

# 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

唐晓阳<sup>1,2,3Δ</sup> 郭晓滨<sup>1,2,3Δ</sup> 郭丹凤<sup>1,2,3</sup> 韩婷<sup>1,2,3</sup> 谢晶<sup>1,2,3</sup> 潘迎捷<sup>1,2,3</sup> 赵勇<sup>1,2,3\*</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 上海 201306)

(3. 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:**【目的】比较 15 °C、20 °C 和 25 °C 时, 9 株不同致病性与非致病性副溶血性弧菌菌株在 TSB (3% NaCl, pH 8.0) 中的最大比生长速率之间的差异。【方法】应用 Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪测定副溶血性弧菌的最大比生长速率。【结果】15 °C、20 °C 和 25 °C 时, 9 株副溶血性弧菌菌株间最大比生长速率的变异系数分别为 20.72%、17.5% 和 15.98%。不同副溶血性弧菌最大比生长速率之间的差异随着温度的降低而增加。【结论】在进行定量微生物风险评估时, 应用仅基于一株菌建立的生长预测模型会给预测结果带来较大的不确定性。需建立可描述不同副溶血性弧菌菌株的最大比生长速率的随机模型来为定量微生物风险评估提供更准确有效的预测模型。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 最大比生长速率, 差异性, 微生物风险评估

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31271870); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20113104110005); 上海市科委部分地方院校能力建设项目(No. 11310501100); 上海市科委工程中心建设项目(No. 11DZ2280300); 上海市科委科技创新行动计划项目(No. 12391901300)

\*通讯作者: Tel: 86-21-61900503; ✉: yzhao@shou.edu.cn

Δ并列第一作者

收稿日期: 2013-04-15; 接受日期: 2013-07-08

# High throughput and rapid determination of the maximum specific growth rate of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*

TANG Xiao-Yang<sup>1,2,3Δ</sup> GUO Xiao-Bin<sup>1,2,3Δ</sup> GUO Dan-Feng<sup>1,2,3</sup> HAN Ting<sup>1,2,3</sup>  
XIE Jing<sup>1,2,3</sup> PAN Ying-Jie<sup>1,2,3</sup> ZHAO Yong<sup>1,2,3\*</sup>

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

(2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

(3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** [Objective] Comparing the variability of the maximum specific growth rate,  $\mu_{\max}$ , of 9 different pathogenic and non-pathogenic *V. parahaemolyticus* strains in TSB (3% NaCl, pH 8.0) at 15 °C, 20 °C and 25 °C. [Methods] An automated turbidimetric system, Bioscreen C, was used to determine the  $\mu_{\max}$  of strains of *V. parahaemolyticus*. [Results] The coefficient of variation of  $\mu_{\max}$  among 9 *V. parahaemolyticus* strains was 20.72%, 17.5% and 15.98% at 15 °C, 20 °C and 25 °C, respectively. The variability of  $\mu_{\max}$  among different *V. parahaemolyticus* strains increased as temperature was decreased. [Conclusion] A quantitative microbial risk assessment of *V. parahaemolyticus* infection and illness based on the growth characteristics of a single strain of *V. parahaemolyticus*, introduces a bias in the assessment. It's necessary to develop stochastic models as the more precise and effective predictive model to be utilized in quantitative microbial risk assessment.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Maximum specific growth rate, Variability, Microbial risk assessment

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种存在于海产品中的革兰氏阴性细菌,是世界各国由海产品引起的急性肠胃炎的主要病原菌<sup>[1]</sup>。我国食源性疾病监测资料显示<sup>[2-3]</sup>,副溶血性弧菌食物中毒居我国细菌性食源性致病之首。风险评估是用于评价食品的安全性和公众健康风险的重要依据,作为重要的科学基础,已被国际食品法典委员会,联合国粮农组织和世界卫生组织等应用于保障国际贸易中的食品安全,控制食品中食源性致病微生物的风险管

理及决策<sup>[4-5]</sup>。

国内外已有牡蛎、血蛤、梭子蟹、三文鱼、草虾等海产品的风险评估研究<sup>[5-8]</sup>。但这些风险评估研究中仍存在许多变异性,其中之一为不同菌株之间的变异性<sup>[9-10]</sup>。菌株之间的微生物生长动力学参数的变异性将会对风险评估的准确性带来影响<sup>[11]</sup>。所以,研究食源性致病微生物不同菌株的生长动力学参数在不同环境条件下的变异性,对于获得更为可靠的风险评估结果十分必要。

与传统的耗时费力的微生物学培养计数方法相比<sup>[12]</sup>, Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪可快速测定致病微生物的生长动力学参数, 并已被广泛应用于测定金黄色葡萄球菌、英诺克李斯特菌、沙门氏菌在不同环境条件下的最大比生长速率<sup>[10,13-16]</sup>。目前, 国内外还没有应用 Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪来测定副溶血性弧菌不同菌株的最大比生长速率的研究。因此, 本研究的主要目的是建立 Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪应用于快速测定副溶血性弧菌菌株的最大比生长速率的方法, 并且比较不同的副溶血性弧菌菌株在不同温度下的最大比生长速率, 为副溶血性弧菌定量风险评估提供精准数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

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, 日本三洋公司; 胰蛋白胨大豆肉汤, 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 菌种活化及接种液制备

**1.2.1 菌种:** 副溶血性弧菌菌种为本实验室-80 °C, 25%甘油管保存。

具体菌种信息如表 1 所示。

**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 °C 保存的甘油管中划线至 TCBS 平板, 37 °C 培养 18-24 h。从 TCBS 平板上挑取绿色的单菌落接种至 10 mL TSB (3% NaCl, pH 8.0)中, 放入摇床中, 37 °C、150 r/min 培养 18 h, 菌株生长到达平台期( $10^9$  CFU/mL), 以此为初始接种液。

### 1.3 生长实验

**1.3.1 采用微生物计数方法进行生长曲线的测定:** 将制备好的 Vp6 接种菌液进行 10 倍梯度稀释, 再接种于 10 mL TSB (3% NaCl, pH 8.0)试管中, 使初始接种量为  $10^4$ - $10^5$  CFU/mL。将接种后的 TSB 试管放入高精度低温培养箱, 温度设置为 25 °C。每小时取样涂布于 TCBS 平板, 计数测定 Vp6 的生长曲线。

**1.3.2 梯度稀释法:** 在全自动微生物生长曲线分析仪配套的 100 微孔板中进行梯度稀释。吸取初始接种液 20  $\mu$ L 接种至第 1 孔 180  $\mu$ L TSB 中, 以此为第一稀释梯度。用移液器吹吸混匀后, 再从这个孔中吸取 20  $\mu$ L 接种至第 2 孔 180  $\mu$ L TSB 中, 依次梯度稀释到第 10 孔 TSB 中, 为了保持各孔中的样品体积一致, 取出 20  $\mu$ 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  $\mu$ L TSB 培养基作为空白对照, 选择 5 个连续 10 倍系列梯度稀释的孔, 即

表 1 9 株副溶血性弧菌菌株信息

Table 1 Information of 9 *V. parahaemolyticus* strains

菌株 Strain	Vp2	Vp3	Vp4	Vp6	Vp11	Vp16	Vp18	Vp19	Vp20
来源 Source	ATCC	ATCC	南美白对虾	食物中毒病人	草虾	河虾	南美白对虾	南美白对虾	河虾
致病基因 Pathogenic gene	<i>tdh</i> +/ <i>trh</i> -	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> +	<i>tdh</i> +/ <i>trh</i> -	<i>tdh</i> +/ <i>trh</i> -	-	<i>tdh</i> +/ <i>trh</i> -	-	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> +	-

注: -: 不含有 *tdh* 或 *trh* 基因, 仅含有 *tlh* 基因的非致病性副溶血性弧菌。

Note: -: Means the non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains, which don't contain *tdh* or *trh* gene, but only *tlh* gene.

$10^6$ – $10^2$  CFU/mL 浓度的孔作为下续计算的样品孔<sup>[14]</sup>。将加好空白对照及样品液的 100 微孔板放入全自动微生物生长曲线分析仪样品槽中, 将全自动微生物生长曲线分析仪设置为每 15 min 读取  $OD_{540}$  值一次, 培养温度分别设定为 15 °C、20 °C 和 25 °C, 测定这 3 个温度下副溶血性弧菌的生长曲线, 每个温度条件下每个菌株做 2 个平行。

1.4 最大比生长速率的计算方法

1.4.1 应用微生物预测模型: 应用英国食品研究所开发的 DMFit 软件 (<http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>)中的三阶段线性方程<sup>[17]</sup>拟合 Vp6 在 25 °C 的生长曲线, 并计算出延滞期( $\lambda$ )、最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )、最大生长密度( $N_{\max}$ )等生长动力学参数。

1.4.2 应用全自动微生物生长曲线分析仪梯度稀释法: 参照 Lianou 等<sup>[10]</sup>和 Lindqvist<sup>[14]</sup>的研究, 全自动微生物生长曲线分析仪梯度稀释法计算菌株最大比生长速率的公式如下:

计算公式为:  $\log(N_i) = k - \mu_{\max} \times t_{\det}$  (1)

式中:  $t_{\det}$  为副溶血性弧菌菌液的  $OD_{540}$  达到 Bioscreen C 全自动微生物生长曲线分析仪可检测水平( $10^7$  CFU/mL)时的时间(h);  $\mu_{\max}$  为副溶血性弧菌的最大比生长速率 $[(\log\text{CFU/mL})\cdot\text{h}^{-1}]$ ,  $N_i$  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)。

2 结果与分析

2.1 传统微生物计数方法测定 25 °C Vp6 的  $\mu_{\max}$  值与全自动微生物生长曲线分析仪测定值的比较

将 Vp6 在 25 °C TSB 中的生长数据绘制生长曲线, 并应用 DMfit 中的三阶段线性模型来拟合 Vp6 的生长曲线, 拟合结果如表 2 所示。

表 2 由 DMFit 软件拟合计算的 Vp6 在 25 °C 下, TSB (pH 8.0)中的生长参数及全自动微生物生长曲线分析仪测定值的比较		
Table 2 Comparison of growth parameters of Vp6 calculated by DMFit and automated turbidimetric system in TSB (pH 8.0) under 25 °C		
生长参数	值 <sup>a</sup>	值 <sup>b</sup>
Growth parameters	Value <sup>a</sup>	Value <sup>b</sup>
$N_0$ (logCFU/mL)	4.480	
$\lambda$ (h)	1.777	
$\mu_{\max}$ $[(\log\text{CFU/mL})\cdot\text{h}^{-1}]$	0.737	0.711
$N_{\max}$ (logCFU/mL)	8.670	
$R^2$	0.995	

注: <sup>a</sup>: 传统微生物计数方法测定的生长动力学参数值; <sup>b</sup>: 全自动微生物生长曲线分析仪测定的生长动力学参数值。  
Note: <sup>a</sup>: The growth kinetic parameters determined by traditional microbiological counting method; <sup>b</sup>: the growth kinetic parameters determined by automated turbidimetric system Bioscreen C.

由表 2 可知, 通过三阶段线性模型计算得出, Vp6 在 25 °C 时的  $\mu_{\max}$  为 0.737  $(\log\text{CFU/mL})\cdot\text{h}^{-1}$ , 而通过全自动微生物生长曲线分析仪梯度稀释法计算出 Vp6 的  $\mu_{\max}$  为 0.711  $(\log\text{CFU/mL})\cdot\text{h}^{-1}$ 。说明全自动微生物生长曲线分析仪测定副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$  与传统的微生物计数方法具有良好的对应性, 与 Lindqvist<sup>[14]</sup>的研究结果一致。由此可知, 全自动微生物生长曲线分析仪可准确测定副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$ 。

2.2 全自动微生物生长曲线分析仪测定不同副溶血性弧菌菌株的最大比生长速率

应用全自动微生物生长曲线分析仪共测定了 432 条副溶血性弧菌的  $OD_{540}$  生长曲线, 采用公式(1)计算出副溶血性弧菌在 15 °C、20 °C 和 25 °C 的  $\mu_{\max}$ , 结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 随着温度的升高, 副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$  增大。在这 3 个温度下, 生长最慢的均为 Vp4, 但没有一株副溶血性弧菌菌株在这 3 个温度下均为生长最快的菌株。通过计算变

表 3 15 °C、20 °C 和 25 °C 时 9 株副溶血性弧菌在 TSB 中的最大比生长速率[(logCFU/mL)·h <sup>-1</sup> ] Table 3 The maximum specific growth rate [(logCFU/mL)·h <sup>-1</sup> ] of 9 <i>V. parahaemolyticus</i> strains in TSB under 15 °C, 20 °C and 25 °C									
温度 Temperature (°C)	Vp2	Vp3	Vp4	Vp6	Vp11	Vp16	Vp18	Vp19	Vp20
15	0.179 ±0.008	0.137 ±0.008	0.087 ±0.002	0.184 ±0.004	0.181 ±0.005	0.200 ±0.002	0.172 ±0.003	0.186 ±0.002	0.183 ±0.007
20	0.445 ±0.016	0.314 ±0.024	0.238 ±0.008	0.404 ±0.006	0.441 ±0.017	0.421 ±0.003	0.400 ±0.016	0.397 ±0.024	0.420 ±0.016
25	0.721 ±0.008	0.549 ±0.018	0.424 ±0.007	0.711 ±0.030	0.710 ±0.052	0.725 ±0.035	0.668 ±0.021	0.682 ±0.009	0.745 ±0.033

异系数可知, 在 15 °C、20 °C 和 25 °C 条件下, 9 株副溶血性弧菌间  $\mu_{\max}$  的变异系数分别为 20.72%、17.5%和 15.98%。这表明, 副溶血性弧菌所处的温度离最适生长温度越远, 菌株  $\mu_{\max}$  之间的差异性越大, 与 Lianou 等<sup>[10,18]</sup>报道的结果一致, 说明温度会影响副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$  间的差异, 差异性随着温度的降低而增高。

由表 3 可知, 在 15 °C、20 °C 和 25 °C 这 3 个温度下, 致病性基因与副溶血性弧菌在 TSB 中的最大比生长速率之间并无明显的相关性。而 Mudoh 等<sup>[19]</sup>报道, 在 15 °C、20 °C、25 °C 和 30 °C 条件下, 在美国牡蛎和亚洲牡蛎中, 致病性副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$  大于总的副溶血性弧菌的  $\mu_{\max}$ 。Yoon 等<sup>[20]</sup>报道, 20 °C、25 °C 和 30 °C

时, 在培养基中和牡蛎匀浆中, 非致病性的副溶血性弧菌菌株的  $\mu_{\max}$  大于致病性副溶血性弧菌。不同研究得出不同的结论, 可能原因是不同的食品基质、培养条件、不同的菌株都可能使菌株的  $\mu_{\max}$  呈现差异性<sup>[9,21]</sup>。

2.3 副溶血性弧菌的生长模拟

应用全自动微生物生长曲线分析仪测定的 9 株不同副溶血性弧菌菌株的  $\mu_{\max}$  进行副溶血性弧菌在 15 °C、20 °C 和 25 °C 的生长曲线预测。假设副溶血性弧菌的初始污染量  $N_0$  为 5 logCFU/mL, 从保障食品安全的角度考虑, 假设副溶血性弧菌的延滞期  $\lambda$  为 0, 以 8.7 logCFU/mL 为最大生长密度, 采用三阶段线性模型对副溶血性弧菌的生长进行预测, 结果如图 1 所示。

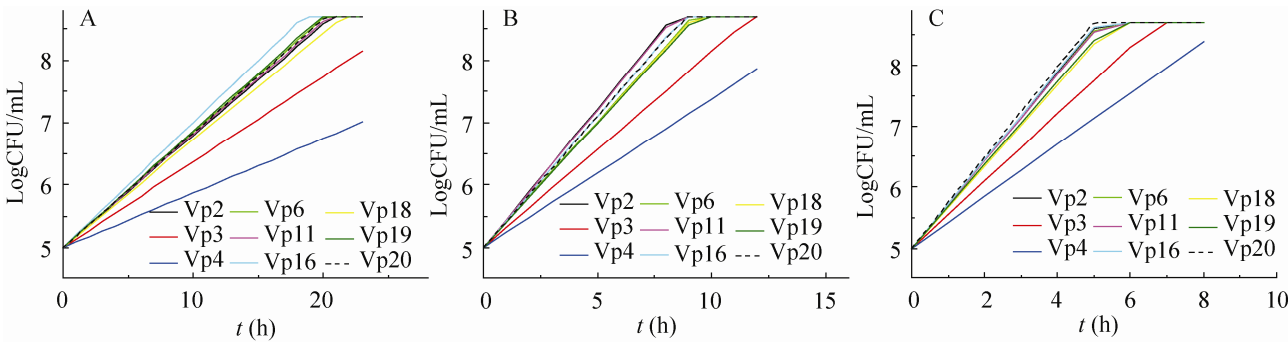


图 1 9 株副溶血性弧菌菌株在 TSB (pH 8.0) 中的生长曲线的预测

Fig. 1 Prediction of growth curves for 9 *V. parahaemolyticus* strains in TSB (pH 8.0)

Note: A: 15 °C; B: 20 °C; C: 25 °C.

从图1中可以看出,不同温度条件下,不同的菌株均呈现出了生长的差异。在15℃条件下,当Vp16生长到平台期时,Vp4的菌数为6.65 logCFU/mL。在20℃条件下,Vp2生长到平台期时,Vp4的菌数为7.142 logCFU/mL。在25℃条件下,Vp20生长到平台期时,Vp4的菌数为7.12 logCFU/mL。

本研究的生长实验是在TSB (pH 8.0)、3% NaCl条件下进行的,此盐度和pH值处于副溶血性弧菌的最适生长条件范围内<sup>[22]</sup>。而各类水产品的pH、销售条件及环境都不相同,应值得注意的是,副溶血性弧菌所处的环境条件离最适生长条件越远,生长差异将越大<sup>[10]</sup>。

Sant'Ana等<sup>[23]</sup>认为微生物最大比生长速率之间的差异性会影响风险评估的准确性,所以其研究了不同的沙门氏菌及单增李斯特菌在即食生菜中的最大比生长速率,为微生物风险评估提供数据支撑。Koutsoumanis等<sup>[24]</sup>将可描述菌株最大比生长速率差异性的随机模型应用于预测冷链中巴氏灭菌乳中单增李斯特菌的生长,从而评价巴氏灭菌乳的货架期及食品安全标准的合理性、并且提出可有效控制单增李斯特菌增长的干预措施。由此可见,致病菌菌株最大比生长速率的差异性对风险评估的影响已逐步引起研究者的重视。

综上所述,菌株之间最大比生长速率的差异性是风险评估中需要考虑的一个重要的差异性<sup>[11]</sup>。在后续研究中,应选择更多的副溶血性弧菌菌株,开展不同环境条件下,包括在不同的水产品中的生长差异性研究。建立可描述不同副溶血性弧菌菌株间的生长差异的随机模型,以此来进行风险评估,为食品安全监管部门制定更切合实际的、更准确有效的监管政策及食品安全标准、保障水产品安全提供科学支撑<sup>[25]</sup>。

### 3 结论

(1) 全自动微生物生长曲线分析仪可作为快速、准确测定副溶血性弧菌的最大比生长速率的有效方法,可作为微生物预测模型和风险评估基础数据收集的重要工具。

(2) 本研究发现不同副溶血性弧菌最大比生长速率之间的差异随着温度的降低而增加,建议在微生物定量风险评估中,应充分考虑不同菌株在不同温度条件下最大比生长速率的不同变异系数,以降低风险评估的不确定性。

### 参考文献

- [1] Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J, et al. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses[J]. Food Research International, 2010, 43(7): 1780-1790.
- [2] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 2003-2007年中国1060起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010(3): 224-228.
- [3] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992-2001年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病预防网[J]. 卫生研究, 2004(6): 725-727.
- [4] 姬华, 韩海红, 王洪新, 等. 副溶血弧菌预测模型与风险评估的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009(5): 346-349, 352.
- [5] FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: interpretative summary and technical report[R]. Microbiology Risk Assessment Series no. 16. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, and World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
- [6] Sani NA, Ariyawansa S, Babji AS, et al. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in cooked black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) in Malaysia[J]. Food Control, 2013, 31(2): 546-552.
- [7] 刘弘, 罗宝章, 秦璐昕, 等. 生食三文鱼片副溶血性弧菌污染的定量风险评估研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012(1): 18-22.

- [8] 高围激, 刘弘, 刘诚, 等. 上海市零售梭子蟹中副溶血性弧菌的污染状况及风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2010(4): 371-374.
- [9] Pouillot R, Albert I, Cornu M, et al. Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 81(2): 87-104.
- [10] Lianou A, Koutsoumanis KP. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior[J]. Food Microbiology, 2011, 28(4): 828-837.
- [11] Nauta MJ. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible?[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2): 297-304.
- [12] OSCAR TP. Variation of lag time and specific growth rate among 11 strains of *Salmonella* inoculated onto sterile ground chicken breast burgers and incubated at 25 °C[J]. Journal of Food Safety, 2000, 20(4): 225-236.
- [13] Diez-Garcia M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 173-180.
- [14] 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.
- [15] Metris A, George SM, Baranyi J. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10): 6674-6679.
- [16] 周康, Susie G, Jozsef B, 等. 不同浓度沙门氏菌细胞生长分布规律研究[J]. 食品科学, 2012(13): 254-258.
- [17] Zwietering M, De Wit J, Cuppers H, et al. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(1): 204-213.
- [18] Lianou A, Stopforth JD, Yoon Y, et al. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(11): 2640-2647.
- [19] Mudoh M, Depaola A, Jones J, et al. Comparison of growth and survival of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in American and Asian oysters[C]. Proceedings of the *Vibriosis* in the Environment International Conference, 2010.
- [20] Yoon K, Min K, Jung Y, et al. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea[J]. Food Microbiology, 2008, 25(5): 635-641.
- [21] Fernandez-Piquer J, Bowman JP, Ross T, et al. Predictive models for the effect of storage temperature on *Vibrio parahaemolyticus* viability and counts of total viable bacteria in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8687-8695.
- [22] Miles DW, Ross T, Olley J, et al. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 38(2/3): 133-142.
- [23] Sant'Ana AS, Franco BD, Schaffner DW. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce[J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 267-273.
- [24] Koutsoumanis K, Pavlis A, Nychas G-JE, et al. Probabilistic model for *Listeria monocytogenes* growth during distribution, retail storage, and domestic storage of pasteurized milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2181-2191.
- [25] Lianou A, Koutsoumanis KP. A stochastic approach for integrating strain variability in modeling *Salmonella enterica* growth as a function of pH and water activity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149(3): 254-261.