

ZASTOSOWANIE METODY PŁYTEK DWUWARSTWOWYCH DO REGENERACJI KOMÓREK *ESCHERICHIA COLI* USZKODZONYCH SUBLETALNIE W WYNIKU DZIAŁANIA DITLENKU WĘGLA W PODWYŻSZONYM CIŚNIENIU

Justyna Nasiłowska, Barbara Sokółowska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Streszczenie

Praca dotyczyła badań nad możliwościami regeneracji komórek *E. coli* uszkodzonych subletalnie w procesie utrwalania ditlenkiem węgla w podwyższonym ciśnieniu (HPCD). Do regeneracji zastosowano płytki dwuwarstwowe TAL (Thin Agar Layer). Dodatkowo podjęto próbę oceny przydatności metody płytek dwuwarstwowych do rutynowej kontroli jakości mikrobiologicznej w odniesieniu do znormalizowanej metody oznaczania *E. coli*.

Bakterie zawieszone w roztworach modelowych o pH 4 i pH 7 poddawano działaniu HPCD pod ciśnieniem 40 MPa, w temperaturze 55°C, w czasie od 10 do 20 minut.

Odzysk uszkodzonych komórek na pożywce TAL był wyższy niż na pożywce TBX zalecanej w obowiązującej normie. Różnice na pożywkach TAL i TBX wynosiły od 0,6 do 1,2 log w buforze pH 4 i od 0,8 do 1,2 log w buforze pH 7. Pożywka TAL umożliwiła wzrost bakterii w postaci charakterystycznych niebieskich kolonii.

Słowa kluczowe: *E. coli*, uszkodzenia subletalne, HPCD, metoda płytek dwuwarstwowych (TAL)

APPLICATION OF THIN AGAR LAYER METHOD FOR RECOVERY OF SUBLETHALLY INJURED *ESCHERICHIA COLI* CELLS BY HIGH PRESSURE CARBON DIOXIDE TREATMENT

Summary

Possibilities of recovery of *E. coli* cells, sublethally injured during high pressure carbon dioxide (HPCD) treatment were investigated. The Thin Agar Layer method (TAL) was used

for recovery of injured cells. Additionally, the suitability of Thin Agar Layer for routine microbiological quality control was evaluated in relation to standardized method.

Bacterial cells suspended in model solutions pH 4 and pH 7 were treated with HPCD under pressure 40 MPa at 55°C from 10 to 20 minutes.

The recovery of damaged cells on TAL was higher than on TBX, recommended in the obligatory standard. The differences between growth of bacterial cells on TAL and TBX were from 0.6 to 1.2 log in buffer pH 4 and from 0.8 to 1.2 log in buffer pH 7. TAL method allowed to grow the bacterial cells in the form of characteristic blue colonies.

Key words: *E. coli*, sublethal injuries, HPCD, thin agar layer method (TAL)

WSTĘP

Bakterie patogenne, do których należy m.in. *Escherichia coli*, stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Większość szczepów *E. coli* pełni funkcję komensali w przewodzie pokarmowym człowieka. Istnieją jednak chorobotwórcze szczepy, do których należą enterokrwotoczne serotypy, np. O157:H7 czy O104:H4, będące przyczyną epidemii wywoływanych na całym świecie. Rezerwuarem tych bakterii jest m.in. nawóz naturalny, coraz częściej stosowany w uprawie owoców i warzyw w gospodarstwach ekologicznych. Źródłem zachorowań powodowanych przez bakterie *E. coli*, w tym śmiertelnych, w USA i Kanadzie w latach 90. ubiegłego stulecia były surowe soki – jabłkowy i cytrusowy [Parish 2003; Vasavada 2003], zaś w ostatnich latach są to kielki, maliny czy produkty gotowe do spożycia, tj. sałatki [<http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html>]. Obecnie w handlu światowym wymogi mikrobiologiczne są coraz bardziej restrykcyjne. Przykładem jest rynek azjatycki, który wymaga, aby powierzchnia jabłek była całkowicie pozbawiona bakterii *E. coli*.

Pomimo wielu starań producentów w kierunku uzyskania produktu czystego mikrobiologicznie, zatrucia pokarmowe występują nadal. Łagodne metody utrwalania stosowane przy produkcji żywności niskoprzetworzonej nie zawsze pozwalają na całkowitą inaktywację drobnoustrojów. Poziom uszkodzeń w przypadku każdej komórki jest indywidualny. Niektóre pozostaną całkowicie nienaruszone, u innych uszkodzenia mogą doprowadzić do utraty żywotności (uszkodzenia letalne), pozostałe będą uszkodzone subletalnie, co oznacza zaburzenia w strukturze komórkowej i tymczasowe zmiany w fizjologii. Uszkodzona w ten sposób mikroflora może ulec regeneracji dzięki wewnętrznym mechanizmom naprawczym, zapewniając sobie przeżywalność, a w konsekwencji namnożyć się w produkcie i spowodować jego zepsucie [Kang, Siragusa 1999; Molenda 2007; Yuste

i in. 2004]. Z doniesień naukowych oraz własnych doświadczeń laboratoryjnych wynika, że komórki uszkodzone subletalnie stają się bardziej wrażliwe na czynniki selektywne (np. antybiotyki, surfaktanty, barwniki) będące składnikiem różnicujących pożywek mikrobiologicznych rekomendowanych przez ISO (International Organization of Standardization) i stosowanych w działach kontroli jakości. Wzrost i regeneracja takich komórek są możliwe jedynie na pożywkach bogatych, nieselektywnych, a te nie umożliwiają selekcji w populacji i różnicowania bakterii [Wu, Fung 2001]. Pożywki nieselektywne służą do oszacowania sumy wszystkich komórek, które przeżyły proces utrwalania. Nie wszystkie znormalizowane metody stosowane w działach kontroli jakości uwzględniają etap regeneracji komórek uszkodzonych w procesach technologicznych, zatem istnieje ryzyko, że zanieczyszczenia produktu nie zostaną wykryte. Nawet kilka komórek posiadających zdolności naprawcze może stanowić dawkę infekcyjną i mieć ogromne znaczenie dla bezpieczeństwa i jakości produktu. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się zastosowanie metody płytek dwuwarstwowych (TAL), umożliwiającej regenerację mikroorganizmów wraz ze wzrostem jedynie flory pożądaną. Metoda ta polega na przygotowaniu płytki z selektywną pożywką, a następnie zalaniu jej powierzchni cienką warstwą podłoża nieselektywnego. Górna część płytki (nieselektywna) zaszczepiana jest zawiesiną mikroorganizmów, a następnie całość poddawana inkubacji. W pierwszej kolejności składniki odżywcze pożywki nieselektywnej umożliwią regenerację komórek uszkodzonych. Składniki selektywne pochodzące z dolnego podłoża (selektywnego) w procesie dyfuzji stają się dostępne dla mikroorganizmów, nadając całemu systemowi selektywności [Kang, Siragusa 1999; Kang, Fung 2000; Yuste, Fung 2003; Yuste i in. 2004].

Coraz częściej nietermiczne metody utrwalania żywności stanowią przedmiot zainteresowań naukowców i producentów. Poszukiwane alternatywne metody powinny zapewniać bezpieczeństwo konsumenta, przy jednoczesnym zachowaniu pożądaných składników odżywczych oraz walorów sensorycznych. Jedną z nich jest metoda z zastosowaniem ditlenku węgla w podwyższonym ciśnieniu (*High Pressure Carbon Dioxide* – HPCD), która w ostatnich latach zyskała na popularności [Spilimbergo i in. 2002; Spilimbergo i in. 2007; Garcia-Gonzales i in. 2007]. W odróżnieniu od klasycznych metod termicznych, metoda HPCD nie zawsze powoduje całkowitą inaktywację drobnoustrojów, natomiast prowadzi do powstania uszkodzeń subletalnych w komórkach na skutek wywołanego stresu. Ditlenek węgla jako medium stosowane w omawianej technice ma wiele zalet – jest nietoksyczny, niedrogi i akceptowalny w przemyśle spożywczym. Z łatwością przenika w głąb błony komórkowej drobnoustrojów, powodując jej rozpuszczenie.

W dalszym etapie akumuluje się we wnętrzu cytoplazmy i powoduje jej zakwaszenie. Pomimo wysokich kosztów inwestycyjnych metody HPCD, koszty eksploatacji są stosunkowo niewielkie [Rawson i in. 2012].

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat przeprowadzono na świecie wiele doświadczeń, w których badano zasadność zastosowania metody płytek dwuwarstwowych do regeneracji uszkodzeń subletalnych drobnoustrojów. Porównywano liczebność populacji komórek uszkodzonych w wyniku działania procesów termicznych oraz nietermicznych, takich jak pulsujące pole elektryczne (PEF) czy wysokie ciśnienia (HPP) dla patogenów żywności, tj. *Salmonella* spp, *Listeria* spp, *E. coli* czy gronkowców na pożywkach selektywnych, nieselektywnych i na pożywce TAL [Kang, Siragusa 1999; Yuste i in. 2004; Zhao i in. 2013; Somolinos i in. 2007; Walking-Ribeiro i in 2008]. Natomiast niewiele jest doniesień naukowych dotyczących uszkodzeń subletalnych po zastosowaniu HPCD i możliwości ich regeneracji na pożywce TAL.

Celem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania metody TAL do regeneracji komórek *Escherichia coli* uszkodzonych subletalnie w procesie utrwalania metodą ditlenku węgla w podwyższonym ciśnieniu oraz porównania jej ze znormalizowaną metodą oznaczania β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* wg PN-EN ISO 16649-2:2004.

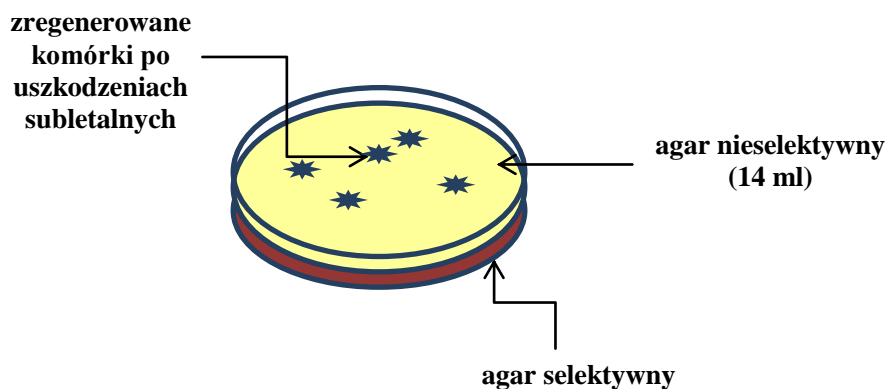
MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Przedmiotem badań były bakterie *Escherichia coli* ATCC 8739. Szczep przed badaniami przechowywano w postaci zamrożonej w Cryobankach w temperaturze $-27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Materiał biologiczny przygotowywano tak, aby uzyskać zawiesinę wyjściową o gęstości około 10^{10} jtk/ml. W tym celu szczep wzorcowy w postaci zamrożonej w Cryobanku ożywiano w 10 ml Tryptone Soy Broth – TSB (Biocar diagnostics) i inkubowano w warunkach $37^{\circ}\text{C}/24$ h. Następnie zawiesinę drobnoustrojów przesiewano na Tryptone Soy Agar – TSA (Biocar diagnostics) w celu uzyskania czystej kultury roboczej i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. W kolejnym etapie zebraną biomasę komórek bakterii zawieszano za pomocą ezy (~ 10 μl) w 200 ml płynnego TSB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 h. Po inkubacji hodowlę wprowadzano w stosunku 1:20 do kolb zawierających po 200 cm^3 TSB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 h (liczba kolb w zależności od potrzeb). Tak uzyskaną hodowlę wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy obrotach 4000 x g, przemywano trzykrotnie i zawieszano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Przygotowaną biomasę zawieszano

w buforach McIlvain (0,1 M kwas cytrynowy; 0,2 M wodorofosforan sodu) o pH 4 i pH 7 bezpośrednio przed poddaniem ich działaniu HPCD w zmodyfikowanej aparaturze do ekstrakcji nadkrytycznej (Applied Separations, USA). W badaniach zastosowano temperaturę 55°C, ciśnienie 40 MPa i czas trwania procesu do 20 minut.

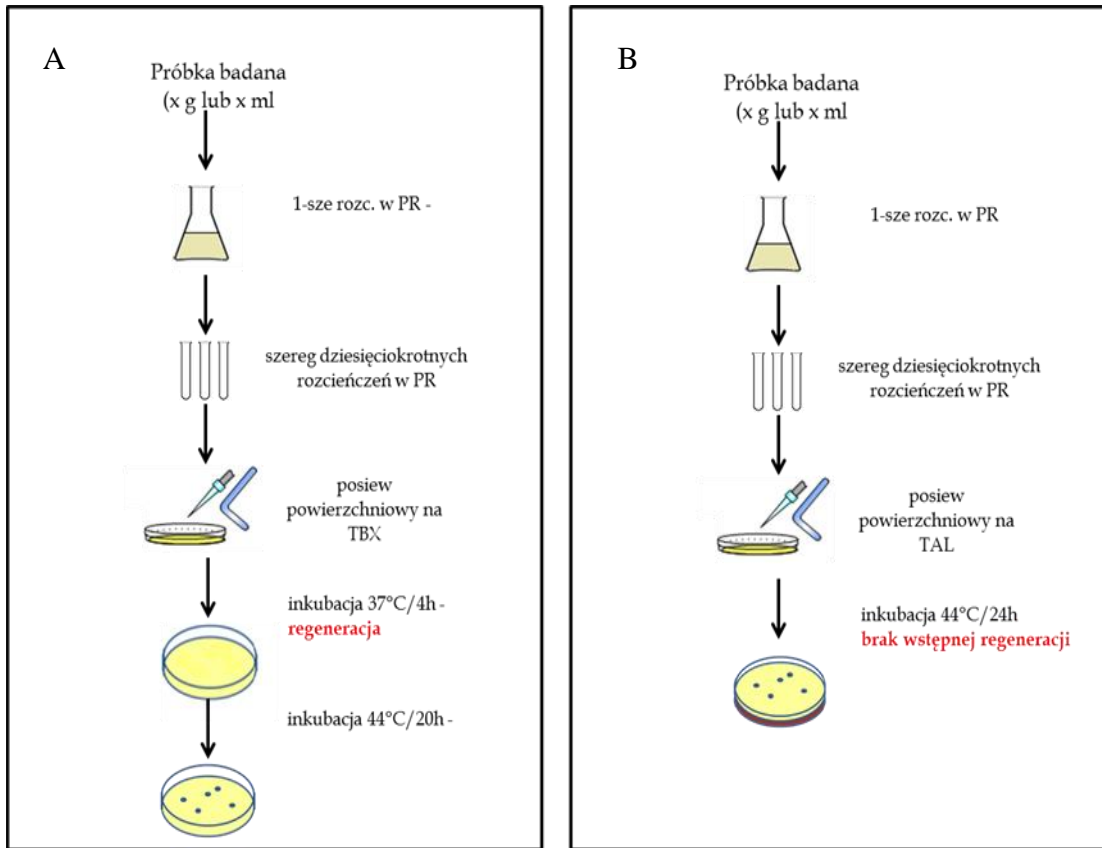
Oznaczenia liczebności bakterii *E. coli* wykonano z wykorzystaniem:

- pożywki nieselektywnej TSA, w celu oznaczenia wszystkich komórek w populacji (uszkodzonych i nieuszkodzonych),
- pożywki TBX (BIO-RAD), zgodnej z metodą znormalizowaną PN-EN ISO 16649-2:2004,
- płytki TAL, która stanowiła kombinację pożywek TSA + TBX. Przygotowanie płytek TAL polegało na wylaniu ok 18 ml pożywki TBX na płytkę Petriego i pokryciu już zestalonej powierzchni 14 ml (7 ml + 7 ml) pożywki TSA (metodyka wg D. H. Kang, D. Y. C. Fung 1999). Schemat płytki dwuwarstwowej przedstawiono na rysunku 1. Płytki TAL miały na celu zastąpienie etapu wstępnej regeneracji komórek uszkodzonych opisanej w przywołanej normie. Sposób wykonania analiz przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 1. Płytką dwuwarstwowa (TAL)

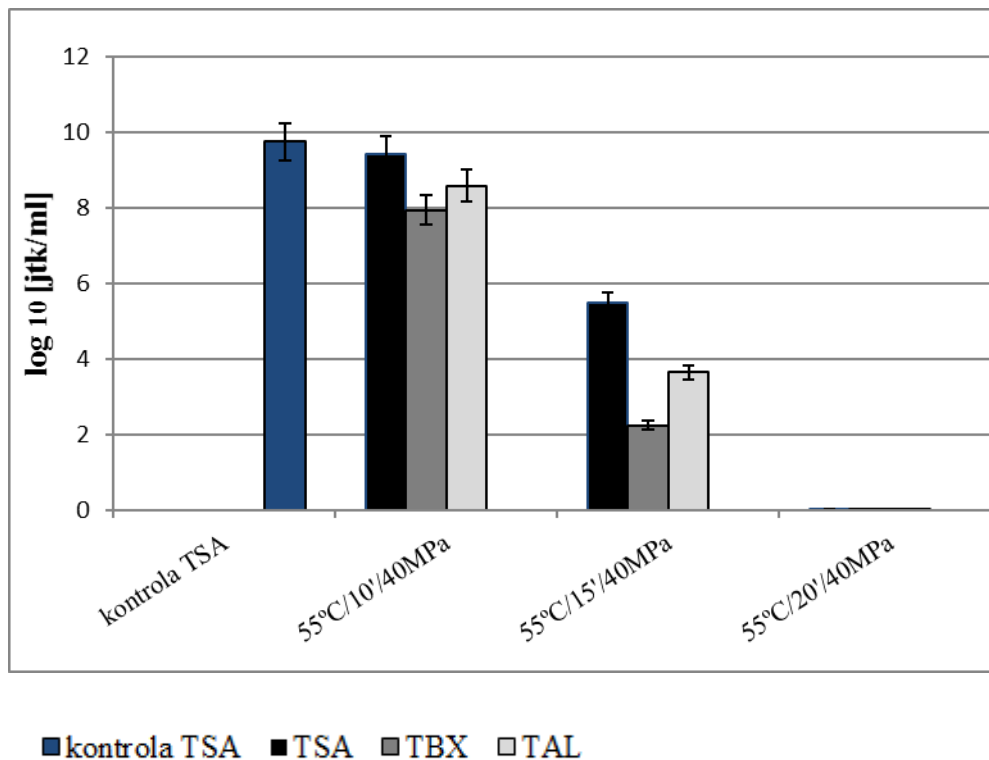
Thin Agar Layer (TAL) plate



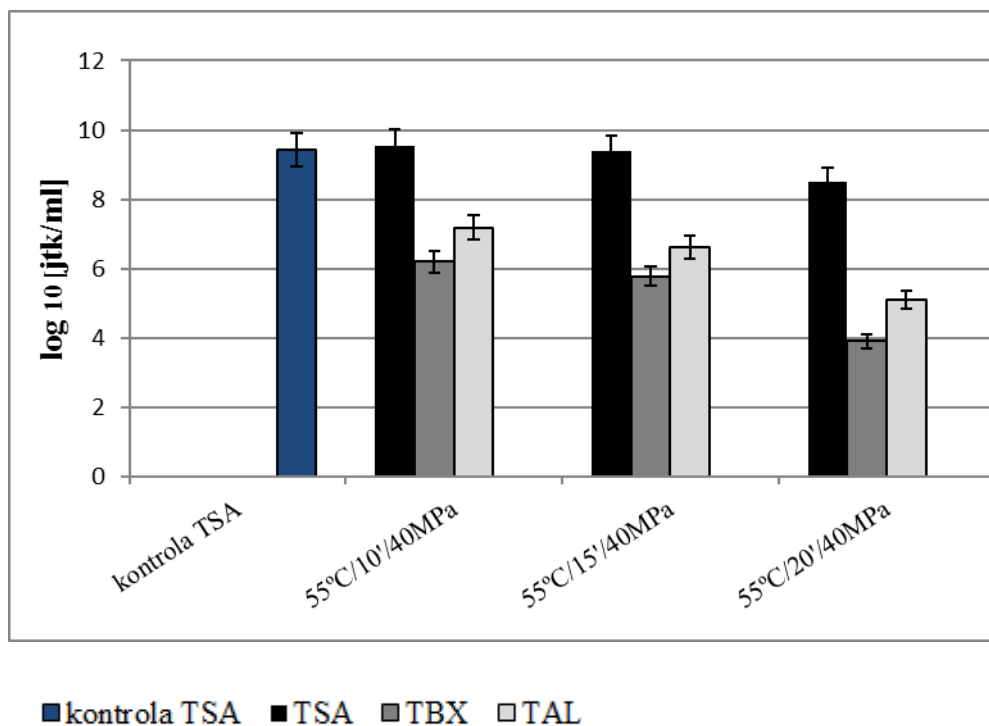
Rysunek 2. Schematy wykonania analiz oznaczania liczby *E. coli* na podstawie PN-EN ISO 16649-2:2004 (A) oraz z zastosowaniem metody płytek TAL (B)
Schemes of enumeration of E. coli based on PN-EN ISO 16649-2:2004 (A) and using TAL method (B)

WYNIKI I DYSKUSJA

Liczebność populacji bakterii *E. coli* zawieszonych w buforach, poddanych działaniu HPCD przedstawiono na rysunkach 3 i 4.



Rysunek 3. Przeżywalność *E. coli* zawieszanej w buforze pH 4 po procesie HPCD
Survival of E. coli suspended in buffer pH 4 after HPCD process



Rysunek 4. Przeżywalność *E. coli* zawieszanej w buforze pH 7 po procesie HPCD
Survival of E. coli suspended in buffer pH 7 after HPCD process

W wyniku działania ditlenku węgla uzyskano istotną redukcję w buforze pH 4 po 15 i 20 minutach procesu (rysunek 3), natomiast w buforze pH 7 redukcja była nieistotna lub bardzo niewielka (rysunek 4). Zastosowane parametry okazały się niewystarczające do inaktywacji bakterii *E. coli* w buforze pH 7, gdyż maksymalny poziom redukcji wyniósł niespełna 1,0 log. W buforze pH 4 po 10 minutach działania HPCD pod ciśnieniem 40 MPa uzyskany stopień redukcji był nieistotny statystycznie ($p > 0,05$). Dopiero wydłużenie czasu do 15 minut spowodowało obniżenie poziomu populacji do 5,5 log. Natomiast całkowitą inaktywację uzyskano po 20 minutach. Różnice pomiędzy liczbą kolonii uzyskanych na pożywce TSA i TBX były większe w przypadku bakterii zawieszonych w buforze pH 7 (max 4,6 log) niż w buforze pH 4 (max 3,2 log). Świadczy to prawdopodobnie o wyższym poziomie uszkodzeń subletalnych wywołanych działaniem ditlenku węgla w środowisku obojętnym.

Pomimo iż analizy mikrobiologiczne przeprowadzono zgodnie z obowiązującą normą, w której zapewniona jest regeneracja komórek uszkodzonych, wzrost *E. coli* na selektywnej pożywce TBX był znacznie słabszy niż na pożywce TAL. W buforze pH 4 różnice wynosiły od 0,6 do 1,2 log, a w buforze pH 7 od 0,8 do 1,2 log w zależności od czasu trwania procesu. Wyniki te potwierdzają wrażliwość komórek uszkodzonych subletalnie na składniki selektywne zawarte w pożywce TBX. Yuste i in. [2004] sugerują, że obecność wyższej liczby komórek uszkodzonych w całej populacji będzie skutkować większymi różnicami w liczbie kolonii na poszczególnych pożywkach, a odzysk na pożywce TAL będzie wyższy niż na pożywkach selektywnych. Na pożywce TAL uzyskano kolonie wykazujące charakterystyczne cechy, tj. wzrost, specyficzną (niebieską) barwę oraz typową morfologię kolonii.

Większość publikacji naukowych dotyczących zastosowania metody TAL odnosi się do uszkodzeń wywołanych metodami termicznymi [Kang, Siragusa 1999; Kang, Fung 2000; Wu, Kang 2001]. Kang i Fung [2000] badali zastosowanie płytek TAL do regeneracji komórek *Salmonella* Typhimurium w wodzie peptonowej uszkodzonych termicznie (55°C, 15 min). Na pożywkach TSA i TAL liczebność populacji po działaniu temperatury wynosiła około 4,5 log, zaś na pożywce XLD odzysk wyniósł 4 log. Autorzy podjęli próbę oceny selektywności metody TAL. W drugim doświadczeniu wysterylizowane odtłuszczone mleko kontaminowano pięcioma dodatkowymi bakteriami tj. *Listeria monocytogenes*, dwoma szczepami *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus cereus*. Metoda TAL umożliwiła charakterystyczny wzrost *S. Typhimurium* (czarne kolonie) z jednoczesnym zahamowaniem wzrostu flory towarzyszącej. Odzysk uszkodzonych komórek *S. Typhimurium* był o ponad 1 log wyższy na TAL niż na XLD. Kang i Siragusa [1999]

w innej pracy porównują poziom uszkodzeń wywołanych działaniem temperatury 60°C w czasie 1,5 minuty u patogenów *Salmonella* Typhimurium oraz *Escherichia coli* O157:H7 na różnych pożywkach. Regeneracja określona za pomocą agaru nieselektywnego TSA nie odbiegała od wyników uzyskanych na płytkach TAL i wynosiła dla *S. Typhimurium* 2,5 log, dla *E. coli* 2,7 log. Natomiast pożywki selektywne dały nieco niższy odzysk. Dla *S. Typhimurium* 1,8 log na pożywce XLD, dla *E. coli* 1,85 log na pożywce selektywnej. Na płytkach TAL odnotowano charakterystyczne reakcje, tj. wzrost, kolor czy morfologię kolonii, dla obydwu szczepów.

Przykład uszkodzeń wywołanych po zastosowaniu wysokich ciśnień hydrostatycznych przedstawiono w pracy Yuste i in. [2004], w której oceniano przydatność metody płytek TAL do regeneracji siedmiu patogenów poddawanych działaniu wysokiego ciśnienia. Wyniki uzyskane na TAL porównano z wynikami uzyskanymi na pożywkach selektywnych dostępnych w handlu oraz na pożywce TSA. Hodowle zawieszono w wodzie peptonowej poddawano ciśnieniowaniu w warunkach 100–900 MPa w czasie 1–5 minut. Dla większości badanych szczepów odzysk uszkodzonych komórek na płytkach TAL był wyższy niż na pożywkach selektywnych. W niektórych przypadkach, przy niskim stężeniu komórek po działaniu ciśnienia, pożywki selektywne nie umożliwiły wykrycia patogenów, w przeciwieństwie do płytek TAL. Dla *Salmonella* Typhimurium po działaniu ciśnienia 200 MPa przez 5 min, na pożywce TSA uzyskano 1,72 log, na XLD nie wykryto drobnoustroju, a na płytkach TAL uzyskano odzysk 0,15 log. Natomiast metoda płytek TAL w dużej mierze nie umożliwiła charakterystycznego wzrostu niektórym badanym patogenom. Typowy wzrost bakterii *E. coli* na zastosowanym selektywnym agarze z dodatkiem eozyny i błękitu metylowego (*eosin methylene blue agar* – EMB), to granatowo-czarne kolonie o charakterystycznym zielonym metalicznym połysku. Barwa kolonii na płytkach TAL była od różowych do fioletowych. Z kolei w przypadku komórek wegetatywnych *Bacillus cereus* uzyskano kolonie pomarańczowe na pożywce TAL zamiast różowych charakterystycznych dla zastosowanej pożywki selektywnej.

Warto także podkreślić, że niemalże wszystkie przywołane doświadczenia nie były prowadzone zgodnie z obowiązującymi metodami znormalizowanymi, gdyż nie uwzględniano np. etapu regeneracji (o ile takie zostały określone w normie). Przeważały hodowle prowadzone w warunkach 24h/37°C bez względu na rodzaj badanego drobnoustroju.

WNIOSKI

1. Metoda płytek dwuwarstwowych TAL umożliwiła lepszą regenerację komórek uszkodzonych w wyniku procesów utrwalania żywności niż pożywka rekomendowana przez ISO i dlatego może okazać się obiecującą alternatywą dla niektórych klasycznych metod stosowanych w kontroli żywności.
2. Zastosowanie alternatywnej metody płytek TAL wiąże się z koniecznością prowadzenia badań dotyczących możliwości regeneracji komórek uszkodzonych dla konkretnych patogenów w żywności utrwalanej różnymi metodami.
3. Wydłużenie czasu działania HPCD spowodowało zwiększenie poziomu inaktywacji oraz uszkodzeń subletalnych bakterii *Escherichia coli*.
4. Nowoczesna metoda HPCD może stać się obiecującą alternatywą w stosunku do metod termicznych. Jej zastosowanie w przemyśle wiąże się jednak z koniecznością prowadzenia badań dotyczących zmian zachodzących zarówno w trakcie samego procesu, jak i podczas przechowywania produktów utrwalonych tą metodą.

PIŚMIENNICTWO

1. Centers of Disease Control and Prevention: Reports of selected E. coli Outbreak Investigations. <http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>
2. Garcia-Gonzales L., Geeraerd A. H., Spilimbergo S., Elst K., Van Ginneken L. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 1-28
3. Kang D-H., Fung D. Y. C. (2000). Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella typhimurium*. *Int. J. of Food Microbiol.*, 54, 127-132
4. Kang D-H., Siragusa G. R. (1999). Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl and Env. Microbiol.*, 65 (12), 5334-5337
5. Marszałek K., Woźniak Ł., Skąpska S. (2014). Wysokie ciśnienia w przemyśle owocowo-warzywnym. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 11-12, 12-15
6. Molenda J. (2007). Wybrane niekonwencjonalne metody utrwalania żywności. *Med. Wet.*, 63 (9), 1016-1020
7. Parish M. E. (1997). Public health and nonpasteurized fruit juices. *Crit. Rev. Microbiol.*, 23 (2), 109-119

8. Rawson A., Tiwari B. K., Brunton N., Brennan C., Cullen P. J., O'Donnell C. P. (2012). Application of Supercritical Carbon Dioxide to Fruit and Vegetables: Extraction, Processing, and Preservation. *Food Rev. Int.*, 28 (3), 253-276
9. Somolinos M., Garcia D., Condón S., Manas P., Pagán R. (2007). Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (12), 3814-3821
10. Spilimbergo S., Mantoan D., Dalser A. (2007). Supercritical gases pasteurization of apple juice. *J. Supercritical Fluids*, 40, 485-489
11. Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucco A. (2002). Microbial inactivation by high – pressure. *J. Supercritical Fluids*, 22, 55-63
12. Vasavada P. C. (2003). Microbiology of fruit juice and beverages. W: Beverage quality and safety, pod red. Foster T., Vasada P. C. CRCPRESS, Institute of Food Technologists, Boca Raton, London, New York, Washington D. C., 95-123
13. Walking Ribeiro M., Noci F., Cronin D. A., Lyng J. G., Morgan D. J. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *J. Food Sci.*, 73 (8), 395-399
14. Wu V. C. H., Fung D. Y. C. (2001). Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborn pathogens. *Food Microbiol. Safety*, 66 (4), 580-583
15. Yuste J., Fung D. Y. C. (2003). Evaluation of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. *Food Microbiol.*, 20, 365-370
16. Yuste J., Capellas M., Fung D. Y. C., Mor-Mur M. (2004). Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Res. Int.*, 37, 861-866
17. Zhao W., Yang R., Shen X., Zhang S., Chen X. (2013). Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control*, 32, 6-12