

过氧化氢处理中鼠伤寒沙门氏菌 VBNC 态形成及其机制解析

Exploration of the formation and mechanism of VBNC state of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during hydrogen peroxide disinfection

聂新颖 廖红梅 刘元法

NIE Xin-ying LIAO Hong-mei LIU Yuan-fa

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(School of Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:为确定过氧化氢的有效杀菌浓度,以鼠伤寒沙门氏菌为目标微生物,借助分子生物学手段,探究过氧化氢对自来水中鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响及其活性的非可培养状态(viable but non-culturable, VBNC)的形成原因。结果表明:较低过氧化氢浓度(0~15 mmol/L)处理可达到部分杀菌的效果,1 mol/L 以上过氧化氢可完全灭菌。而 15 mmol/L 过氧化氢处理导致 4.08 lg(CFU/mL)鼠伤寒沙门氏菌全部进入 VBNC 状态。该状态的沙门氏菌形态和结构改变,过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶几乎完全被钝化,处理中产生的自由基强度在 0~30 min 内与 VBNC 发生系数呈正相关。

关键词:过氧化氢;鼠伤寒沙门氏菌;活性的非可培养状态;自由基

Abstract: In order to determine the effective bactericidal concentration of hydrogen peroxide, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was used as a target microorganism to explore the effect of hydrogen peroxide on activity and culturability of it in tap water and its viable but non-culturable (VBNC) state by means of molecular biology. The results showed that lower hydrogen peroxide concentration (0~15 mmol/L) could kill some *S. Typhimurium*, which could be completely sterilized with 1 mol/L hydrogen peroxide. It was also found that 4.08 lg(CFU/mL) *S. Typhimurium* could be induced into a VBNC state as exposure to 15 mmol/L hydrogen peroxide. The morphology and structure of

S. Typhimurium in VBNC state have changed, and the catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were almost completely inactivated. It was detected that the intensity of free radicals generated during treatment was positively correlated with VBNC indexes within 0~30 min.

Keywords: hydrogen peroxide; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; viable but non-culturable; free radical

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是一种常见的食源性致病菌,属于革兰氏阴性肠道杆菌,其血清型具有致病性^[1]。该病原菌主要寄居于胃肠道,引起胃肠道感染,其菌型繁多,分布广泛^[2]。在全球食物中毒引发的安全事件中,由沙门氏菌引起中毒的病例常居于首位。据报道^[3],细菌性腹泻导致全球每年 23 万人左右死亡,其中很大一部分是由沙门氏菌感染引起的。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)是近年来报道频率较高的血清型之一^[4],可通过污染食物造成人类肠道感染或畜禽腹泻,是重要的人畜共患病原菌;每年因鼠伤寒沙门氏菌引起的感染占沙门氏菌感染总量的 20%,造成了严重的经济损失^[5]。

活性的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态是指某些微生物遇到不利环境进入的一种特殊休眠状态^[6]。处于该状态的微生物在常规培养基上不能形成菌落,但仍保留呼吸、代谢活性、膜完整性和微弱基因转录,在合适的条件下又可恢复可培养性^[7]。因此,食源性致病菌一旦进入 VBNC 状态,可能会漏检进而造成食品安全事故及至危害人类健康。目前已有文献报道光^[8]、低温^[9]、寡营养^[10]、过氧化氢^[11]、次氯酸钠^[12]等处理能够诱导沙门氏菌进入 VBNC 状态。

早在 18 世纪便发现过氧化氢,并在食品、饮料、医疗

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0400703-3);国家自然科学基金(编号:31471714);中国博士后科学基金资助项目(编号:2017M621632)

作者简介:聂新颖,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:廖红梅(1983—),女,江南大学副教授,博士。

E-mail: hmeiliao@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-12-21

器械和卫生保健领域广泛运用。过氧化氢的使用主要依赖其氧化性,不同浓度的过氧化氢具有不同的用途。一般医用过氧化氢(俗称双氧水)使用浓度为 3%^[13],工业用过氧化氢浓度一般为 25%~50%^[14]。与工业级过氧化氢不同,食品级的过氧化氢中没有萘醌类有机杂质,以及铅砷等对人体有害的金属物质,因而被广泛应用于果汁、饮料、乳品、饮用水、啤酒、果蔬保鲜以及无菌包装等食品的生产和消毒^[15]。已有文献^[16]报道低浓度过氧化氢会使培养基中肠炎沙门氏菌进入 VBNC 休眠状态,造成生物漏检。然而,至今却无研究揭示低浓度过氧化氢处理使鼠伤寒沙门氏菌形成 VBNC 状态的机制。

本试验拟研究自来水体系中食品级过氧化氢对鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响,并通过分析扫描电镜、透射电镜、相关胞内酶活、自由基产生与鼠伤寒沙门氏菌活性及可培养性的关系以探究其 VBNC 态的产生机制,旨在为过氧化氢在食品工业中杀菌消毒领域的应用提供理论支持和技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及培养条件

鼠伤寒沙门氏菌(*S. Typhimurium*)CMCC 50115;中国医学细菌菌种保菌管理中心(National Center for Medical Culture Collections,CMCC)。

鼠伤寒沙门氏菌采用 BPY(Beef Peptone Yeast)培养基[牛肉膏 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、酵母粉 5 g/L 和葡萄糖 5 g/L,pH (7.0±0.2)]培养,培养基经过高压灭菌后使用^[17]。挑取单菌落于 100 mL BPY 培养基中 37℃培养 10 h 达到对数稳定期(菌落数为 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ CFU/mL),停止培养。另外,于 BPY 培养基中添加 1.5%琼脂粉,以用于平板计数检测其可培养数。

1.2 主要仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪:ABI 7900 HT 型,美国应用生物系统公司;

电子自旋共振波谱仪:EMXplus-10/12 型,德国布鲁克科技有限公司;

激光共聚焦荧光显微镜:LSM710 型,德国蔡司公司;

扫描电镜:Hitachi Model SU8010 型,日本 JEOL 公司;

透射电镜:JEM-1230 型,日本 JEOL 公司。

DNA 提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;

细菌 RNA 提取试剂:杭州博日公司;

LIVE/DEAD® BacLight™ 试剂盒:美国 Molecular Probes 公司;

DMPO 自由基捕获剂:>97.0%,日本 TCI 公司;

食品级过氧化氢:30%,上海哈勃化学技术有限公司;

过氧化氢酶检测试剂盒、总 SOD 活性检测试剂盒(WST-8 法)、总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒:碧云天生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 过氧化氢处理 取 10 mL 培养至对数生长期的鼠伤寒沙门氏菌于 90 mL 灭菌 BPY 培养基中,调整菌液浓度为 $1 \times 10^7 \sim 9 \times 10^7$ CFU/mL。混匀后分成 10 mL/份稀释菌液于 15 mL 离心管中,在 4℃下 5 500 r/min 离心 10 min,弃上清,用无菌生理盐水洗菌体两次,加入等体积的无菌自来水重悬。向其中加入一定体积 30 g/100 g 食品级过氧化氢溶液,使其终浓度分别为 0.2,0.5,1.0,2.0,3.0,5.0,10.0,15.0,1 000,10 000 mmol/L,37℃暗反应 1.5 h 后 4℃下 5 500 r/min 离心 10 min,再用无菌自来水重悬,此步骤重复 3 次以去除体系中的过氧化氢终止反应,处理后的样品进行下一步试验。

1.3.2 鼠伤寒沙门氏菌总菌数、活菌数和可培养数定量检测方法

(1) DNA 和 RNA 的提取:按照试剂盒步骤分别提取细菌 DNA 和 RNA。用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Kusatsu, Japan)去除 RNA 中 DNA 的干扰,并进行反转录。将提取的 DNA 和反转录得到的 cDNA 于 -20℃保存备用。DNA 作为 qPCR 的模板,cDNA 作为 RT-qPCR 的模板。

(2) qPCR 引物设计和反应条件:以沙门氏菌保守序列 *invA* 基因^[18]设计特异性引物,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。前引物:5'-ACAGTGCTCGTT-TACGACC-3';后引物:5'-ACTGGTACTGATCGATA-AT-3',扩增片段大小为 240 bp。根据 Liao 等^[19]的方法进行荧光定量 PCR 扩增。试验结果用 ABI 7900 HT 软件进行分析。

(3) 总菌数、活菌数、可培养数和 VBNC 数的检测:采用相对标准曲线法。将 qPCR 和 RT-qPCR 获得的 C_T 值与对应的细胞数建立线性标准曲线,将待测样品的 C_T 值代入线性方程分别计算总菌数和活菌数。用平板计数测定可培养数。

参考 Jiang 等^[11]的方法计算鼠伤寒沙门氏菌的 VBNC 细胞数和 VBNC 发生系数:

$$a = b - c, \quad (1)$$

式中:

a ——VBNC 细胞数,CFU/mL;

b ——活细胞数,CFU/mL;

c ——可培养细胞数,CFU/mL。

$$d = \frac{a}{b} \times 1\,000, \quad (2)$$

式中:

d ——VBNC 发生系数。

1.3.3 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察细胞形态和结构 将对照和过氧化氢(15 mmol/L)处理的样品在 4℃ 下 5 500 r/min 离心 10 min 后收集细菌沉淀物。用 0.85% 无菌生理盐水洗涤沉淀,并在 4℃ 下 5 500 r/min 离心 10 min,此过程重复 3 次。将洗过的样品用 2.5% 戊二醛重悬,4℃ 过夜固定。根据 Ding 等^[20]的方法进行扫描和透射电子显微镜分析。

1.3.4 酶活性检测 将过氧化氢(15 mmol/L)处理后的样品分为两份:一份直接测自来水过氧化氢处理液中的酶活,视为胞外酶活;另一份做如下处理以测其胞内酶活:菌液于 4℃ 下 5 500 r/min 离心 10 min,弃上清,用无菌生理盐水清洗两次,清洗后的细胞重悬并在冰浴条件下超声(304 W,超声 9 s,停歇 30 s,重复 5 次),镜检以确保细胞完全破碎。将超声破碎后细菌破碎液于 4℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。参照 Lin 等^[21]和 Li 等^[22]的方法检测鼠伤寒沙门氏菌胞内外过氧化氢酶、总超氧化物歧化酶和总谷胱甘肽过氧化物酶的活性。

1.3.5 自由基强度检测和图谱分析 为了定量过氧化氢处理中自来水中产生的自由基,在样品处理前加入 100 mmol/L DMPO 自由基捕获剂,处理后用电子自旋共振法(Electron Spin Resonance, ESR)检测并分析自由基。根据 Liao 等^[17]的方法进行自由基强度和图谱分析。使用 Bruker Xenon 软件进行自由基拟合,并以羟基自由基第 2 条谱线的峰高代表自由基强度以相对定量。

1.3.6 细菌细胞膜完整性分析 LIVE/DEAD® BacLight™ 试剂盒包含两种核酸荧光染料 SYTO 9 和 PI。其中 SYTO 9 可以透过破损和完整的细胞膜并与 DNA 结合,在 488 nm 激发光下呈绿色荧光;而 PI 只能透过受损的细胞膜并与 SYTO 9 竞争结合位点,在 488 nm 激发光下产生红色荧光。因此在两种染料都存在的情况下,细胞膜受损的细胞呈红色荧光,有完整细胞膜的活细胞呈绿色荧光。根据 Liao 等^[19]的方法对过氧化氢处理前后的鼠伤寒沙门氏菌进行染色,然后使用激光共聚焦显微镜拍照并分析过氧化氢对于细菌细胞膜完整性和活性的影响。

1.3.7 数据处理及统计分析 每个试验至少 3 次重复,2 个平行,试验结果取平均值,并用 Microsoft Excel 2013 计算标准偏差。采用 SPSS Statistics V17.0 软件(美国 SPSS 公司)的独立样本 t 检验进行显著性分析($P < 0.05$),用 Origin 8.5 软件(美国 Microcal 软件公司)作图。

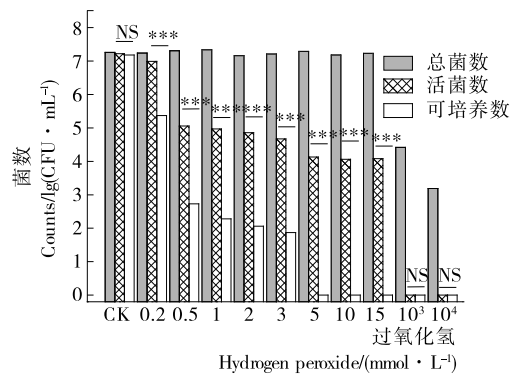
2 结果与讨论

2.1 对鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响

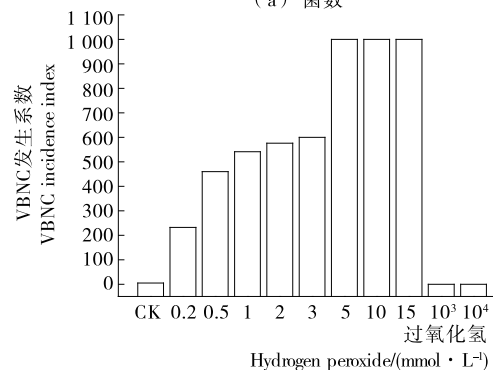
过氧化氢处理浓度对鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响如图 1(a)所示。未经过氧化氢处理的鼠伤寒沙门氏菌(对照组,CK)的活菌数和可培养数未显著性差异

($P > 0.05$)。当过氧化氢浓度在 0.2~3.0 mmol/L 时,随着过氧化氢浓度升高,活菌数逐渐减小至 4.67 lg CFU/mL;可培养数也逐步且迅速降低,但活菌数和可培养数存在显著差异($P < 0.05$);说明其中部分鼠伤寒沙门氏菌进入了 VBNC 状态。当过氧化氢为 5.0~15.0 mmol/L 时,可培养数降低至平板计数法的检测限(< 0.1 CFU/mL),而活菌数为 4.03~4.16 lg(CFU/mL);说明该浓度范围内自来水中鼠伤寒沙门氏菌全部以 VBNC 存活;当过氧化氢浓度增大至 1.0~10.0 mol/L,活菌数和可培养数均在检测限以下,说明自来水中鼠伤寒沙门氏菌全部被杀灭。如图 1(b) 所示,即在较低浓度范围内(0.2~15.0 mmol/L)随着过氧化氢浓度的升高,VBNC 发生系数增大。

以上研究结果说明低浓度过氧化氢处理可能会导致鼠伤寒沙门氏菌进入 VBNC 态,且随过氧化氢浓度增大 VBNC 态发生系数增大。Morishige 等^[16]的研究结果显示 10 mmol/L 的过氧化氢处理 45 min 才能使肉汤培养基体系中肠炎沙门氏菌完全丧失可培养性;而 Kong 等^[23]报道 2 mmol/L 的过氧化氢在室温下处理 45 min



(a) 菌数



(b) VBNC发生系数

*** 表示差异显著($P < 0.05$); NS 表示无显著性差异($P > 0.05$)

图 1 过氧化氢处理对 *S. Typhimurium* 总菌数、活菌数、可培养数和 VBNC 发生系数的影响

Figure 1 Effect on total, viable, culturable numbers and VBNC incidence index of *S. Typhimurium* by hydrogen peroxide treatment

对野生型创伤弧菌的可培养性无影响;这可能是菌种、体系和处理时间的不同导致沙门氏菌对过氧化氢的抗性有差异。但当其浓度增大到一定程度时,细菌无法抗衡较高浓度过氧化氢造成的损伤而全部被杀灭。

2.2 对鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响机制

2.2.1 对鼠伤寒沙门氏菌细胞形态和结构的影响 如图 2 所示,未处理的细胞表面光滑且饱满,大部分细胞呈长杆状[图 2(a)];而经过氧化氢处理的大部分细胞表面褶皱塌陷甚至破裂,细胞收缩弯曲变小,少数细胞表面光滑且形态接近圆棒状[图 2(b)]。透射电镜观察到未处理的鼠伤寒沙门氏菌细胞质分布均匀,胞内物质完整[图 2(c)];而经过氧化氢处理的大部分细菌细胞质受到严重的损伤,主要表现在胞内物质聚集、外漏甚至变成“空壳”。但仍有极少数细胞质均匀分布,未受任何损伤,结合扫描电镜观察的结果可判断该部分细胞为了应对过氧化氢的胁迫而进入 VBNC 休眠状态,已有报道^[24]表明 VBNC 状态的细胞通常表现出矮化(细胞尺寸减小)现象,细胞形态变为球形,细胞膜完整。

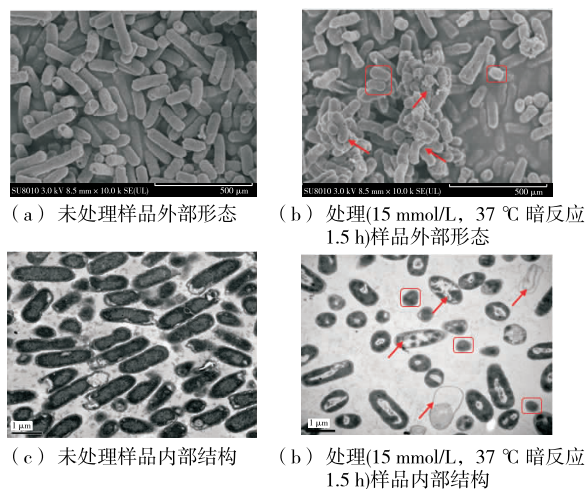


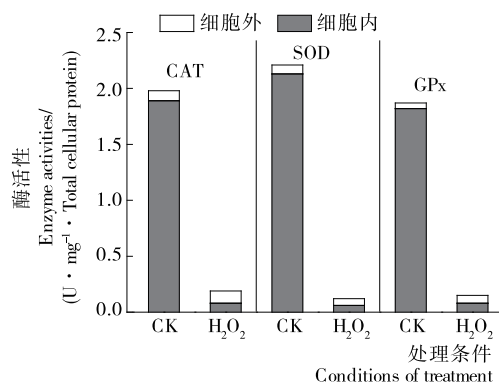
图 2 过氧化氢处理对 *S. Typhimurium* 的外部形态 (SEM, 10 000×) 和内部结构 (TEM, 20 000×) 的影响

Figure 2 Effect on the external morphology (SEM, 10 000×) and internal structure (TEM, 20 000×) of *S. Typhimurium* by hydrogen peroxide treatment

2.2.2 对鼠伤寒沙门氏菌胞内酶活性影响 过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathioneperoxidase, GPx) 是细胞中比较重要的抗氧化胁迫酶^[25-26]。CAT 可以催化过氧化氢分解为水和氧气,从而保护细胞抵抗活性氧(ROS)的氧化胁迫^[27];SOD 通过将超氧自由基阴离子($O_2^{\cdot-}$)催化分解为过氧化氢,再由 CAT 酶催化分解过氧化氢而参与细胞的抗氧化胁迫反

应^[28];GPx 是过氧化氧、超氧自由基阴离子和过氧化物的第一道防御,它利用谷胱甘肽催化/中和过氧化物,阻止活性氧自由基对细胞的损伤,从而保护机体和细胞组分(DNA、蛋白及脂质体等生物分子)免受氧自由基的损伤^[29-30]。通过测定 CAT、SOD、GPx 等酶活性探究过氧化氢处理前后细菌细胞的抗氧化能力。

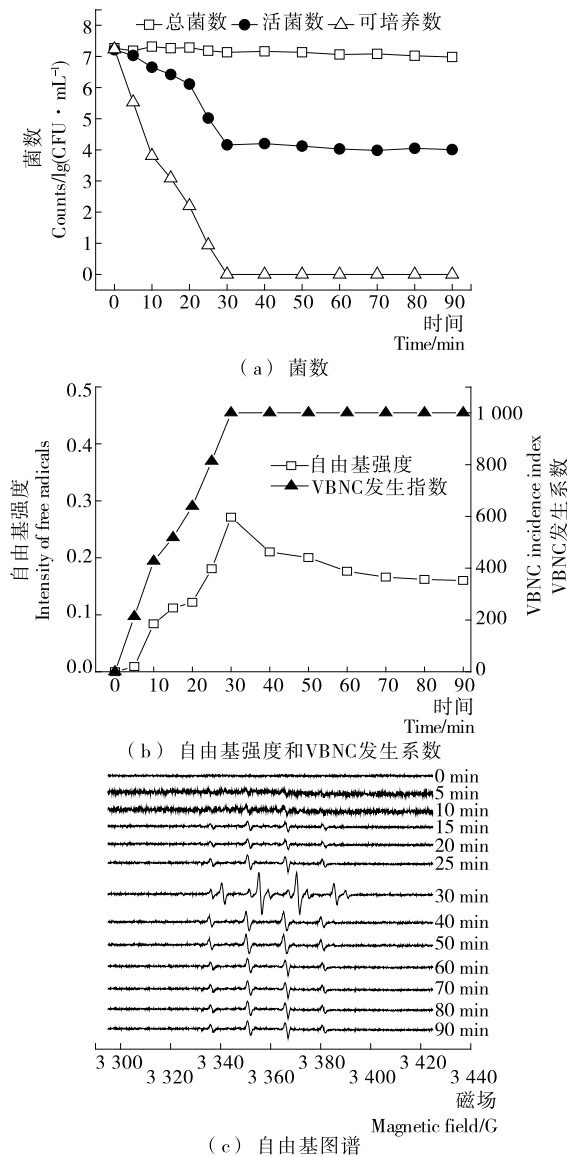
如图 3 所示,未经处理的鼠伤寒沙门氏菌胞内 CAT、SOD、GPx 活性较高,经过氧化氢处理进入 VBNC 状态的鼠伤寒沙门氏菌胞内 CAT 活性显著降低,几乎为零,与 Kong 等^[23]报道的过氧化氢酶活性丧失使细胞变得不可培养以及 Harris 等^[31]研究表明幽门螺杆菌的过氧化氢酶缺陷型突变体对过氧化氢敏感而野生型可以抵抗 100 mmol/L 过氧化氢结果具有一致性。除 CAT 活性降低外,与细胞抗氧化相关的 SOD 和 GPx 活性也显著降低,表明经过氧化氢处理后细胞抗氧化系统受到严重损伤,细胞代谢活性显著降低。



过氧化氢处理条件: 15 mmol/L, 37 °C 暗反应 1.5 h

图 3 过氧化氢处理对 *S. Typhimurium* 酶活性的影响
Figure 3 Effect on the enzyme activities of *S. Typhimurium* by hydrogen peroxide treatment

2.2.3 过氧化氢处理中产生自由基对鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的干预 由于过氧化氢的杀菌因子并非其本身,而主要是其分解后产生的自由基和活性衍生物^[32],因此本研究测定了 15 mmol/L 过氧化氢处理鼠伤寒沙门氏菌 90 min 内产生的自由基。在 0~30 min 内,随着过氧化氢处理时间的延长,活菌数和可培养数逐渐减小,30 min 时活菌数降至 4.16 lg(CFU/mL),可培养数低于平板计数的检测限(<0.1 CFU/mL)[图 4(a)];相应自由基强度和 VBNC 发生系数随着过氧化氢处理时间延长而增大,30 min 时 VBNC 发生系数达到最大值[图 4(b)];产生自由基图谱的峰高也逐渐增加[图 4(c)]。然而,30~90 min 内,无论过氧化氢处理时间持续多久,活菌数基本保持不变,可培养数均在平板计数的检测限以下,说明残留活菌全部以 VBNC 状态存在。



过氧化氢处理条件: 15 mmol/L, 37 °C 暗反应 1.5 h

图4 过氧化氢处理时间对 *S. Typhimurium* 总菌数、活菌数和可培养数、自由基强度和 VBNC 发生系数以及 ESR 自由基图谱的影响

Figure 4 Effect of hydrogen peroxide treatment on total, viable, culturable numbers of *S. Typhimurium*, intensity of free radicals and VBNC incidence indexes and ESR spectra of free radicals at different times

随着过氧化氢处理时间的延长,自由基强度却有所下降,可能有 3 种原因:① 过氧化氢在光照下会有少量分解为 O_2 和 H_2O ^[33];② 自由基非常活泼,存在寿命非常短,一经产生就会马上与接触物质发生反应,而自由基与 DMPO 的自旋加合物存在时间也仅仅只有几分钟或几十分钟^[34];③ 体系中捕捉剂 DMPO 加入量不够,已经完全

与处理过程中产生的自由基加合。此外,过氧化氢处理时间延长并未引起活菌数、可培养数和 VBNC 发生指数的变化,表明低浓度过氧化氢诱导细菌进入 VBNC 状态在短时间内是不可逆的过程。

2.2.4 自由基参与诱导鼠伤寒沙门氏菌 VBNC 状态形成的验证 试验结果表明,加入 100 mmol/L 的丙酮酸钠自由基清除剂后鼠伤寒沙门氏菌活菌数和可培养数均增加[图 5(a)];VBNC 发生系数降低[图 5(b)];过氧化氢处理的自来水体系中除产生高强度的羟基自由基外,还产生了低强度的氢质子自由基和烷基自由基[图 6(a)],但是由于 0.5 mmol/L 过氧化氢浓度低,产生的自由基强度不高,因而只能观察到羟基自由基的存在[图 6(b)],自由基 ESR 图谱表明加入丙酮酸钠后其峰值降低。进而通过激光共聚焦显微镜直接观察可看到加入丙酮酸钠后绿色荧光细胞数增多,说明细菌活性被保护(图 7);而在过氧化氢处理后再加入自由基清除剂对细菌细胞无保护作用;从而进一步验证了过氧化氢处理中自由基参与鼠伤寒沙门氏菌 VBNC 状态的形成。

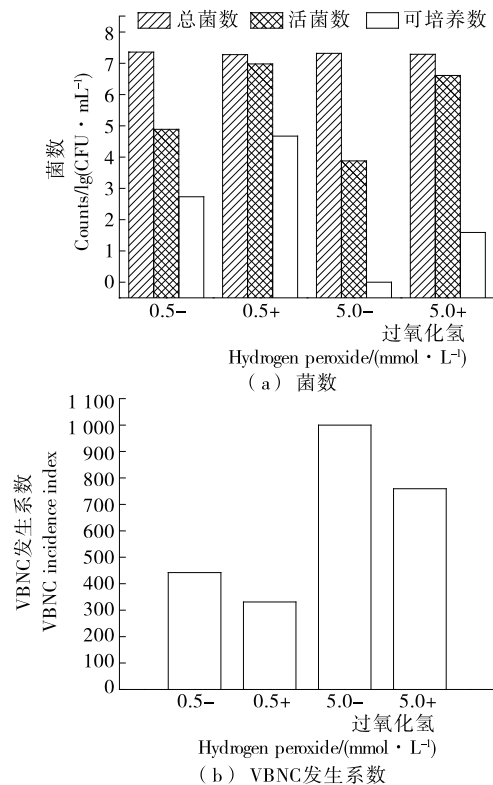


图5 H_2O_2 处理时加(“+”)丙酮酸钠和不加(“-”)丙酮酸钠对 *S. Typhimurium* 的总菌数、活菌数和可培养数以及 VBNC 发生系数的影响

Figure 5 Effect on total, viable, culturable numbers and VBNC incidence indexes of *S. Typhimurium* by hydrogen peroxide treatment with/without sodium pyruvate

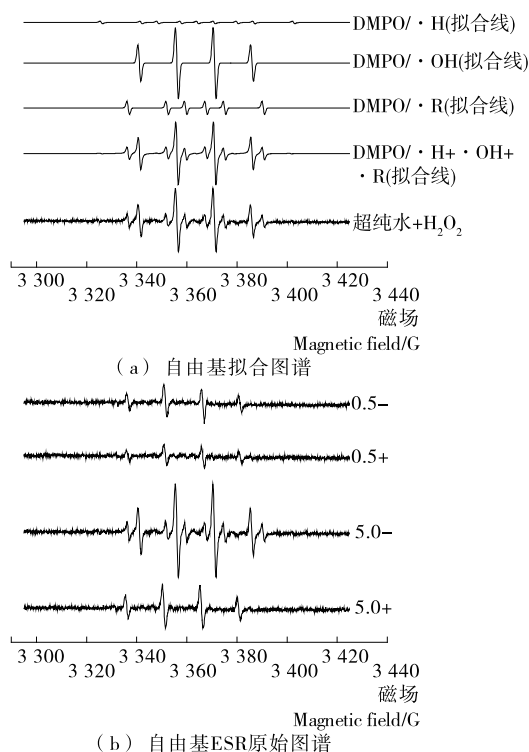


图 6 H_2O_2 处理时加(“+”)丙酮酸钠和不加(“-”)丙酮酸钠对 ESR 自由基谱图的影响

Figure 6 Effect on ESR spectra of free radicals by hydrogen peroxide treatment with/without sodium pyruvate

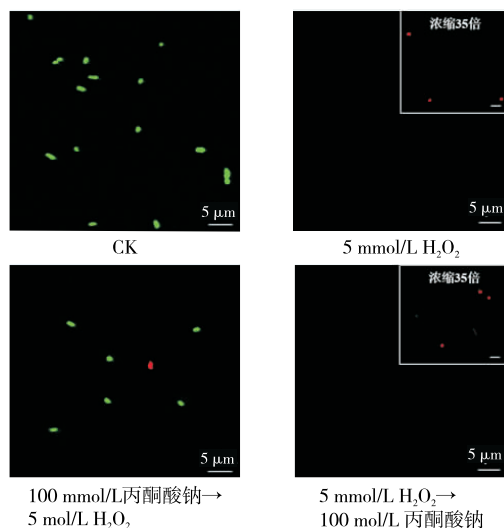


图 7 H_2O_2 处理前加丙酮酸钠和处理后加丙酮酸钠对 *S. Typhimurium* 活性的影响

Figure 7 Effect on the activity of *S. Typhimurium* before hydrogen peroxide treatment with/without sodium pyruvate

3 结论

本试验研究了食品级过氧化氢对自来水中鼠伤寒沙门氏菌活性和可培养性的影响,并从细胞形态和结构、酶活力、自由基产生等几个方面解析过氧化氢处理中 VBNC 状态发生机制。结果表明,不当过氧化氢处理,例如 0.2~15.0 mmol/L 过氧化氢处理 1.5 h,不仅不能达到完全杀菌的效果,反而使得其中部分鼠伤寒沙门氏菌进入 VBNC 特殊休眠状态而存活,进而造成漏检。当过氧化氢浓度到达 1 mol/L 及以上,可实现完全灭菌。过氧化氢处理过程中产生羟基、烷基和氢质子 3 种自由基,这些自由基的产生是使细菌进入 VBNC 状态的重要原因。进入 VBNC 状态的细菌细胞中与氧化相关的 CAT、SOD 和 GPx 3 种酶酶活显著降低,初步表明 VBNC 状态发生与其氧化损伤可能相关。但自由基如何参与 VBNC 状态形成及该状态的细菌是否复苏尚不明确,可进一步开展相关研究。

参考文献

- [1] PARK S H, RICKE S C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 152-160.
- [2] 孙雨,卜仕金,王美君. 沙门氏菌的毒理作用机制及其检测方法研究进展[J]. 口岸卫生控制, 2009, 14(2): 56-58.
- [3] WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases [EB/OL]. (2015-03-12) [2018-12-21] https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/.
- [4] KARIUKI S, REVATHI G, KARIUKI N, et al. Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya [J]. Bio Med Central Microbiology, 2006, 6(1): 1-10.
- [5] MORTEN H, STEEN E, KÅRE M. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001[J]. Emerging Infectious Diseases, 2005, 11(6): 859-867.
- [6] 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): 61.
- [7] PIENAAR J A, SINGH A, BARNARD T G. The viable but non-culturable (VBNC) state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review [J]. African Journal of Laboratory Medicine, 2016, 5(1): 1-9.
- [8] DAVIES C M, EVISON L M. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters[J]. Journal of Applied Microbiology, 1991, 70(3): 10.

- [9] ZENG Bin, ZHAO Guo-zhong, CAO Xiao-hong, et al. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*[J]. Biomed Research International, 2013, 2 013 (1): 907-170.
- [10] PANUTDAPORN N, KAWAMOTO K, ASKURA H, et al. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(3): 241-247.
- [11] XU Jun, SUITA K, OKUNO K, et al. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2018, 80(1): 133-137.
- [12] FERNANDES E, MARTINS V C, NóbREGA C, et al. A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 52: 239-246.
- [13] 关于泡椒凤爪加工使用双氧水的解读[J]. 现代食品, 2015 (14): 80.
- [14] 付丽娟, 刘万忠. 过氧化氢消毒灭菌技术及设备的研究新进展[J]. 中国药师, 2017(2): 340-344.
- [15] 张平均. 食品级过氧化氢的消毒特性及其在食品行业中的应用[J]. 中国乳业, 2004, 33(12): 42-44.
- [16] MORISHIGE Y, FUJIMORI K, AMANO F. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2015, 38(9): 1 255-1 264.
- [17] LIAO Hong-mei, ZHANG Rui-rui, ZHONG Kui, et al. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella Typhimurium* is correlated with free radicals generated by thermosonication[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 286: 90-97.
- [18] JIANG Qian, FU Bo, CHEN Yan, et al. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(13): 6 043-6 050.
- [19] LIAO Hong-mei, JIANG Li-fen, ZHANG Rui-rui. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella Typhimurium* by thermosonication and factors affecting resuscitation[J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365: fnx 249.
- [20] DING Tian, XUAN Xiao-ting, LI Jiao, et al. Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Staphylococcus aureus* in pure culture[J]. Food Control, 2016, 60: 505-510.
- [21] LIN Jin-zhong, ZOU Ye-xia, CAO Kun-lin, et al. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(5): 703-711.
- [22] LI Chen-yang, SHI Liang, CHEN Dong-dong, et al. Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82: 168-180.
- [23] KONG I S, BATES T C, ANJA HÜLSMANN, et al. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*[J]. Fems Microbiology Ecology, 2004, 50 (3): 133-142.
- [24] 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.
- [25] 周密. 单增李斯特菌抗次氯酸钠胁迫机制的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 5-6.
- [26] URSINI F, MAIORINO M, BRIGELIUS-FLOHÉ R, et al. Diversity of glutathione peroxidases[J]. Methods in Enzymology, 1995, 252(2): 38.
- [27] CHELIKANI P, FITA I, LOEWEN P C. Diversity of structures and properties among Catalases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences. 2004, 61(2): 192-208.
- [28] HAYYAN M, HASHIM M A, ALNASHEF I M. Superoxide Ion: Generation and chemical implications[J]. Chemical Reviews. 2016, 116(5): 3 029-3 085.
- [29] DOYEN P, BIGOT A, VASSEUR P, et al. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part C Toxicology & Pharmacology, 2008, 147 (1): 69-77.
- [30] OWUOR E D, KONG A N. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 64(5/6): 765-770.
- [31] HARRIS, A G, HINDS F E, BECKHOUSE A G, et al. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: Role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874) [J]. Microbiology, 2002, 148: 3 813-3 825.
- [32] 杨洪彩, 傅虹, 艾山江·哈德尔. 过氧化氢溶液在医药卫生方面研究与应用进展[J]. 中国卫生标准管理, 2012(4): 55-60.
- [33] 章育中. 过氧化氢的安定性和安定剂[J]. 化学通报, 1956 (11): 14-16, 7.
- [34] 王仕良, 张曾, 黄干强. 羟基自由基的产生与测定[J]. 造纸科学与技术, 2003, 22(6): 45-47.