

# 多重与单一耐药的副溶血性弧菌在纯培养及南美白对虾中生长动力学的参数比较研究

娄阳<sup>1</sup>, 张昭寰<sup>1</sup>, 肖莉莉<sup>1</sup>, 郭丹凤<sup>1</sup>, 刘海泉<sup>1,2</sup>, 潘迎捷<sup>1,2</sup>, 赵勇<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

**摘要:** 为比较多重与单一耐药的副溶血性弧菌生长动力学差异, 并探索“细菌耐药性”与“风险”之间的关联, 本研究应用 Bioscreen 全自动微生物生长曲线分析仪结合梯度稀释法, 对不同耐药程度的副溶血性弧菌在纯培养条件(TSB)下的最大比生长速率( $\mu_{max}$ )进行了比较分析。进一步选取六重耐药的 VPD18 菌株与单一耐药的 VPD43 菌株接种于南美白对虾中, 构建不同温度下的生长曲线, 采用 Baranyi 模型进行拟合得出生长动力学参数。结果显示: 在纯培养条件下, 多重与单一耐药的副溶血性弧菌的  $\mu_{max}$  间并无显著性差异 ( $P>0.05$ )。而在南美白对虾中, 单一耐药的副溶血性弧菌的  $\mu_{max}$  更大, 但六重耐药的菌株却具有更短的延滞期( $\lambda$ )。基于该现象提出假设: 细菌耐药程度的增加可能导致其延滞期缩短, 但对其最大比生长速率影响不显著。该结果可为我国开展副溶血性弧菌的定量风险评估提供基础数据。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 细菌耐药性; 生长动力学参数; 风险评估

文章编号: 1673-9078(2015)5-181-186

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.029

## Growth Kinetic Parameters of Multi-drug and Single-drug Resistant

## *Vibrio parahaemolyticus* Strains in Pure Culture and in *Penaeus vannamei*

LOU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Zhao-huan<sup>1</sup>, XIAO Li-li<sup>1</sup>, GUO Dan-feng<sup>1</sup>, LIU Hai-quan<sup>1,2</sup>, PAN Ying-jie<sup>1,2</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2</sup>

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

Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing and Preservation, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation Shanghai, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The variations in growth kinetic parameters of single- and multi-drug resistant *Vibrio parahaemolyticus* strains were investigated, and the relationship between bacterial resistance and risk was explored. A Bioscreen-C automated growth curve analysis system combined with the serial dilution method was employed to compare and analyze the maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) of *V. parahaemolyticus* strains with varying degrees of drug resistance cultured in trypticase soy broth (TSB). Furthermore, *Penaeus vannamei* was inoculated with the VPD18 strain, which is resistant to six antibiotics, and the VPD43 strain, which is only resistant to ampicillin. Growth curves at different temperatures were established and then the growth dynamics parameters were calculated using the Baranyi model. There was no significant difference in  $\mu_{max}$  values between the single- and multi-drug resistant strains grown in TSB ( $P > 0.05$ ). However, in *P. vannamei*, the  $\mu_{max}$  of the single-drug resistant strain was higher than that of the strain resistant to six antibiotics, but the latter strain had a shorter lag time ( $\lambda$ ). These results suggest that the increase of antibiotic resistance may lead to a shortened  $\lambda$ , but has no significant effect on the  $\mu_{max}$ . The results of this study can provide basic data for the development of a quantitative risk assessment of *V. parahaemolyticus* in China.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; resistant bacteria; growth kinetic parameters; risk assessment

收稿日期: 2014-11-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271870); 上海市科委计划项目(14ZD1205100, 14320502100, 12391901300); 上海市科技农农重点攻关项目(沪农科攻字 2014 第 3-5 号); 交叉学科项目(B5201120040)

作者简介: 娄阳(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与生态风险

通讯作者: 赵勇(1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全学

细菌的耐药性已经成为全球范围内极其严重的公共卫生安全问题<sup>[1]</sup>。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的食源性致病菌, 食用被致病性副溶血性弧菌污染的水产品易引起急性胃肠炎和原发性败血症等疾病<sup>[2]</sup>。根据我国食源性疾病预防网的数据显示, 在微生物引起的食源性疾病爆发事件中, 副溶血性弧菌污染为首要因素<sup>[3]</sup>。抗生素能够

有效的治愈副溶血性弧菌所引发的食源性疾病,但是研究表明:随着抗生素的过度使用,该菌的耐药性呈现逐年增加的趋势<sup>[4]</sup>。

抗菌药耐药微生物风险评估(Antimicrobial Resistance Risk Assessment, AMR-RA)是一种新兴的食品安全风险评评估手段,其基本原理是在传统微生物风险评估(Microbial risk assessment, MRA)的基础上<sup>[5]</sup>,评估耐药微生物与耐药决定因子在食品和饲料中或通过食品和饲料传播对人类健康造成的风险,从而提出适当的风险管理措施以降低此类风险<sup>[6]</sup>。

预测微生物学(Predictive microbiology)是微生物风险评估(MRA)中不可或缺的一个部分,依据建立的预测微生物学模型,可快速地对食品中致病菌的生长情况进行判断,从而有效地控制食品中病原微生物的风险<sup>[7]</sup>。近年来,随着科学技术的进步,对于预测微生物学模型的应用有了新的突破,科研工作者不再局限于单纯的模型构建,而是将其发展成为评价不同菌株之间或菌株处于不同条件之下生长动力学差异的方法:唐晓阳等利用预测微生物学的生长动力学参数,评价了致病性及非致病性副溶血性弧菌间的变异性<sup>[8]</sup>,Belda-Galbis等利用修正的Gompertz方程评价了甜叶菊对李斯特菌的杀菌效果<sup>[9]</sup>,王敬敬利用修正的Gompertz方程和Log-linear方程,评价电解水处理之后南美白对虾中副溶血性弧菌的生长参数变化<sup>[10]</sup>。

关于不同耐药程度细菌间生长动力学参数的比较,本研究组已有相关研究报道<sup>[11]</sup>,但仅用OD值构建的生长参数成为其研究的一大缺陷,本文建立在前期研究基础之上,利用全自动生长曲线分析测定仪(Bioscreen C)结合梯度稀释法,比较多重与单一耐药的副溶血性弧菌在纯培养中的生长差异,并选取耐药性最强的VPD18菌株(六重耐药)与耐药性相对较弱的VPD43菌株(只对氨苄西林具有耐药性)在南美白对虾中进行进一步的试验,旨在揭示副溶血性弧菌“耐药性”与“风险”之间的关系,为耐药性副溶血性弧菌的风险评估提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

Bioscreen C全自动微生物生长曲线分析仪,芬兰Oy Growth Curves Ab公司;MIR154高精度低温培养箱,MLS-3750型高压灭菌锅,日本三洋电机生物医药株式会社;OptiMair®垂直流超净工作台,Airstream®A2型二级生物安全柜,Esco China公司;GHP-9270型隔水式恒温培养箱,上海一恒科技有限

公司。

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),TCBS培养基,3%氯化钠碱性蛋白胨水,北京陆桥技术有限责任公司。

### 1.2 耐药性菌株的获得

#### 1.2.1 菌种

实验中所用的11株副溶血性弧菌菌株均由本实验室从海产品中分离,经过PCR鉴定均携带致病基因tdh,并利用K-B纸片扩散法测定其对18种常见抗生素的耐药性(氨苄西林、哌拉西林、阿莫西林-克拉维酸、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、头孢唑林、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、四环素、环丙沙星、左氧氟沙星、氯霉素、复方新诺明),具体菌种信息如表1所示。

表1 副溶血性弧菌菌株信息

Table 1 Information regarding the *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株名称	菌株来源	致病基因	耐药情况*
VPD18	日本沼虾	tdh+trh-	AMP,AMC,PRL,KZ,CIP,LEV
VPD14	日本沼虾	tdh+trh-	AMP,PRL,AK
VPD8	日本沼虾	tdh+trh-	AMP,CN
VPD33	斑节对虾	tdh+trh-	AMP,KZ
VPD34	太平洋牡蛎	tdh+trh-	AMP,KZ
VPD41	日本沼虾	tdh+trh-	AMP,KZ
VPD57	日本沼虾	tdh+trh-	AMP,KZ
VPD61	南美白对虾	tdh+trh-	AMP,KZ
VPD31	日本沼虾	tdh+trh-	AMP
VPD43	日本沼虾	tdh+trh-	AMP
VPD58	南美白对虾	tdh+trh-	AMP

注:表中VPD18、VPD14、VPD8菌株信息引自于前期研究<sup>[11]</sup>,其余菌株信息尚未发表;\*AMP:氨苄西林(Ampicillin);AMC:阿莫西林-克拉维酸(Amoxicillin-clavulanic acid);PRL:哌拉西林(Piperacillin);KZ:头孢唑林(cephazolin);CIP:环丙沙星(Ciprofloxacin);LEV:左氧氟沙星(levofloxacin);AK:阿米卡星(Amikacin);CN:庆大霉素(Gentamincin)。

#### 1.2.2 菌种活化及接种液制备

将各副溶血性弧菌菌株从-80℃保存的甘油管中划线至TCBS平板,37℃培养24h,挑取单菌落于10mL TSB(3% NaCl)的试管中,在37℃转速为180r/min的摇床中培养12h,连续活化2次,作为种子液(约10<sup>9</sup>CFU/mL),备用。

### 1.3 纯培养中副溶血性弧菌生长动力学参数的获得

### 1.3.1 Bioscreen 梯度稀释法

根据 Lianou<sup>[12]</sup>、Lindqvist<sup>[13]</sup>和唐晓阳<sup>[8]</sup>等的研究, Bioscreen 梯度稀释法的具体步骤如下: 在 Bioscreen 配套的 100 微孔板中, 吸取初始接种液 20  $\mu\text{L}$  接种至第一孔 180  $\mu\text{L}$  TSB 中, 以此为第一稀释梯度。用移液器吹吸混匀后, 再从此孔中吸取 20  $\mu\text{L}$  接种至第二孔 180  $\mu\text{L}$  TSB 中, 依次梯度稀释至第 10 孔 TSB 中, 为了保持各孔中的样品体积一致, 取出 20  $\mu\text{L}$  第 10 孔中的液体废弃。

以这种方法对副溶血性弧菌菌液进行梯度稀释, 并以 180  $\mu\text{L}$  TSB 培养基作为空白对照, 选择五个连续 10 倍系列梯度稀释的孔, 即  $10^6\sim 10^2$  CFU/mL 浓度的孔作为后续计算的样品孔<sup>[8]</sup>。将加好空白对照及样品液的 100 微孔板放入 Bioscreen 样品槽中, 将 Bioscreen 设置为每 15 min 读取 OD<sub>540</sub> 值一次, 培养温度分别设定为 15、20、25 和 30  $^{\circ}\text{C}$ , 测定这四个温度下副溶血性弧菌的生长曲线, 每组试验重复 2 次

### 1.3.2 生长动力学参数的计算

参照 Lianou<sup>[12]</sup>、Lindqvist<sup>[13]</sup>和唐晓阳<sup>[8]</sup>等的研究, Bioscreen 梯度稀释法计算菌株最大比生长速率的方法如下:

$$\log(N_i) = k - \mu_{\max} \times t_{\text{det}} \quad (1)$$

式中:  $t_{\text{det}}$  为副溶血性弧菌菌液的 OD<sub>540</sub> 达到 Bioscreen 可检测水平 ( $10^6\sim 10^7$  CFU/mL) 时的时间 (h);  $\mu_{\max}$  为副溶血性弧菌的最大比生长速率 [ $\log$  CFU/mL/h],  $N_i$  为 1.3.2 中所选择的样品孔中的副溶血性弧菌初始浓度值 (CFU/g)。

## 1.4 南美白对虾中副溶血性弧菌生长动力学参数的获得

### 1.4.1 人工接种实验

无菌南美白对虾的制备: 将冰鲜南美白对虾在含 3% NaCl 的去离子水中煮沸 20 min, 转移至生物安全柜, 室温下冷却沥干, 挑选 (10 $\pm$ 2) g 的虾备用。

菌株的接种: 将副溶血性弧菌的种子液稀释至约  $10^6$  CFU/mL 接种于虾中, 使南美白对虾的初始接种浓度为  $10^3\sim 10^4$  CFU/mL, 将接种上菌液的虾室温下放置 30 min, 使副溶血性弧菌附着到南美白对虾中。

### 1.4.2 生长曲线测定

将接种后的南美白对虾放入无菌封口袋中, 分别于 15  $^{\circ}\text{C}$ 、20  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$  及 30  $^{\circ}\text{C}$  贮存, 以此为初始生长点, 此后于适当时间间隔取样, 采用平板计数法, 每个时间点 2 个平行。

### 1.4.3 生长动力学参数拟合

应用英国食品研究所(IFR)Baranyi 博士开发的 DMFit v3.0 软件, 选取 Baranyi 生长模型 (1) 对副溶血性弧菌的生长数据进行拟合<sup>[14]</sup>。根据拟合的生长曲线由 DMFit 软件计算生长参数最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )、延滞期(lag)、以及最大菌数(D)。

$$y = y_0 + \frac{y_1}{\ln(y)} + \frac{y_2}{\ln(y)} \quad (1)$$

$$y_1 = \mu_{\max} t + \ln[e^{-\mu_{\max} t} - e^{-\mu_{\max}(t+\text{lag})} + e^{-\mu_{\max} \text{lag}}]$$

$$y_2 = \ln[1 + 10^{(y_0 - y_{\max})} (e^{\mu_{\max}(t-\text{lag})} + e^{-\mu_{\max} \text{lag}})]$$

公式 (1) 中,  $y_0$  和  $y_{\max}$  分别是细菌的初始菌量和最大菌数 (D);  $\mu_{\max}$  为最大比生长速率; lag 为延滞期。

## 1.5 数据处理

实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $X\pm S$ )表示, 显著性差异比较采用 SPSS statistics 17.0 进行单因素方差分析 (ANOVA), 检验水平为  $p < 0.05$  时为差异显著, 具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯培养中不同耐药性副溶血性弧菌生长动力学参数的比较

应用全自动微生物生长曲线分析仪共测定了 11 株不同耐药程度的副溶血性弧菌 OD<sub>540</sub> 时的生长曲线, 利用公式(1)计算出副溶血性弧菌在 15  $^{\circ}\text{C}$ 、20  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$  和 30  $^{\circ}\text{C}$  的  $\mu_{\max}$ , 结果如表 3 所示。

由表 2 可知, 在纯培养 (TSB) 培养条件中, 15  $^{\circ}\text{C}$  培养温度下, 两重耐药性菌株 VPD57 的  $\mu_{\max}$  最大, 而六重耐药性菌株 VPD18 的  $\mu_{\max}$  最小; 20  $^{\circ}\text{C}$  培养温度下, 两重耐药性菌株 VPD33 的  $\mu_{\max}$  最大, 而另一株同等抗性的菌株 VPD61 的  $\mu_{\max}$  最小; 25  $^{\circ}\text{C}$  培养温度下, 两重耐药性菌株 VPD8 的  $\mu_{\max}$  最大, 而三重耐药性菌株 VPD14 的  $\mu_{\max}$  最小; 30  $^{\circ}\text{C}$  培养温度下, 六重耐药性菌株 VPD18 和三重耐药性菌株 VPD14 的  $\mu_{\max}$  最大, 而两重耐药性菌株 VPD61 的  $\mu_{\max}$  最小。同时, 在各温度条件下, 不同耐药性的副溶血性弧菌最大比生长速率间并无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。由上述分析可知, 在纯培养条件下, 副溶血性弧菌的最大比生长速率与其耐药性的强弱并无关联。

表 2 不同耐药程度的副溶血性弧菌在纯培养 (TSB) 中的最大比生长速率 [(logCFU/mL)/h]

Table 2 Maximum specific growth rate [(log CFU/mL)/h] of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different degrees of drug resistance in trypticase soy broth

温度/°C	副溶血性弧菌菌株					
	VPD18	VPD14	VPD8	VPD33	VPD34	VPD41
15	0.16±0.02 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>
20	0.42±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	0.41±0.01 <sup>b</sup>	0.46±0.07 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>
25	0.68±0.01 <sup>c</sup>	0.61±0.06 <sup>c</sup>	0.71±0.03 <sup>c</sup>	0.70±0.04 <sup>c</sup>	0.70±0.02 <sup>c</sup>	0.70±0.03 <sup>c</sup>
30	1.20±0.03 <sup>d</sup>	1.20±0.04 <sup>d</sup>	1.03±0.01 <sup>d</sup>	1.11±0.03 <sup>d</sup>	0.99±0.01 <sup>d</sup>	1.03±0.01 <sup>d</sup>

温度/°C	副溶血性弧菌菌株				
	VPD57	VPD61	VPD31	VPD43	VPD58
15	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>
20	0.42±0.01 <sup>b</sup>	0.41±0.01 <sup>b</sup>	0.41±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>
25	0.64±0.05 <sup>c</sup>	0.65±0.02 <sup>c</sup>	0.68±0.01 <sup>c</sup>	0.67±0.01 <sup>c</sup>	0.68±0.03 <sup>c</sup>
30	0.96±0.03 <sup>d</sup>	0.95±0.03 <sup>d</sup>	0.96±0.04 <sup>d</sup>	0.99±0.04 <sup>d</sup>	1.40±0.05 <sup>d</sup>

注: 数值以平均值±标准偏差表示; 同行上标相同字母a, b, c, d分别表示各温度下不同耐药性副溶血性弧菌最大比生长速率间无显著性差异 (P>0.05)。

## 2.2 南美白对虾中六重与单一耐药的副溶血

### 性弧菌生长动力学参数的比较

表 3 VPD18 及 VPD43 在 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C 条件下的生长动力学参数

Table 3 Growth kinetic parameters of VPD18 and VPD43 at 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C

温度/°C	菌株	$\mu_{max}/$ [(log CFU/g)/h]	$\lambda/h$	$y_{max}/$ (log CFU/g)
15	VPD18	0.28±0.02 <sup>a</sup>	4.76±1.84 <sup>a</sup>	9.24±0.24 <sup>a</sup>
	VPD43	0.36±0.03 <sup>a</sup>	18.47±0.42 <sup>b</sup>	9.16±0.08 <sup>a</sup>
20	VPD18	0.77±0.17 <sup>a</sup>	4.43±0.76 <sup>a</sup>	9.27±0.10 <sup>a</sup>
	VPD43	0.93±0.12 <sup>a</sup>	7.78±0.50 <sup>b</sup>	9.22±0.13 <sup>a</sup>
25	VPD18	0.89±0.15 <sup>a</sup>	2.81±0.75 <sup>a</sup>	9.26±0.17 <sup>a</sup>
	VPD43	0.99±0.10 <sup>a</sup>	4.03±0.38 <sup>b</sup>	9.24±0.16 <sup>a</sup>
30	VPD18	1.00±0.21 <sup>a</sup>	1.49±0.96 <sup>a</sup>	9.48±0.20 <sup>a</sup>
	VPD43	1.54±0.27 <sup>a</sup>	3.19±0.45 <sup>b</sup>	9.49±0.12 <sup>a</sup>

注: 数值以平均值±标准偏差表示; 同一列各温度组间, 上标不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 上标相同小写字母表示差异不显著 (P>0.05)。

研究表明, 不同的食品基质、不同的培养条件都可能导致菌株的生长动力学参数呈现差异性<sup>[8]</sup>。所以, 本研究选取南美白对虾作为食品基质, 进行进一步的不同耐药程度副溶血性生长参数比较试验: 选取耐药性最强的 VPD18 菌株 (六重耐药) 与耐药性相对较弱的 VPD43 菌株 (只对氨苄西林具有抗性) 接种于

无菌南美白对虾中, 置于 15 °C、20 °C、25 °C 和 30 °C 温度下贮藏, 并利用 Baranyi 生长模型进行数据拟合, 两株副溶血性弧菌菌株的生长曲线与生长参数如图 1 和表 3 所示。

由图 1 和表 3 可知, VPD18 与 VPD43 在不同温度下的最大细菌浓度 ( $y_{max}$ ) 并无显著性差异, 均为  $10^9$  CFU/mL, 这与大部分副溶血性弧菌预测微生物学模型报道基本保持一致<sup>[5,8,10]</sup>。对比两株菌在不同温度下的最大比生长速率, 单一耐药的副溶血性弧菌 VPD43 最大比生长速率均大于六重耐药的菌株 VPD18, 但两者的最大比生长速率间没有显著性差异 (P>0.05)。而对比两者的延滞期, 六重耐药菌株 VPD18 的延滞期显著性低于单一耐药的菌株 VPD43 (P<0.05)。

## 3 讨论

细菌耐药性风险评估, 是现今研究的热点问题, 同时也是一个难点问题。致病菌是否耐药均能导致人体发病, 所以进行细菌耐药性风险评估的最重要工作在于探究“耐药性”与“风险”之间的关联, 即耐药微生物的存在是否增加了人类健康的危险性<sup>[12]</sup>。本文基于实验室已有研究<sup>[11]</sup>, 对 11 株不同耐药程度的致病性副溶血性弧菌进行生长动力学参数比较研究, 旨在揭示耐药程度与菌株生长活力之间的关系。通过全自动生长曲线分析测定仪, 并结合 Lianou<sup>[12]</sup>、Lindqvist<sup>[13]</sup> 和唐晓阳<sup>[8]</sup>等研究中的梯度稀释法, 获得了 11 株菌株在纯培养 (TSB) 条件下的最大比生长速率 ( $\mu_{max}$ )。

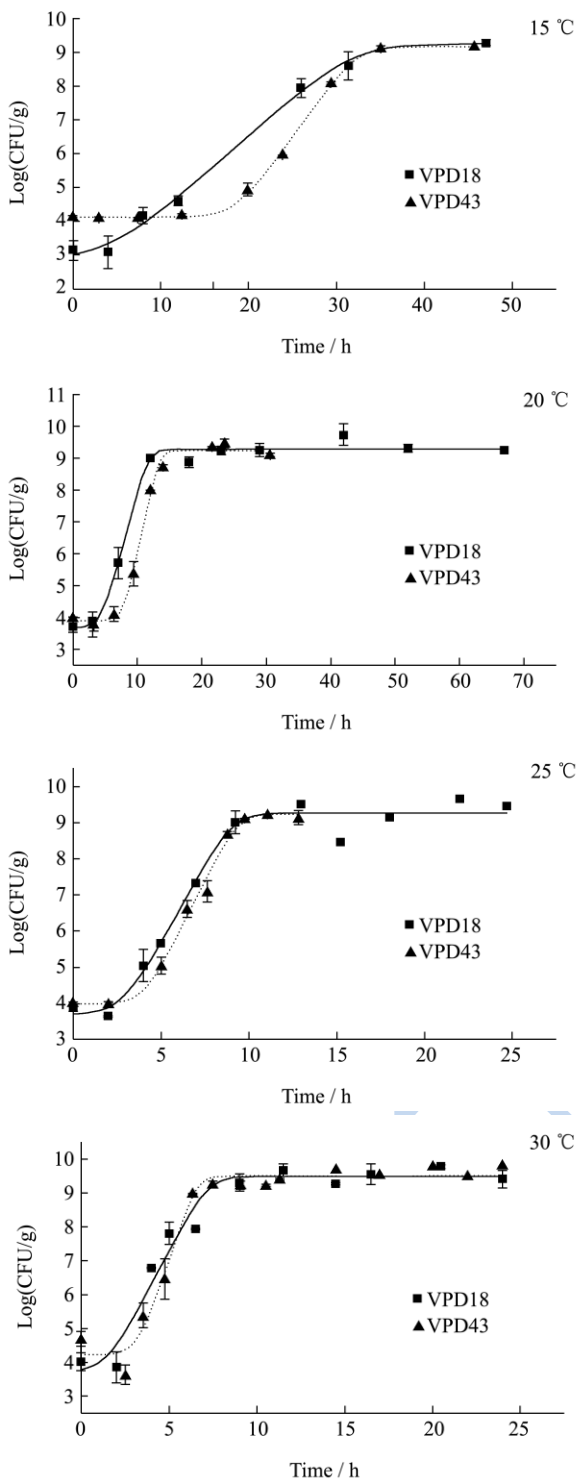


图 1 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C条件下 VPD18 及 VPD43 在南美白对虾中的 Baranyi 模型拟合曲线

Fig.1 Fitted Baranyi curves of strains VPD18 and VPD43 in *Penaeus vannamei* at 15 °C, 20 °C, 25 °C and 30 °C

比较结果显示：在各温度（15 °C、20 °C、25 °C 和 30 °C）下，不同耐药性的副溶血性弧菌最大比生长速率间并无显著性差异（ $P>0.05$ ），而且在纯培养（TSB）条件下，副溶血性弧菌的最大比生长速率与其耐药性的强弱并无关联。这一结果与郭丹凤等的研

究基本一致<sup>[11]</sup>，但是，郭丹凤等基于 OD 值获得的最大比生长速率（ $OD_{540}/h$ ），只能用于耐药性生长差异的比较，而本研究，则真实地获得了基于菌落数的最大比生长速率 $[(\log CFU/mL)/h]$ ，这些数据能够为副溶血性弧菌耐药性风险评估的后续研究，提供有效的数据支持。

已有研究表明<sup>[8]</sup>，因选用的生长基质（如不同种类水产品 and 培养基）不同，可能导致菌株的生长动力学参数呈现差异性，所以本研究在纯培养的基础之上，选择南美白对虾这一消费量极大的海产品作为食品基质，同时选取本实验室耐药性最强的 VPD18 菌株（六重耐药）与耐药性相对较弱的 VPD43 菌株（只对氨基苄西林具有抗性）接种于无菌南美白对虾中，构建 15 °C、20 °C、25 °C 和 30 °C 温度下的生长曲线，并利用 Baranyi 生长模型进行数据拟合，获得六重与单一耐药的副溶血性弧菌的生长动力学参数。通过两菌株的生长动力学参数对比，发现单一耐药的副溶血性弧菌 VPD43 最大比生长速率更大，而六重耐药的菌株 VPD18 则具有更短的延滞期。

最大比生长速率（ $\mu_{max}$ ）和延滞期（ $\lambda$ ）是预测微生物学模型最重要的两个参数<sup>[7]</sup>。研究表明<sup>[5, 10]</sup>，致病菌的最大比生长速率越大、延滞期越短，证明其生长活力越强，所造成的风险也越大。而本研究结果显示：单一耐药的副溶血性弧菌的最大比生长速率更大，但六重耐药的菌株却具有更短的延滞期。多重耐药的菌株 VPD18 的生长速率较小，说明其在指数增长阶段的能够造成的风险较 VPD43 更小，耐药性的增强并没有导致其生长速率的升高。但 VPD18 具有较短的延滞期，延滞期长短能够体现菌株适应环境的能力<sup>[7-8]</sup>，多重耐药的 VPD18 具有更强的抗生素抗性，环境适应能力更强<sup>[14]</sup>，这可能是导致其延滞期较短的原因。适应性(fitness)一般是指细菌为了生存与繁殖而调节自身代谢以适应环境条件(如温度、pH、渗透压、抗生等)的能力<sup>[14]</sup>。国内外很多学者进行了有关细菌耐药性与适应性关系的研究，许多研究结果表明细菌的耐药性与其适应性之间有直接的联系<sup>[14]</sup>。细菌通过耐药性的获得，导致其在体外或动物体内适应性补偿突变的情况发生，即细菌获得耐药性突变后，可引起其适应性升高的结果<sup>[14]</sup>。这一结论与本研究的结果保持一致，多重耐药的 VPD18 具有更强的环境适应能力，从而导致其延滞期较短，而环境适应能力的强弱对其指数增长阶段的最大比生长速率影响不大。但是本研究首次利用预测微生物学模型分析这一现象，使得实验结果更为客观真实，有助于更好地揭示细菌耐药性和风险之间的关系。

## 4 结论

综上所述,本研究首次分析并获得了不同耐药程度的副溶血性弧菌在纯培养及南美白对虾中的生长动力学参数,发现不同耐药程度副溶血性弧菌的最大比生长速率在纯培养(TSB)条件下没有显著性差异,但在南美白对虾中,六重与单一耐药的副溶血性弧菌呈现出特殊的生长现象:单一耐药的副溶血性弧菌的最大比生长速率更大,但六重耐药的菌株却具有更短的延滞期,基于该现象提出假设:细菌耐药程度的增加可能导致其延滞期缩短,但对其最大比生长速率影响不显著。这一假设在国内外尚属首次,验证该假设的正确性,需要获得大量耐药性细菌在不同培养机制中的生长动力学参数,并进行深入的分析和讨论。利用预测微生物学对多重与单一耐药性副溶血性弧菌的生长动力学参数进行比较研究,是对副溶血性弧菌耐药监测和耐药机制研究的重要补充,可为副溶血性弧菌的耐药性风险评估提供基础数据,进而探索阻遏耐药性副溶血性弧菌有效的应对措施。

## 参考文献

- [1] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance [J]. *Science*, 1992, 257(5073): 1064-1073
- [2] 赵勇,王敬敬,唐晓阳,等.水产品中食源性致病微生物风险评估研究现状[J].上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 899-905  
ZHAO Yong, WANG Jing-jing, TANG Xiao-yang, et al. Risk assessment research status of food-borne pathogenic microorganism in aquatic products [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 899-905
- [3] 田明胜,郑雷军,彭少杰,等.2000-2007年上海市致集体性食物中毒分析及对策[J].中国食品卫生杂志, 2008, 20(6): 514-517  
TIAN Ming-sheng, ZHENG Lei-jun, PENG Shao-jie, et al. Analysis and measures on collective food poisoning caused by vibrio parahaemolyticus in shanghai municipality during 2000-2007 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2008, 20(6): 514-517
- [4] Zulkifli Y, Alitheen NB, et al. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia [J]. *International Food Research Journal*, 2009, 16: 53-58
- [5] World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [R]. Geneva: WHO/FAO, 2011: 8
- [6] CAC. Guidelines for Risk Analysis of Foodborne Antimicrobial Resistance, (CAC/GL 77-2011) [DB/OL]. <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11776/CXG-077e.pdf> [2012-01-07]
- [7] McMeekin T, Bowman J, McQuestin O, et al. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128(1): 2-9
- [8] 唐晓阳,郭晓滨,郭丹凤,等.高通量快速测定致病性及非致病性副溶血性弧菌最大比生长速率[J].微生物学通报, 2013,40(11):2138-2144  
TANG Xiao-yang, GUO Xiao-bin, GUO Dan-feng, et al. High Throughput and Rapid Determination of the Maximum Specific Growth Rate of Pathogenic and Non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiology China*, 2013, 40(11): 2138-2144
- [9] Belda-Galbis CM, Pina-Pérez MC, Espinosa J, et al. Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertonii antilisterial kinetics [J]. *Food Microbiology*, 2014(38): 56-61
- [10] Wang JJ, Sun WS, Jin MT, et al. Fate of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp after acidic electrolyzed water treatment [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014(179): 50-56
- [11] 郭丹凤,张昭寰,肖莉莉,等.不同耐药性致病性副溶血性弧菌的生长特性比较研究[J].食品工业科技, 2014, 35(19): 137-141  
GUO Dan-feng, ZHANG Zhao-huan, XIAO Li-li, et al. Comparison of growth characteristic of different antibiotic resistant pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(19): 137-141
- [12] Lianou A, Koutsoumanis KP. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(4): 828-37
- [13] Lindqvist R. Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: Characterization of strain variation and comparison of methods, [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4862-4870
- [14] 李颖,杨帆.细菌的耐药性与适应性[J].中国感染与化疗杂志,2010,1:76-80  
LI Ying, YANG Fan. The resistance and fitness of bacteria [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2010, 1: 76-80

现代食品科技