda}}{k!} \quad (12)$$

$$\lambda = -\log[P(X = 0)] \quad (13)$$

式中:

$P(X=k)$ ——在微孔板中随机选择,找到k个细胞的概率;

λ ——泊松分布参数。

然而,利用失活曲线的积累数据间接估计失活时

间,会导致描述概率分布形状的准确性降低。因此,Aspridou等^[61]开发了显微镜时间推移法,结合碘化丙啶(PI)荧光染色监测单个细胞的失活行为。利用高通量细菌单细胞分析管道(BaSCA)^[62],将随时间推移的每帧图片转化为对单细胞失活时间定量的依据。并且采用修正的Gompertz方程,见式(14)拟合荧光染色细胞的数量,进一步使用蒙特卡洛模拟预测单细胞失活时间的分布。

$$P_t(\%) = P_{\max} \exp\left[-\exp\left[\frac{\mu_c e(1)}{P_{\max}}(\lambda_c - t) + 1\right]\right] \quad (14)$$

式中:

t ——时间;

P_t —— t 时间细胞表面被碘化丙啶覆盖的数量百分比;

P_{\max} —— $t \rightarrow +\infty$ 时的渐进 P_t 值;

μ_c ——拐点切线的斜率;

λ_c ——拐点切线与 t 轴的截距。

此外,沙门氏菌菌落的大小、菌落中细胞的位置都会影响单细胞的失活时间。目前关于沙门氏菌在单细胞水平上失活建模的研究还比较少,往后还需要进行更深入的研究来完善失活建模工作。

4 总结与展望

在肉禽及其制品中,沙门氏菌是重点控制的食源性致病菌。本文总结的失活模型及其参数可以反映不同控制条件对不同食品中沙门氏菌的作用效果,这对肉禽及其制品中沙门氏菌的食品安全风险评估及质量控制具有重要意义。

在今后沙门氏菌的失活模型研究中,展望如下:

(1)在实际食品基质中建立失活模型。大多数预测模型都是基于液体模型系统中的实验而开发的,未来仍然需要基于具体情况对现有的预测模型进行修正甚至建立新的且更适合实际情况的模型。

(2)研究微生物细胞恢复的机制。目前,描述细胞亚致死状态的模型大致只有两种,并且很少有研究涉及细胞损伤后的恢复情况。因此,模拟微生物受到细胞损伤的真实环境和研究细胞恢复的机制,能够为建立损伤/修复模型提供理论参考。

(3)更加深入地研究单细胞的异质性行为。目前,虽然关于单细胞的异质性信息非常有限,但是新开发的模型和概率方法有望得到发展和改进。而且,进一步研究单细胞失活时间的分布与环境之间的关系,有助于制定更加有效的食品质量和安全管理办法。

参考文献

- [1] Shrivastava S, Shrivastava P, Ramasamy J. World health

- organization releases estimates of foodborne diseases for the very first time: an opportunity for the national program managers [J]. *International Journal of Health System and Disaster Management*, 2016, 4(2): 71-72
- [2] 朱江辉,宋筱瑜,王晔茹,等.我国食品微生物定量风险分级模型初探与应用[J].*中国食品卫生杂志*,2016,28(4):516-522
ZHU Jianghui, SONG Xiaoyu, WANG Yeru, et al. Preliminary investigation of quantitative food microbial risk ranking model and its applications [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2016, 28(4): 516-522
- [3] Kariuki S, Kiiru J. Detection and characterization of *Salmonella enterica* serotypes by simple PCR technologies [J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J.), 2021, 2182: 161-177
- [4] 余树荣.微生物学和微生物学检验[M].北京:人民卫生出版社,1988
YU Shurong. *Microbiology and Microbiology Examination* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988
- [5] 宋晟,郭焜鹏,张海韵,等.生鲜畜禽肉中沙门氏菌污染情况调查[J].*食品安全导刊*,2020,15:97-98
SONG Sheng, GUO Kunpeng, ZHANG Haiyun, et al. Investigation of *Salmonella* contamination in fresh livestock and poultry meat [J]. *China Food Safety Magazine*, 2020, 15: 97-98
- [6] 唐廷廷,王利娜,林华,等.生鲜畜禽肉中金黄色葡萄球菌风险评估研究进展[J].*肉类研究*,2017,31(7):67-72
TANG Tingting, WANG Lina, LIN Hua, et al. Advances in risk assessment of *Staphylococcus aureus* in fresh meat in China [J]. *Meat Research*, 2017, 31(7): 67-72
- [7] Th. Madsen, Max Nyman. Zurtheorie der desinfektion I [J]. *Zeitschriftfür Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1907, 57(1): 388-404
- [8] C O Ball, F C W Olson. Sterilization in food technology theory, practice and calculation [J]. McGraw-Hill Book, 1957
- [9] Katzin L I, Sandholzer L A, Strong M E. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization [J]. *Journal of Bacteriology*, 1943, 45(3): 265-272
- [10] 郑婷.冷却牛肉中沙门氏菌的生长动力学模型和热失活模型的建立[D].泰安:山东农业大学,2015
ZHENG Ting. Development of growth model and thermal inactivation model of *Salmonella* in chilled beef [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2015
- [11] Dimitrios K, Panagiotis N S, Vijay K J. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast [J]. *Food Research International*, 2017, 100: 894-898
- [12] Tareq M O, Anas A Al-Nabulsi, Reyad R S, et al. Thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in chicken shawirma (gyro) [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(1): 15-20
- [13] R Meminn, J J Sindelar, K A Glass, et al. Thermal inactivation of *Salmonella* in high-fat frankfurters [J]. *Meat Science*, 2016, 112: 164
- [14] Juneja V K, Eblen B S, Ransom G M. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in chicken broth, beef, pork, turkey, and chicken: Determination of D- and Z- values [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(1): 146-152
- [15] Gurman P M, Ross T, Holds G L, et al. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in pork burger patties [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 219: 12-21
- [16] Veeramuthu G J, Price J F, Davis C E, et al. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella senftenberg*, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground turkey thigh meat [J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(2): 171-175
- [17] Ahmed N M, Conner D E, Huffman D L. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition [J]. *Journal of Food Science*, 1995, 60(3): 606-610
- [18] V K Juneja, B S Eblen, H M Marks. Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70(1): 37-51
- [19] 张佩佩,牛会敏,李苗云,等.不同介质中甲型副伤寒沙门氏菌的热失活特性[J].*食品科学*,2017,38(14):58-63
ZHANG Peipei, NIU Huiming, LI Miaoyun, et al. Thermal inactivation properties of *Salmonella paratyphi* A in different media [J]. *Food Science*, 2017, 38(14): 58-63
- [20] 惠利娜.生鲜鸡肉和熏煮火腿中沙门氏菌流行状况及热抗性研究[D].郑州:河南农业大学,2014
HUI Lina. The prevalence of *Salmonella* and thermal resistance in chicken and ready-to-eat meat [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014
- [21] Xiang W, Evy L, De Boeck Elien, et al. Growth and inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth and validation in ground pork meat during simulated home storage abusive temperature and home pan-frying [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1161
- [22] Yadav A S, Saxena G K, Saxena V K, et al. Thermal

- inactivation of *Salmonella* typhimurium on dressed chicken skin previously exposed to acidified sodium chlorite or carvacrol [J]. *Food Control*, 2016, 66: 227-232
- [23] Suo B, Lu Y, Wang Y, et al. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* spp. in ground pork supplemented with cinnamaldehyde [J]. *Journal of Food Safety*, 2017, 37(3): e12322
- [24] A H Geeraerd, C H Herremans, J F Van Impe. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59(3): 185-209
- [25] Cerf O. Tailing of survival curves of bacterial spores [J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1977, 42(1): 1-19
- [26] S C Stringer, S M George, M W Peck. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(S1): 79S-89S
- [27] 朱立贤,郑婷,董鹏程,等.牛肉中沙门氏菌热失活模型的建立[J].食品工业科技,2018,39(17):89-93
- ZHU Lixian, ZHENG Ting, DONG Pengcheng, et al. Thermal inactivation model of *Salmonella* in beef [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(17): 89-93
- [28] Rachon G, Peñaloza W, Gibbs P A. Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 231: 16-25
- [29] Xingning X, Wen W, Xibin Z, et al. Modeling the reduction of *Salmonella* spp. on chicken breasts and wingettes during scalding for QMRA of the poultry supply chain in China [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(6): 165
- [30] Milkievicz Tatiane, Badia Vinicius, Souza Vanessa Barreira, et al. Modeling *Salmonella* spp. inactivation in chicken meat subjected to isothermal and non-isothermal temperature profiles [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 344(16): 109119
- [31] Coroller L, Leguerinel I, Mettler E, et al. General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6493-6502
- [32] Geeraerd A H, Valdramidis V P, Van Impe J F. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102(1): 95-105
- [33] Mutz Yhan S, Rosario Denes K A, Bernardes Patricia C, et al. Modeling *Salmonella* typhimurium inactivation in dry-fermented sausages: previous habituation in the food matrix undermines UV-C decontamination efficacy [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11
- [34] Bonah Ernest, Huang Xingyi, Hongying Yang, et al. Nondestructive monitoring, kinetics and antimicrobial properties of ultrasound technology applied for surface decontamination of bacterial foodborne pathogen in pork [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 70: 105344
- [35] Hee Jeong Hwang, Ji Hyun Seo, Chanmin Jeong, et al. Analysis of bacterial inactivation by intense pulsed light using a double-Weibull survival model [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019, 56: 102185
- [36] Anastasia E L, Konstantinos Tzortzinis, Panagiotis N S, et al. Investigating the influence of organic acid marinades, storage temperature and time on the survival/inactivation interface of *Salmonella* on chicken breast fillets [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 299: 47-57
- [37] Rui Li, Xiaoxi Kou, Lihui Zhang, et al. Inactivation kinetics of food-borne pathogens subjected to thermal treatments: a review [J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2018, 34(2): 177-188
- [38] Biao Suo, Yangliu Lu, Yuexia Wang, et al. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* spp. in ground pork supplemented with cinnamaldehyde [J]. *Journal of Food Safety*, 2017, 37(3): e12322
- [39] Si Hyeon Roh, Yeong Ji Oh, Seung Young Lee, et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Tulane virus in processed chicken breast via atmospheric in-package cold plasma treatment [J]. *LWT*, 2020, 127: 109429
- [40] López Romero Julio Cesar, Valenzuela Melendres Martin, Juneja Vijay K, et al. Effects and interactions of gallic acid, eugenol and temperature on thermal inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken [J]. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 2018, 103: 289-294
- [41] T P Oscar. Neural network model for thermal inactivation of *Salmonella* typhimurium to elimination in ground chicken: acquisition of data by whole sample enrichment, miniature most-probable-number method [J]. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(1): 104-112
- [42] S Bover Cid, N Belletti, M Garriga, et al. Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham [J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 1111-1117

- [43] A R D K, S M Y, S C V, et al. Optimization of UV-C light and lactic acid combined treatment in decontamination of sliced Brazilian dry-cured loin: *Salmonella* typhimurium inactivation and physicochemical quality [J]. Meat Science, 2021, 172: 108308
- [44] A Hurst. Bacterial injury: a review [J]. NRC Research Press Ottawa, 1977, 23(8): 935-944
- [45] Verheyen D, Baka M, Akkermans S, et al. Effect of microstructure and initial cell conditions on thermal inactivation kinetics and sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in fish-based food model systems [J]. Food Microbiology, 2019, 84: 1-14
- [46] Tina Beck Hansen, Susanne Knøchel. Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in sous vide cooked beef [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63(1): 135-147
- [47] J L Smith, D L Archer. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1988, 3(2): 105-110
- [48] Wang X, Devlieghere F, Geeraerd A, et al. Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth versus agar surface [J]. International Journal of Food, Microbiology, 2017, 243: 70-77
- [49] Suo B, Shi C, Shi X. Inactivation and occurrence of sublethal injury of *Salmonella* typhimurium under mild heat stress in broth [J]. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012, 7(2): 125-131
- [50] Sherre C L, Neelam N, K J V, et al. Thermal injury and recovery of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in ground chicken with temperature, pH, and sodium chloride as controlling factors [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(9): 2058-2065
- [51] Saldaña G, Puértolas E, Condón S, et al. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* typhimurium in media of different pH [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(2): 290-298
- [52] Corradini, M G, M Peleg. Dynamic model of heat inactivation kinetics for bacterial adaptation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(8): 2590-2597
- [53] V P Valdramidis, A H Geeraerd, J F Van Impe. Stress-adaptive responses by heat under the microscope of predictive microbiology [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1922-1930
- [54] Knabel S J, Walker H W, Hartman P A, et al. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(2): 370-376
- [55] Diller Kenneth R. Stress protein expression kinetics [J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2006, 8: 403-424
- [56] I T M, P M B, T R E, et al. Evaluating the predictive ability of a path-dependent thermal inactivation model for *Salmonella* subjected to prior sublethal heating in ground turkey, beef, and pork [J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(2): 220-226
- [57] J B T, I T M, P M B, et al. Evaluation of *Salmonella* thermal inactivation model validity for slow cooking of whole-muscle meat roasts in a pilot-scale oven [J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(11): 1897-1903
- [58] Konstantinos P Koutsoumanis, Zafiro Aspidou. Individual cell heterogeneity in predictive food microbiology: challenges in predicting a "noisy" world [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 240: 3-10
- [59] Zafiro Aspidou, Konstantinos P Koutsoumanis. Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation [J]. Food Microbiology, 2015, 45: 216-221
- [60] Kento Koyama, Hidekazu Hokunan, Mayumi Hasegawa, et al. Modeling stochastic variability in the numbers of surviving *Salmonella enterica*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* cells at the single-cell level in a desiccated environment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(4): e02974-16
- [61] Aspidou Z, Akritidou T, Koutsoumanis K P. Simultaneous growth, survival and death: the trimodal behavior of *Salmonella* cells under osmotic stress giving rise to "Phoenix phenomenon" [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 285: 103-109
- [62] Athanasios D Balomenos, Panagiotis Tsakanikas, Zafiro Aspidou, et al. Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology [J]. BMC Systems Biology, 2017, 11(1): 43