

产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控制研究进展

任宏荣, 李苗云*, 朱瑶迪, 赵改名, 赵莉君, 吴慧琳, 肖 康, 崔文明
(河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种革兰氏阳性厌氧芽孢致病菌, 广泛分布于环境、动物以及人类的胃肠道中, 因能分解肌肉和结缔组织中的糖类并产生大量气体以及形成荚膜而得名。其对生长环境要求较低, 是自然界中常见的致病菌。其芽孢是在环境胁迫 (低温、干燥或营养缺乏等) 下形成的一种微生物休眠体, 具有极强的抗逆性, 在食品杀菌过程中很难被灭活, 是导致食品腐败变质的重要致病菌。因此, 控制产气荚膜梭菌是食品研究领域普遍关注的问题。本文系统概述了产气荚膜梭菌的特性、危害及控制该菌及芽孢污染的物理、化学方法, 并阐述了目前控制产气荚膜梭菌研究的热点, 以期为进一步定向调控产气荚膜梭菌的危害、提高食品安全性、促进肉制品产业健康发展提供理论指导, 对食品加工业具有重要的现实意义和实际应用价值。

关键词: 产气荚膜梭菌; 食源性致病菌; 芽孢; 危害控制

Recent Progress in Hazards and Control of *Clostridium perfringens* in Foods

REN Hongrong, LI Miaoyun*, ZHU Yaodi, ZHAO Gaiming, ZHAO Lijun, WU Huilin, XIAO Kang, CUI Wenming
(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: *Clostridium perfringens* is a Gram-positive anaerobic spore-forming pathogen that is widely distributed in the environment and the gastrointestinal tract of animals and humans. It can break down sugars in muscles and connective tissues to produce large amounts of gas and can form capsules. It can grow with low environmental requirements and is a common pathogen in nature. This bacterium, a major food spoilage bacterium, can form spores as a hypopus under environmental stress such as low temperature, water deficiency and nutrient deficiency, which has strong resistance to adversity. Its spores can survive in the sterilization process. Therefore, controlling contamination of *C. perfringens* has become a widespread concern in the field of food research. In this article, the characteristics and hazards of *C. perfringens* are summarized systematically and the physical and chemical methods used for controlling *C. perfringens* pollution are described in detail. Besides, the current research hotspots are discussed. The aim of this review is to provide the theoretical foundation for further studies to control the hazards of *C. perfringens*, improve food safety and promote the healthy development of the meat products industry. The information gathered here is of important practical significance for the food processing industry.

Keywords: *Clostridium perfringens*; foodborne pathogen; spores; hazard control

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200325-363

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2021) 07-0352-08

引文格式:

任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 352-359.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200325-363. <http://www.spkx.net.cn>

REN Hongrong, LI Miaoyun, ZHU Yaodi, et al. Recent progress in hazards and control of *Clostridium perfringens* in foods[J]. Food Science, 2021, 42(7): 352-359. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200325-363. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2020-03-25

基金项目: 河南省高校创新人才计划项目 (18HASTIT036); 河南省科技攻关计划项目 (192102110216);

现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-37)

第一作者简介: 任宏荣 (1995—) (ORCID: 0000-0002-4367-5273), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品加工与安全控制。

E-mail: rhr1795@126.com

*通信作者简介: 李苗云 (1976—) (ORCID: 0000-0003-4074-7654), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品加工与安全控制。

E-mail: limy7476@126.com

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 又称魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*)，最早是由英国学者Welchii和Nuttall从一腐败物体中分离得到，是一种革兰氏阳性、可以产生芽孢的厌氧致病菌^[1]，广泛存在于空气、污水、土壤、各种食品以及动物和人类的胃肠道中，是导致食源性疾病以及人类食物中毒、非食源性腹泻和创伤性气性坏疽的主要病原菌之一^[2]。近年来，食品安全越来越受到人们的关注，食源性疾病的爆发与食品安全紧密相连，因此人们对影响健康的致病菌更为重视。在很多致病菌中，产气荚膜梭菌因能够造成食品胀袋、腐败而受到广泛关注，其芽孢是在环境胁迫（如低温、干燥或营养缺乏等）下形成的一种微生物休眠体^[3]，且其芽孢对各种胁迫因素（如高温、高压、有毒化学物质和辐射）具有极强的抗逆性^[4]，不易杀死，能在适宜条件下萌发并产生毒性，不但致病性强，而且易带来很大的经济损失^[5]。产气荚膜梭菌是英国食源性疾病暴发最常见的原因^[6]。本文在前人的研究基础上，针对产气荚膜梭菌特性、危害及控制产气荚膜梭菌菌体及芽孢的方法进行了综述，以期为进一步定向调控产气荚膜梭菌的危害、提高食品安全性，以及为肉制品生产及保藏提供理论依据和指导。

1 产气荚膜梭菌的特性

产气荚膜梭菌在胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基平板上会生成圆形、光滑、凸起、边缘整齐的菌落，呈现黑色^[7]，大小为 $(0.9 \sim 1.3) \mu\text{m} \times (3.0 \sim 9.0) \mu\text{m}$ ，单个、成对或成链状连接排列；在液体硫乙醇酸盐培养基中会产生气体和絮状物。产气荚膜梭菌的生化反应特性对其准确鉴别具有重要的参考作用，产气荚膜梭菌可与含铁牛奶培养基发生反应，出现“暴烈发酵”的现象，但培养基不变黑；在乳糖-明胶培养基中，产气荚膜梭菌能改变培养基的颜色（由红色变为黄色），这表明乳糖被该菌发酵，并且产生了酸，同时明胶被液化；在加入葡萄糖的绵羊血琼脂培养基中具有更好的生长效果，在适宜温度条件下此菌体每8 min可增长一代，在菌落的附近能够形成双溶血环；在庖肉培养基中培养一段时间后就会形成大量的气泡，24 h后肉粒或肉块会变成粉色，但肉不被消化。自然界中的产气荚膜梭菌通常以芽孢形式存在，芽孢的形状为椭圆形，位居菌体的中间，有时位于次极端，在一般培养条件下不太容易形成芽孢，但芽孢在不含糖的培养基中会很快形成^[8]。其芽孢的耐受力非常强，对湿热和干热、紫外线辐射和 γ 射线辐射、极端干燥（包括真空）、高压和氧化剂等不利条件下均具有极强的抗逆性^[5]，能够长久存活，因此对食品安全会产生极大威胁。

2 产气荚膜梭菌的危害

产气荚膜梭菌是一种食源性致病菌，每年都有大量的动物因感染产气荚膜梭菌的不同菌种而死亡，产气荚膜梭菌产生的外毒素是其主要的致病因子^[9]，目前已知其能够分泌大于20种致病性毒素及降解酶（微生物胶原酶、神经氨酸酶、透明质酸酶、卵磷脂酶和DNA酶等）^[10]。这些毒性毒素和酶类能够单独或协同作用，具有强大的侵袭感染能力，被机体吸收进入循环系统可对机体产生一系列的损伤，严重影响细胞和组织正常的生理结构功能，危害动物体（宿主）的健康^[10]。产气荚膜梭菌产生的主要毒性毒素类型有： α 毒素、 β 毒素、 ϵ 毒素、 ι 毒素、肠毒素和Net B毒素^[11]。依据主要致死性毒素分布的差异性，又可将该菌分为A、B、C、D、E、F、G 7种，且每种产气荚膜梭菌对不同宿主都具有较强的致病能力^[11]。不同类型的产气荚膜梭菌所产生的毒素及其致病作用存在差异，如A型主要产生具有溶血性和致死性的 α 致病毒素，会引起人和动物的气性坏疽和人类食源性食物中毒^[12]；B型（特别是它所携带的 β 毒素）会引起新生羊羔痢疾和绵羊的出血性肠毒血症等，而在其他宿主中很少见到^[13]；C型是引起各种动物（如绵羊、羔羊、仔猪、犊牛等）发生肠毒血症、坏死性肠炎的主要菌型；D型主要会引起新生羔羊痢疾、小肠结肠炎和牛的肠毒血症等疾病^[10]，这无疑会造成国家畜牧业和食品产业的严重损失。然而，没有单一的菌株可以产生全部的毒素，各型产气荚膜梭菌所产毒素的分类见表1。

表1 产气荚膜梭菌产生的6种主要毒素分类^[14]
Table 1 Classification of six major toxins produced by *C. perfringens*^[14]

菌型	毒素类型					
	α 毒素	β 毒素	ϵ 毒素	ι 毒素	肠毒素	Net B毒素
A	+	—	—	—	—	—
B	+	+	+	—	—	—
C	+	+	—	—	+/-	—
D	+	—	+	—	+/-	—
E	+	—	—	+	+/-	—
F	+	—	—	—	—	—
G	+	—	—	—	—	+

注：+，可以形成对应毒素；—，不能形成对应毒素；+/-，有的可以形成对应毒素。

产气荚膜梭菌在肉及肉类产品中污染率最高，不仅容易污染熟肉制品，而且也容易污染原料肉^[15]。产气荚膜梭菌存活于动物的肠道或粪便中，当屠宰动物时，原料肉很容易受到污染，此外食品在加工过程中被产气荚膜梭菌污染的概率也非常高，可达80%左右^[16]。表2列出了近年来产气荚膜梭菌在肉制品中的检出情况，生熟肉中产气荚膜梭菌的检出率均较高，部分熟肉的检出率超过50%。当摄入菌含量高于 10^5 CFU/g以上的食品时可引起食物中毒。因此，有效控制肉制品中产气荚膜梭菌的污染是食品产业发展中必须解决的问题。

表2 产气荚膜梭菌在不同肉制品中的检出情况

样品种类	样品数量	检出数量	检出率/%	抽样地点	参考文献
熟鸡肉	173	30	17.34	中国 郑州	[17]
	110	56	50.91	中国 关中地区	[18]
	25	3	12	埃及	[19]
	51	15	29.41	中国 吉林	[20]
	252	38	15.08	中国 武汉	[21]
熟猪肉	25	2	8	埃及	[19]
	21	4	19.05	波兰	[22]
	90	48	53.33	中国 吉林	[20]
熟牛肉	90	48	53.33	中国 吉林	[20]
	82	4	4.88	韩国 首尔	[23]
	100	40	40	土耳其	[24]
鱼肉	45	6	13.33	中国 吉林	[20]
火鸡	562	130	23.13	中国 武汉	[21]
冻肉	93	15	16.13	中国 广州	[25]
生鲜肉	204	88	43.14	中国 关中地区	[18]
	50	10	20	埃及	[19]
	49	6	12.24	中国 广州	[25]

3 产气荚膜梭菌及其芽孢的危害控制

由于在食品中产气荚膜梭菌存在的普遍性及其产生的毒素对人体有极大的危害性，因此，对于产气荚膜梭菌污染的危害控制至关重要。肉及其肉制品中产气荚膜梭菌污染的控制策略主要有物理法、化学法和“先萌发后灭活”策略，对肉及其肉制品中产气荚膜梭菌污染的控制不仅能够减少大量的食物浪费和挽回巨大的经济损失，而且能够使人们享用品质优良的产品，有效地保障人们身体健康和促进食品产业的发展。

3.1 物理法控制产气荚膜梭菌及其芽孢

产气荚膜梭菌的营养细胞通过各种物理条件很容易被杀死，但是该菌的芽孢很难用这些物理方法灭活。通过两个及多个物理条件相结合处理能够使芽孢失活，以下讨论了可用于灭活营养菌体和芽孢的几种物理方法，以及它们在食品工业中的应用。

3.1.1 热处理

热处理是最常见的灭活方法之一，因为过多的热量会破坏大多数细菌细胞。虽然产气荚膜梭菌芽孢具有很高的耐热性，但是长期高温处理可以使产气荚膜梭菌芽孢大量失活^[26-27]。有研究表明，在90~100℃的水中孵育10~30 min时，超过90%的产气荚膜梭菌芽孢会失活^[26]。Byrne等^[27]研究发现，减少肉类产品中产气荚膜梭菌芽孢的数量需要较高的温度（110℃）。当其他物理处理与中高温相结合时也可以有效灭活产气荚膜梭菌的营养细胞和芽孢。如有研究发现，实施臭氧处理后经热处理可以有效地灭活肉制品中产气荚膜梭菌的营养细胞和芽孢^[28]；Evelyn等^[29]发现同时使用热处理和超声波

处理或先进行热处理再进行超声波处理，都可以显著提高牛肉浆中产气荚膜梭菌芽孢热灭活的效率。

3.1.2 高静水压处理

高静水压是一种无需加热的新型食品杀菌技术，主要是在冷藏或室温（4~25℃）下，利用高压（400~600 MPa）对食品进行处理以延长其货架期^[30]，保持食品新鲜。与传统热杀菌相比，可最大限度地保留食品中的营养成分及感官品质，并且消耗的能量较小；与传统的食品热处理相比，高静水压处理食品在杀死细菌营养体和芽孢方面更有效^[31]。Paredes-Sabja等^[32]研究表明，在高静水压（650 MPa）、温度（75℃）和低pH值（pH 4.75）条件下产气荚膜梭菌A型P-cpe分离株的芽孢数减少了80.39%，但针对实验室培养基中产气荚膜梭菌C-cpe分离株的芽孢灭活效果不佳（芽孢数减少了64.29%）；此外，有研究发现，高静水压（654 MPa）、高温（74℃）和乳酸链球菌素（328 IU/mL）相结合处理可以有效增强高静水压对乳制品中产气荚膜梭菌芽孢的灭活效果^[33]。表3总结了不同物理处理方法对产气荚膜梭菌营养细胞和芽孢的抑制作用。

表3 不同物理处理方法对产气荚膜梭菌细胞和芽孢的抑制作用

处理方法	基质	处理条件	抑制作用	参考文献
温度	猪肉卷	营养细胞：70℃、1.3 min； 芽孢：110℃、36 s	芽孢和营养细胞数 下降了6 (lg (CFU/g))	[27]
温度结合 臭氧	牛肉	75℃、5 mg/L的 臭氧水溶液	芽孢和营养细胞数 下降了1~2 (lg (CFU/g))	[28]
温度结合 超声波	牛肉浆	75℃下超声 (24 kHz、0.33 W/g) 60 min	芽孢数下降约 1.5 (lg (CFU/g))	[29]
高静水压 结合温度	牛肉浆	600 MPa、 75℃	芽孢数下降约 2.2 (lg (CFU/g))	[34]
高静水压、pH 值与温度结合	缓冲液	650 MPa、 pH 4.75、75℃	P-cpe分离株的芽孢数减少了80.39%； C-cpe分离株的芽孢数减少了64.29%	[32]

3.2 化学法控制产气荚膜梭菌及其芽孢

不同类型的化学试剂可有效控制产气荚膜梭菌的污染，目前大多数的研究集中在可用作食品防腐剂、增香剂和增色剂的化学物质，主要包括硝酸盐和亚硝酸盐、有机酸、磷酸盐以及一些天然化合物如精油提取物、乳酸链球菌素（Nisin）、绿茶提取物、溶菌酶、脂肪酸、壳聚糖等。

3.2.1 化学物质

3.2.1.1 硝酸盐和亚硝酸盐

硝酸盐和亚硝酸盐是普遍用于食品中的化学防腐剂，长期以来主要用于肉、鱼和奶酪等产品中^[35-36]，也被称为食品添加剂，特别是在腌制肉中，硝酸盐和亚硝酸盐可提供风味和颜色稳定性^[36]。亚硝酸盐可以抑制产气荚膜梭菌细菌营养体及其芽孢，Redondo-Solano等^[37]研究表明，含有亚硝酸盐的腌制肉制品中产气荚膜梭菌的

生长受到抑制。Myers等^[38]将产气荚膜梭菌分别接种于含质量浓度为0、50 mg/L和100 mg/L的亚硝酸盐无菌肉汤中,发现质量浓度50 mg/L和100 mg/L的亚硝酸盐比0 mg/L可以更有效地抑制产气荚膜梭菌营养细胞及其芽孢的生长。尽管亚硝酸盐是一种非常好的抗菌剂,但是其容易形成致癌衍生物,因而在食品中的使用受到了限制^[36]。因此,人们致力于从天然化合物中寻找亚硝酸盐的替代物,尽管这些天然化合物对产气荚膜梭菌芽孢生长的抑制效果不如常规腌制肉中使用的化合物^[39]。

3.2.1.2 有机酸

有机酸及有机酸盐具有广谱的抑菌性、毒副作用小、性质比较稳定等特点,不会严重影响到食品的风味和色泽,所以在新型的食品抑菌剂中,人们更多地倾向于选择有机酸和有机酸盐^[40]。其抑菌机理是通过抑制细胞的生长来达到抑菌目的。迄今为止,一些有机酸盐(山梨酸钾、乳酸钾和柠檬酸钠等)及其不同盐的衍生物已在肉制品中广泛应用,同时也被应用于产气荚膜梭菌的安全控制,为食品的微生物安全提供了保障^[41-42]。Velugoti等^[41]发现柠檬酸钾与柠檬酸钠可以抑制猪肉中产气荚膜梭菌的生长。Valenzuela-Martinez等^[42]将天然抗菌剂(MOstatin V、MOstatin LV)与柠檬汁浓缩物3种溶液分别加入到肉制品中来探究其对产气荚膜梭菌的抑制作用,21 h的降温后,MOstatin V(相对含量2.5%)和MOstatin LV(相对含量3.5%)可以有效地抑制火鸡烤肉中产气荚膜梭菌芽孢的萌发,其生长量低于1.0 (lg (CFU/g));缓冲液醋酸以及柠檬汁浓缩物和醋酸的混合物(缓冲液)均可以有效地控制火鸡烤肉中产气荚膜梭菌芽孢的萌发和生长。

3.2.1.3 磷酸盐

长链多聚无机磷酸盐(多磷酸盐)和正磷酸盐衍生物的混合物已在肉类和奶制品中被广泛使用^[43]。这些磷酸盐及其衍生物由于具有乳化、防止氧化和改善风味的功能而被用作食品添加剂,最重要的是其具有抑菌性。长链多聚磷酸盐(正磷酸盐、焦磷酸盐和多磷酸盐)的抗菌活性已显示出可以对多种不同细菌起到抑制作用^[43],包括产气荚膜梭菌^[44-45]。有研究发现产气荚膜梭菌在质量浓度1 250 mg/L三聚磷酸钠、质量分数5%乳酸钠和2.5% NaCl的条件下,47 °C孵育24 h,产气荚膜梭菌的生长受到显著抑制^[44]。Singh等^[45]发现在不同的冷藏条件下,不同来源的酸式焦磷酸钠组合可有效地抑制不同肉制品中产气荚膜梭菌的生长,但是这些焦磷酸盐的功效取决于肉制品的类型和焦磷酸盐的剂量。表4总结了不同化学处理方法对产气荚膜梭菌营养细胞和芽孢的抑制作用。

表4 不同化学处理方法对产气荚膜梭菌细胞和芽孢的抑制作用

Table 4 Effects of different chemical agents on the inhibition of *C. perfringens* cells and spores

处理方法	基质	处理条件	抑制作用	参考文献
硝酸盐和亚硝酸盐	肉汤	100 mg/L NaNO ₂ , 11 °C	芽孢和营养细胞数下降了4 (lg (CFU/mL))	[38]
	火腿	200 mg/L NaNO ₂	芽孢和营养细胞数下降了2~4 (lg (CFU/g))	[37]
山梨酸	缓冲液	体积分数1%山梨酸钠	可有效抑制30%~70% C-cpe分离株芽孢、50%~90% P-cpe分离株芽孢的萌发	[46]
苯甲酸	缓冲液	体积分数1%苯甲酸钠	可有效抑制30%~70% C-cpe分离株芽孢、98% P-cpe分离株芽孢的萌发	[46]
乳酸	猪肉	≥2% (质量分数,下同) 乳酸钙、≥3%乳酸钾或≥3%乳酸钠	芽孢萌发和生长数下降了4~6 (lg (CFU/g))	[47]
	火鸡	≥2%乳酸钙、≥3%乳酸钾或≥3%乳酸钠	芽孢萌发和生长数下降了4~6 (lg (CFU/g))	[47]
醋酸	烤牛肉	≥2% MOstatin LV1	芽孢萌发和生长数下降了6~7 (lg (CFU/g))	[48]
	火鸡	2.5% MOstatin V或3.5% MOstatin LV	芽孢萌发和生长数下降了3~5 (lg (CFU/g))	[42]
磷酸盐	牛肉	1 250 mg/L三聚磷酸钠、5%乳酸钠和2.5% NaCl, 47 °C、24 h	营养细胞数下降了2 (lg (CFU/g))	[44]

3.2.2 天然化合物

3.2.2.1 精油提取物

精油是具有一定挥发性的植物特有芳香物质的提取物总称,其被用作食品防腐剂以及用于调味、调香已有数千年的历史,研究表明精油对多种细菌(包括产气荚膜梭菌)均具有抑菌活性^[49]。肉桂醛是最常见的植物来源的精油之一,并且对产气荚膜梭菌营养细胞表现出较强的抑菌活性。研究发现,肉桂醛(质量分数≥0.5%)也可有效控制冷藏条件下煮熟的碎牛肉和碎火鸡中产气荚膜梭菌芽孢的萌发和生长^[50-51]。Alanazi等^[49]研究表明,肉桂醛、丁香酚和香芹酚均能抑制产气荚膜梭菌芽孢萌发。王小慧等^[17]研究了黑胡椒精油、茴香精油、肉桂精油、姜精油、艾草精油和白芷精油的抑菌活性,结果显示,肉桂精油对产气荚膜梭菌的抑制效果最佳,然后依次为艾草精油、茴香精油、黑胡椒精油和姜精油,而白芷精油对产气荚膜梭菌无明显的抑制作用。表5总结了不同精油对产气荚膜梭菌营养细胞表现出的抑菌活性。

表5 精油对产气荚膜梭菌的抑菌活性

Table 5 Antimicrobial activities of selected essential oils against *C. perfringens*

精油种类	<i>C. perfringens</i> 菌株	最小抑菌质量浓度	参考文献
黑胡椒精油	ATCC 13124	11 mg/mL	[17]
茴香精油	ATCC 13124	22 mg/mL	[17]
姜精油	CICC 22949	22 mg/mL	[17]
艾草精油	CICC 22949	2.75 mg/mL	[17]
肉桂精油	ATCC 13124	2.75 mg/mL	[17]
反肉桂精油*	A型(分离于鸡中)	167 μg/mL	[52]
百里酚	CVCC 2027	375 μg/mL	[53]
香芹酚	CVCC 2027	375 μg/mL	[53]
2-叔基-6-甲基苯酚*	A型(分离于鸡中)	175 μg/mL	[52]
罗马洋甘菊精油*	A型(分离于鸡中)	450 μg/mL	[52]
柠檬精油*	A型(分离于鸡中)	275 μg/mL	[52]
香茅醛*	A型(分离于鸡中)	400 μg/mL	[52]
香叶醇*	A型(分离于鸡中)	450 μg/mL	[52]

注:*.测定的为使菌落总数减少95%的最小抑菌质量浓度(MIC₉₅)。

3.2.2.2 绿茶提取物

绿茶对人体健康具有有益作用, 且其提取物对多种细菌(包括产气荚膜梭菌)均具有抑制作用, 绿茶提取物可以抑制产气荚膜梭菌芽孢的萌发^[54]。Juneja等^[55]将从绿茶中提取的物质配制成了一系列不同浓度的溶液, 分别添加于接种了产气荚膜梭菌芽孢的不同肉制品中, 在煮制肉样从54.4℃降至7.2℃的过程中, 观察样品中产气荚膜梭菌的菌落数变化情况, 结果表明, 绿茶提取物的添加量为2%时效果最好, 在不同的肉品介质中, 与对照组相比产气荚膜梭菌的残存量都比较低。此外, 绿茶提取物对产气荚膜梭菌的抑制作用与其浓度紧密相关。

3.2.2.3 脂肪酸

短链和长链脂肪酸对产气荚膜梭菌的抗菌活性已在研究中得到证实, 此外, 研究发现长链脂肪酸在抑制产气荚膜梭菌生长方面比短链脂肪酸更为有效^[56-57]。Skřivanová等^[57]研究发现, 产气荚膜梭菌的不同菌株对各脂肪酸的敏感性不同, 其中, 辛酸(C_{8:0})、癸酸(C_{10:0})、月桂酸(C_{12:0})、肉豆蔻酸(C_{14:0})和油酸(C_{18:0})可以有效抑制产气荚膜梭菌ATCC 13124和CNCTC 5459两种菌株的生长, 而亚油酸(C_{18:2})仅抑制产气荚膜梭菌CNCTC 5459菌株, 而不抑制ATCC 13124菌株, 同时证明月桂酸(C_{12:0})是最有效的抗菌剂, 其次是肉豆蔻酸(C_{14:0})和癸酸(C_{10:0})。

3.2.2.4 溶菌酶

溶菌酶主要来源于鸡蛋, 占蛋清蛋白的3%~5%^[40], 具有广谱抗菌活性, 常用于奶酪生产中以防止由梭状芽孢杆菌引起的污染^[58]。溶菌酶主要通过水解细胞壁中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4糖苷键来破坏细胞壁肽聚糖层而使细菌细胞失活, 它是抵抗多种革兰氏阳性细菌的有效抗菌剂^[59]。Paredes-Sabja等^[60]发现溶菌酶是通过引起芽孢皮层的快速水解而使芽孢核心受到破坏, 从而导致产气荚膜梭菌芽孢失活。有研究发现质量浓度156 $\mu\text{g/mL}$ 的溶菌酶可以有效抑制产气荚膜梭菌营养细胞的生长^[61]。

3.2.2.5 壳聚糖

壳聚糖为天然多糖甲壳素脱除部分乙酰基的产物, 具有无毒性、抑菌、生物降解性、生物相容性等多种功能, 被广泛应用于食品添加剂及抗菌剂等^[62]。Filimon等^[63]的实验研究结果表明, 对于多种革兰氏阳性致病菌, 如产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌等, 壳聚糖对它们的生长有较大的影响。Alnomani等^[62]研究发现, 质量浓度0.1 mg/mL的壳聚糖(pH 4.5)可以抑制产气荚膜梭菌芽孢的萌发, 同时壳聚糖对产气荚膜梭菌的营养细胞具有抑菌活性。Juneja等^[64]在煮熟的牛肉和火鸡长达18 h

的冷却过程中添加质量分数3%的壳聚糖(乙酰化度为0.14), 发现产气荚膜梭菌芽孢的萌发和生长数量均减少了约4~5 (lg (CFU/g))。

3.2.2.6 细菌素

细菌素是由细菌生成的多肽类物质, Nisin^[65]、乳酸片球菌素^[66]、戊糖片球菌素等细菌素, 在体外抑菌实验中, 都可以抑制产气荚膜梭菌的生长。Nisin由于来源天然和对多种革兰氏阳性细菌具有高效抑制作用, 作为防腐剂已被用于多种食品中。有研究表明, Nisin单独或与其他食品保鲜技术(如加热和高静水压)协同作用对抑制梭状芽孢杆菌的芽孢生长具有较好的效果^[33,65]。Nisin在实验室条件下对产气荚膜梭菌FP菌株和NFB菌株的芽孢萌发和营养细胞生长均具有抑制作用, 但在肉模型系统中未观察到这种作用^[65]。在体内实验中, 细菌素对产气荚膜梭菌的抑制作用非常有限。食品中内源性蛋白酶可以降解细菌素, 脂肪颗粒可以吸收细菌素, 这些都是细菌素不能正常发挥其对产气荚膜梭菌抑制作用的原因^[67], 由此影响了细菌素对体内产气荚膜梭菌的抑制效果。表6总结了不同天然化合物处理对产气荚膜梭菌营养细胞和芽孢的抑制作用。

表6 不同天然化合物处理对产气荚膜梭菌细胞和芽孢的抑制作用
Table 6 Effects of different natural antimicrobials on the inhibition of *C. perfringens* cells and spores

处理方法	基质	处理条件	抑制作用	参考文献
肉桂醛	熟制的牛肉和火鸡	质量分数1%肉桂醛	芽孢萌发和生长数下降了3~4 (lg (CFU/g))	[50-51]
香芹酚、百里香酚、牛至精油	熟制的牛肉和火鸡	质量分数2%香芹酚、2%百里香酚和2%牛至精油	芽孢萌发和生长数下降了3~5 (lg (CFU/g))	[50-51]
绿茶提取物	熟制的鸡肉和猪肉	质量分数2%绿茶提取物	芽孢萌发和生长数下降了3~4 (lg (CFU/g))	[55]
脂肪酸	缓冲液	质量浓度1 mg/mL月桂酸	营养细胞数下降超过7 (lg (CFU/g))	[57]
溶菌酶	肉汤	质量浓度156 $\mu\text{g/mL}$ 鸡蛋清的溶菌酶	完全抑制营养细胞的生长	[61]
壳聚糖	熟制的牛肉和火鸡	质量分数3%壳聚糖	芽孢萌发和生长数下降了4~5 (lg (CFU/g))	[64]
Nisin	肉汤	$\geq 10 \mu\text{mol/L}$ 乳链菌肽	完全抑制营养细胞和芽孢的生长	[65]

3.3 “先萌发后灭活”策略控制产气荚膜梭菌及其芽孢

常用的物理及化学方法对产气荚膜梭菌营养菌体有一定的抑制效果, 但是对于该菌芽孢的抑制作用较差。因此寻找新的方法来控制产气荚膜梭菌芽孢的污染成为研究热点。近年来, 众多学者研究了各种理化因素对芽孢萌发的诱导效果, 在了解芽孢萌发的机制方面也取得了重大进展。目前, 已经发现许多因素可以诱导芽孢萌发, 主要包括营养、非营养萌发剂以及物理方式协同萌发剂诱导芽孢萌发, 其中营养素主要有氨基酸(如L-丙氨酸和L-赖氨酸)、糖类、嘌呤、核苷以及一些营养素的组合^[4,68-69], 如AGFK(L-天冬酰胺、D-葡萄糖、

D-果糖和 K^+)^[68,70]；非营养素主要有细胞壁碎片、阳离子表面活性剂（如十二烷基）、2,6-吡啶二羧酸钙（ Ca^{2+} -DPA）、外源裂解酶等^[71]，这些非营养素因子触发芽孢萌发途径和营养性萌发剂触发的萌发途径是关联的。此外，物理因素如温度、超高压、机械擦伤等也可以诱导芽孢萌发，比如很多芽孢在高压（100~600 MPa）下可以萌发，在较低的压力（100~200 MPa）下芽孢依靠萌发受体的作用萌发^[72]，在较高的压力（500~600 MPa）下，缺少萌发受体的芽孢也可以快速的萌发^[73]。Saeed等^[69]研究表明，L-赖氨酸（pH 6.0）可以诱导产气荚膜梭菌C-cpe和P-cpe分离株芽孢的萌发。Zhu Yaodi等^[70]在Tris-HCl缓冲液中添加萌发剂AGFK后作用于产气荚膜梭菌芽孢，发现100 mmol/L的AGFK可以很好地诱导芽孢萌发。Paredes-Sabja等^[74]研究发现诱导芽孢萌发大大提高了常用消毒剂对附着在不锈钢上的产气荚膜梭菌FP芽孢的杀灭效率。总之，先诱导芽孢萌发然后进行灭活处理是提高杀灭芽孢效率的新策略。

4 结 语

产气荚膜梭菌作为一种主要污染肉及其肉制品的食源性致病菌之一，已逐渐引起国内外研究者的关注。本文综述了产气荚膜梭菌特性、危害及控制产气荚膜梭菌污染方法。虽然物理、化学及理化相结合的方法灭活产气荚膜梭菌营养细胞取得了巨大的成功，但由于产气荚膜梭菌芽孢具有高度的抗逆性，灭活食品中的产气荚膜梭菌芽孢仍是食品工业所面临的严峻挑战。这主要是因为极端的外界压力会降低食品品质，使用过多的化学防腐剂会导致毒性并危害人体健康；此外，在食品中添加抑菌剂可能会对人对胃肠道中的有益微生物表现出非特异性抑制活性，从而导致肠道菌群失衡。这些问题强调了在将活性化合物应用于食品之前评估其毒理的重要性，以确保其安全使用。另外，阐明不同物理和化学技术以及天然抑菌剂的作用机理对于有效利用这些处理方法来抑制产气荚膜梭菌营养细胞和芽孢的生长至关重要。

近年来，随着人民生活水平的提高，全球对食品的安全越来越重视，对控制产气荚膜梭菌在食品中的污染是今后研究的重要方向。开发定向调控产气荚膜梭菌芽孢危害的新技术，并有效灭活食品中产气荚膜梭菌的芽孢或营养细胞，不仅为有效控制该菌污染及肉类产品贮藏提供理论依据，同时在控制食物源芽孢梭菌、提高食品安全性、促进肉制品产业健康发展等方面也具有重要现实意义和实际应用价值。

参考文献：

- [1] JIA Z, LIU Y H, HWANG C A, et al. Effect of combination of oxyrase and sodium thioglycolate on growth of *Clostridium perfringens* from spores under aerobic incubation[J]. Food Microbiology, 2020, 89: 103413. DOI:10.1016/j.fm.2020.103413.
- [2] MONMA C, HATAKEYAMA K, OBATA H, et al. Four foodborne disease outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(3): 859-867. DOI:10.1128/JCM.02859-14.
- [3] 梁栋, 陈芳, 胡小松. 芽孢萌发研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 221-228. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.06.029.
- [4] ABBONA C C, STAGNITTA P V. *Clostridium perfringens*: comparative effects of heat and osmotic stress on non-enterotoxigenic and enterotoxigenic strains[J]. Anaerobe, 2016, 39: 105-113. DOI:10.1016/j.anaerobe.2016.03.007.
- [5] RAHAYU W P, FARDIAZ D, KARTIKA G D, et al. Estimation of economic loss due to food poisoning outbreaks[J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(Suppl 1): 157-161. DOI:10.1007/s10068-016-0113-8.
- [6] DOLAN G P, FOSTER K, LAWLER J, et al. An epidemiological review of gastrointestinal outbreaks associated with *Clostridium perfringens*, North East of England, 2012–2014[J]. Epidemiology and Infection, 2016, 144(7): 1386-1393. DOI:10.1017/s0950268815002824.
- [7] 卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验: GB 4789.13–2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-4.
- [8] LI J H, DANIEL P S, SARKER M R, et al. *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production[J]. Microbiology Spectrum, 2016, 4(3): 1-27. DOI:10.1128/microbiolspec.tbs-0022-2015.
- [9] NAVARRO M, MCCLANE B, UZAL F. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins[J]. Toxins, 2018, 10(5): 212. DOI:10.3390/toxins10050212.
- [10] KIU R, HALL L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1): 1-15. DOI:10.1038/s41426-018-0144-8.
- [11] XIN W W, WANG J L. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: toxic effects and mechanisms of action[J]. Biosafety and Health, 2019, 1: 71-75. DOI:10.1016/j.bsheat.2019.09.004.
- [12] NAKANO V, IGNACIO A, LLANCO L, et al. Multilocus sequence typing analyses of *Clostridium perfringens* type A strains harboring *tpeL* and *netB* genes[J]. Anaerobe, 2017, 44: 99-105. DOI:10.1016/j.anaerobe.2017.02.017.
- [13] NAGAHAMA M, OCHI S, ODA M, et al. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin[J]. Toxins, 2015, 7(2): 396-406. DOI:10.3390/toxins7020396.
- [14] ROOD J I, ADAMS V, LACEY J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. Anaerobe, 2018, 53: 5-10. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
- [15] GKOGKA E, REIJ M W, GORRIS L G M, et al. Risk assessment of *Clostridium perfringens* in Cornish pasties in the UK[J]. Food Control, 2020, 108: 106822. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.106822.
- [16] LI L, VALENZUELA-MARTINEZ C, REDONDO M, et al. Inhibition of *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth by lemon juice and vinegar product in reduced NaCl roast beef[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(11): M598-M603. DOI:10.1111/j.1750-3841.2012.02922.x.

- [17] 王小慧, 魏法山, 赵莉君, 等. 郑州市熟肉制品中产气荚膜梭菌污染状况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2): 194-197. DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.017.
- [18] 姜艳芬, 王清爱. 零售肉品中产气荚膜梭菌的检测与定型: 以陕西关中地区为例[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(11): 55-60; 69. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.11.008.
- [19] SHALTOUT F A, OSMAN I M, KAMEL E A, et al. Isolation of *Clostridium perfringens* from meat samples obtained from the university students' hostel[J]. EC Nutrition, 2017, 9(3): 142-150.
- [20] 王艳红, 李昊宇, 韩立君, 等. 肉类熟食中产气荚膜梭菌污染及耐药状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 2993-2994.
- [21] ZHANG T F, ZHANG W T, AI D Y, et al. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and retail chicken meat in central China[J]. Anaerobe, 2018, 54: 100-103. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.08.007.
- [22] GREINDA T, GRABCAZAK M, KWIAŁTEK K, et al. Prevalence of *C. botulinum* and *C. perfringens* spores in food products available on Polish market[J]. Journal of Veterinary Research, 2017, 61(3): 287-291. DOI:10.1515/jvetres-2017-0038.
- [23] JEONG D, KIM D H, KANG I B, et al. Prevalence and toxin type of *Clostridium perfringens* in beef from four different types of meat markets in Seoul, Korea[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(2): 545-548. DOI:10.1007/s10068-017-0075-5.
- [24] ARAS Z, HADIMLI H H. Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and Turkey meats[J]. Anaerobe, 2015, 32(32): 15-17. DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.11.004.
- [25] 邓志爱, 李孝权, 李钊华, 等. 食品中产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(6): 682-684; 690. DOI:10.3969/j.jissn.1672-3619.2006.06.021.
- [26] WANG Guiwen, PAREDES-SABJA D, SARKER M R, et al. Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 824-836. DOI:10.1111/j.1365-2672.2012.05387.x.
- [27] BYRNE B, DUNNE G, BOLTON D J. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll[J]. Food Microbiology, 2006, 23(8): 803-808. DOI:10.1016/j.fm.2006.02.002.
- [28] NOVAK J S, YUAN J T C. Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(2): 342-346. DOI:10.4315/0362-028x-67.2.342.
- [29] EVELYN, SILVA F V M. Use of power ultrasound to enhance the thermal inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206: 17-23. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.013.
- [30] 白妍, 葛雨珊, 向迎春, 等. 非热杀菌技术杀灭食品中芽孢效能及机理研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 314-322. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180908-083.
- [31] SARKER M R, AKHTAR S, TORRES J A, et al. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(1): 18-26. DOI:10.3109/1040841X.2013.788475.
- [32] PAREDES-SABJA D, GONZALEZ M, SARKER M R, et al. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature, and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(6): M202-M206. DOI:10.1111/j.1750-3841.2007.00423.x.
- [33] GAO Y L, QIU W F, WU Ding, et al. Assessment of *Clostridium perfringens* spore response to high hydrostatic pressure and heat with nisin[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(7): 1083-1095. DOI:10.1007/s12010-011-9196-0.
- [34] EVELYN, SILVA F V M. High pressure thermal processing for the inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33: 26-31. DOI:10.1016/j.ifset.2015.12.021.
- [35] MAJOU D, CHRISTIEANS S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats[J]. Meat Science, 2018, 145: 273-284. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.06.013.
- [36] HUANG L, ZENG X Q, SUN Z, et al. Production of a safe cured meat with low residual nitrite using nitrite substitutes[J]. Meat Science, 2020, 162: 1-9. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108027.
- [37] REDONDO-SOLANO M, VALENZUELA-MARTINEZ C, CASSADA D A, et al. Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling[J]. Food Microbiology, 2013, 35(2): 108-115. DOI:10.1016/j.fm.2013.02.008.
- [38] MYERS M I, SEBRANEK J G, DICKSON J S, et al. Implications of decreased nitrite concentrations on *Clostridium perfringens* outgrowth during cooling of ready-to-eat meats[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(1): 153-156. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-15-301.
- [39] KING A M, GLASS K A, MILKOWSKI A L, et al. Impact of clean-label antimicrobials and nitrite derived from natural sources on the outgrowth of *Clostridium perfringens* during cooling of deli-style turkey breast[J]. Journal of Food Protection, 2015, 78(5): 946-953. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-14-503.
- [40] DAVIDSON P M, TAYLOR T M, SCHIMIDT S E. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds[M]// DOYLE M P, BUCHANAN R L. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 2013: 765-801. DOI:10.1128/9781555818463.ch30.
- [41] VELUGOTI P R, KUMAR S, BOHRA L K, et al. Inhibition of germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores by buffered calcium, potassium and sodium citrates in cured and non-cured injected pork during cooling[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 123: 109074. DOI:10.1016/j.lwt.2020.109074.
- [42] VALENZUELA-MARTINEZ C, PENA-RAMOS A, JUNEJA V K, et al. Inhibition of *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth by buffered vinegar and lemon juice concentrate during chilling of ground turkey roast containing minimal ingredients[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(3): 470-476. DOI:10.4315/0362-028X-73.3.470.
- [43] TENDERIS B, KILIÇ B, YALÇIN H, et al. Impact of sodium lactate, encapsulated or unencapsulated polyphosphates and their combinations on *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* growth in cooked ground beef[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 312: 1-8. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108560.
- [44] HUANG Lihan, LI Changcheng, HWANG C A. Growth/no growth boundary of *Clostridium perfringens* from spores in cooked meat: a logistic analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 257-266. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.010.
- [45] SINGH A, KORASAPATI N R, JUNEJA V K, et al. Effect of phosphate and meat (pork) types on the germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores during abusive chilling[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(5): 879-887. DOI:10.4315/0362-028x-73.5.879.

- [46] ALNOMAN M, UDOMPIJITKUL P, PAREDES-SABJA D, et al. The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates[J]. Food Microbiology, 2015, 48: 89-98. DOI:10.1016/j.fm.2014.12.007.
- [47] VELUGOTI P R, BOHRA L K, JUNEJA V K, et al. Inhibition of germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores by lactic acid salts during cooling of injected turkey[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(4): 923-929. DOI:10.4315/0362-028X-70.4.923.
- [48] LI L, VALENZUELA-MARTINEZ C, REDONDO M, et al. Inhibition of *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth by lemon juice and vinegar product in reduced NaCl roast beef[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(11): M598-M603. DOI:10.1111/j.1750-3841.2012.02922.x.
- [49] ALANAZI S, ALNOMAN M, BANAWAS S, et al. The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Clostridium perfringens* type A in laboratory medium and chicken meat[J]. Food Microbiology, 2018, 73: 311-318. DOI:10.1016/j.fm.2018.02.003.
- [50] JUNEJA V K, FRIEDMAN M. Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil, and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(1): 218-222. DOI:10.1038/sj.jes.7500518.
- [51] JUNEJA V K, THIPPAREDDI H, FRIEDMAN M. Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(7): 1546-1551. DOI:10.4315/0362-028X-69.7.1546.
- [52] SI W, NI X, GONG J, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 213-220. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.03994.x.
- [53] DU E C, GAN L P, LI Z, et al. *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2015, 6(1): 58. DOI:10.1186/s40104-015-0055-7.
- [54] FRIEDMAN M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(1): 116-134. DOI:10.1002/mnfr.200600173.
- [55] JUNEJA V K, BARI M L, INATSU Y, et al. Control of *Clostridium perfringens* spores by green tea leaf extracts during cooling of cooked ground beef, chicken, and pork[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(6): 1429-1433. DOI:10.1089/cmb.2007.R010.
- [56] SPRONG R C, HULSTEIN M F E, VAN DER MEER R. Bactericidal activities of milk lipids[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 1298-1301. DOI:10.1128/AAC.45.4.1298-1301.2001.
- [57] SKŘIVANOVÁ E, MAROUNEK M, DLOUHÁ G, et al. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C₂-C₁₈ fatty acids[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(1): 77-81. DOI:10.1111/j.1472-765X.2005.01709.x.
- [58] GÓMEZ-TORRES N, ÁVILA M, GAYA P, et al. Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct[J]. Food Microbiology, 2014, 42: 82-88. DOI:10.1016/j.fm.2014.02.018.
- [59] DAVIDSON P M, CRITZER F J, TAYLOR T M. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods[J]. Annual Review of Food Science & Technology, 2013, 4(1): 163-190. DOI:10.1146/annurev-food-030212-182535.
- [60] PAREDES-SABJA D, SETLOW P, SARKER M R. SleC is essential for cortex peptidoglycan hydrolysis during germination of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(8): 2711-2720. DOI:10.1128/JB.01832-08.
- [61] ZHANG G, DARIUS S, SMITH S R, et al. *In vitro* inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α -toxin production[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(2): 138-143. DOI:10.1111/j.1472-765X.2005.01812.x.
- [62] ALNOMAN M, UDOMPIJITKUL P, SARKER M R. Chitosan inhibits enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A in growth medium and chicken meat[J]. Food Microbiology, 2017, 64: 15-22. DOI:10.1016/j.fm.2016.11.019.
- [63] FILIMON M N, POPESCU R, SINITEAN A, et al. The assessment of chitosan solutions effects on bacterial strains[J]. Revista de Chimie, 2018, 69(6): 1485-1488. DOI:10.37358/RC.18.6.6351.
- [64] JUNEJA V K, THIPPAREDDI H, BARI L, et al. Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(6): M236-M240. DOI:10.1111/j.1750-3841.2006.00109.x.
- [65] UDOMPIJITKUL P, PAREDES-SABJA D, SARKER M R. Inhibitory effects of nisin against *Clostridium perfringens* food poisoning and nonfood-borne isolates[J]. Journal of Food Science, 2012, 77: M51-M56. DOI:10.1111/j.1750-3841.2011.02475.x.
- [66] NIETO-LOZANO J C, REGUERA-USEROS J I, PELÁEZ-MARTÍNEZ M D C, et al. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters[J]. Food Control, 2010, 21(5): 679-685. DOI:10.1016/j.foodcont.2009.10.00.
- [67] TSAI G J, HWANG S P. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria[J]. Fisheries Science, 2004, 70(4): 675-681. DOI:10.1111/j.1444-2906.2004.00856.x.
- [68] ZHU Y D, ZHANG J Y, LI M Y, et al. Near-infrared spectroscopy coupled with chemometrics algorithms for the quantitative determination of the germinability of *Clostridium perfringens* in four different matrices[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 232: 117997. DOI:10.1016/j.saa.2019.117997.
- [69] SAEED B, SARKER M R. L-lysine (pH 6.0) induces germination of spores of, *Clostridium perfringens*, type F isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 123: 227-232. DOI:10.1016/j.micpath.2018.07.022.
- [70] ZHU Yaodi, ZHANG Jiaye, LI Miaoyun, et al. Rapid determination of spore germinability of *Clostridium perfringens* based on microscopic hyperspectral imaging technology and chemometrics[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 280: 109896. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2019.109896.
- [71] PAREDES-SABJA D, SETLOW P, SARKER M R. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(2): 85-94. DOI:10.1016/j.tim.2010.10.004.
- [72] WUYTACK E Y, SOONS J, POSCHET F, et al. Comparative study of pressure- and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 257-261. DOI:10.1128/AEM.66.1.257-261.2000.
- [73] PAIDHUNGAT M, SETLOW B, DANIELS W B, et al. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 3172-3175. DOI:10.1128/AEM.68.6.3172-3175.2002.
- [74] PAREDES-SABJA D, TORRES J A, SETLOW P, et al. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(4): 1190-1201. DOI:10.1128/JB.01748-07.