

生孢梭菌芽孢萌发条件的优化

黄忠民, 郭鼎, 潘治利, 艾志录, 雷萌萌, 索标

(河南农业大学食品科学技术学院, 国家速冻米面制品加工技术研发专业中心, 农业部大宗粮食加工重点实验室, 河南省冷链食品工程技术研究中心, 河南郑州 450002)

摘要: 本文研究了不同温度、时间和 pH 值条件下, 生孢梭菌芽孢萌发所需的最佳条件。本研究将活化传代好的生孢梭菌菌液培养 7 d, 多次离心后, 加入无菌水制成生孢梭菌芽孢悬浮液, 处理温度为 70 °C~90 °C, 处理时间为 5~25 min, 处理 pH 值为 4~8, 用平板计数法观察计算不同条件处理后的芽孢萌发率, 用响应面优化法对影响生孢梭菌芽孢萌发率三个条件的最佳值进行了研究。通过分析所建立的二次多项回归方程, 得到生孢梭菌芽孢萌发的最佳条件为, 当温度为 80.90 °C, 时间为 20.72 min, pH 值为 4.69 时, 生孢梭菌芽孢萌发率最高可以达到 80%。本文试验结合芽孢萌发机理, 利用芽孢的最佳萌发条件, 用较温和的条件使芽孢萌发, 为使芽孢“先萌发, 再杀灭”的新杀菌方式奠定基础, 为杀灭芽孢这一难题提供了新思路和低强度杀菌的可行性, 对将其应用于低酸性罐头食品的杀菌有重要意义。

关键词: 食品加工与安全; 生孢梭菌; 芽孢; 萌发; 肉毒梭菌

文章编号: 1673-9078(2021)02-49-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0783

Optimization of Spore Germination Conditions of *Clostridium sporogenes*

HUANG Zhong-min, GUO Nai, PAN Zhi-li, AI Zhi-lu, LEI Meng-meng, SUO Biao

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, National R&D Center of Quick-frozen Rice and Noodles Processing Technology, Key Laboratory of Bulk Grain Processing, Ministry of Agriculture, Henan Engineering Technology Research Center of Cold Chain Food, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To study the optimum conditions for the spore germination of *Clostridium sporogenes* under different temperature, time and pH values, in this study, the spore suspension of *Clostridium sporogenes* was prepared by activating the passaged *Clostridium sporogenes* solution for 7 days, centrifugation for several times, and adding sterile water. The treatment temperature was 70 °C~90 °C, and the treatment time was 5~25 min. The germination rate of *Clostridium sporogenes* was observed and calculated by plate counting method, and the optimal values of three conditions affecting the germination rate of *Clostridium sporogenes* were studied by response surface methodology. Through the analysis of the quadratic multiple regression equation, the best conditions for spore germination of *Clostridium sporogenes* were obtained as follows: when the temperature was 80.90 °C, the time was 20.72 min, and the pH value was 4.69, the highest germination rate of *Clostridium sporogenes* could reach 80%. In this paper, combined with the mechanism of spore germination, the optimum germination conditions of spores were used to make the spores germinate under mild conditions, which laid the foundation for the new sterilization method of "germination first and then killing"; and provided a new idea and feasibility of low-intensity sterilization for the difficult problem of spore killing, which was of great significance to the application of low-intensity sterilization in the sterilization of low acid canned food.

Key words: food processing and safety; *Clostridium biosporum*; spore; germination; *Clostridium botulinum*

引文格式:

黄忠民, 郭鼎, 潘治利, 等. 生孢梭菌芽孢萌发条件的优化[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 49-55

HUANG Zhong-min, GUO Nai, PAN Zhi-li, et al. Optimization of spore germination conditions of *Clostridium sporogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 49-55

收稿日期: 2020-08-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0400502); 郑州市科技重大专项 (174PZDX576); 河南省科技攻关项目 (182102110064)

作者简介: 黄忠民 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 速冻食品

通讯作者: 索标 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物分子生态与食品安全

罐头食品杀菌目的是杀死食品中所污染的致病菌和腐败菌, 并破坏食物中的酶使产品的货架期达到二年以上。在肉类罐头中最易发生中毒事件的就是肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) 毒素中毒^[1]。肉毒梭状芽孢杆菌是低酸性罐头食品中危害最大的微生物之一^[2], 由于其产生强效神经毒素和抗性内生孢子的能力

而成为重要的食品安全问题^[3]。肉毒梭状芽孢杆菌属于厌氧性梭状芽孢杆菌属,为革兰氏阳性菌,专性厌氧生长^[4],最常用的杀菌方式是高温高压杀菌,但这种杀菌方法温度高、时间长,不仅会导致食物因产生“蒸煮味”而口感变差^[5,6],也容易导致营养物质被破坏。随着食品工业的发展,高温高压等杀菌方法正在被改进。同时,找到肉毒梭状芽孢杆菌低强度的杀菌方式是低酸性罐头食品杀菌问题中的关键点和难点。

但肉毒梭状芽孢杆菌属于高致病性病原微生物,对研究人员的生命安全存在一定威胁,而生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)的性质和特征都与肉毒梭状芽孢杆菌非常相似,所以常作为实验室中肉毒梭状芽孢杆菌的替代菌进行研究^[7]。

生孢梭菌又译产孢梭菌,是典型的严格厌氧型细菌,为梭状芽孢杆菌属,细胞大小(0.3~0.4) $\mu\text{m} \times$ (1.4~6.6) μm ,芽孢卵圆形、次端生。在固体培养基上菌落直径 2~6 mm,中部突起,白色至淡黄色,边缘假根状,半透明,表面无光泽,能分解蛋白质和糖类,发酵葡萄糖和麦芽糖,产丁酸和少量乙酸等,存在于土壤、伤口和肠道内。生孢梭菌是不产毒素的蛋白水解型肉毒梭菌 B、E、和 F 种的研究替代菌,本身也能引起食品的腐败^[8,9]。同时,生孢梭菌也是近几年微生物中的研究热潮,Valero Antonio 等研究了 pH、NaCl 和时间对产孢梭菌的孢子萌发概率的影响^[10];郭长凯等研究了微波热处理对生孢梭菌的影响,通过设计同步升温曲线分析微波和传统热处理对三文鱼样品中生孢梭菌的灭活效果^[11]。杜翠荣等研究了次磷酸钠对部分革兰氏阳性厌氧菌(特别是肉制品中肉毒梭菌)的抑制效果^[12]。马仕洪等采用抗力仪和油浴仪处理生孢梭菌的芽孢悬液,使其达到灭菌条件^[13]。

生孢梭菌个体生长到一定阶段,受到营养缺乏、环境胁迫等因素的刺激就会产生芽孢^[14],芽孢可能呈圆形或是椭圆形,直径大于菌体直径^[15],会使整个菌体呈梭形^[16]。芽孢由外壁、芽孢衣、外膜、皮层、细胞壁、内膜和内核等结构组成(图1)。其中,芽孢的原生质体中有 2,6-吡啶二羧酸(dipicolinic acid)含量高,为芽孢干重的 5%~15%,能与钙离子形成络合物对热和其他致死因子有极强的抗逆性,芽孢形成过程中,2,6-吡啶二羧酸随即合成,芽孢就会具有耐热性。

芽孢可以长时间保持休眠状态,一旦遇到适宜的环境,芽孢就能迅速萌发成为具有代谢功能的营养细胞,从而降低对外界刺激的耐受力^[17-20]。它对高温、高静压、干燥、辐射、低温等条件都具有极强的抗逆性^[21,22]。芽孢的热抵抗力很强,干热 180 $^{\circ}\text{C}$, 5~15 min 或高压蒸汽 121 $^{\circ}\text{C}$, 30 min,才能被杀死。同时,芽

孢在探测到外界有适宜萌发条件时就会开始萌发,生长成新的营养细胞^[23]。

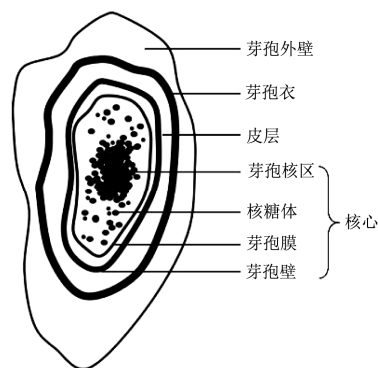


图1 芽孢结构示意图

Fig.1 Endospore structure diagram

常见的高温高压的灭菌方式会使产品品质大大降低,找到一种低强度的灭菌方法,能够较大程度的保留食物的风味和营养价值是食品工业的新热点。结合芽孢萌发机理,找到芽孢萌发的最佳条件,使芽孢“先萌发,再杀灭”为这一难题提供了新思路和低强度杀菌的可行性,对其应用于低酸性罐头食品有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

生孢梭菌(10385),购于中国工业微生物保藏管理中心,0代菌,包装形式为冻干管;硫乙醇酸盐流体培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;平板计数琼脂,北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

无菌操作台,苏州净化设备有限公司;恒温水浴锅、恒温恒湿培养箱,上海鸿都电子科技有限公司;SX-500型高压蒸汽灭菌锅,日本 TONY 公司;20 mL 玻璃瓶;厌氧盒、厌氧袋,日本三菱瓦斯化学株式会社;JJ3000型电子分析天平,常州市双杰测试仪器厂;pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 实验流程

菌种活化→继代培养→收集芽孢→单因素试验→响应面试验→结果分析

1.3.2 菌种活化与继代培养

1.3.2.1 菌种活化

在无菌操作台中开启菌种冻干管,加入 1 mL 硫乙醇酸盐流体培养基,将冻干粉菌种溶解,取 0.1 mL 冻干粉菌液转移到装有 10 mL 硫乙醇酸盐流体培养基

的玻璃瓶中^[24],用无菌棉塞在玻璃瓶口,将玻璃瓶至于35℃的厌氧盒中培养24 h。

1.3.2.2 菌种继代培养

取0.1 mL上述活化后的新鲜培养物加至10 mL硫乙醇酸盐培养基中35℃培养24 h,重复两次^[25]。

1.3.3 芽孢悬浮液的制备

7 d后取少量培养液做芽孢染色镜检,发现有大量芽孢存在。取培养液至无菌离心管中,2000 r/min,4℃离心10 min,取上清液;6000 r/min,4℃离心10 min取底部沉淀,加入无菌水混匀,重复离心3次,再次加入无菌水混匀,获得芽孢悬浮液,置于4℃冰箱内保存备用^[26]。

1.3.4 单因素试验

试验单元为含有芽孢浓度为 10^8 CFU/mL的1.5 mL硫乙醇酸盐培养基液体。参考肉毒梭状芽孢杆菌的芽孢萌发最佳时间和温度^[1]设置本试验中单因素的水平及梯度。

1.3.4.1 不同水浴时间处理

将样品在水浴温度为80℃,pH值为5.0条件下分别处理5、10、15、20、25 min,重复三次。

1.3.4.2 不同温度处理

将样品在水浴时间为20 min,pH值为5.0条件下分别处理70℃、75℃、80℃、85℃、90℃,重复三次。

1.3.4.3 不同pH值处理

在pH值低于4.6的条件下,大多数芽孢不会萌发且生长受到抑制。将样品在水浴温度为85℃,处理时间为20 min条件下分别调整pH值为4、5、6、7、8,重复三次。

1.3.5 响应面优化

在单因素试验的基础上,根据Box-Behnken设计原理,以芽孢萌发率为响应值,选取温度(A)、时间(B)、pH值(C)为影响因子,每个因子取三个水平,以(-1, 0, 1)编码,进行3因素3水平响应面实验,试验因素水平设计见表1。

表1 响应面试验因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	-1	0	1
A (温度/℃)	75	80	85
B (时间/min)	15	20	25
C (pH值)	4	5	6

1.3.6 芽孢平板计数

将处理前后的芽孢悬浮液进行平板稀释,每个平板中加入0.1 mL的稀释菌液,在35℃的厌氧盒中进行培养,48 h后进行计数^[27]。

2 试验结果与数据分析

2.1 单因素试验结果

查阅文献可知,芽孢常见的萌发温度为60℃~80℃,而梭菌属比杆菌属的细菌耐热性更强,芽孢更难萌发。本实验在预实验的基础上将温度设定为70、75、80、85、90℃等5个梯度,将时间设定为5、10、15、20、25 min等5个梯度,将pH值设定为4、5、6、7、8等5个梯度,进行单因素实验。

2.1.1 不同处理温度对芽孢萌发率的影响

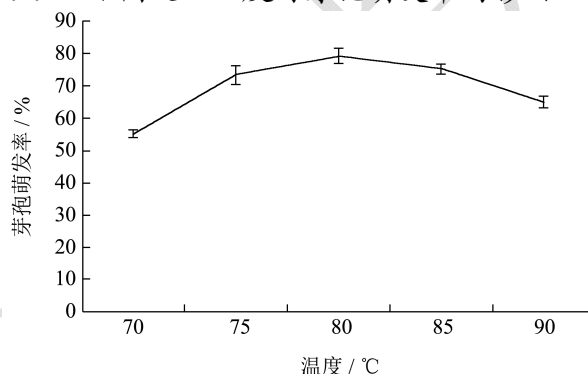


图2 不同温度对芽孢萌发率的影响

Fig.2 Effect of processing temperature on spore germination

由图2可知,生孢梭菌芽孢的萌发率随着温度的升高而增加,当温度达到80℃时,萌发率最高达到79.13%,然后随着温度的升高而降低。大部分芽孢的萌发温度在60℃~80℃,可知温度达到80℃时,热作用对生孢梭菌芽孢外壁的刺激达到最大,促使芽孢萌发。

2.1.2 不同处理时间对芽孢萌发率的影响

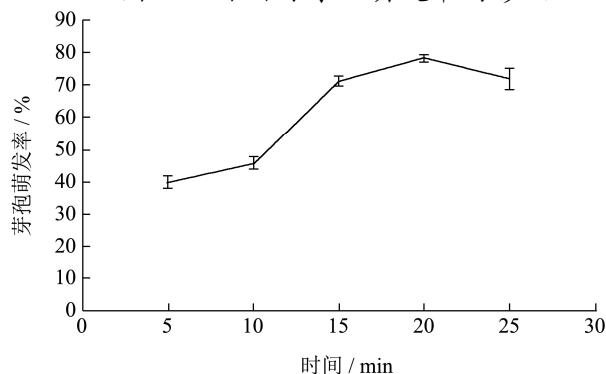


图3 不同时间对芽孢萌发率的影响

Fig.3 Effect of different time on spore germination rate

由图3可知,生孢梭菌芽孢的萌发率随着时间的增长而升高,当时间达到20 min时,萌发率最高达到78.04%,然后随着温度的升高而降低。大部分芽孢的萌发时间在10~30 min,可知当热处理时间达到20 min时,生孢梭菌芽孢萌发成新的菌体的数量最多,萌发

率达到最高。

2.1.3 不同处理 pH 值对芽孢萌发率的影响

由图 4 可知,生孢梭菌芽孢的萌发率在 pH 值为 5 时,萌发率最高达到 75.89%,然后随着 pH 值的升高而降低。对于酸性食品,其 pH 低于 4.6,大多数芽孢不会萌发且生长受到抑制,当生孢梭菌芽孢在 pH 值为 5 时,萌发率最高达到最高,但在 pH 值为 4 时,萌发率并没有大幅度降低,可能是因为实验操作过程中,调节降低 pH 值时,花费时间较长,使部分芽孢在调节 pH 值时就已经萌发。

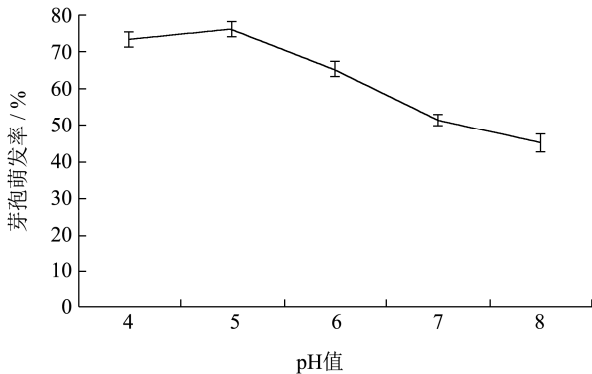


图 4 不同 pH 值对芽孢萌发率的影响

Fig.4 Effect of different pH on spore germination rate

2.2 响应面优化试验结果

用 Box-Behnken 设计原理设计试验结果,以温度 (A)、时间 (B)、pH 值 (C) 为自变量,以生孢梭

菌的芽孢萌发率为结果分析值,运用响应面测试结果,见表 2。

利用 Box-Behnken 使用方法原理得出实验结果,再利用 Design Expert7.0 分析软件对肉毒梭状芽孢杆菌芽孢萌发率回归性总结分析和方差分析,见表 3。

表 2 响应面分析实验设计及结果

Table 2 Results of response surface experiments

序号	A	B	C	Y 芽孢萌发率/%
1	85.00	20.00	6.00	65.01
2	80.00	15.00	6.00	59.12
3	80.00	20.00	5.00	79.13
4	75.00	15.00	5.00	63.19
5	80.00	25.00	4.00	71.89
6	85.00	25.00	5.00	70.06
7	80.00	20.00	5.00	80.05
8	80.00	20.00	5.00	80.17
9	75.00	20.00	6.00	60.79
10	75.00	20.00	4.00	65.99
11	75.00	25.00	5.00	63.04
12	80.00	20.00	5.00	78.04
13	85.00	15.00	5.00	62.22
14	85.00	20.00	4.00	71.34
15	80.00	15.00	4.00	67.09
16	80.00	20.00	5.00	78.05
17	80.00	25.00	6.00	59.23

表 3 二次响应面回归模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic response surface regression model

方差来源	总和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	915.15	9	101.68	41.53	<0.0001	***
A	30.50	1	30.50	12.46	0.0096	**
B	19.85	1	19.85	8.10	0.0248	*
C	129.28	1	129.28	52.80	0.0002	***
A2	178.18	1	178.18	72.77	<0.0001	***
B2	266.47	1	266.47	108.83	<0.0001	***
C2	194.71	1	194.71	79.52	<0.0001	***
AB	15.96	1	15.96	6.52	0.0379	*
AC	0.32	1	0.32	0.13	0.7287	
BC	5.50	1	5.50	2.25	0.1776	
残差	17.14	7	2.45			
失拟项	12.87	3	4.29	4.01	0.1064	
净误差	4.27	4	1.07			
总离差	932.29	16				

注*: 显著性 ($0.01 < p < 0.05$); **: 极显著性 ($p < 0.01$)。

据表 3, 理论模型 $p < 0.05$, 芽孢萌发率的系数 $R^2 = 0.9816$, 调整 $R^2 = 0.9580$, 说明理论模型显著, 非

试验因素的影响较小; 失拟项 $p = 0.1064 > 0.05$, 不显著, 可以说明模型比较可信。所以可以用该模型理论

值和对具体结果进行测试和结果值预测。获得的芽孢萌发率 Y 对自变量水浴温度 (A)、水浴时间 (B) 和 pH 值 (C) 的多元回归方程:

$$Y = 79.09 + 1.95A + 1.58B - 4.02C - 6.51A^2 - 7.96B^2 - 6.80C^2 + 2.00AB - 0.28AC - 1.17BC$$

此方程说明生孢梭菌萌发率与 3 个不同自变量的相关性显著, 试验结果可靠。

通过响应面的数字组合分析得到芽孢萌发的最佳条件为: 当温度 80.90 °C, 时间 20.72 min, pH 值 4.69 时, 生孢梭菌芽孢萌发率最高达到 80.00%。

2.3 响应曲面图和等高线图分析

2.3.1 温度和时间两两因子交互作用

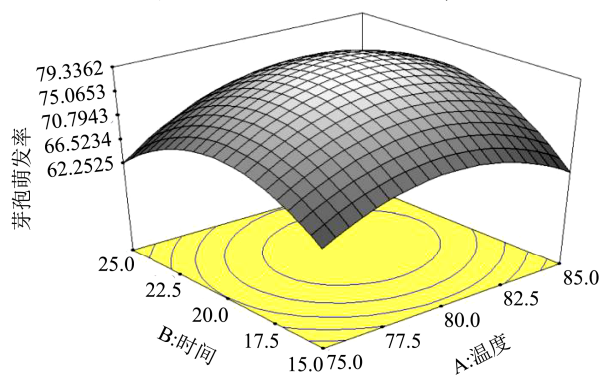


图 5 温度和时间响应曲面图

Fig.5 Temperature and time response surface diagram

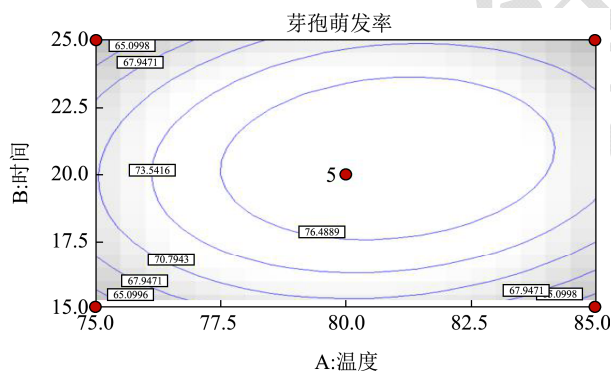


图 6 温度和时间等高线图

Fig.6 Temperature and time contour plot

由图 5 和 6 可知, 该响应面的坡度大且等高线的形状不圆但较扁, 说明时间温度的交互作用很强。温度坡度更大且等高线聚积, 说明温度对芽孢萌发率的影响更大。

2.3.2 温度和 pH 值两两因子交互作用

由图 7 和 8 可知, 温度和 pH 值的交互作用响应面等高图的等高线呈圆形, 说明其交互作用不显著。pH 值坡度更大且等高线聚积, 说明 pH 值对芽孢萌发率的影响更大。

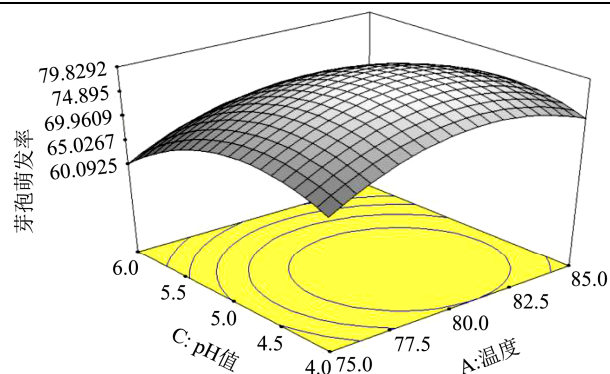


图 7 温度和 pH 值响应曲面图

Fig.7 Response surface diagram of temperature and pH values

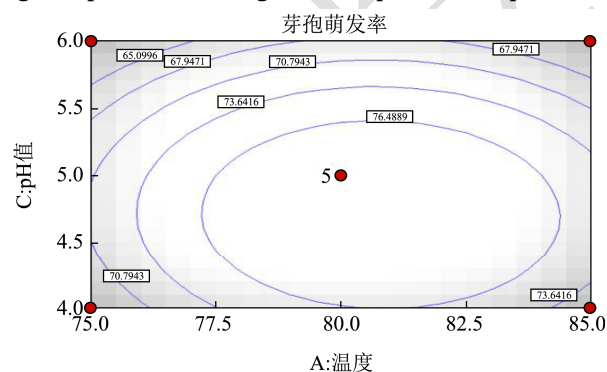


图 8 温度和 pH 值等高线图

Fig.8 Temperature and pH contour plot

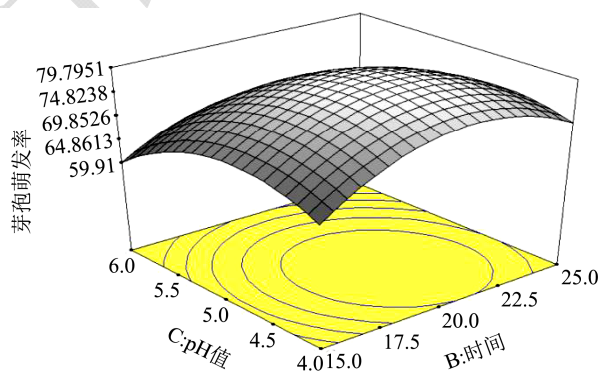


图 9 时间和 pH 值响应曲面图

Fig.9 Time and pH response surface graph

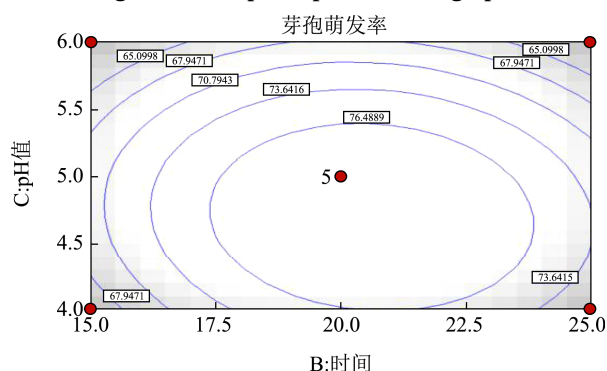


图 10 时间和 pH 值等高线图

Fig.10 Time and pH contour plot

2.3.3 时间和 pH 值两两因子交互作用

由图 9 和 10 可知,时间和 pH 值的交互作用响应面等高图的等高线形状较圆。pH 值坡度更大且等高线聚积,说明 pH 值对芽孢萌发率的影响更大。

2.4 响应面验证试验

通过 Design-Expert 软件对回归方程分析,得到温度为 80.90 °C,时间为 20.72 min, pH 值为 4.69 时,生孢梭菌芽孢萌发率最高达到 80.00%。为了验证该方法的可靠性并考虑到实际情况,将最佳工艺参数修正为温度为 80 °C,时间为 21 min, pH 值为 4.7,在此条件下进行验证试验,重复三次,芽孢平均萌发率为 79.66%,理论值和试验值相差不大,说明模型可以较好地模拟和预测生孢梭菌芽孢萌发率,从而也证明了采用响应面法优化生孢梭菌芽孢萌发条件参数的可行性。

3 结论

3.1 单因素实验的最佳条件为:温度 80 °C、时间 21 min、pH 值为 5。通过单因素实验,找到了各个影响因素的最佳范围,并对其用了 3 因素 3 水平的响应面法实验设计优化生孢梭菌芽孢萌发条件。根据响应面法得到生孢梭菌芽孢优化的最佳条件为温度 80.90 °C、时间 20.72 min、pH 值为 4.69 时,生孢梭菌的芽孢最高萌发率达到 80%,还有一部分芽孢没有萌发,原因可能是剩余芽孢为“超级芽孢”很难萌发。

3.2 生孢梭菌(肉毒梭菌)作为肉制品和罐头食品中的主要致病菌之一,近年来逐渐引起许多国内外学者的关注和重视。虽然高温高压等条件可以达到杀灭生孢梭菌的目的,但不仅容易破坏产品品质,且生孢梭菌具有高度的可逆性,找到一种更佳的杀菌方式仍是当前食品工业所面临的严峻考验。近年来随着人民生活水平的逐渐提高,全世界对食品安全问题的关注度的提高,灭活食品中的致病菌是今后食品行业的重点方向。本文试验可结合芽孢萌发机理,利用芽孢的最佳萌发条件,为杀灭芽孢这一难题提供了新思路和低强度杀菌的可行性,对提高食品的安全性,将其应用于低酸性罐头食品的杀菌有重要意义和实际应用价值。

参考文献

- [1] 项丰娟.肉毒梭状芽孢杆菌芽孢萌发条件及鸡肉罐头低温杀菌方法的研究[D].新乡:河南科技学院,2015
XIANG Feng-juan. Study on spore germination conditions of *Clostridium botulinum* and low-temperature sterilization

method of canned chicken [D]. Xinxiang: Henan University of Science and Technology, 2015

- [2] 袁运开,顾明远,孙大文.科学技术社会辞典(生物)[M].浙江教育出版社,1991
YUAN Yun-kai, GU Ming-yuan, SUN Da-wen. Social Dictionary of Science and Technology (Biology) [M]. Zhejiang Education Press, 1991
- [3] Pernu Noora, Keto-Timonen Riikka, Lindström Miia, et al. High prevalence of *Clostridium botulinum* in vegetarian sausages [J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103512
- [4] 林修光,寇运同.肉毒梭菌与食物中毒[J].食品科学,2003, 24(8):194-196
LIN Xiu-guang, KOU Yun-tong. *Clostridium botulinum* and food poisoning [J]. Food Science, 2003, 24(8): 194-196
- [5] 刘永强.软罐头食品的杀菌[J].肉类工业,2008,2:34-37
LIU Yong-qiang. Sterilization of soft pot [J]. Food Meat Industry, 2008, 2: 34-37
- [6] 费斐,薛凤照,王学辉.罐头食品杀菌技术研究进展.海军医学杂志,2010,2:181-183
FEI Fei, XUE Feng-zhao, WANG Xue-hui. Advances in germicidal technology of canned food [J]. Naval Medical Journal, 2010, 2: 181-183
- [7] 徐应淑,张景群.桑白皮中总黄酮的最佳提取工艺[J].贵州农业科学,2011,39(8):185-186
XU Ying-shu, ZHANG Jing-qun. Best extraction technology of total flavonoids from mulberry peel [J]. Guizhou Agricultural Science, 2011, 39(8): 185-186
- [8] 董庆利,郭黎洋,屠康,等.不同试验条件下生孢梭菌孢子生长预测方程的建立[J].浙江大学学报(农业与生命科学版), 2007,33(2):162-168
DONG Qing-li, GUO Li-yang, TU Kang, et al. Establishment of prediction equation for spore growth of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions [J]. Journal of Zhejiang University (Agricultural and Life Sciences Edition), 2007, 33(2): 162-168
- [9] Lund B M, Peck M W. The Microbiological Safety and Quality of Food [M]. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc, 2000: 1057-1109
- [10] 杜翠荣,李金禄.次磷酸钠对肉制品中肉毒梭状芽孢杆菌(生孢梭菌)的抑制效果研究[J].中国食品添加剂,2019, 30(1):142-148
DU Cui-rong, LI Jin-lu. Effect of sodium hypophosphite on *Clostridium botulinum* (*Clostridium sporogenes*) in meat products [J]. Study China Food Additives, 2019, 30(1): 142-148

- [11] Hasan Yetim, Ahmed Kayacier, Zual Kesmen, et al. The effects of nitrite on the survival of *Clostridium sporogenes* and the autoxidation properties of the kavurma [J]. Meat Science, 2006, 72: 206-210
- [12] Antonio Valero, Elena Olague, Eduardo Medina-pradas, et al. Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and Time [J]. Foods, 2020, 9(2): 127
- [13] 郭长凯, 栾东磊. 微波热处理对生孢梭菌灭活效果的影响研究[C]. 中国食品科学技术学会(Chinese Institute of Food Science and Technology). 中国食品科学技术学会第十六年年会暨第十届中美食品业高层论坛论文摘要集. 中国食品科学技术学会(Chinese Institute of Food Science and Technology): 中国食品科学技术学会, 2019: 247-248
GUO Chang-kai, LUAN Dong-lei. Effect of Microwave Heat Treatment on Inactivation of *Clostridium sporogenes* [C]. China Food Science and Technology Society (Chinese Institute of Food Science and Technology). Summary of the 16th Annual meeting of the Chinese Food Science and Technology Society and the 10th China-US Food Industry Forum. China Food Science and Technology Society (Chinese Institute of Food Science and Technology): China Food Science and Technology, 2019: 247-248
- [14] 马仕洪, 王似锦, 熊骏, 等. 抗力仪与油浴法测定生孢梭菌芽孢 D 值和 Z 值的比较[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(1): 7-10
MA Shi-hong, WANG Si-jin, XIONG Jun, et al. Comparison of D and Z values of spores of *Clostridium sporogenes* by resistance meter and oil bath method [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2018, 35(1): 7-10
- [15] 丁国婵. 羊肠毒血症的流行病学及其防控措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 4: 81-81
DING Guo-chan. Epidemiology and prevention and control measures of enterotoxemia in sheep [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts, 2013, 4: 81-81
- [16] 霍振华. 多粘类芽孢杆菌 SQR-21 芽孢形成、萌发特征研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010
HUO Zhen-hua. *Bacillus polymyxis* SQR-21 spore formation and germination characteristics [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [17] Ghosh S, Setlow P. The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 582-590
- [18] Erika Georget, Asel Kushman, Michael Callanan, et al. *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC7953 spore chemical germination mechanisms in model systems [J]. Food Control, 2015, 50: 141-149
- [19] 程琴, 黄庶识, 陈丽梅. 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(9): 878-885
CHENG Qin, HUANG Shu-shi, CHEN Li-mei. Advances in studies on the mechanism of spore germination in *Bacillus* [J]. Life Sciences, 2010, 22(9): 878-885
- [20] Ghosh Sonali, Setlow Peter. Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(6): 1787-1797
- [21] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-525
- [22] 王一晓, 张海红, 章中. 理化因素诱导芽孢萌发研究进展[J]. 农业科学研究, 2016, 37(1): 58-64
WANG Yi-xiao, ZHANG Hai-hong, ZHANG Zhong. Advances in germination of spore induced by physicochemical factors [J]. Agricultural Science Research, 2016, 37(1): 58-64
- [23] 张良. 高静压与温度协同杀灭芽孢的效果与机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015
ZHANG Liang. Effect and mechanism of high hydrostatic pressure and temperature on spore killing [D]. Beijing: Agricultural University of China, 2015
- [24] 杨静, 李翠, 周志云, 等. 生孢梭菌生长所需最低水分活度研究[J]. 中国药业, 2020, 29(7): 102-104
YANG Jing, LI Cui, ZHOU Zhi-yun, et al. A study on the minimum water activity required for growth of *Clostridium sporogenes* [J]. China Pharm, 2020, 29(7): 102-104
- [25] 刘晓菲. 生孢梭菌半固体培养基菌落计数方法的研究[J]. 化工设计通讯, 2016, 42(3): 173-179
LIU Xiao-fei. A study on colony counting method of *Clostridium sporogenes* semisolid medium [J]. Chemical Design Newsletter, 2016, 42(3): 173-179
- [26] Anellis A, Berkowitz D, Kemper D, et al. Production of types A and B spores of *Clostridium botulinum* by the biphasic method: effect on spore population, radiation resistance, and toxigenicity [J]. Applied Microbiology, 1972, 23(4)
- [27] 梁晶晶, 刘宝同, 武梦君, 等. 枯草芽孢杆菌 3 个不同亚种萌发差异初探[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(9): 161-164
LIANG Jing-jing, LIU Bao-tong, WU Meng-jun, et al. A preliminary study on the difference in germination of three different subspecies of *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2019, 55(9): 161-164