

# 酸化和渗透压不同处理顺序对肠炎沙门菌失活的影响

董庆利<sup>1</sup> 石育娇<sup>1</sup> 刘 箐<sup>1</sup> 刘阳泰<sup>1</sup> 张春江<sup>2</sup> 刘 弘<sup>3</sup>

(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;

3. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

**摘要:** 为探讨酸化和渗透压不同处理顺序对肠炎沙门菌失活的影响, 运用统计学模型模拟了最优处理条件下, 肠炎沙门菌在不同初始接菌量下的失活过程。实验结果表明: 在 25℃ 和 10 h 内, 先 15% NaCl 再 pH 值 4.5 处理使肠炎沙门菌失活的效果大于相反顺序的处理、同时处理或者单独处理的效果。模拟结果表明: 在最优处理条件下的各个阶段中, 随着初始接菌量的增加, 肠炎沙门菌分别达到 0.986 4 和 0.993 9 失活率时对应的失活时间的变异性逐渐降低。对于大量群体细菌, 用确定性失活动力学一级模型拟合的  $D$  值是单一的定值; 而对少量群体细菌, 由于个体细胞本身的变异性,  $D$  值表现出较高的变异性, 并且可用概率分布的形式表示。酸化和渗透压不同处理顺序的研究能为食品工业生产控制致病菌提供借鉴, 且应用的统计学建模方法有助于从个体细胞的角度理解群体失活过程, 提高风险评估的准确性。

**关键词:** 肠炎沙门菌; 失活; 酸化; 渗透压; 数学模型

**中图分类号:** TS251.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-1298(2016)04-0201-08

## Effect of Processing Sequence of Acid and Osmotic Pressure on *Salmonella enteritis* Inactivation

Dong Qingli<sup>1</sup> Shi Yujiao<sup>1</sup> Liu Qing<sup>1</sup> Liu Yangtai<sup>1</sup> Zhang Chunjiang<sup>2</sup> Liu Hong<sup>3</sup>

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

2. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

3. Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract:** To study the influence of different processing sequences of acid and osmotic pressure on the inactivation of *Salmonella enteritis*, a statistical model was used to simulate the inactivation of *Salmonella enteritis* with different initial inoculations under the optimal processing conditions. The experimental results demonstrated that the sequence of 15% NaCl stress applied firstly and then pH value of 4.5 stress treatment made the number of *Salmonella enteritis* reduce faster than the reverse sequence or single stress or double stresses used simultaneously at 25℃ in 10 h. Moreover, the simulation results indicated that the variability of inactivation time was reduced gradually with the increase of initial inoculation when the inactivation rate of *Salmonella enteritis* reached 0.986 4 and 0.993 9, respectively, at all stages of the optimal processing conditions. In addition, the  $D$  value by the deterministic inactivation model was a single constant value for a large number of bacteria. However, the fitted  $D$  value showed high variability for a small group of bacteria due to the variability of the individual cells, and the  $D$  value could be described by the probability distribution. Consequently, the research of different processing sequences of acid and osmotic stress could provide reference of controlling pathogens for food industry production, and the applied statistical modeling method would help to understand the inactivation from the perspective of individual cells as well as to improve the accuracy of risk assessment.

**Key words:** *Salmonella enteritis*; inactivation; acid; osmotic pressure; mathematical model

收稿日期: 2015-09-14 修回日期: 2015-10-16

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31271896、31371776)、上海市科委重点支撑项目(13430502400)和上海市科委长三角科技联合攻关领域项目(15395810900)

**作者简介:** 董庆利(1979—),男,副教授,主要从事预测微生物学与风险评估研究,E-mail: dongqingli@126.com

## 引言

沙门菌是一种自然界中广泛存在的革兰氏阴性杆菌,主要寄生于人和动物肠道中<sup>[1]</sup>,是一种人畜共患的食源性致病菌<sup>[2]</sup>。近年来全球的食源性疾病频发,在国外由沙门菌引起的食物中毒事件居细菌性食物中毒事件的前列<sup>[3-4]</sup>,而在我国由沙门菌引起的食物中毒事件占细菌性食物中毒事件的70%~80%<sup>[5]</sup>。肠炎沙门菌是一种常见的沙门菌,肠炎沙门菌给人类健康带来的威胁正逐渐高于其他沙门菌带来的威胁<sup>[6]</sup>。因此有效灭活肠炎沙门菌从而减少沙门菌引起的食源性疾病具有研究价值。

食品加工过程中经常会用到热处理、渗透压处理、酸化处理、高静水压力、脉冲电场、辐照、超声波等技术灭活有害微生物<sup>[7]</sup>。在这些加工处理技术中,酸化和渗透压处理是经常用到的加工技术(比如酸和食盐的加入),或者是食品加工中所固有的过程(比如水果的酸度变化、水分蒸发等)<sup>[8]</sup>,这些技术经常同时地或者有顺序地应用于食品加工中,如肉类、牛奶、植物产品的发酵和成熟过程,或者卤制肉产品的干燥过程等<sup>[9-10]</sup>。不同的加工处理顺序会使微生物有不同的失活效果。SHADBOLT等<sup>[11]</sup>在模拟发酵和成熟的过程中发现,先pH值3.5的酸化处理后10% NaCl处理使大肠杆菌失活效果明显地好于相反顺序的处理、同时处理或者单独处理的效果。SHABALA等<sup>[12]</sup>和TIGANITAS等<sup>[13]</sup>等研究也表明:先酸化处理后渗透压处理的顺序分别使单增李斯特菌和鼠伤寒沙门菌失活的效果优于其他处理顺序。但是关于酸化和渗透压不同处理顺序对肠炎沙门菌失活影响的研究未见报道。

近年来,沙门菌失活模型的研究有了较大进展:线性模型、Weibull模型、Baranyi模型、Gompertz模型等广泛用于模拟沙门菌的失活过程<sup>[14-17]</sup>。传统的微生物失活模型大都基于确定性的方法,没有考虑影响微生物行为的变异性<sup>[18]</sup>。近年来关于微生物单细胞生长和分裂的变异性研究较多,已有单细胞分裂模型、随机模型等用来模拟微生物单细胞的生长分裂过程<sup>[19-20]</sup>。ASPRIDOU等<sup>[21]</sup>采用一种统计模型描述和评价了肠炎沙门菌在pH值3.5条件下的失活过程中个体细胞的变异性,未考虑其余更符合真实食品环境的酸度、渗透压等条件。

本文旨在研究酸化和渗透压的不同处理顺序对肠炎沙门菌失活的影响并获得最优的处理顺序,运用统计学模型模拟在不同初始接菌量和最优处理顺序下肠炎沙门菌个体细胞失活的变异性,以期在食

品加工过程中更好地灭活肠炎沙门菌,并从致病菌个体细胞角度更好地理解群体失活过程,完善风险评估体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与菌悬液制备

肠炎沙门菌(ATCC 13076)保存于 $(4 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 冰箱中的大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基上备用。

临用前从TSA培养基上取一环菌苔,接种于100 mL的胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基中,于 $37^\circ\text{C}$ 、110 r/min的摇床上培养16~18 h至菌体浓度达到稳定期。量取10 mL活化后的菌悬液,于 $4^\circ\text{C}$ 、6 000 r/min的离心机中离心10 min,再用10 mL的0.85%无菌生理盐水清洗2次,最后加入适量无菌生理盐水制得菌体浓度为 $10^9$  CFU/mL左右的菌悬液备用。将制备的菌悬液进行一系列的稀释,分别得到 $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU/mL不同初始接菌量的菌悬液。

### 1.2 培养基、试剂与设备

沙门菌选择性(BS琼脂)培养基、TSA培养基、TSB培养基购于青岛海博生物技术有限公司;乳酸、氢氧化钠、氯化钠等均为化学纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

JJ500型电子天平(江苏常熟市双杰测试仪器厂);SW-CJ-1FD型无菌操作台(江苏苏州安泰空气技术有限公司);YXQ-LS-75S11型高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);HWS-150型恒温恒湿培养箱(上海比朗仪器有限公司);THZ-103B型恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);Avanti J-20XP型离心机(上海恪敏生物科技有限公司)等。

### 1.3 酸化和渗透压处理

参考文献[11-13],通过添加NaCl和乳酸制得5种酸度和渗透压不同处理顺序的TSB培养基:①单独渗透压处理(15% NaCl)。②单独酸化处理(pH值4.5)。③渗透压和酸化同时处理(15% NaCl+pH值4.5)。④先渗透压处理再酸化处理(15% NaCl-pH值4.5)。⑤先酸化处理再渗透压处理(pH值4.5-15% NaCl)。

其中培养基①、②、③为常规制备并接种肠炎沙门菌菌悬液,置于 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温摇床上以60 r/min的速度培养。培养基④和⑤制备方法如下:在培养基①和②基础上灭菌、接菌后,分别置于 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温摇床中进行第1阶段的培养。5 h后,进行第2阶段处理:添加乳酸使15% NaCl处理的培养基①的pH值达到4.5,制得培养基④;

添加 NaCl 使 pH 值 4.5 处理的培养基②的 NaCl 质量分数达到 15%, 制得培养基⑤。定时从各处理条件下的培养基中取样, 参照文献[22]测定肠炎沙门菌菌落数, 每种处理条件重复 2 次。

#### 1.4 不同处理条件下肠炎沙门菌失活模型拟合

应用 Origin 9.0 软件(美国 OriginLab 公司)拟合不同处理条件下肠炎沙门菌的失活曲线, 选用的失活动力学一级模型为<sup>[23]</sup>

$$N_t = N_0 \exp(-kt) = N_0 \exp(-t \ln 10 / D) \quad (1)$$

两侧取对数可得

$$\lg N_t = \lg N_0 - t/D \quad (2)$$

式中  $N_t$ 、 $N_0$ ——肠炎沙门菌在  $t$  时刻、0 时刻的菌体浓度, CFU/mL

$k$ ——失活速率,  $\text{h}^{-1}$

$D$ ——将微生物杀灭 90% 所需时间, h

#### 1.5 最优处理条件的获得

应用 DPS 7.05 软件(中国)和 SPSS 17.0 软件(美国 IBM 公司)分别分析不同处理条件对肠炎沙门菌失活效果的显著性和失活模型参数  $D$  值影响的显著性, 进而得到 pH 值 4.5 和 15% NaCl 不同处理顺序中的最优处理条件。

#### 1.6 肠炎沙门菌失活时间概率分布的拟合

在最优处理条件下, 参照文献[21], 将各个阶段中失活曲线的纵坐标  $N_t$  转换为  $(N_0 - N_t)/N_0$ , 进而得到  $(N_0 - N_t)/N_0$  随失活时间  $t$  变化的累积概率。用 @ Risk 5.5 软件(美国 Palisade 公司)将失活时间  $t$  和累积概率  $(N_0 - N_t)/N_0$  拟合 BetaGeneral、Gamma 等一系列连续的分布, 通过评价均方根误差获得各处理阶段下失活时间  $t$  的最优概率分布<sup>[24]</sup>。

#### 1.7 不同初始接菌量下肠炎沙门菌失活过程模拟

基于蒙特卡罗(Monte Carlo)随机抽样法, 参照文献[21], 将以上所得失活时间  $t$  的最优概率分布用于预测不同初始接菌量( $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU/mL)和最优处理条件下, 肠炎沙门菌群体降低一定程度时的失活时间。

假定在每一次模拟中, 迭代的次数等于失活的细胞数目, 模拟的次数代表群体失活行为的变异性。当细菌初始接菌量为  $N_0$  时, 在某一特定条件下失活了  $n$  个细胞, 可从失活时间( $t_i$ )服从的最优概率分布中随机选取  $n$  个时间值, 假设每 2 个时间值之间群体失活一个细胞。将所选的时间值进行排序, 从而获得某一时刻时失活细胞的总数目。以上的失活过程用公式表示为

$$N_{t_i} = N_0 - \text{rank}(t_i) \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (3)$$

式中  $N_{t_i}$ ——最优处理条件下, 第 1 阶段或第 2 阶段在  $t_i$  时刻对应的菌体浓度, CFU/mL

$t_i$ ——最优处理条件下, 第 1 阶段或第 2 阶段细菌失活时间最优概率分布下的不同时刻

在最优处理条件下, 将第 1 阶段处理结束时每个初始接菌量对应的失活时间用 @ Risk 5.5 软件拟合 Uniform、Expon 等分布, 根据  $\chi^2$  检验得到最优概率分布<sup>[25]</sup>。假定以最优概率分布的预测值作为第 1 阶段结束时间的代表值, 进行第 2 阶段失活过程的模拟。重复 100 次以上的模拟过程,  $N_{t_i}$  随  $t_i$  的变化情况采用 Origin 9.0 软件(美国 OriginLab 公司)制图。

为更好地展现不同初始接菌量下肠炎沙门菌失活的变异性, 在最优处理条件下, 将各个处理阶段结束时肠炎沙门菌的失活时间用 Origin 9.0 软件制作出相对频率图。

#### 1.8 不同初始接菌量下肠炎沙门菌失活模型拟合

在最优处理条件下, 采用 Origin 9.0 软件, 用式(2)拟合肠炎沙门菌在不同初始接菌量下的失活曲线, 以研究肠炎沙门菌的失活动力学。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸化和渗透压不同处理顺序对肠炎沙门菌失活的影响

由图 1 可看出, 在 25°C 和 10 h 内, 5 种不同处理条件使肠炎沙门菌失活的效果有显著性差异( $p < 0.05$ )。其中, 15% NaCl - pH 值 4.5 处理与 15% NaCl 处理对肠炎沙门菌的失活影响分别显著大于其他 3 种处理的影响( $p < 0.05$ )。且 25°C 和 10 h 内, 肠炎沙门菌在 15% NaCl - pH 值 4.5 处理下失活的菌落数大于 15% NaCl 处理下失活菌落数。故在 25°C 和 10 h 内, 5 种使肠炎沙门菌失活的处理条件以 15% NaCl - pH 值 4.5 处理最优。

### 2.2 不同处理顺序下肠炎沙门菌的失活模型参数

拟合不同处理顺序下肠炎沙门菌的失活模型参数如表 1 所示。由表 1 可知, 在不同处理阶段下, 决

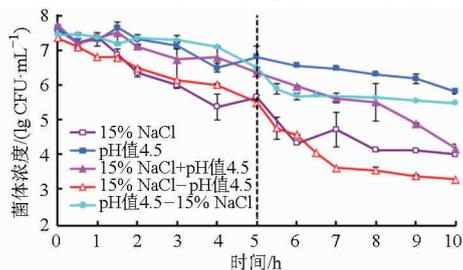


图 1 不同酸化和渗透压的处理顺序下肠炎沙门菌的失活曲线

Fig. 1 Survival curves of *Salmonella enteritidis* under various acid and osmotic pressure applied singly, sequentially or simultaneously

定系数  $R^2$  较高(0.78 以上),表明式(2)能较好地拟合沙门菌的失活过程。由单因素方差分析可知, $D$  值在不同阶段内分别存在显著性差异( $p < 0.05$ )。在 15% NaCl-pH 值 4.5 处理条件下,第 1 阶段处理中  $D$  值为 2.652 h,较小于其他条件下的  $D$  值;第 2 阶段处理中  $D$  值为 1.767 h,显著小于其他条件下的  $D$  值。故由  $D$  值差异显著性可知,在 25℃ 和 10 h 内,5 种使肠炎沙门菌失活的处理条件以 15% NaCl-pH 值 4.5 处理最优。结合表 1 和图 1,以下研究以 15% NaCl-pH 值 4.5 处理为使肠炎沙门菌在 25℃

表 1 不同处理条件下肠炎沙门菌失活模型的参数估计值

Tab.1 Parameters estimation values of inactivation model of *Salmonella enteritidis* under various pH values and NaCl stresses

处理条件	第 1 阶段(0~5 h)			第 2 阶段(5~10 h)		
	D/h	$R^2$		D/h	$R^2$	
		最大值	最小值		最大值	最小值
15% NaCl	2.086 ± 0.157 <sup>a</sup>	0.971	0.941	2.487 ± 0.020 <sup>ac</sup>	0.861	0.850
pH 值 4.5	5.156 ± 0.841 <sup>b</sup>	0.824	0.806	5.555 ± 0.172 <sup>b</sup>	0.984	0.978
15% NaCl + pH 值 4.5	3.727 ± 0.808 <sup>bc</sup>	0.917	0.819	2.585 ± 0.116 <sup>c</sup>	0.996	0.912
15% NaCl-pH 值 4.5	2.652 ± 0.085 <sup>c</sup>	0.989	0.987	1.767 ± 0.079 <sup>d</sup>	0.913	0.887
pH 值 4.5-15% NaCl	7.832 ± 0.116 <sup>d</sup>	0.785	0.783	3.912 ± 0.193 <sup>e</sup>	0.807	0.798

注:同列不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

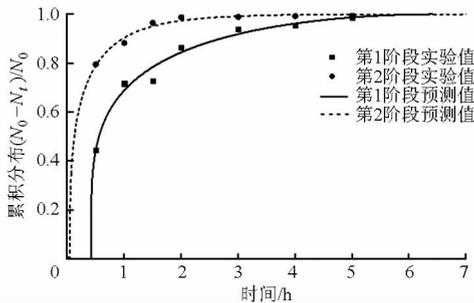


图 2 肠炎沙门菌在 15% NaCl-pH 值 4.5 各阶段下失活时间的累积分布图

Fig.2 Cumulative distribution of inactivation times of *Salmonella enteritidis* under each stage in 15% NaCl and pH value of 4.5 stress

## 2.4 不同初始接菌量下肠炎沙门菌个体细胞失活的变异性

在选定的最优处理条件下(15% NaCl-pH 值 4.5),当每个阶段处理结束时,肠炎沙门菌的失活率分别为 0.986 4 和 0.993 9。则当第 1 阶段初始接菌量分别为  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU/mL 时,对应的失活细胞数目取整分别为 10、99、986、9 864 CFU/mL。当第 2 阶段初始接菌量分别为 0、1、14、136 CFU/mL 时,对应的失活细胞数目取整分别为 0、1、14、135 CFU/mL。

在选定的最优处理条件下(15% NaCl-pH 值 4.5),由图 2 可知,当累积概率  $(N_0 - N_t)/N_0$  在第 1、第 2 阶段分别达到 0.986 4 和 0.993 9 时,所对应的

和 10 h 内失活的最优条件。

## 2.3 肠炎沙门菌失活时间的概率分布

在选定的最优处理条件下(15% NaCl-pH 值 4.5),第 1 阶段的失活时间拟合 BetaGeneral、Gamma 等分布的均方根误差分别为 0.024 6、0.026 2 等,其中以 BetaGeneral(0.230, 1.814, 0.416, 6.451) 分布最优。第 2 阶段的失活时间拟合 BetaGeneral、Gamma 等分布的均方根误差分别为 0.015 8、0.010 5 等,以 Gamma(0.302,1.041) 分布最优。各阶段失活时间最优概率分布的累积分布图(CDF)如图 2 所示。

最大失活时间分别为 4.968 h 和 3.245 h。故模拟过程中,2 个阶段的失活时间分别介于 0 时刻和最大失活时间之间。

在最优处理条件下(15% NaCl-pH 值 4.5),当  $N_0$  为  $10^3$  CFU/mL 时,第 1 阶段处理结束时的失活时间拟合 Uniform、Expon 等分布的  $\chi^2$  值分别为 147.06、372.78 等,以 Uniform(4.691, 4.971) 分布最优; $N_0$  为  $10^4$  CFU/mL 时,第 1 阶段处理结束时的失活时间拟合 Uniform、Expon 等分布的  $\chi^2$  值分别为 819.84、819.82 等,以 Expon(0.024 2) 分布最优。故将 2 个最优分布的预测值 4.831 h、4.966 h 分别作为  $10^3$  CFU/mL、 $10^4$  CFU/mL 初始接菌量下第 1 阶段处理结束时的时间。模拟结果如图 3 所示。

图 3 展示了在不同初始接菌量和最优处理条件下,肠炎沙门菌失活时间的变异性。在各个阶段中,随着初始接菌量增加,肠炎沙门菌的失活曲线逐渐集中,失活时间的变异性降低。与失活过程相对应,微生物生长过程中的变异性也会随着初始接菌量的增加而降低,最后呈现出确定性生长状态。本文研究结论与 KOUTSOUMANIS 等<sup>[26]</sup>对沙门菌单细胞在不同初始接菌量下随机生长规律的研究相似。

由图 3a 和图 3b 可看出,当初始接菌量分别为 10 CFU/mL、 $10^2$  CFU/mL 时,第 1 阶段 15% NaCl 处理的肠炎沙门菌分别达到 0.986 4 的失活率时,所剩菌体浓度分别为 0、1 CFU/mL,细菌已基本完全失

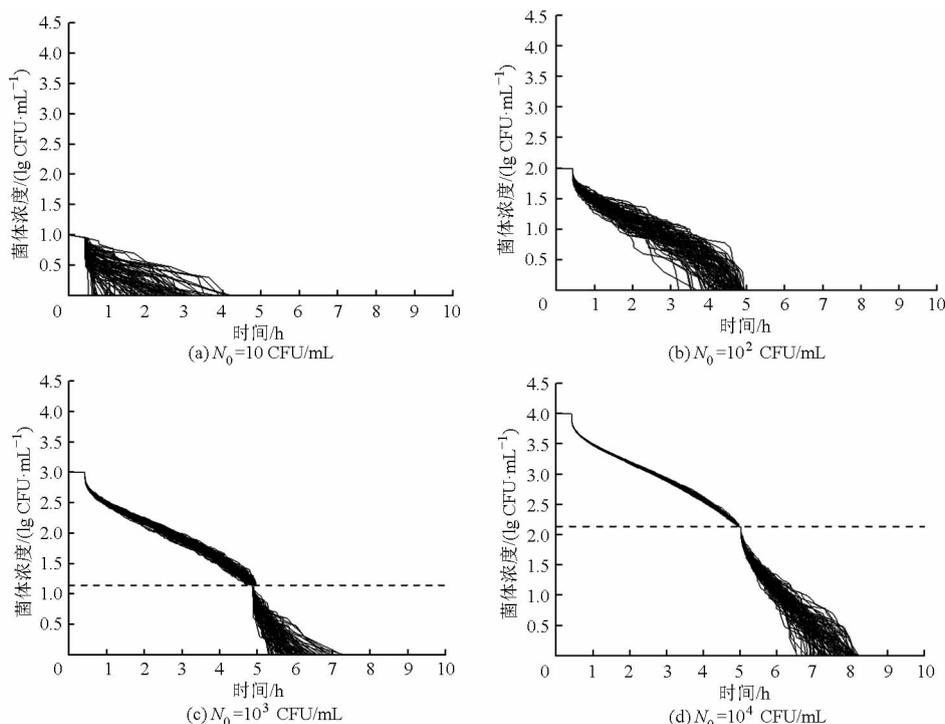


图 3 不同初始接菌量下肠炎沙门菌的失活情况

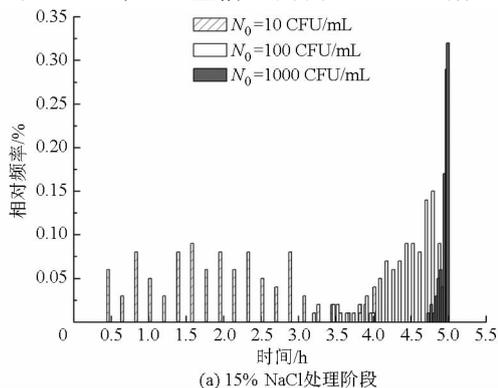
Fig. 3 Inactivation of *Salmonella enteritidis* with different initial concentrations

活,故无第 2 阶段的模拟过程。

图 4 展现了最优处理条件下 (15% NaCl - pH 值 4.5),不同处理阶段结束时肠炎沙门菌失活时间的变异性。由图 4 可知,最优处理条件下,当各个阶段处理结束时,随着初始接菌量的增加,肠炎沙门菌失活时间的分布范围变窄,失活时间变长,失活变异性降低。

### 2.5 不同初始接菌量下肠炎沙门菌的失活模型参数

图 5 反映了不同初始接菌量和 15% NaCl - pH 值 4.5 各个处理阶段中肠炎沙门菌的失活模型参数。由图 5 可知:在各处理阶段下, $D$  值的累积分布随初始接菌量的降低逐渐变宽;15% NaCl 处理阶段中,随着初始接菌量的降低, $D$  值的变异系数从 1.0% 增加到 35.8%,95% 置信区间由 2.647 h 增加



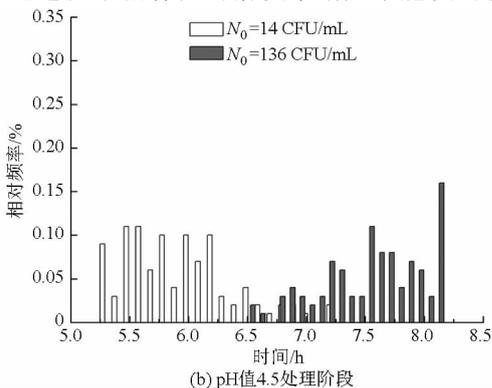
(a) 15% NaCl 处理阶段

到 3.767 h;在 pH 值 4.5 处理阶段中, $D$  值的变异系数从 12.8% 增加到 38.0%,95% 置信区间由 1.229 h 增加到 1.647 h。本文中应用的统计学建模方法表明:在某一环境条件下,失活过程中的  $D$  值是累积分布的形式而不是一个确定的值。

## 3 讨论

### 3.1 肠炎沙门菌在酸化和渗透压不同处理顺序下的失活机理

细菌应对低酸和高渗透压的反应机理不同:在低酸环境下,细菌为了维持细胞内 pH 值的平衡,需要释放  $H^+$ ,从而导致 ATP 降低,需消耗能量,故细菌在低酸环境中逐渐失活;在高渗透压环境下,细菌通过积累相容性的溶质来增加细胞质的渗透性或保



(b) pH 值 4.5 处理阶段

图 4 不同初始接种量下的肠炎沙门菌在 15% NaCl - pH 值 4.5 处理中各个阶段结束时的失活时间变异性

Fig. 4 Variability of inactivation time of *Salmonella enteritidis* at the end of each stage in 15% NaCl and pH value of 4.5 stress with different initial concentrations

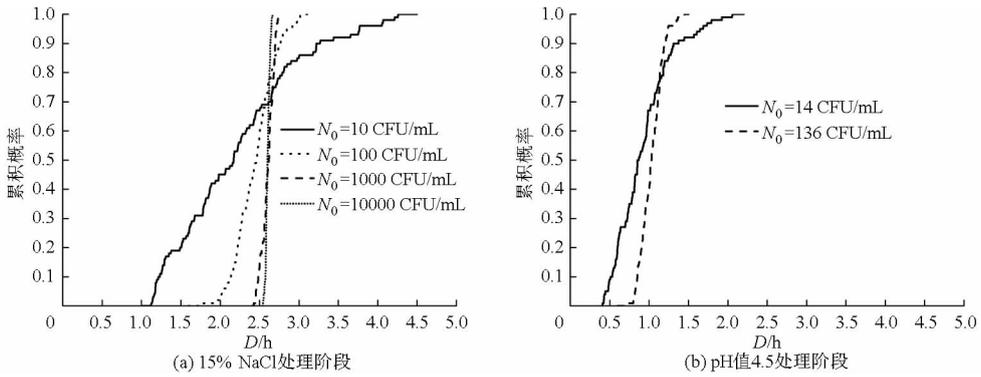


图5 不同初始接菌量下肠炎沙门菌在15% NaCl-pH值4.5处理中D值的累积分布图

Fig. 5 Cumulative distribution of D-value of *Salmonella enteritidis* with different initial concentrations in 15% NaCl and pH value of 4.5 stress

护细胞的新陈代谢从而抵抗高渗环境<sup>[27-28]</sup>。

本文研究结果表明,15% NaCl-pH值4.5这一处理顺序是使肠炎沙门菌在25℃和10h内失活的最优条件。但已有的研究显示,先酸化后渗透压处理使细菌失活的效果要优于相反顺序处理、单独处理或者同时处理的效果<sup>[11-13]</sup>。本文与已有研究结论有所不同的原因有:

(1)参数选择不同。发酵肉制品所需的pH值为4.5~5.5,所需的水分活度大多在0.9以下<sup>[29-30]</sup>。故本文选取pH值4.5和15% NaCl的参数更符合实际情况。而已有文献<sup>[11-13]</sup>选取的pH值3.5或者10% NaCl参数与真实的食品环境略有偏差。同时由ASPRIDOU等<sup>[21]</sup>的研究可知,肠炎沙门菌在25℃和pH值3.5条件下,失活时间在200min以内。故肠炎沙门菌在25℃和单独pH值3.5的条件下不可能存活10小时甚至几百小时。所以不同的实验参数会有不同的实验结果<sup>[31]</sup>。

(2)菌种差异性。文献<sup>[11-13]</sup>研究的是大肠杆菌、单增李斯特菌、鼠伤寒沙门菌在不同酸和渗透压下的失活情况,而本文研究的是肠炎沙门菌的失活情况。且BERK<sup>[32]</sup>等研究发现,37株不同血清型的鼠伤寒沙门菌(DT104)分别在pH值2.5条件下处理2h后,表现出不同程度的耐酸性:6株高耐酸性,14株中等耐酸性,17株低耐酸性。SHABALA等<sup>[12]</sup>在挑选可耐受高渗环境的单增李斯特菌研究中发现:127株不同血清型的单增李斯特菌中,有多于85%的菌株可耐受11.2% NaCl环境,有25%的菌株可耐受13% NaCl环境,有4.7%菌株可耐受13.9%高渗环境。故由于菌属不同和菌株的差异性,细菌对酸和盐耐受性也可能不同<sup>[33-34]</sup>。

(3)环境因素的交互作用不同。当环境中的pH值较高时,细菌在高渗透压条件下能够积累较多的可溶性溶质来抵抗高渗透环境<sup>[11-13]</sup>。当高渗透压作为第2步处理时,细胞在低pH值环境下积累

所需相容性溶质的能力会降低<sup>[35]</sup>。故先低酸处理后高渗透压处理对细菌有较好的失活效果。但是SHABALA等<sup>[12]</sup>表明这一理论不能很好地解释不同细菌应对低酸和高渗透压不同处理顺序的反应,所以低酸和高渗透压哪一种处理顺序使细菌失活效果更好有待进一步研究。

LEISTENER<sup>[36]</sup>曾提到,参数的结合会产生协同作用,从而促进微生物的生长或者失活。但是本实验中,pH值4.5+15% NaCl条件使肠炎沙门菌的失活的效果介于单独pH值4.5和单独15% NaCl处理之间,而不是大于2种单独处理的效果。故本实验中参数的协同作用不显著,这一研究结论与SHADBOLT等<sup>[11]</sup>的研究结论相似。

### 3.2 试验试剂及参数的选择

在动物性食品加工过程中,经常采用乳酸来调节食品体系的pH值;相比用HCl作酸化剂,乳酸还可消除由Cl<sup>-</sup>带来的干扰影响。故试验中选用乳酸来调节体系的pH值。同时在微生物消耗碳源——葡萄糖的过程中,葡萄糖的分解会影响体系的pH值,所以试验中采用不含葡萄糖的TSB培养基,以减少体系中pH值变化所带来的影响。为获得pH值4.5-15% NaCl或15% NaCl-pH值4.5的处理顺序,本研究对肠炎沙门菌有2个阶段的处理:先将肠炎沙门菌进行单独pH值4.5或单独15% NaCl处理,然后在单独处理的基础上分别进行15% NaCl或pH值4.5处理。本研究总观测时间为10h,以5h为分界点是为了研究当试验时间进行1/2时,肠炎沙门菌在pH值和NaCl不同处理顺序下的失活情况。

### 3.3 失活模型的选择

传统的微生物失活模型大多基于确定性的方法,如失活动力学一级模型等,而确定性的方法只能提供点的理解<sup>[19]</sup>。但是加工条件中的变异性、食品特性的变异性、储存条件的变异性等都会影响微生物

物的行为,故确定性的方法不能很好地理解微生物的行为。本文运用统计学模型,将微生物本身作为变异性来源之一,模拟结果表明:在某一环境条件下,微生物在失活过程中表现出了较高的变异性,同时拟合的失活模型参数  $D$  值是累积分布的形式而不是一个单一的定值。此统计学模型将有助于更好地理解失活过程,降低风险评估中的不确定性。

## 4 结束语

研究了不同酸化和渗透压的处理顺序对肠炎沙

门菌的失活情况,经显著性分析得到:肠炎沙门菌在  $25^{\circ}\text{C}$  和  $10\text{ h}$  内失活的最优条件为  $15\% \text{ NaCl}-\text{pH}$  值  $4.5$  处理。应用统计学模型得到了肠炎沙门菌在不同初始接菌量和最优处理顺序下失活时间的变异性:随着初始接菌量的增加,肠炎沙门菌失活时间的变异性逐渐降低。本文研究的内容与肉制品、奶酪等食品的发酵、成熟和干燥等过程有关<sup>[37]</sup>。这将会对食品工业有借鉴作用,并可从致病菌个体细胞变异性的角度,提高风险评估的准确性。

## 参 考 文 献

- 1 邱全琰,关洪全. 医学免疫学与病原生物学[M]. 北京:科学出版社,2005.
- 2 赵瑞兰. 沙门氏菌预测模型的建立及出口分割鸡肉中沙门氏菌的风险分析[D]. 泰安:山东农业大学,2005.
- 3 TREVEJO R T, COURTNEY J G, STARR M, et al. Epidemiology of *Salmonellosis* in California, 1990 - 1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2003, 157(1): 48 - 57.
- 4 YANG B W, QU D, ZHANG X L, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella serovars* in retail meats of marketplace in Shaanxi, China [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141 (1 - 2): 63 - 72.
- 5 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J]. *中国动物检疫*, 2007, 24(4): 23 - 25.
- 6 COGAN T A, HUMPHREY T J. The rise and fall of *Salmonella enteritidis* in the UK[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(Supp. 1): 114 - 119.
- 7 LEISTNER L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55(1 - 3): 181 - 186.
- 8 JORDAN K N, DAVIES K W. Sodium chloride enhances recovery and growth of acid-stressed *E-coli* O157: H7 [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 32(5): 312 - 315.
- 9 NIKSIC M, NIEBUHR S E, DICKSON J S, et al. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 during sauerkraut fermentation [J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(7): 1367 - 1374.
- 10 YOON Y, SKANDAMIS P N, KENDALL P A, et al. A predictive model for the effect of temperature and predrying treatments in reducing *Listeria monocytogenes* populations during drying of beef jerky [J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(1): 62 - 70.
- 11 SHADBOLT C, ROSS T, MCMEEKIN T A. Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 32(2): 99 - 102.
- 12 SHABALA L, LEE S H, CANNESON P, et al. Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(6): 1169 - 1177.
- 13 TIGANITAS A, ZEAKI N, GOUNADAKI A, et al. Study of the effect of lethal and sublethal pH and  $a_w$  stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 134 (1 - 2): 104 - 112.
- 14 JUNEJA V K, GONZALES-BARRON U, BUTLER F, et al. Predictive thermal inactivation model for the combined effect of temperature, cinnamaldehyde and carvacrol on starvation-stressed multiple *Salmonella serotypes* in ground chicken [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(2): 184 - 199.
- 15 SKANDAMIS P N, YOON Y, STOPFORTH, et al. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(2): 294 - 303.
- 16 LIAO H, KONG X Z, ZHANG Z Y, et al. Modeling the inactivation of *Salmonella typhimurium* by dense phase carbon dioxide in carrot juice [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(1): 94 - 100.
- 17 YOON Y, GEORNARAS Y, KENDALL P A, et al. Modeling the effect of marination and temperature on *Salmonella* inactivation during drying of beef jerky [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(4): M165 - M171.
- 18 MEMBRÉ J M, AMÉZQUITA A, BASSETT J, et al. A probabilistic modeling approach in thermal inactivation: estimation of postprocess *Bacillus cereus* spore prevalence and concentration [J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(1): 118 - 129.
- 19 PIN C, BARANYI J. Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2163 - 2169.
- 20 ALONSO A A, MOLINA I, THEODOROPOULOS C. Modeling bacterial population growth from stochastic single-cell dynamics [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(17): 5241 - 5253.
- 21 ASPRIDOU Z, KOUTSOUMANIS K P. Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation [J]. *Food Microbiol*, 2015, 45(Part B): 216 - 221.

- 22 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 2-2010 食品安全国家标准 卫生微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 23 董庆利. 食品预测微生物学-过去 现在 将来[J]. 农产品加工, 2009(3): 38-41.  
DONG Qingli. Predictive food microbiology: past, present and future[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2009(3): 38-41. (in Chinese)
- 24 董庆利, 王海梅, MALAKAR K P, 等. 气单胞菌在不同食物接触表面的存活与交叉污染[J]. 农业机械学报, 2015, 46(3): 228-234.  
DONG Qingli, WANG Haimei, MALAKAR K P, et al. Survival and cross-contamination of *Aeromonas spp.* on different food contacts[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(3): 228-234. (in Chinese)
- 25 KARL P. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling [J]. Philosophical Magazine Series, 1990, 50 (302): 157-175.
- 26 KOUTSOUMANIS K P, LIANO A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2294-2301.
- 27 SHABALA L, BUDDE B, ROSS T, et al. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1794-1802.
- 28 WOOD J M, BREMER E, CSONKA L N, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2001, 130(3): 437-460.
- 29 STOPFORTH J D, YOON Y, BARMALIA I M, et al. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(3): 309-319.
- 30 张兰威. 发酵食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
- 31 SAMELIS J, IKEDA J S, SOFOS J N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3): 563-575.
- 32 BERK P A, DE JONGE R, ZWIETERING M H, et al. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* DT104[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(4): 859-866.
- 33 KARACA B, AKCELIK N, AKCELIK M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey[J]. Biologia, 2013, 68(1): 1-10.
- 34 MATTICK K L, JORGENSEN F, LEGAN J D, et al. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* Serovar *enteritidis* PT4 and *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* DT104 at low water activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1274-1279.
- 35 FARWICK M, SIEWE R M, KRAMER R. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(16): 4690-4695.
- 36 LEISTNER L. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation[J]. Journal of Food Engineering, 1994, 22(1-4): 421-432.
- 37 ARGYRI A A, LYRA E, PANAGOUE E Z, et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine[J]. Food Microbiology, 2013, 36(1): 1-6.