

环境因子对大黄鱼腐败希瓦氏菌生长影响的计数法分析

郭全友¹ 修艳辉^{1,2} 姜朝军¹ 张淑平³ 宋炜¹ 田冬梅³

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;
3. 上海理工大学理学院, 上海 200093)

摘要: 以分离于腐败大黄鱼中的腐败希瓦氏菌为对象, 采用平板计数法和浊度法分析不同 pH 值、NaCl 浓度和温度下的生长情况, 运用修正的 Gompertz 方程拟合生长曲线, 用决定系数、准确度、精确度、残差平方和及平方根误差评价拟合优度, 比较分析 2 种计数法下环境因子对生长界限和动力学参数的影响。结果表明, 在 3 ~ 8℃, pH 值 6.0 及 NaCl 质量分数 3.5% 时不生长; 2 种计数法下生长动力学参数最大比生长速率 (μ_{\max}) 和代时差异不显著 ($p > 0.05$), 而迟滞期 (λ) 和最大细胞密度差异显著 ($p < 0.05$); 环境因子对生长动力学参数有显著影响, 温度和 NaCl 浓度对代时影响较大, 温度越高或 NaCl 浓度越低, 代时越短; 在 3 ~ 25℃, 温度越高, μ_{\max} 越大, 增速为 $(0.0143 \pm 0.0032) \text{ h}^{-1}/\text{℃}$, 温度越高, λ 越小, 平板计数法下其减速约 $1.5 \text{ h}/\text{℃}$, 而在 8 ~ 15℃, 浊度法下 λ 减速约 $2.5 \text{ h}/\text{℃}$; 平板计数法下 μ_{\max} 的变化受 NaCl 浓度及 pH 值影响较大, λ 变化无明显规律, 而浊度法下 μ_{\max} 的变化受 NaCl 浓度和 pH 值影响不明显, λ 变化较明显。因此 2 种计数法均可对腐败希瓦氏菌生长/非生长作出有效判断, 环境因子强度较大时浊度法相比平板计数法迟滞期与最大细胞密度误差较大。

关键词: 大黄鱼; 腐败希瓦氏菌; 平板计数法; 浊度法; 环境因子; 生长动力学参数

中图分类号: TS254.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)08-0250-08

Effect of Environmental Factors on Growth of *Shewanella putrefaciens* Based on Different Counting Methods

Guo Quanyou¹ Xiu Yanhui^{1,2} Jiang Chaojun¹ Zhang Shuping³ Song Wei¹ Tian Dongmei³

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

2. College of Food & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. College of Science, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The *Shewanella* separated from corruption large yellow croaker was used as research object. The growth data of *Shewanella putrefaciens* under different pH values, NaCl concentrations and temperatures was obtained by using viable count and optical density methods, and the Gompertz model was built. Effect of environmental factors on growth kinetic parameters was compared and analyzed. Results showed that *Shewanella putrefaciens* could not grow at pH value of 6.0 and NaCl concentration of 3.5% during 3 ~ 8℃. The differences of maximum specific growth rate (μ_{\max}) and generation time were not significant ($p > 0.05$), but the differences of lag phase (λ) and the most probable density (M) were significant ($p < 0.05$). Environmental factors had significant effect on the growth kinetic parameters. High temperature or low NaCl concentration resulted in short generation time. When temperature was 3 ~ 25℃, high temperature resulted in large μ_{\max} . The increase rate of μ_{\max} was $(0.0143 \pm 0.0032) \text{ h}^{-1}/\text{℃}$. When temperature was high, λ would be short. The λ was decreased at a rate of $1.5 \text{ h}/\text{℃}$ by using

收稿日期: 2016-03-24 修回日期: 2016-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371867)、上海市自然科学基金项目(16ZR1444900)、中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费项目(2014G02)、创新训练项目(201510252095)和南昌大学食品科学与技术国家重点实验室开放基金项目(SKLF-KF-201607)

作者简介: 郭全友(1974—),男,副研究员,主要从事水产品加工及贮藏研究,E-mail: dhsguoqy@163.com

viable count method, while during 8 ~ 15°C, it was decreased approximately at a speed of 2.5 h/°C by optical density method. The μ_{\max} was influenced significantly by NaCl concentration and pH value, while lag time showed no significant changes by viable count method. Using optical density method, changes of μ_{\max} were affected insignificantly by NaCl concentration and pH value, while changes of λ were apparent. Thus, both of the two counting methods could judge the growth/non-growth state of *Shewanella*, and the estimation errors of λ and M were increased by harsh environments when using optical density methods.

Key words: large yellow croaker; *Shewanella putrefaciens*; viable count method; optical density method; environmental factors; growth kinetic parameters

引言

大黄鱼体色金黄,肉质鲜美,营养丰富。20 世纪 80 年代末大黄鱼人工繁殖技术获得突破及网箱养殖技术的渐趋成熟,形成了筏式网箱、土池养殖,围网养殖、深水网箱等养殖模式,2014 年养殖产量为 12.8 万 t,是我国六大海产养殖品种之一^[1-2]。大黄鱼内销多以冰鲜流通为主,实际过程往往脱离冷链,造成极大的鲜度损失。虽然鱼体最初会受到多种微生物的污染,在内因子和外因子的影响下,微生物自身具有不同的耐受能力,同类型的产品中一种或几种微生物总是作为腐败菌出现,这些适合生存和繁殖并产生腐败臭味和异味代谢产物的菌群,即为优势腐败菌(Specific spoilage organism, SSO),每种水产品具有自身特有的 SSO 种类、腐败范围、腐败潜力和腐败能力^[3-5]。

随着对水产品 SSO 研究的深入,逐渐明确低温和室温贮藏大黄鱼 SSO 分别为腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)和气单胞菌(*Aeromonas* spp.)^[6],前者单位腐败菌产生挥发性盐基氮及三甲胺为 4.49×10^{-8} mg/CFU 和 1.74×10^{-8} mg/CFU^[7],表明其具有较强的腐败能力。判断水产品某种病原菌或腐败菌是否达到临界水平,是其安全性和货架期的重要判断指标之一^[8]。随着轻微加工和天然保藏法的需求增强,采用低盐、轻微热干燥和真空包装等轻微加工而成的轻腌大黄鱼,符合方便、即用、营养和安全的消费需求。同时改变了水产品 SSO 所处的生态学环境,降低其生长速率,延长迟滞期,防止其在产品流通、贮藏等过程中生长增殖而使产品达不到应有的货架期或引起对消费者的健康损害。

随着微生物学、数学、统计学和计算机技术的快速发展,微生物生长动力学的评估通过数学模型来描述和预测设定环境(包括可变条件)下生物增殖和衰减状况^[9]。微生物计数法和生长模型选择对动力学参数具有较大影响,微生物计数法主要有平板计数法(VC 法)、浊度法(OD 法)、最大概率法和浓缩法等,其中 VC 法和 OD 法较为常用,前者计数

准确,但费时耗力,后者具有快速和高通量等优点,但也具有一定局限性,如 MELLEFONT 等^[10]发现从最适到低水分活度下渗透压急剧变化导致鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的迟滞期降低,而用 VC 法和 OD 法进行比较验证,结果显示这仅是浊度法的一种假象。同时,生长模型选择和适用性要根据实际情况加以判断,如 Gompertz 模型虽然可以体现良好的拟合效果且易于使用^[11],但 LEBERT 等^[12]研究表明肉汤培养液中混合菌株的生长曲线未呈现 S 型,难以用 Gompertz 方程求出动力学参数。

本文通过对养殖大黄鱼低温贮藏下的 SSO(腐败希瓦氏菌)在不同环境因子下的生长动态进行研究,采用平板计数法和浊度法进行计数,用 Gompertz 方程拟合生长数据,比较评估 2 种计数法所建模型及动力学参数的差异性,并分析环境因子对腐败希瓦氏菌生长/非生长界限和生长动力学的影响,为大黄鱼品质保持和动态评估提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

冻干腐败希瓦氏菌,分离于腐败大黄鱼的经 16sRNA 鉴定的优势腐败菌^[6];胰酪胨大豆肉汤(TSB),上海中科昆虫生物技术开发有限公司;HCl 标准溶液(0.01 mol/L),深圳市博材达科技有限公司;营养肉汤(BR)、营养琼脂(AR)、氯化钠(AR),上海市国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

KYC-111 型空气恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司;UV9100D 型紫外分光光度计,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;pHS-3C 型 pH 计,上海雷磁仪器厂;SENSITITRE 型细菌鉴定仪配套比浊仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;MIR-153 型低温培养箱,日本三洋公司;SW-CJ-1FB 型洁净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;QT-2 型漩涡混合器,上海琪特分析仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液的制备

取冻干腐败希瓦氏菌于营养肉汤中活化,经两代划线复壮后,取适量菌株接种到 4 mL 去离子水中,用比浊仪调节菌体浓度至 10^8 CFU/mL,振荡后用生理盐水对其进行 10 倍系列稀释,至菌体浓度为 10^5 CFU/mL,再用不同组合的 pH 值(6.0、7.0)和 NaCl 溶液(0.5%、2.0% 和 3.5%)的 TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)稀释至 10^3 CFU/mL,分装到试管中(10 mL/管),分别置于摇床中培养(3℃、8℃、15℃ 和 25℃),培养时间 240 h。每间隔适当时间用分光光度计测定 OD 值,同时取 0.1 mL 平板涂布,25℃ 培养 48 h 计数,获得菌数。

1.3.2 平板计数法一级方程的构建

采用修正的 Gompertz 方程^[13]对腐败希瓦氏菌菌数进行拟合,公式为

$$\lg N_t = A_1 + C \exp(-\exp(2.718\mu_{\max}(\lambda - t)/C - 1)) \quad (1)$$

式中 t ——时间, h

N_t —— t 时的菌体浓度, CFU/mL

A_1 ——评估得到的最小菌数的对数值, lg CFU/mL

C ——评估得到的最大菌数与最小菌数之差的对数值, lg CFU/mL

μ_{\max} ——最大比生长速率, h^{-1}

λ ——迟滞期, h

根据修正的 Gompertz 方程可求出

$$M = A_1 + C \quad (2)$$

$$G = \lg 2/\mu_{\max} \quad (3)$$

式中 M ——最大细胞密度, lg CFU/mL

G ——代时, h

1.3.3 浊度法一级方程的构建

采用修正的 Gompertz 方程^[14]对腐败希瓦氏菌菌悬液 OD 值进行拟合,公式为

$$\ln B_t = A_2 + C \exp(-\exp(2.718\mu_{\max}(\lambda - t)/C - 1)) \quad (4)$$

式中 B_t —— t 时的吸光度

A_2 ——最小 OD 值的对数值

根据修正的 Gompertz 方程可求出

$$M = A_0 + C \quad (5)$$

式中 A_0 ——初始腐败希瓦氏菌菌数的对数值, lg CFU/mL

1.3.4 二级方程的构建

描述温度对 2 种计数方法下腐败希瓦氏菌的 μ_{\max} 、 G 影响的公式为^[13]

$$\sqrt{\mu_{\max}} = a(T - T_m) \quad (6)$$

$$G = a(T - T_{\min})^2 + G_{\min} \quad (7)$$

式中 a ——参数 T ——温度, °C

T_m ——微生物理论最低生长温度, °C

G_{\min} ——最小代时, h

T_{\min} —— G_{\min} 时的温度, °C

描述温度对 VC 法下、OD 法下腐败希瓦氏菌的迟滞期影响的公式为

$$\lambda = aT - b \quad (8)$$

$$\lambda = aT^2 + bT + c \quad (9)$$

式中 b 、 c ——参数

1.3.5 一级模型评价方法

采用决定系数(R^2)、准确度(A_f)、精确度(B_f)、平方根误差和残差平方和对腐败希瓦氏菌生长动力学模型的可靠性进行评价。 A_f 衡量预测值和观测值之间的差异, B_f 检查预测值波动的幅度^[15], 其值越接近 1, 效果越好。平方根误差和残差平方和越接近于 0, 回归效果越好^[6]。 R^2 越接近于 1, 模型的拟合越好。

1.4 数据处理与统计分析

使用软件 SPSS 19.0(美国 IBM 公司)对数据进行处理,采用最小平方差法,以修正的 Gompertz 方程进行回归分析,获得的生长动力学参数用独立样本 t 检验方法计算其显著差异性。采用软件 Origin 8.0(美国 OriginLab 公司)进行制图。

2 结果与分析

2.1 基于 2 种计数法的腐败希瓦氏菌生长/非生长判定及模型评价

图 1 为 2 种计数法下腐败希瓦氏菌的生长曲线。由图可见, pH 值 6.0 条件下, 3 ~ 8℃ 范围内, NaCl 质量分数为 3.5% 时, 168 h 内菌体浓度增量小于 1 lg CFU/mL, OD 值变量小于 0.03, 变化趋势与时间轴近似平行, 判断为非生长, pH 值 6.0 时其他环境条件下以及 pH 值 7.0 条件下, 3 ~ 25℃ 范围内, NaCl 质量分数 0.5% ~ 3.5% 时其皆表现为 S 型曲线, 判断为生长; 2 种计数法均可对腐败希瓦氏菌生长/非生长作出判断。对于微生物生长/非生长的判断, 也有研究者通过计算对照组和实验组的 OD 值差异性^[16-18], 或采用 VC 法和 OD 法相结合进行判断^[19]。

2 种计数法下腐败希瓦氏菌生长趋势为 S 型曲线, VC 法下其生长曲线初始阶段时呈现明显增长趋势, 迟滞期较短; OD 法下其生长曲线初始阶段变化不大, 与 VALERO 等^[19-20]的研究结果类似, 与 VC 法相比呈现出一定的滞后性, 可能是初始菌体浓度

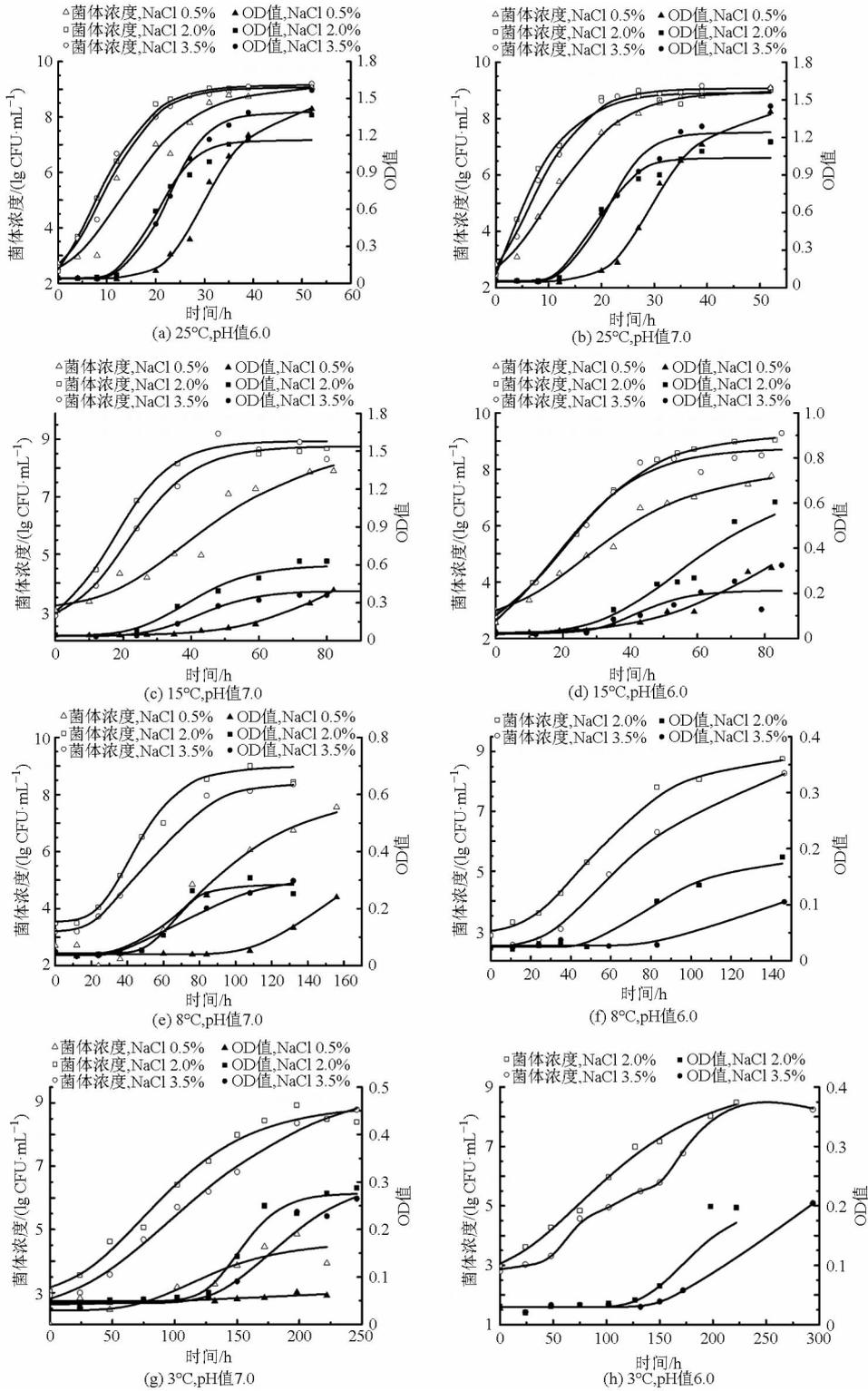


图 1 不同条件下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* under different conditions

太低,达不到仪器检测阈值。结果表明 Gompertz 方程能较好描述 VC 法和 OD 法下腐败希瓦氏菌生长曲线, R^2 分别为 0.964 ± 0.458 和 0.965 ± 0.489 , A_t 、 B_t 、平方根误差、残差平方和都在可接受范围(表 1),但差异显著($p < 0.05$)。

表 1 模型的评价指标

Tab. 1 Evaluation indexes of model

方法	A_t	B_t	残差平方和	平方根误差
VC 法	1.035 ± 0.036	1.001 ± 0.004	0.577 ± 0.661	0.201 ± 0.145
OD 法	1.086 ± 0.062	0.996 ± 0.012	0.015 ± 0.025	0.026 ± 0.027

2.2 2种计数法下生长动力学参数比较

2种计数法下不同环境因子对腐败希瓦氏菌生长动力学参数(M 、 G 、 μ_{\max} 和 λ)的影响,见图2~5。表2可见,即使在适温(15~25℃)范围内,2种计数法下的 M 差异显著($p < 0.05$)。图2所示,基于VC法的 M 在不同环境条件下多处于8.0~

9.0 lg CFU/mL之间,与榨菜中植物乳酸菌在不同环境条件下最终菌体密度无显著性差异($p > 0.05$)相似,菌值在7.0~8.5 lg CFU/mL范围内^[13],可能是培养营养条件和菌种的差异造成的;基于OD法的 M 在不同环境条件数值处于3.0~11.0 lg CFU/mL范围内。

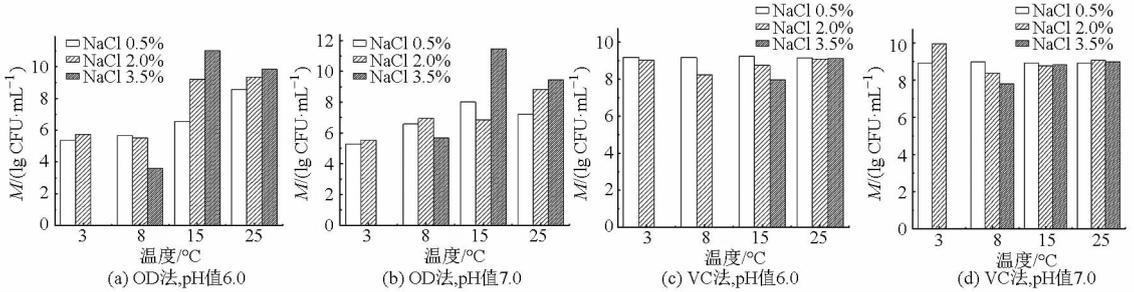


图2 基于OD法和VC所求的 M

Fig.2 Values of M based on OD and VC methods

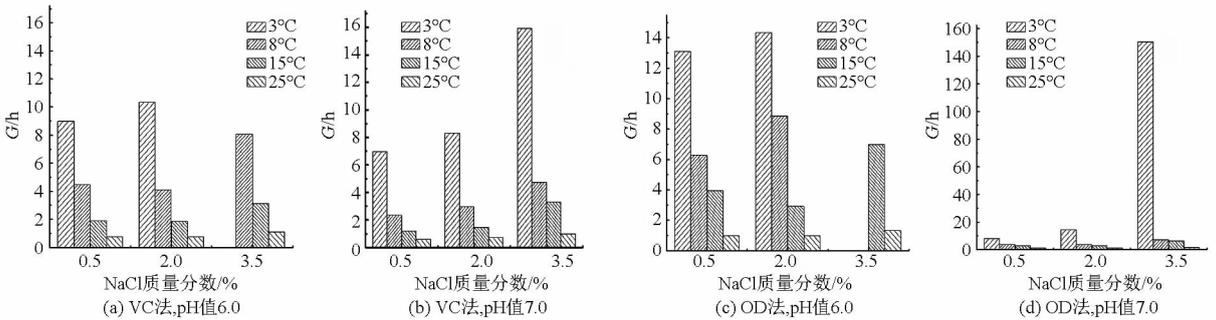


图3 基于OD法和VC法所求的 G

Fig.3 Values of G based on OD and VC methods

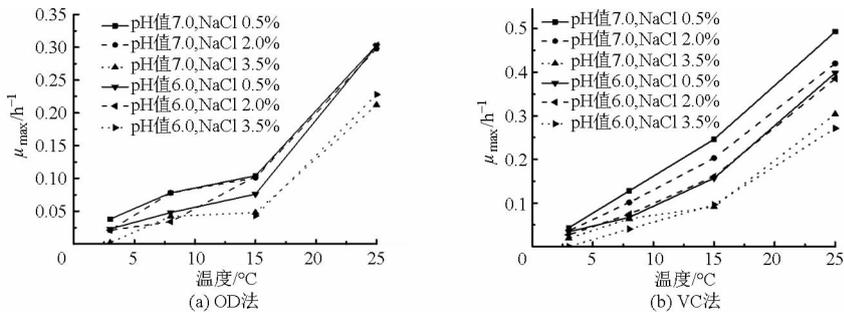


图4 基于OD法和VC法所求的 μ_{\max}

Fig.4 Values of μ_{\max} based on OD and VC methods

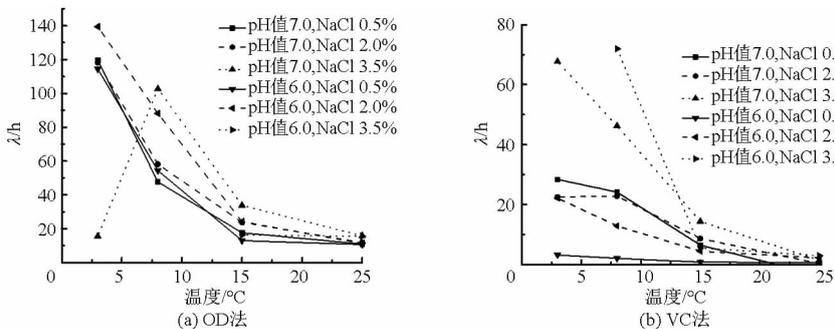


图5 基于OD法和VC法所求的 λ

Fig.5 Values of λ based on OD and VC methods

表 2 基于 OD 法和 VC 法拟合参数的显著差异性

Tab. 2 Significant difference of fitting parameters based on OD and VC methods

温度/°C	M	G	λ	μ_{\max}
3~25	$p=0.000$	$p=0.098$	$p=0.000$	$p=0.107$
8~25			$p=0.006$	
15~25	$p=0.002$		$p=0.284$	

2 种计数法下的 G 之间及 μ_{\max} 之间无显著差异 ($p > 0.05$), 但基于 OD 法的 G 整体略大于 VC 法, 而基于 OD 法的 μ_{\max} 整体略小于 VC 法。3~25°C 范围内, 2 种计数法下的 λ 差异显著 ($p < 0.05$), 而 15~25°C 范围内统计分析差异不显著 ($p > 0.05$)。图 5 可见, 3~25°C 范围内, 基于 VC 法的 λ 变化比较平稳, 但基于 OD 法的 λ 在低温时变化非常大。温度较高时, 2 种计数法得到的 λ 较为接近, 而温度较低时基于 OD 法的 λ 远大于 VC 法, 图 1 显示 VC 法求出的 λ 更为符合菌数增殖规律。

DALGAARD 等^[20] 利用 Gompertz、Logistic、Exponential 和 Richards 模型求出基于 OD 法的 μ 与用 Logistic 模型求出的基于 VC 法的 μ 对比发现, 基于 VC 法与 OD 法的 μ 比值分别为 1.3 ± 0.7 、 2.9 ± 2.2 、 3.2 ± 2.2 和 1.1 ± 0.3 , 文中用 Gompertz 求出的相应值为 1.6 ± 0.4 , 优于 Logistic 和 Exponential 模型, 而略差于 Richards 模型。本文所求基于 OD 法的 μ 略低于 VC 法, 而 λ 高于 VC 法, 与 AUGUSTIN 等^[14] 研究显示 OD 法下求出的动力学参数一般比 VC 法下求出的参数值偏低略有差异, 可能是由模型

不同或参数计算方法的差异造成的。

2.3 不同环境因子对生长动力学参数的影响

2.3.1 温度和 NaCl 对代时的影响

微生物代时变化较大, 常为 1 h 左右。由于培养基成分和物理条件不同, 同一种菌株对数期的代时也不相同, 主要影响因素为菌株种类和培养温度等。表 3 为温度对代时影响的二项式模型, 可知, VC 法中 T_{\min} 在 20°C 左右, 最小 G 值约为 0.2 h; OD 法中 T_{\min} 在 21°C 左右, G_{\min} 变化较大。VC 法中, R^2 均值为 0.952 ± 0.031 , OD 法中, R^2 均值为 0.928 ± 0.060 。拟合得到的模型均能较好描述两者间的关系, 基于 VC 法的模型拟合效果优于 OD 法, 且基于 OD 法拟合的 G_{\min} 具有一定的不确定性。结合图 3, 可看出温度对代时影响很大, 从 3°C 到 25°C, G 大多降低十几倍, 如 VC 法中, pH 值 6.0 和 NaCl 质量分数 0.5% 条件下, 3°C 时 G 为 8.977 h, 25°C 时 G 降低为 0.756 h。

从图 3 可看出 NaCl 对 G 也有较大影响, 25°C、NaCl 质量分数从 0.5% 到 3.5% 时, G 约增至 1.3~1.6 倍, 如在 VC 和 OD 法中, pH 值 7.0、NaCl 质量分数 0.5% 时, G 分别为 0.610 h 和 0.993 h, NaCl 质量分数 3.5% 时, G 分别为 0.991 h 和 1.420 h; 8°C 和 15°C 时, G 约增至 1.8~2.3 倍, 在 VC 和 OD 法中, pH 值 6.0、NaCl 质量分数 0.5% 时, G 分别为 4.462 h 和 6.271 h, NaCl 质量分数 3.5% 时, G 分别为 8.078 h 和 7.001 h。

表 3 温度对腐败希瓦氏菌代时的影响

Tab. 3 Effect of temperature on G of *Shewanella putrefaciens*

pH 值	NaCl 质量分数/ %	VC 法		OD 法	
		公式	R^2	公式	R^2
7.0	0.5	$G=0.05(T-19.996)^2+0.154$	0.907	$G=0.015(T-23.665)^2+1.153$	0.942
	2.0	$G=0.027(T-19.847)^2+0.147$	0.953	$G=0.047(T-19.667)^2+0.093$	0.888
	3.5	$G=0.023(T-19.636)^2+0.081$	0.944	$G=0.709(T-18.047)^2-26.882$	0.847
6.0	0.5	$G=0.024(T-21.567)^2+0.548$	0.990	$G=0.033(T-23.280)^2+0.850$	0.999
	2.0	$G=0.032(T-20.307)^2+0.238$	0.967	$G=0.028(T-23.304)^2-1.129$	0.962

2.3.2 温度对生长动力学参数的影响

表 4 和表 5 分别为 2 种计数法下温度与 μ_{\max} 和温度与 λ 的关系, 可见, 在 3~25°C 范围内, VC 法和 OD 法下温度与 μ_{\max} 之间均呈现良好线性关系, R^2 分别为 0.958 ± 0.016 和 0.897 ± 0.010 。温度与基于 VC 法的 λ 之间呈良好线性关系, R^2 均值为 0.874 ± 0.091 , 李柏林等^[21] 研究显示 Gompertz 方程的曲线形式比较固定, λ 常被计算为负数, 本文拟合结果出现相似情况, 因此不能用 Belehradec 方程进行拟合; 温度与基于 OD 法的 λ 之间采用二项式方程拟合, R^2 为

0.991 ± 0.009 。上述拟合效果均在可接受范围内。

温度是影响微生物生长的主要原因之一, 不同微生物对温度要求及范围不同, 比如希瓦氏菌生长范围为 1~40°C^[22], 而假单胞菌可在 4~43°C 生长^[23], 在生长范围内不同微生物及不同环境下, 微生物对温度敏感性也不同。灭菌鲟鱼片中 0~25°C 内假单胞菌 μ_{\max} 与温度间直线斜率为 0.0171 ^[24], 而在 TSB 培养基中 0~10°C 内的直线斜率为 0.2166 ^[25], 文中 3~25°C 内直线斜率为 0.0194 ± 0.0023 。在 3~25°C, 温度越高, μ_{\max} 越大, 增速为

(0.0143 ± 0.0032) h^{-1}/C 。3 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 温度越高, 迟滞期越短, 基于 VC 法的 λ 降速约 $1.5 \text{ h}/\text{C}$; 8 ~ 15 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 基于 OD 法的 λ 降速约 $2.5 \text{ h}/\text{C}$,

而在 3 $^{\circ}\text{C}$ 基于 OD 法的 λ 骤增至 120 h 左右。也有研究表明不同初始接菌量对微生物迟滞期影响较明显, 但最大生长速率受其影响不明显^[26]。

表 4 不同 pH 值和 NaCl 质量分数下温度与 μ_{\max} 的关系

Tab. 4 Relationships between temperature and μ_{\max} under different pH values and NaCl concentrations

pH 值	NaCl 质量分数/ %	VC 法		OD 法	
		公式	R^2	公式	R^2
7.0	0.5	$\mu_{\max} = 0.022(T + 7.303)$	0.993	$\mu_{\max} = 0.016(T + 8.901)$	0.951
	2.0	$\mu_{\max} = 0.021(T + 6.930)$	0.997	$\mu_{\max} = 0.017(T + 6.092)$	0.956
	3.5	$\mu_{\max} = 0.018(T + 4.604)$	0.960	$\mu_{\max} = 0.017(T + 0.663)$	0.928
6.0	0.5	$\mu_{\max} = 0.021(T + 5.179)$	0.993	$\mu_{\max} = 0.018(T + 4.124)$	0.936
	2.0	$\mu_{\max} = 0.021(T + 4.973)$	0.999	$\mu_{\max} = 0.019(T + 3.066)$	0.976

表 5 不同 pH 值和 NaCl 质量分数下 λ 与温度的关系

Tab. 5 Relationships between λ and temperature under different pH values and NaCl concentrations

pH 值	NaCl 质量分数/%	VC 法		OD 法	
		公式	R^2	公式	R^2
7.0	0.5	$\lambda = -1.546T + 33.55$	0.961	$\lambda = 0.405T^2 - 15.996T + 159.57$	0.978
	2.0	$\lambda = -1.117T + 27.82$	0.931	$\lambda = 0.332T^2 - 13.981T + 154.62$	0.991
	3.5	$\lambda = -3.041T + 71.22$	0.928		
6.0	0.5	$\lambda = -0.121T + 3.19$	0.861	$\lambda = 0.387T^2 - 15.472T + 156.14$	0.998
	2.0	$\lambda = -0.880T + 21.65$	0.857	$\lambda = 0.350T^2 - 15.777T + 186.26$	0.995

2.3.3 NaCl 质量分数和 pH 值对生长动力学参数的影响

图 6 为不同 NaCl 条件下 μ_{\max} 和 λ 的变化情况, 可见, VC 法拟合的 $\Delta\mu_{\max}$ (Δ 表示差值) 在 NaCl 质量分数及 pH 值影响下, 相同 pH 值时, NaCl 质量分数越高, $\Delta\mu_{\max}$ 越小, 如 3 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 内, pH 值 7.0, NaCl 质量分数 0.5% 时, $\Delta\mu_{\max}$ 为 0.450 h^{-1} , NaCl 质量分数 3.5% 时, $\Delta\mu_{\max}$ 为 0.285 h^{-1} 。相同 NaCl 质量分数时, pH 值 7.0 时的 $\Delta\mu_{\max}$ 小于 pH 值 6.0 时的 $\Delta\mu_{\max}$ 。但

VC 法拟合的 λ 则没有明显的规律。图 6 中 OD 法拟合的 $\Delta\mu_{\max}$ 主要受温度影响, NaCl 和 pH 值无显著影响, $\Delta\mu_{\max}$ 在 $0.2 \sim 0.3 \text{ h}^{-1}$ 之间, NaCl 和 pH 值对 λ 有较显著影响, 相同 pH 值下, NaCl 质量分数越高, $\Delta\lambda$ 越小, 如 8 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, pH 值 7.0 下, NaCl 质量分数 0.5% 时, $\Delta\lambda$ 为 36.725 h, NaCl 质量分数 2.0% 时, $\Delta\lambda$ 为 46.366 h。相同 NaCl 质量分数下, pH 值 7.0 时的 $\Delta\lambda$ 小于 pH 值 6.0。

不同微生物对 NaCl 的耐受性不同, LEROI

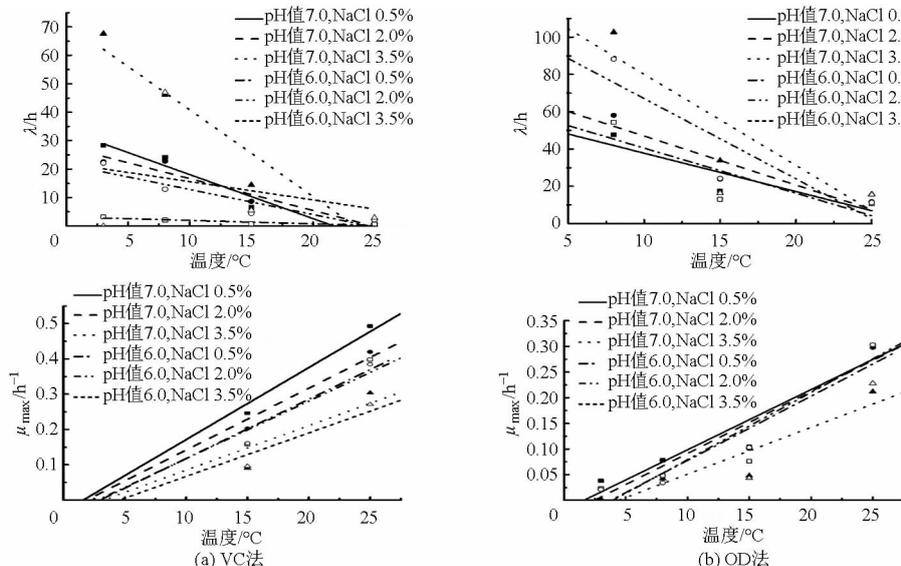


图 6 不同 NaCl 质量分数下 μ_{\max} 和 λ 的变化情况

Fig. 6 Changes of μ_{\max} and λ under different NaCl concentrations

等^[27]以 *B. thermosphacta* 和 *L. piscium* 为研究对象,发现 *B. thermosphacta* 最大耐受盐浓度是 *L. piscium* 的3倍,此外在介质为固体中比在液体培养基的耐盐性更强,在不同温度、pH 值及 NaCl 质量分数下求出2种菌的 μ_{\max} ,发现 NaCl 对其影响较大,也有研究表明 NaCl 会降低生长速率和温度之间的相关性^[28]。

3 结束语

基于 VC 法和 OD 法测得的腐败希瓦氏菌生长

曲线可以用 Gompertz 方程进行拟合,均可对腐败希瓦氏菌的生长与非生长作出判断;2种计数法下生长动力学参数 G 和 μ_{\max} 差异不显著($p > 0.05$),而 M 和 λ 差异显著($p < 0.05$);环境因子对生长动力学参数有显著影响,温度越高或 NaCl 质量分数越低,代时越短;在 $3 \sim 25^{\circ}\text{C}$,温度越高, μ_{\max} 越大,温度越高, λ 越小;平板计数法下 μ_{\max} 的变化受 NaCl 及 pH 值影响较大, λ 变化无明显规律,而浊度法下 μ_{\max} 的变化受 NaCl 和 pH 值影响不明显, λ 变化较明显。

参 考 文 献

- 1 杨华,刘丽君,张慧恩. 大黄鱼加工和综合利用现状及展望[J]. 科学养鱼,2014(4):75-77.
- 2 赵兴武,崔利锋,刘新中,等. 中国渔业年鉴[M]. 1版. 北京:中国农业出版社,2015.
- 3 MIKŠ-KRAJNİK M, YOON Y J, UKUKU D O, et al. Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives[J]. Food Microbiology, 2016, 53(B):182-191.
- 4 DALGAARD P, BUCH P, SILBERG S. Seafood spoilage predictor: development and distribution of a product specific application software[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2-3):343-349.
- 5 DABADÉ D S, BESTEN H M W D, AZOKPOTA P, et al. Spoilage evaluation, shelf-life prediction, and potential spoilage organisms of tropical brackish water shrimp (*Penaeus notialis*) at different storage temperatures[J]. Food Microbiology, 2015, 48: 8-16.
- 6 郭全友,王锡昌,杨宪时,等. 不同贮藏温度下养殖大黄鱼货架期预测模型的构建[J]. 农业工程学报,2012,28(10):267-272. GUO Quanyou, WANG Xichang, YANG Xianshi, et al. Predictive model construction of shelf life for cultured *Pseudosciaena crocea* stored at different temperatures[J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(10): 267-272. (in Chinese)
- 7 许振伟,许钟,杨宪时,等. 鱼类腐败菌腐败能力测定方法的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 355-359. XU Zhenwei, XU Zhong, YANG Xianshi. Comparative evaluation of two methods for determining spoilage ability of fish spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens*[J]. Food Science, 2010, 31(20): 355-359. (in Chinese)
- 8 DALGAARD P, ROSS T, KAMPERMAN L, et al. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data [J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23(3-4):391-404.
- 9 ROBIN C, MCKELLAR, LU Xuewen. Modeling microbial responses in food[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
- 10 MELLEFONT L A, MCMEEKIN T A, ROSS T. Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella typhimurium* M48 subjected to abrupt osmotic shifts [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3):399-410.
- 11 陈晓宇,朱志强,张小栓,等. 食品货架期预测研究进展与趋势[J]. 农业机械学报,2015,46(8):192-199. CHEN Xiaoyu, ZHU Zhiqiang, ZHANG Xiaoshuan, et al. Research progress and trend of food shelf life prediction [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(8):192-199. (in Chinese)
- 12 LEBERT I, BEGOT C, LEBERT A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8~7.0), water activity (0.97~1.00) and temperature (7~25°C) [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39(1-2):53-60.
- 13 翁佩芳,雷兰兰,吴祖芳. 榨菜腌制特征性微生物植物乳杆菌生长预测模型的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(10):67-75. WENG Peifang, LEI Lanlan, WU Zufang. Growth prediction models of characteristic microbe *Lactobacillus plantarum* in pickled vegetables [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(10):67-75. (in Chinese)
- 14 AUGUSTIN J C, ROSSO L, CARLIER V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 38(1): 137-146.
- 15 戴志远,翁丽萍. 气调保鲜养殖大黄鱼特定腐败菌动态变化初步研究[J]. 中国食品学报,2010,10(1):122-126. DAI Zhiyuan, WENG Liping. The preliminary study on microbial growth kinetics change of specific spoilage organisms for cultured large yellow croaker under modified atmosphere packaging [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(1):122-126. (in Chinese)
- 16 DANG T D T, MERTENS L, VERMEULEN A, et al. Modelling the growth/no growth boundary of *Zygosaccharomyces bailii* in acidic conditions: a contribution to the alternative method to preserve foods without using chemical preservatives [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(1):1-12.
- 17 VERMEULEN A, DEVLIEGHERE F, BERNAERTS K, et al. Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(3):258-269.

- 17 李登辉,李智. 基于测量信息论的小样本粗大误差处理研究[J]. 机械工程与自动化, 2009(6):115-117.
LI Denghui, LI Zhi. Processing of gross error in small samples based on measurement information theory [J]. Mechanical Engineering & Automation, 2009(6):115-117. (in Chinese)
- 18 刘振宇,周思杭. 基于多准则修正的产品性能多参数关联分析与预测方法[J]. 机械工程学报, 2013, 49(15):105-114.
LIU Zhenyu, ZHOU Sihang. Multiple parameters correlation analysis and prediction method of product performance based on multi-criteria modification [J]. Journal of Mechanical Engineering, 2013, 49(15):105-114. (in Chinese)
- 19 厉英,王正. BP神经网络漏钢预测系统优化[J]. 控制与决策, 2010, 25(3):453-456.
LI Ying, WANG Zheng. Optimization for breakout prediction system of BP neural network [J]. Control and Decision, 2010, 25(3):453-456. (in Chinese)
- 20 潘宇雄,任章,李清东. 动态贝叶斯最小二乘支持向量[J]. 控制与决策, 2014(12):2297-2300.
PAN Yuxiong, REN Zhang, LI Qingdong. Dynamic Bayesian least squares support vector machine [J]. Control and Decision, 2014(12):2297-2300. (in Chinese)
- 21 孟银凤,梁吉业. 基于最小二乘支持向量机的函数型数据回归分析[J]. 模式识别与人工智能, 2014, 27(12):1124-1130.
MENG Yinfeng, LIANG Jiye. Regression analysis for functional data based on least squares support vector machine [J]. Pattern Recognition and Artificial Intelligence, 2014, 27(12):1124-1130. (in Chinese)
- 22 郭振凯,宋青召,毛剑琴. 一种改进的在线最小二乘支持向量机回归算法[J]. 控制与决策, 2009, 24(1):145-148.
GUO Zhenkai, SONG Zhaoqing, MAO Jianqin. An improved online least squares support vector machines regression algorithm [J]. Control and Decision, 2009, 24(1):145-148. (in Chinese)
- 23 朱庆生,曾令秋,屈洪春,等. 基于粒子群算法的B样条曲线拟合[J]. 计算机科学, 2009, 36(10):289-291.
ZHU Qingsheng, ZENG Lingqiu, QU Hongchun, et al. Curve fitting of B-spline based on particle swarm optimization [J]. Computer Science, 2009, 36(10):289-291. (in Chinese)
- 24 闫秋艳,夏士雄. 一种无限长时间序列的分段线性拟合算法[J]. 电子学报, 2010, 38(2):443-448
YAN Qiuyan, XIA Shixiong. An piecewise linear fitting algorithm for infinite time series [J]. Acta Electronica Sinica, 2010, 38(2):443-448. (in Chinese)

(上接第 257 页)

- 18 VERMEULEN A, DANG T D T, GEERAERD A H, et al. Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and a_w on the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(1):79-90.
- 19 VALERO A, RODRÍGUEZ M, CARRASCO E, et al. Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements [J]. Food Microbiology, 2010, 27(6):819-828.
- 20 DALGAARD P, KOUTSOUMANIS K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 43(3):183-196.
- 21 李柏林,郭剑飞,欧杰. 预测微生物学数学建模的方法构建[J]. 食品科学, 2004, 25(11):52-57.
LI Bolin, GUO Jianfei, OU Jie. Research approach of microbial modeling on predictive microbiology [J]. Food Science, 2004, 25(11):52-57. (in Chinese)
- 22 邓旗,孙力军,王雅玲,等. 环境条件对腐败希瓦氏菌生物被膜形成能力的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10):43-50.
DENG Qi, SUN Lijun, WANG Yaling, et al. The effect of different environmental conditions on the ability of *Shewanella putrefaciens* biofilm formation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10):43-50. (in Chinese)
- 23 杨光富,魏云林. 假单胞菌研究现状及应用前景[J]. 生物技术通报, 2011(1):37-39, 49.
YANG Guangfu, WEI Yunlin. The research status and application prospect of *Pseudomonas* [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(1):37-39, 49. (in Chinese)
- 24 章志超,桂萌,彭朝辉,等. 鲟鱼中荧光假单胞菌生长预测模型构建及货架期预测[J]. 食品科学, 2014, 35(10):278-283.
ZHANG Zhichao, GUI Meng, PENG Chaohui, et al. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth and shelf life prediction of sturgeon [J]. Food Science, 2014, 35(10):278-283. (in Chinese)
- 25 FU Peng, LI Pinglan, ZHOU Kang, et al. Development of models to predict the growth of *Pseudomonas* isolated from chilling pork [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(4):229-234.
- 26 董庆利,王忻,苏亮,等. 基于不同初始接种量的铜绿假单胞菌生长模型[J]. 农业机械学报, 2015, 46(12):246-252.
DONG Qingli, WANG Xin, SU Liang, et al. Modeling on growth of *Pseudomonas aeruginosa* with different inoculum sizes [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(12):246-252. (in Chinese)
- 27 LEROI F, FALL P A, PILET M F, et al. Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I - 4031 [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2):222-228.
- 28 KRIST K A, ROSS T, MCMEEKIN T A. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 43(3):195-203.