

# 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件

刘代新<sup>1</sup> 宁喜斌<sup>1\*</sup> 张继伦<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学食品学院 上海 200090)

(2. 上海出入境检验检疫局 上海 201202)

**摘要:** 通过单因素分析, 确定最适于副溶血性弧菌 VPJ33 生长的 pH、温度和盐度。在此基础上, 综合考虑 3 个因素对 VPJ33 生长的影响, 用 Design-Expert 软件进行响应面分析, 优化 VPJ33 的培养条件得到了菌体生长模型, 以及取得模型最优值时各因素的水平。结果表明, VPJ33 的最优培养条件为: pH 8.41、温度 34.1℃ 和盐度 2.47%; 菌体生长过程中, pH 和盐度以及 pH 和温度对 VPJ33 生长的交互作用显著, 盐度和温度对 VPJ33 生长的交互作用不显著。菌体生长模型达到显著水平, 可以对 VPJ33 在不同条件下的生长情况进行分析和预测。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 响应面, 生长条件

## Optimization of Growth Condition of *Vibrio parahaemolyticus* via Response Surface Methodology

LIU Dai-Xin<sup>1</sup> NING Xi-Bin<sup>1\*</sup> ZHANG Ji-Lun<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

(2. Shanghai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 201202)

**Abstract:** In this paper, the optimum pH, temperature and salinity for VpJ33 growth were determined through singe-factor analysis respectively and the Response Surface Methodology (RSM). The multivariate non-linear model was applied to study the interactions and optimization of the growth parameters for VpJ33 which were explored by experiments. The experimental results showed that the optimum conditions for germination as follows: pH 8.41, temperature 34.1℃ and salinity 2.47%. Significant interactions between pH and salinity, as well as pH and temperature were found during the germination respectively, otherwise the relationship between salinity and temperature was relatively unapparent. The experimental results indicated that the proposed model is reasonably accurate and can be used for describing and predicting the growth feature of VPJ33 in different outside environmental factors.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Response Surface Methodology, Growth Condition

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP)是广泛分布于近海区域、盐湖及海产品中的嗜盐

性细菌, 是沿海地区引起食物中毒的重要病原菌, 可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧

等典型胃肠炎反应, 严重者可引起败血症<sup>[1]</sup>。人多因食用被本菌污染而又未煮熟的海产品而引起中毒。在细菌性食物中毒中, 比例高、危害大<sup>[2]</sup>。国家食源性疾病预防网数据显示, 沿海省份, 副溶血性弧菌引起的食物中毒, 在发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势, 已经高居微生物性食物中毒首位<sup>[3]</sup>。

响应面法(Response Surface Methodology, 简称RSA)是利用合理的试验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优条件参数, 解决多变量问题的一种统计方法<sup>[4,5]</sup>。应用 Design-Expert 6.0 软件系统对试验数据进行统计分析, 拟合曲线、建立数学模型, 利用其提供的三维立体图形, 观察响应曲面, 进一步求得试验的最佳化<sup>[6]</sup>。本文在研究影响副溶血性弧菌 VPJ33 生长的 pH、盐度和温度 3 个单因素初步实验的基础上, 应用响应面分析法, 以 pH、盐度、温度为响应因子, 以菌体浓度对应的 OD 值为响应值, 用 Design-Expert 6.0 的 Box-Behnken 设计建立响应曲面模型, 来优化副溶血性弧菌 VPJ33 的生长条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

1.1.1 试验菌株: 副溶血性弧菌 VPJ33, 本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及培养基: NaOH(化学纯)(上海凌风化学试剂公司); NaCl(分析纯)(上海埃彼化学试剂有限公司); 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)(上海市疾病预防控制中心)

1.1.3 主要仪器: 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); 台式 pH 精密测试仪(德国 WTW); UV2300 分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌体生长的测定: VPJ33 培养 18 h 后, 取一环接种于 5 mL 3.5%NaCl TSB, 做 2 组平行, 培养后测 OD<sub>600</sub>。

1.2.2 单因素试验: (1)pH 对菌体生长的影响: 5 mL 的 3.5%NaCl TSB 的 pH 分别调为 5.00、6.00、7.00、7.50、8.00、8.50、9.00 和 10.00 接种, 37 °C 下培养, 每隔 1h 取样, 600 nm 下测吸光度。(2)温度(T)对菌体生长的影响: 取一环 VPJ33 接种于 5 mL 的 3.5%

NaCl TSB, 分别在 10 °C、20 °C、25 °C、30 °C、34 °C、37 °C 和 42 °C 下培养, 每隔 1h 取样, 600 nm 下测吸光度。(3)盐度(S)对菌体生长的影响: TSB 配制成盐度为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10% 的培养基, 接种后, 37 °C 下培养, 每隔 1h 取样, 600nm 下测吸光度。

1.2.3 响应面试验: 通过对影响 VPJ33 生长的单因素分析, 确定在单因素条件下适合 VPJ33 生长的 pH、温度、盐度范围, 再用 Design-Expert 软件进行响应面分析, 优化 VPJ33 的生长条件, 并且在响应面分析法得到的 VPJ33 最佳生长条件下, 测定培养 8 h 后的 OD<sub>600</sub>, 平行做 3 次验证试验, 证实响应面分析方法可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

2.1.1 pH 对菌体生长的影响: 由图 1 可见, 酸性(pH 5~6)以及强碱(pH 10)条件下, 不适宜 VPJ33 的生长, pH 5 基本不生长; 中性及弱碱性(pH 7~9)条件下适宜 VPJ33 的生长, 8h 菌体的 OD<sub>600</sub> 约 1.400。因此, 选择 pH 7~9 为最适生长条件。

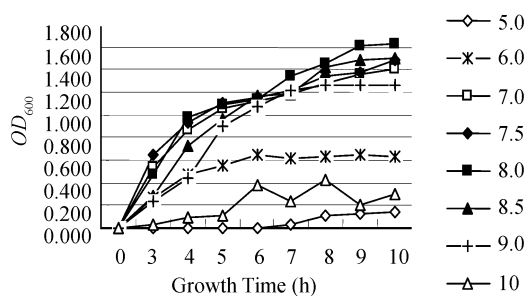


图 1 pH 对 VPJ33 生长的影响

Fig.1 Effect of the pH on growth of VPJ33

2.1.2 温度(T)对菌体生长的影响: 由图 2 可见, 温度较低(10 ~25 °C)及较高(42 °C), 不适宜 VPJ33 的生长, 10 °C 基本不生长; 温度在 30 ~37 °C 时, 适宜 VPJ33 的生长, 8 h 菌体的 OD<sub>600</sub> 约 1.200。因此, 选择 30 ~37 °C 为最适生长条件。

2.1.3 盐度(S)对菌体生长度的影响: 由图 3 可见, 盐度太低(1%)或太高(5%~10%), 不适宜 VPJ33 的生长, 10%基本不生长; 盐度 2%~4%适宜 VPJ33 的生长, 8 h 菌体 OD<sub>600</sub> 约 1.600。因此, 选择盐度 2%~4%为最适生长条件。

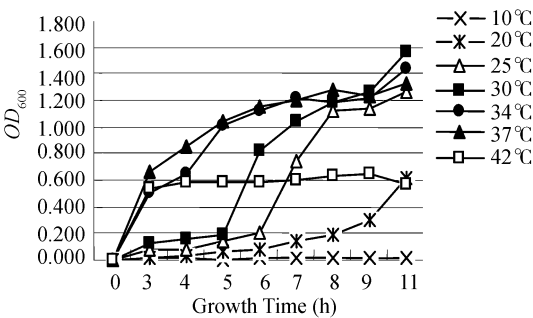


图 2 温度对 VPJ33 生长的影响  
Fig. 2 Effect of the temperature on growth of VPJ33

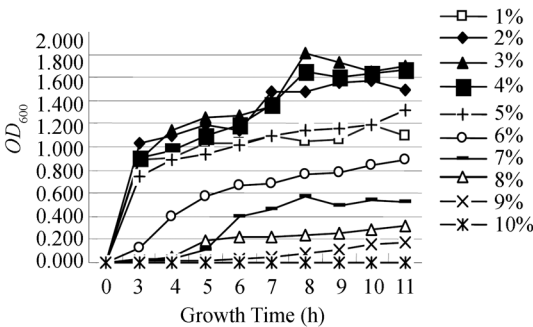


图 3 盐度对 VPJ33 生长的影响  
Fig.3 Effect of the salinity on growth of VPJ33

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面分析方案与试验结果：对影响 VPJ33

生长的 pH、温度和盐度进行了三因素三水平响应面分析试验，试验设计与结果见表 1 和表 2，其中  $OD_{600}$  是在各条件下培养 8h 的值。利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合，得到  $OD_{600}$  预测值 Y 对编码自变量 A、B 和 C 的二次多项回归方程：

$$Y=1.50+0.035A-0.097B+0.040C-0.020AB+0.021AC-0.013BC-0.030A^2-0.11B^2-0.18C^2$$

对上述回归模型进行方差分析(表 3)，结果表明，模型是显著的( $P=0.0207<0.0500$ )，回归模型的决定系数为 0.9293，说明该模型能够解释 92.93%的变化。因此，可用此模型对 VPJ33 不同条件下的生长情况进行分析和预测。

表 1 响应面三因素三水平试验设计				
Table 1 The experiment design of 3 factors and 3 levels of response surface method				
因素(Factors)	编码 (Encode)	水平(Levels)		
		+1	0	-1
pH	A	8.50	8.00	7.50
盐度 (%) Salinity	B	4	3	2
温度 ( ) Temperature	C	30	33.5	37

表2 响应面分析方案与试验结果					
Table 2 Experimental result and scheme of response surface method					
序号 No.	因素 Factors			$OD_{600}$	
	A (pH)	B (盐度) Salinity	C (温度) Temperature	实际值 Measured value	预测值 Predicted value
1	-1.00	-1.00	0.00	1.45	1.40
2	-1.00	1.00	0.00	1.56	1.51
3	1.00	-1.00	0.00	1.20	1.25
4	1.00	1.00	0.00	1.23	1.28
5	0.00	-1.00	-1.00	1.23	1.24
6	0.00	-1.00	1.00	1.25	1.27
7	0.00	1.00	-1.00	1.29	1.28
8	0.00	1.00	1.00	1.40	1.39
9	-1.00	0.00	-1.00	1.22	1.25
10	1.00	0.00	-1.00	1.14	1.08
11	-1.00	0.00	1.00	1.30	1.36
12	1.00	0.00	1.00	1.18	1.14
13	0.00	0.00	0.00	1.50	1.50
14	0.00	0.00	0.00	1.50	1.50
15	0.00	0.00	0.00	1.51	1.50

表3 回归模型方差分析  
Table 3 Analysis of variance with regression model

变异来源 Source	平方和SS	自由度DF	均方MS	F 值 F value	P 值(显著水平) Prob> F	显著的 Significance level
模型Model	0.26	9	0.028	7.30	0.0207	*
A	0.00966	1	0.00966	2.48	0.1761	
B	0.075	1	0.075	19.38	0.0070	
C	0.013	1	0.013	3.31	0.1286	
AB	0.00164	1	0.00164	0.42	0.5450	
AC	0.001722	1	0.001722	0.44	0.5355	
BC	0.00063	1	0.00063	0.16	0.7053	
A <sup>2</sup>	0.0033	1	0.0033	0.85	0.3992	
B <sup>2</sup>	0.047	1	0.047	12.03	0.0179	
C <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	30.09	0.0027	
残差Residual	0.019	5	0.0039			
总变异Cor Total	0.28	14				

Note : R<sup>2</sup> = 0.9293    Adj R<sup>2</sup> = 0.8020

2.2.2 菌体生长条件的优化 :利用 Design-Expert 软件对表 2 的数据进行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程的响应面及其等高线见图 4~6。从图 4、图 5、图 6 可以直观地看出, pH 和盐度以及 pH 和

温度对 VPJ33 生长的交互作用显著; 盐度和温度对 VPJ33 生长的交互作用不显著。因为等高线的形状反映交互效应的强弱大小, 圆形表示两个因素交互作用不显著, 椭圆形表示两个因素交互作用显

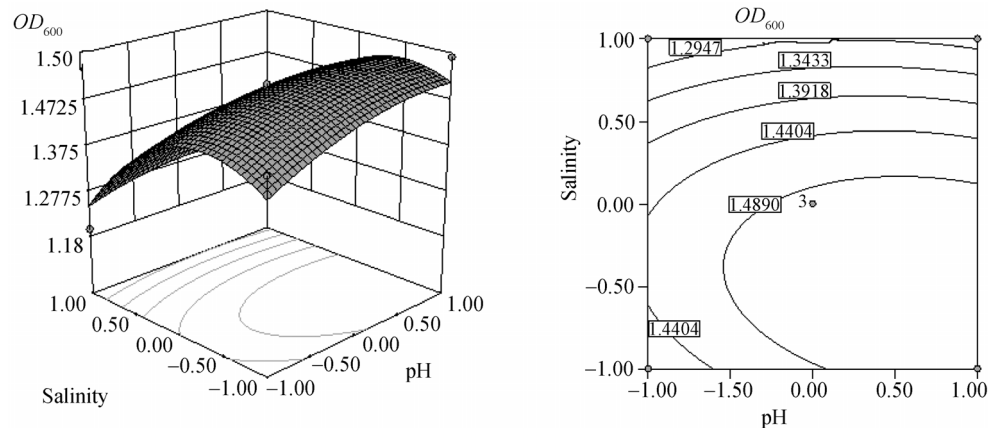


图 4 pH 和盐度交互作用对 VPJ33 生长的影响  
Fig.4 Effect of interaction between the pH and salinity on growth of VPJ33

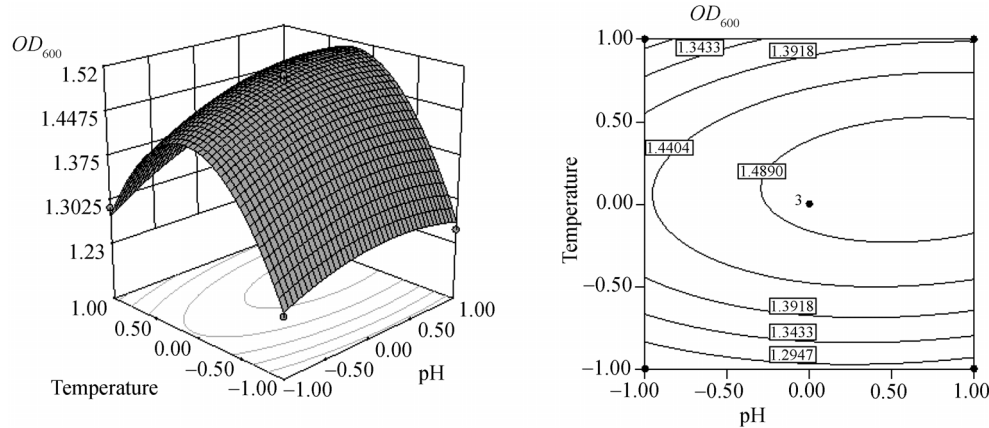


图 5 pH 和温度交互作用对 VPJ33 生长的影响  
Fig.5 Effect of interaction between the temperature and pH on growth of VPJ33

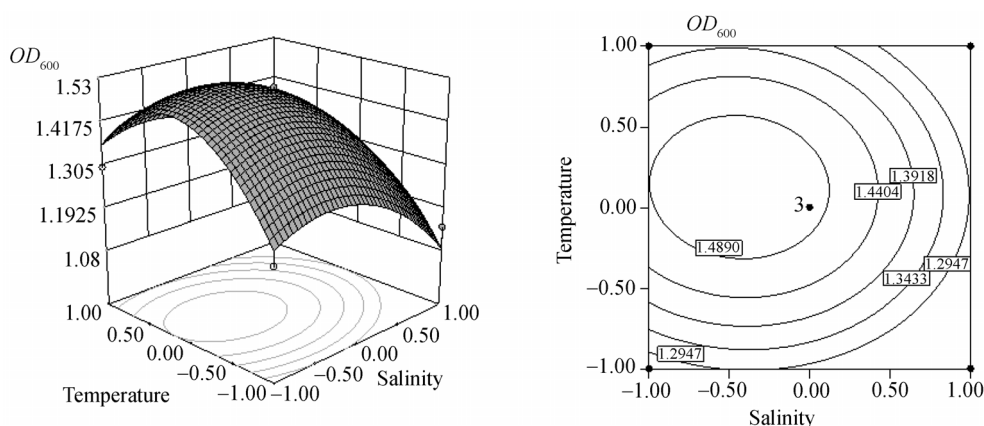


图6 温度和盐度交互作用对 VPJ33 生长的影响

Fig.6 Effect of interaction between the temperature and salinity on growth of VPJ33

表4 试验结果的验证  
Table 4 Result of demonstration tests

试验条件 Experiment condition	pH	温度 Temperature (°C)	盐度 Salinity (%)	OD <sub>600</sub>
单因素最佳条件 Best single condition	8.00	34	3	1.50
响应面预测最佳条件 Best predicted condition	8.41	34.1	2.47	1.54
验证响应面预测最佳条件 Best condition	8.41	34.1	2.47	1.52

著。从各图可以看出 A、B 和 C 存在极值点, 利用 Design-Expert 软件, 对菌体浓度的二次多项式数学模型解逆矩阵得知<sup>[7]</sup>, 3 个因素的最优试验点(A、B、C)代码值(0.821、-0.526、0.178)即(8.41、2.47%、34.1), 此时 Y 取最大值 1.54。

**2.2.3 验证试验:**以响应面分析得到的 VPJ33 最佳生长条件, 做 3 次平行试验, 验证试验结果。由表 4 可知, 试验结果与预测相符, 响应面分析方法可靠。

### 3 讨论与结论

副溶血性弧菌 VPJ33 的生长适应性很强, 从单因素分析看, 在盐度为 1%~9%, pH 为 5~10, 温度为 10~42 间的范围条件下都能生长, 其最合适生长条件为 pH 7~9, 温度 30~37, 盐度 2%~4%。在单因素分析的基础上, 综合考虑盐度、温度和 pH 值 3 个因素对菌体生长的影响, 采用响应面分析方法, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理设计了三因素三水平实验, 用 Design-Expert 软件处理实验数据, 得到了菌体生长模型, 以及取得模型最优值时各因素的水平。实验结果表明, VPJ33 的最优培养条件为: pH 8.41、温度 34.1 和盐度 2.47%; 菌体生长过程中, pH 和盐度以及 pH 和温度对 VPJ33 生长的交互作用显著, 盐度和温度对 VPJ33 生长的交互作用不显著。菌体生长模型达到显著水平, 模型可以对 VPJ33 在不同条件下的生长情况进行分析和预测。虽然副溶血性弧菌不同菌株的最佳生长条

件会有所差异, 但是优化的 VPJ33 生长条件对其他菌株也有一定参考价值。我们得到的 VPJ33 的最佳生长条件温度 34.1, 这正是我国沿海地区夏天的温度, 而盐度 2.47%与海水的盐度相当, 可以说明为什么副溶血性弧菌食物中毒在沿海地区的夏季有较高的发病率。

### 参考文献

- [1] Douet JP, Castroviejo M. Study of the haemolytic process and receptors of thermostable direct haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Res Microbiol*, 1996, **147**(1): 687-696.
- [2] 张凡非. 副溶血性弧菌及其引起的食物中毒检验研究进展. *中国卫生监督志*, 2003, **10**(1): 8-10.
- [3] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究. *中国食品卫生杂志*, 2004, **16**(1): 3-9.
- [4] Giovinni. M. Response surface methodology and product optimization. *Food Technology*, 1982, **37**(9): 41-45.
- [5] 杨文雄, 高炎祥. 响应面法及其在食品工业中的应用. *中国食品添加剂*, 2005, **2**(2): 68-71.
- [6] 陶有俊, Daniel Tao, 赵跃民, 等. 采用 Design-Expert 设计进行优化 Falcon 分选试验. *中国矿业大学学报*, 2005, **34**(3): 343-348.
- [7] 吴有炜. 试验设计与数据处理. 苏州: 苏州大学出版社, 2002, pp.135-142.