pH、水分活度和 NaCl 对腐败希瓦氏菌生长/非生长界限及生长动力学参数的影响

修艳辉[1,2]，郭全友[1]，姜朝军[1]

（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）

摘要：以有氧贮藏养殖大黄鱼的特定腐败菌腐败希瓦氏菌为研究对象，通过 pH、Aw、NaCl 和温度调控其生长/非生长状况，并分析其对生长动力学参数的影响，为有效抑制特定腐败菌增殖，延长产品货架期提供支持。将腐败希瓦氏菌接种于 TSB 中培养，测定不同调控因子下 OD 动态数据，确定生长/非生长界限，在生长范围内用修正的 Gompertz 方程进行拟合，对模型的拟合优度及调控因子对动力学参数的影响进行研究。实验表明，15 ℃时，pH≤5.0 或 Aw≤0.930 或 NaCl≥7%时，腐败希瓦氏菌不生长；25 ℃时，pH≤5.0 或 Aw≤0.920 或 NaCl≥12%时，腐败希瓦氏菌不生长；37 ℃时，腐败希瓦氏菌均不生长。腐败希瓦氏菌生长模型拟合显示，不同 pH、Aw 和 NaCl 对其最大比生长速率和迟滞期有较大影响，模型的 R^2、偏差度和准确度接均接近 1,均方根误差接近 0，表明模型能较好地拟合不同条件下的腐败希瓦氏菌的生长。

关键词：腐败希瓦氏菌；生长/非生长界限；迟滞期；最大比生长速率

文章篇号：1673-9078(2016)6-156-162 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.025

Effect of pH, Water Activity, and Common Salt on the Growth/No Growth Boundary and Growth Kinetic Parameters of *Shewanella putrefaciens*

XIU Yan-hui[1,2], GUO Quan-you[1], JIANG Chao-jun[1]

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

(2.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Isolates of the spoilage organism *Shewanella putrefaciens* from farmed *Pseudosciaena crocea* stored in aerobic conditions were studied. The growth of *S. putrefaciens* was regulated by pH, water activity (Aw), sodium chloride (salt), and temperature, and the effect of regulatory factors on the growth kinetic parameters was analyzed. This study can aid in effectively inhibiting spoilage and bacterial growth to extend the shelf life of products. *S. putrefaciens* was inoculated in tryptic soy broth (TSB), and real-time optical density (OD) data were measured in different environmental conditions to determine the growth/no growth boundary. The OD data were fitted to a modified Gompertz equation in the growth range, and the goodness of fit of the model and the effect of regulatory factors on kinetic parameters were studied. The experimental results showed that at 15 ℃, *S. putrefaciens* could not grow at pH ≤ 5.0, Aw ≤ 0.930, or salt ≥ 7%. At 25 ℃, *S. putrefaciens* could not grow at pH ≤ 5.0, Aw ≤ 0.920, or salt ≥ 12%. At 37 ℃, *S. putrefaciens* could not grow. The goodness of fit of the growth model for *S. putrefaciens* showed that pH, Aw, and salt had a considerable effect on the maximum specific growth rate and lag phase of *S. putrefaciens*. The R^2, bias, and accuracy values of the model were all near 1, and root mean square error (RMSE) was close to 0, indicating that the model is a good fit for the growth of *S. putrefaciens* in different conditions.

Key words: *Shewanella putrefaciens*; the growth/no growth boundary; lag phase; maximum specific growth rate

大黄鱼（*Pseudosciaena crocea*），又名大黄花鱼，肉质鲜嫩，营养价值高，是四大传统海产经济鱼类。新鲜大黄鱼肌肉中水分及蛋白质含量高，比一般动物肉组织更容易腐败，而微生物活动是引起变质的主要原因。研究表明[1,2]在低温有氧贮藏条件下，养殖大黄鱼的特定腐败菌为腐败希瓦氏菌（*Shewanella putrefaciens*）。腐败希瓦氏菌属于革兰氏阴性好氧杆菌，能够产生 H_2S、TMA 及氨基酸代谢产物等[3]，将其接种于无菌鱼块中，腐败代谢产物（TVBN 和 TMA）

收稿日期：2015-06-19

基金项目：国家自然科学基金项目（31371867）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金（2011M04, 2014G02）

作者简介：修艳辉（1990-），女，硕士研究生，研究方向：水产品加工与安全保障

通讯作者：郭全友（1974-），男，博士，副研究员，研究方向：水产品加工与安全保障

的产量因子分别为 1.38×10^{-10} mg-N TVBN/CFU 和 1.31×10^{-10} mg-N TMA/CFU[2]，表明腐败希瓦氏菌具有很强的腐败能力，因此抑制以及预测腐败希瓦氏菌的生长对于评估水产品安全具有重要意义。

养殖大黄鱼常采用低盐、轻微干燥、弱酸和真空包装等轻微化加工手段，能较好保持产品原有营养、质地和风味，符合人们消费需求，但也更容易腐败，因此基于产品原有特征、成分及特定腐败菌种类[4]，采用 Aw、pH、盐分、贮藏温度等栅栏因子改变其特定腐败菌的环境条件，打破微生物内平衡，使其得以抑制甚至死亡。通过构建生长模型预测腐败希瓦氏菌的生长状况，为大黄鱼加工中确定危害关键控制点以及品质与安全进行有效评估评估提供支撑。

目前微生物生长动力学模型的构建及参数获取多为平板计数法，此法准确度高，但是费时费力，吸光度法具有检测速度快和高通量等优势，日益受到关注[5]。汪玲玲等基于 OD-TTD 值法构建金黄色葡萄球菌生长模型，但所求迟滞期具有不确定性[6]。本文以冷藏有氧贮藏养殖大黄鱼中分离的特定腐败菌（腐败希瓦氏菌）为对象，研究温度、pH、NaCl 和 Aw 对腐败希瓦氏菌生长/非生长的影响，采用 OD 值测量法，用 Gompertz 模型对数据进行拟合，确定腐败希瓦氏的生长/非生长界限，分析调控因子和强度对最大比生长速率（μ_{max}）和迟滞期（λ）的影响，为有效抑制腐败希瓦氏菌的生长，延长大黄鱼货架期提供支持。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

HCl 标准溶液：0.01 mol/L，深圳市博材达科技有限公司；营养琼脂（AR）、甘油、营养肉汤（BR）、氯化钠（AR）：上海市国药集团化学试剂有限公司；胰酪胨大豆肉汤（TSB）（pH 7.1~7.5，0.5% NaCl）：上海中科昆虫生物技术开发有限公司。

pH 计：pHS-3C，上海雷磁仪器厂；水分活度仪：AW LAB-Touch PMB35，大昌华嘉商业（中国）有限公司；微生物生长测定仪：Bioscreen C，芬兰；洁净工作台：SW-CJ-1FB,上海博讯实业有限公司医疗设备厂；低温培养箱：MIR-153，日本三洋公司；漩涡混合器：QT-2,上海琪特分析仪器有限公司。

1.2 菌种来源与菌悬液制备

1.2.1 菌种来源

从冷藏大黄鱼货架期终点时分离纯化出优势菌株，经过 16S rRNA 测序鉴定为腐败希瓦氏菌，冻干后置于 4 ℃存储，待用。

1.2.2 菌悬液制备

菌株活化：取冻干腐败希瓦氏菌接种于无菌营养肉汤中，震荡 30 s，25 ℃培养 24 h，划线得到单菌落。

种子液制备：取单菌株接种到 50 mL 的 TSB 中，震荡 30 s，取 250 μL 菌液接种于无菌生长板中的十个孔内（A_1~A_{10}），置于 Bioscreen C 中，25 ℃培养条件下，持续震荡 1 h，静置 15 s 后，测定 A_1 和 A_2 的 $OD_{600\ nm}$ 值，培养周期 40 h。依次从 A_3~A_{10} 中每隔 3 h 取其中 1 孔菌液 0.1 mL 进行涂布，25 ℃培养 48 h 计数，获得腐败希瓦氏菌到达稳定期时的菌数和 OD 值，确定达到稳定期的培养条件，从而制备种子液。

菌液稀释：种子液用无菌生理盐水做 10 倍稀释，获得菌数为 10^3~10^4 CFU/mL 的菌悬液。

1.3 实验方法

1.3.1 pH 对腐败希瓦氏菌生长的影响

取 10^3~10^4 CFU/mL 的菌悬液 1 mL，接种到 121 ℃灭菌后的 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.5、7.0、7.5、8.0（标准 HCl 调节）的装有 9 mL TSB 试管中，分别取 200 μL 置于 Bioscreen C 中，15 ℃下培养，每个 pH 两组平行，每隔 0.5 h 测定 $OD_{600\ nm}$。同上，调节 pH（4.0、4.5、5.0、5.5、6.5、7.0、7.5、7.7），于 25 ℃下培养；调节 pH（4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5）于 37 ℃下培养。

1.3.2 Aw 对腐败希瓦氏菌生长的影响

取 10^3~10^4 CFU/mL 的菌悬液 1 mL，接种到 121 ℃灭菌后的 Aw 为 0.900~0.960，梯度为 0.010（甘油调节）的装有 9 mL TSB 试管中，分别取 200 μL 置于生长板中，于 Bioscreen C 中 15 ℃下培养，每个 pH 两组平行，每隔 0.5 h 测定 OD_{600nm}。同上，调节 Aw（0.900~0.930，0.950~0.990，梯度为 0.010）和 Aw（0.900~0.990，梯度为 0.010）分别于 25 ℃和 37 ℃培养。

1.3.3 NaCl 对腐败希瓦氏菌生长的影响

取 10^3~10^4 CFU/mL 的菌悬液 1 mL，接种到 121 ℃灭菌后的 NaCl 浓度为 1%~9%、11%~15%，梯度为 1% （NaCl 调节）的装有 9 mL TSB 试管中，分别取 200 μL 置于生长板中，于 Bioscreen C 中 15 ℃、25 ℃和 37 ℃下培养，每个 pH 两组平行，每隔 0.5 h 测定 $OD_{600\ nm}$。

1.4 腐败希瓦氏菌一级生长动力学模型

选择修正的 Gompertz 方程[7]对实验数据进行拟合。方程如下：

$$\mathrm{Ln}(OD_T / OD_{\min}) = A \times EXP\left\{-EXP\left[\frac{\mu_{\max} \times 2.718 \times (\lambda - T)}{A}\right] + 1\right\}$$

其中：T 为时间（h），OD_T 为 T 时的吸光度值，OD_{min} 为最小 OD 值，A 为菌数增长的对数值，μ_{max} 为最大比生长速率（h^{-1}），λ 为迟滞期（h）。

1.5 一级生长动力学模型的评价

采用决定系数（R^2）、准确度（A_f）、偏差度（B_f）和均方根误差（RMS）等对模型拟合优度进行评价。研究认为 R^2、A_f 和 B_f 值越接近于 1，RMS 越接近于 0，预测效果越好[8]。评价方程如下，其中 X_{cal} 和 X_{obs} 分别为预测值和实测值。

$$A_f = 10^{\frac{\sum\left|\lg(X_{cal}/X_{obs})\right|}{n}}$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum\lg(X_{cal}/X_{obs})}{n}}$$

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum(X_{cal} - X_{obs})^2}{n}}$$

1.6 数据处理

用软件 Origin 8.0 和 SPSS19.0 对实验数据进行处理。绘制腐败希瓦氏菌生长曲线时仅显示以 5 h 为间隔的点。

2 结果与讨论

2.1 种子液制备条件的确定

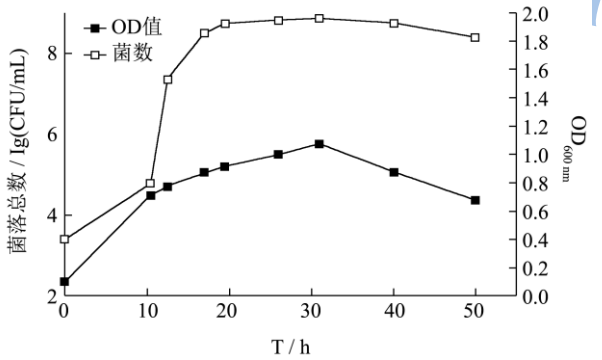


图 1 25 ℃时种子液菌数及 OD 值变化

Fig.1 Changes in the bacterial count and OD value of seed fluid at 25 ℃

从 A_3-A_{10} 孔中取菌液涂布计数后的菌落总数和 OD 值变化如图 1 所示，由图 1 可见腐败希瓦氏菌没有迟滞期，在 0~10 h 内，菌落总数缓慢增加，在 10 h~18 h 内迅速增加，约 18 h 后腐败希瓦氏菌进入稳定期，此时菌数为 8~9 lg CFU/mL，而 OD 值具有延滞性，约 30 h 时 OD 达到最大值 1.1，35 h 后腐败希瓦氏菌进入衰退期，菌数和 OD 值下降。确定腐败希瓦氏菌在 25 ℃时 TSB 中培养 18 h，获得菌数的对数值为 8~9 lg CFU/mL 的种子液。

2.2 pH 胁迫作用对腐败希瓦氏菌生长范围及生长动力学参数的影响

2.2.1 不同 pH 下腐败希瓦氏菌的生长界限及模型评价

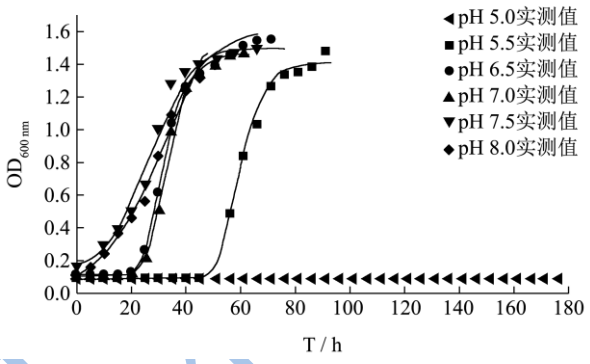


图 2 15 ℃时不同 pH 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different pH values at 15 ℃

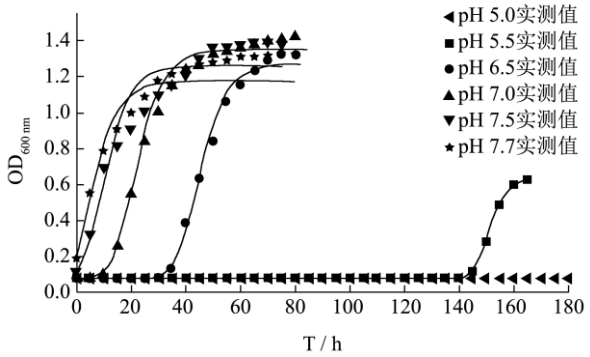


图 3 25℃时不同 pH 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.3 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different pH values at 25 ℃

微生物能够在广泛范围的 H^+浓度条件下生长，一般细菌可以在 pH 5.0~9.0 条件下生存，极端 pH 会改变细胞膜通透性，破坏营养物质，产生有毒物质，造成细胞死亡。15 ℃和 25 ℃时，在 pH 4.0、4.5 和 5.0 条件下培养腐败希瓦氏菌，7 d 内 OD 值无显著差异（OD 差异≤0.003），μ_{max}≤0.001，可判定为不生长，pH 值大于 5.0 时，呈现出 S 型生长曲线，如图 2 和图 3 所示，模型评价中 R^2 除 0.897（25 ℃，pH 7.7）外皆大于 0.990，A_f 在 1.000~1.070 之间，B_f 在 1.000~1.100 之间，RMS 在 0.000-0.100 之间，表明生长模型拟合优度良好。

37 ℃时，腐败希瓦氏菌 pH 为 4.0~7.5 时 7 d 内

OD 值无显著差异（OD 差异≤0.003），判定腐败希瓦氏菌不生长,与 Abboud R[9]所描述的 *S.oneidensis* MR-1 最大生长温度为 35 ℃相似。有研究[10]表明 pH 的变化会影响腐败希瓦氏菌表面超微结构，pH 增大会导致细胞壁厚度变大。Adam B. Leaphart[11]研究表明 *S. oneidensis* 调节多种转运蛋白、细胞壁成分、氨基酸的消耗途径和中间代谢作为转录的一部分以应对 pH 的变化。Frank Ziemke 等对含有不同基因组 I、II 和 III 的腐败希瓦氏菌和两株 *S.Alga*（基因组 IV）进行评估不同的表征性状，结果发现在 4 ℃时含有基因组 I 和 II 的菌株能够生长，而 *S.Alga* 和基因组 III 则不能生长，在 37 ℃时只有基因组 II 不能生长[12]，因此腐败希瓦氏菌对温度的耐受性可能受这几种基因组控制。

2.2.2 pH 对生长动力学参数的影响

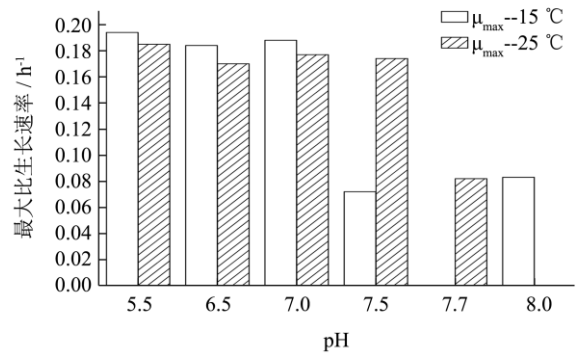


图 4 15℃和 25℃下 pH 与 μ_{max} 的关系

Fig.4 Relationship between pH and μ_{max} at 15 ℃ and 25℃

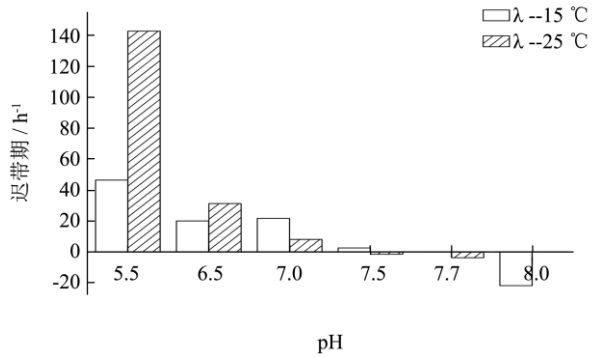


图 5 15℃和 25℃下 pH 与 λ 的关系

Fig.5 Relationship between pH and λ at 15 ℃ and 25 ℃

pH 与腐败希瓦氏菌最大比生长速率的关系见图 4，由图 4 可知，15℃培养条件下，pH 5.5~7.0 时，最大比生长速率变化不显著，在 1.840 h^{-1} 到 1.940 h^{-1} 之间，pH＞7.0 时，最大比生长速率迅速降低，pH 7.5 和 pH 8.0 时分别为 0.072 h^{-1} 和 0.083 h^{-1}；25 ℃培养条件下，pH 5.5~7.5 时，最大比生长速率变化不显著，在 1.700 h^{-1} 到 1.850 h^{-1} 之间，pH＞7.5 时，最大比生长速率迅速降低，pH 7.7 时为 0.082 h^{-1}。15 ℃和 25 ℃时，pH 7.0 时最大比生长速率值最大，分别为 0.188 h^{-1} 和 0.177 h^{-1}，和 Jung-Hoon Yoon 等[13]所收集的数据中希瓦氏菌的生长最适 pH 值在 7.0 到 8.0 之间吻合。

pH 与腐败希瓦氏菌迟滞期的关系见图 5，由图 5 可知，15 ℃培养条件下，迟滞期随着 pH 增大而减小，pH 5.5 时迟滞期最长，为 46.4 h，pH 7.5 时，迟滞期降至 2.6 h，pH 8.0 时，腐败希瓦氏菌没有迟滞期，直接进入对数期；25 ℃培养条件下，迟滞期降低的趋势相比于 15 ℃更加明显，pH 5.5 时迟滞期长达 142.6 h，pH 7.0 时降至 8.1 h，在 pH 7.5 和 pH 7.7 时，腐败希瓦氏菌没有迟滞期，直接进入对数期。由此可见低 pH 会延长迟滞期，抑制腐败希瓦氏菌的生长。

2.3 Aw 对腐败希瓦氏菌生长范围及生长动力学参数的影响

2.3.1 不同 Aw 下腐败希瓦氏菌的生长界限及模型评价

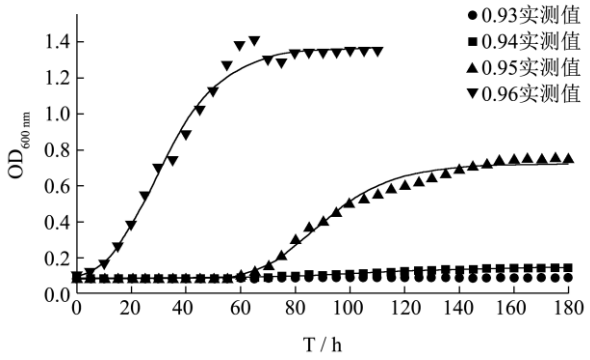


图 6 15℃时不同 Aw 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.6 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different Aw values at 15 ℃

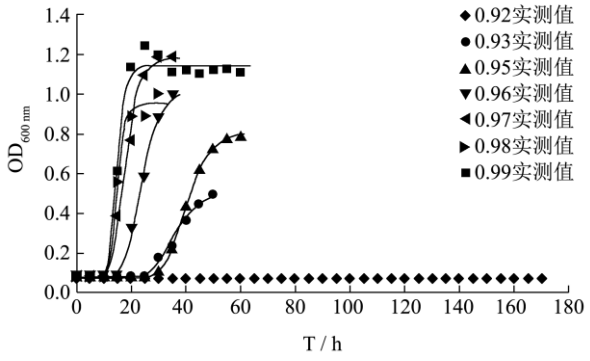


图 7 25℃时不同 Aw 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.7 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different Aw values at 25 ℃

Aw 值影响微生物的生长繁殖以及孢子的产生，降低 Aw，微生物代谢活性也会降低。在食品中，不同微生物对 Aw 要求不同，一般来说细菌对 Aw 的要

求较高，为 Aw>0.900。在水产品中，低 Aw 可以抑制或者降低一些反应速率，比如非酶褐变、脂肪氧化、维生素降解、酶反应，蛋白质变性和淀粉糊化等，以此保持水产品质量，延长保质期[14]。15 ℃时，Aw 在 0.900~0.930 条件下培养腐败希瓦氏菌，7 d 内 OD 值无显著差异（OD 差异≤0.003），μ_{max}≤0.001，可判定为不生长，Aw 为 0.940~0.960 时生长曲线如图 6 所示。25 ℃时，Aw 在 0.900~0.920 条件下培养腐败希瓦氏菌，7 d 内 OD 值无显著差异（OD 差异≤0.003），可判定为不生长，Aw 为 0.930~0.990 时生长曲线如图 7 所示。15 ℃及 25 ℃模型评价中，R^2 皆大于 0.980，A_f 在 1.000~1.050 之间，B_f 皆为 1.000，RMS 在 0.000~0.050 之间，表明生长模型拟合优度良好。

37 ℃时，腐败希瓦氏菌 Aw 为 0.900~0.990 时 7 d 内 OD 无显著差异（OD 差异≤0.003），判定为不生长。很多因素会影响某种微生物的生长最小 Aw，比如用以调节 Aw 的介质。David S. Nichols 等[15]用 NaCl 调节水分活度，在 20℃下测得 *Shewanella gelidimarina* 的生长最小 Aw 为 0.974±0.004（4.6%的 NaCl），最大 Aw 为 0.996±0002（0.7%的 NaCl），最适 Aw 为 0.986（2.5%的 NaCl）。可能是 NaCl 和 Aw 两者共同作用的结果。Aw 会影响微生物对不良因素的抵抗力，例如在营养微生物中用 NaCl 作润湿剂时，降低悬浮介质的 Aw 值，热抗性明显增加[16]。

2.3.2 Aw 对生长动力学参数的影响

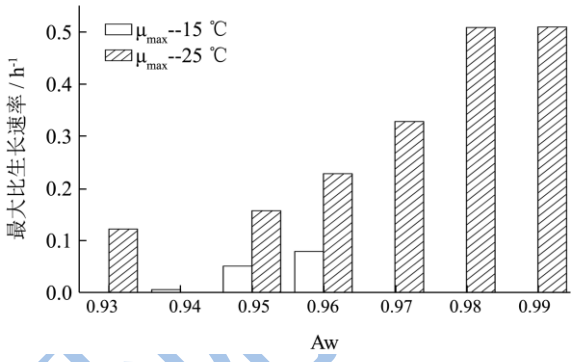


图 8 15℃和 25℃下 Aw 和 μ_{max} 的关系

Fig.8 Relationship between pH and μ_{max} at 15 ℃ and 25 ℃

Aw 与腐败希瓦氏菌最大比生长速率的关系见图 8,由图 8 可知，15 ℃时，最大比生长速率随着 Aw 增大而增大，Aw 为 0.930 时，最大比生长速率为 0.006 h^{-1}，Aw 为 0.960 时增至 0.079 h^{-1}。25 ℃时，最大比生长速率随着 Aw 增大而增大，Aw 为 0.930，最大比生长速率为 0.122 h^{-1}，随后最大比生长速率增大趋势愈加明显，Aw 为 0.980 和 0.990 时趋于稳定，分别为 0.508 h^{-1} 和 0.509 h^{-1}。

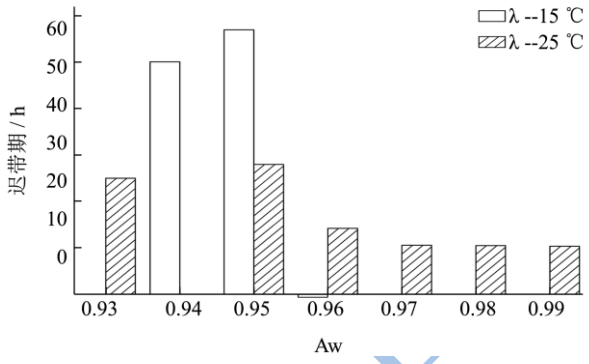


图 9 15 ℃和 25 ℃下 Aw 和 λ 的关系

Fig.9 Relationship between pH and λ at 15 ℃ and 25 ℃

Aw 与腐败希瓦氏菌迟滞期的关系见图 9，由图 9 可知，15 ℃培养条件下，Aw≤0.950 时迟滞期超过 50 h，而 Aw 为 0.960 时腐败希瓦氏菌没有迟滞期。25 ℃培养条件下，Aw≤0.950 时迟滞期超过 25 h，Aw 为 0.960 时降至 14.3 h，Aw 为 0.970 至 0.990 时，迟滞期变化不显著，皆在 10 h 左右。

2.4 NaCl 胁迫作用对腐败希瓦氏菌生长范围及生长动力学参数的影响

2.4.1 不同 NaCl 下腐败希瓦氏菌的生长界限及模型评价

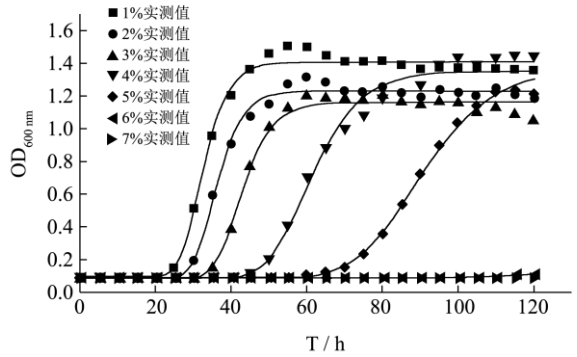


图 10 15℃时不同 NaCl 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.10 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different NaCl concentrations at 15 ℃

盐分浓度和微生物繁殖关系密切，Na^+对细胞有毒性，主要体现在高 Na^+造成的高渗条件会导致细胞质失水而引起质壁分离，进而膨压下降，细胞生长变慢而停止，大分子的生物合成受到抑制，进而生长受到抑制甚至死亡。15 ℃时，在 NaCl 浓度为 7%~15%条件下培养腐败希瓦氏菌，OD 值无显著差异（OD 差异≤0.003），μ_{max}≤0.001，可判定为不生长，NaCl 浓度为 1%~6%时生长曲线如图 10 所示。25 ℃时，NaCl 浓度为 12%~15%时，腐败希瓦氏菌不生长，NaCl 浓

度为 1%~11%时生长曲线如图 11 所示。15 ℃及 25 ℃模型评价中 R^2 除 0.856（15 ℃，6%的 NaCl）外皆大于 0.990，A_f 在 1.000~1.070 之间，B_f 皆为 1.000，RMS 在 0.000~0.060 之间，表明生长模型拟合优度良好。

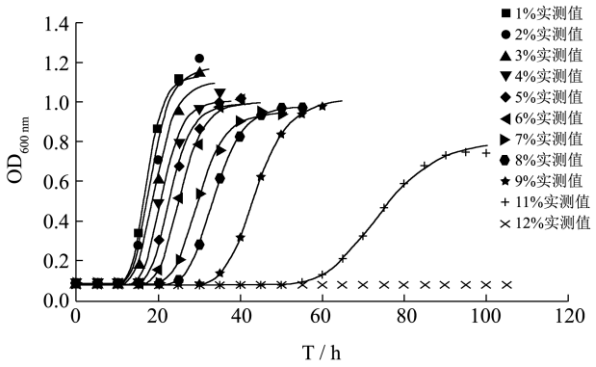


图 11 25℃时不同 NaCl 下腐败希瓦氏菌生长曲线

Fig.11 Growth curves of *Shewanella putrefaciens* at different NaCl concentrations at 25 ℃

37 ℃时，腐败希瓦氏菌在 NaCl 浓度为 1%~15%内 OD 变化不显著（OD 差异≤0.003），判定为不生长。有研究[17]细胞膜成分的变化可能是对高 NaCl 胁迫的间接生理响应，当 NaCl 浓度为 9.35%时，*Shewanella amazonensis* 生长速率被抑制至原来的 50%。此外 NaCl 还会影响希瓦氏菌的脱色能力，分离自海洋的希瓦氏菌比非盐来源的希瓦氏菌脱色能力更强[18]。

2.4.2 NaCl 对生长动力学参数的影响

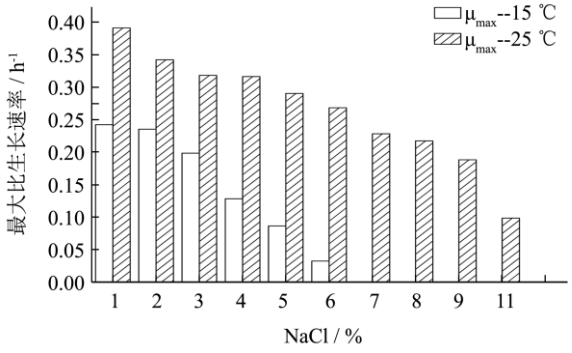


图 12 15℃和 25℃下 NaCl 与 μ_{max} 的关系

Fig.12 Relation between NaCl concentrations and μ_{max} at 15 ℃ and 25 ℃

NaCl 浓度与腐败希瓦氏菌最大比生长速率的关系见图 12，可知，15 ℃培养条件下，最大比生长速率随着 NaCl 浓度增加而减小，NaCl 浓度为 1%时最大比生长速率最大，为 0.242 h^{-1}，近似为 NaCl 浓度为 6%时的 8 倍；25 ℃培养条件下，NaCl 浓度为 1%时最大比生长速率最大，为 0.391 h^{-1}，分别近似 NaCl 浓度为 8%时的 2 倍和 NaCl 浓度为 11%时的 4 倍，而 NaCl≥12%时，最大比生长速率降为 0.000 h^{-1}。NaCl 浓度与腐败希瓦氏菌迟滞期的关系见图 13，可知，15 ℃培养条件下，NaCl 浓度为 1%时迟滞期最短，为 23.0 h；NaCl 浓度为 5%时迟滞期增至 63.3 h，NaCl 浓度为 6%时迟滞期骤增至 140.0 h。25 ℃培养条件下，NaCl 浓度为 1%时，迟滞期为 11.4 h，随着 NaCl 浓度增大,每增加 1%的 NaCl 迟滞期增加约 1.0 h，当 NaCl>6%时，迟滞期迅速增加，NaCl 浓度为 11%时迟滞期增至 55.1 h。

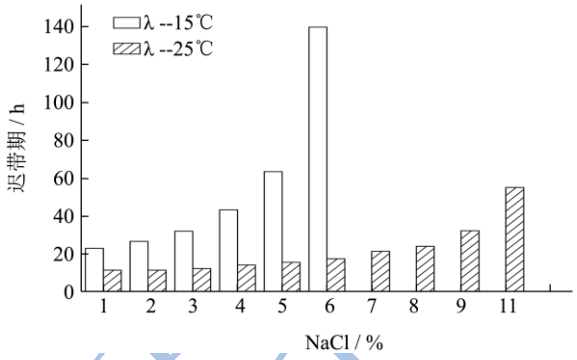


图 13 15℃和 25℃下 NaCl 与 λ 的关系

Fig.13 Relationship between NaCl concentrations and λ at 15 ℃ and 25 ℃

本文中 15 ℃和 25 ℃下 NaCl 浓度为 1%时腐败希瓦氏菌最大比生长速率最大以及迟滞期最短，判定为最适浓度，与 *Shewanella xiamenensis* 生长最适 NaCl 浓度为 1%~2%[19]一致，而生长范围差异性较大，*Shewanella xiamenensis* 只能在 1%-4%的 NaCl 中生长，而腐败希瓦氏菌 15 ℃时可以在 NaCl 浓度≤6%下生长，在 25 ℃时可以在 NaCl 浓度≤11%下生长,生长范围的差异可能是菌种和温度等条件的差异造成的。

3 结论

3.1 以腐败希瓦氏菌为研究对象，通过调控不同环境因子（温度、pH、NaCl 和 Aw）确定生长/非生长界限：15 ℃时，pH≤5.0 或 Aw≤0.930 或 NaCl≥7%时，腐败希瓦氏菌不生长；25 ℃时，pH≤5.0 或 Aw≤0.920 或 NaCl≥12%时，腐败希瓦氏菌不生长；温度≥37 ℃时，腐败希瓦氏菌均不生长。

3.2 对修正的 Gompertz 方程拟合优度进行评估，得出不同调控因子下（温度、pH、NaCl 和 Aw）模型的 R^2 均值大于 0.970、A_f 均值小于 1.060、B_f 均值为 1.000，且 RSS 均值小于 0.060，判定该模型能较好地描述环境对腐败希瓦氏菌生长的影响。

3.3 不同调控因子对腐败希瓦氏菌生长动力学参数的影响

腐败希瓦氏菌最大比生长速率在 pH 5.5~7.0（15 ℃）/7.5（25 ℃）时变化不显著，继而迅速降低，而迟滞期随着 pH 增大而减小，15 ℃，pH 为 8.0

和 25 ℃，pH 为 7.7 时，最大比生长速率分别为 0.083 h^{-1} 和 0.082 h^{-1}，且皆没有迟滞期；腐败希瓦氏菌最大比生长速率随着 Aw 增大而增大，迟滞期呈现相反趋势，15 ℃，Aw 为 0.960 和 25 ℃，Aw 为 0.990 时分别为 0.079 h^{-1} 和 0.509 h^{-1}，15 ℃和 25 ℃，Aw≤0.950 时迟滞期分别超过 50 h 和 25 h，而 15 ℃，Aw 为 0.960 时腐败希瓦氏菌没有迟滞期，25 ℃，Aw 为 0.970 至 0.990 时，迟滞期降低至 10 h 左右；最大比生长速率随着 NaCl 浓度增加而减小，迟滞期则相反，NaCl 浓度为 1%时最大比生长速率最大以及迟滞期最短，15 ℃时为 0.242 h^{-1} 和 23.0 h，25 ℃时为 0.391 h^{-1} 和 11.4 h，15 ℃，NaCl 浓度为 6%时最大比生长速率降至 0.032 h^{-1}，迟滞期骤增至 140.0 h，25 ℃时，NaCl 浓度为 11%最大比生长速率降为 0.098 h^{-1}，迟滞期增至 55.1 h。

参考文献

[1] 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): 267-273
GUO Quan-You,WANG Xi-Chang,YANG Xian-Shi, et al. Predictive model construction of shelf life for cultured Pseudosciaena crocea stored at different temperatures [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(10): 267-273

[2] 李学英,许钟,杨宪时,等.大黄鱼腐败菌腐败能力分析与特定腐败菌鉴别[J].上海海洋大学学报,2010,19(04):547-552
LI Xue-Ying, XU Zhong, YANG Xian-Shi, et al. Analysis of microbial spoilage ability and characterization of specific spoilage organism for Pseudosciaena crocea [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(04): 547-552

[3] Serio A, Fusella G C, López C C, et al. A survey on bacteria isolated as hydrogen sulfide-producers from marine fish [J]. Food Control, 2014, 39: 111-118

[4] 郭燕茹,顾赛麒,王帅,等.栅栏技术在水产品加工与贮藏中应用的研究进展[J].食品科学,2014,11:339-342
GUO Yan-ru, GU Sai-qi, WANG Shuai, et al. Research advances in application of hurdle technology for aquatic products processing and storage [J]. Food Science, 2014, 11: 339-342

[5] ka M, Noriega E, Stamati I, et al. Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters [J]. Journal of Food Safety, 2015, 35: 179-192

[6] 汪玲玲,钟武杰,黄少鹏,郝淑贤.基于 OD-TTD 法构建金黄色葡萄球菌生长模型的研究[J].现代食品科技,2014, 4: 160-164
WANG Ling-Ling, ZHONG Wu-Jie, HUANG Shao-Peng, et al. Establishment of growth model of staphylococcus aureus based on OD-TTD [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 4: 160-164

[7] ugustin 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

[8] 唐晓阳,赵勇,孙晓红,等.冷却猪肉中假单胞菌生长预测模型的建立与验证[J].湖南农业科学,2010,01:128-131+134
TANG Xiao-Yang, ZHAO Yong, SUN Xiao-Hong, et al. Establishment and validation of predictive model of Pseudomonas spp. from chilled Pork [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010, 01: 128-131+134

[9] Abboud R, Popa R, Souza-Egipsy V, et al. Low-temperature growth of Shewanella oneidensis MR-1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 811-816

[10] Gaboriaud F, Bailet S, Dague E, et al. Surface structure and nanomechanical properties of Shewanella putrefaciens bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11): 3864-3868

[11] Leaphart A B, Thompson D K, Huang K, et al. Transcriptome profiling of Shewanella oneidensis gene expression following exposure to acidic and alkaline Ph [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(4): 1633-1642

[12] Ziemke F, H02fle MG, Lalucat J, et al. Reclassification of Shewanella putrefaciens Owen's genomic group II as Shewanella baltica sp. nov. [J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1998, 48 pt 1: 179-86

[13] Yoon J H, Yeo S H, Kim I G, et al. Shewanella marisflavi sp. nov. and Shewanella aquimarina sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 2004, 54(6): 2347-2352

[14] Abbas K A, Saleh A M, Mohamed A, et al. The relationship between water activity and fish spoilage during cold storage: A review [J]. J. Food Agric. Environ., 2009, 7: 86-90

[15] Nichols D S, Olley J, Garda H, et al. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of Shewanella gelidimarina [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2422-2429

[16] 李琳,万素英.水分活度(Aw)与食品防腐[J].中国食品添加剂,2000,04:33-37
LI Lin, WAN Su-ying. Water activity and preservation of food [J]. China food additives, 2000, 04: 33-37

[17] Parnell J J, Callister S J, Rompato G, et al. Time-course analysis of the Shewanella amazonensis SB2B proteome in response to sodium chloride shock [J]. Scientific reports, 2011, 1

[18] Liu G, Zhou J, Meng X, et al. Decolorization of azo dyes by marine Shewanella strains under saline conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4187-4197

[19] Huang J. Shewanella xiamenensis sp. nov. isolated from coastal sea sediment [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2010, 60(3): 585-1589

现代食品科技