

文章编号:1673-1689(2009)03-0408-05

温度、pH 值、盐度交互作用优化福氏志 贺氏菌 F2b 培养条件

张亚琼, 宁喜斌*

(上海海洋大学 食品学院, 上海 200090)

摘要: 研究温度、pH 值、盐度 3 个因素交互作用下食源性致病微生物福氏志贺氏菌 F2b 的最优培养条件。在温度、pH 值、盐度单因素试验的基础上,应用 Box-Behnken 中心组合试验原理,设计三因素交互作用试验。以温度、pH 值、盐度为响应因子,以菌液的 OD₅₅₀ 为响应值,采用响应面法处理试验数据。结果表明,在所选的因素水平范围内,温度、pH 值对 F2b 生长影响显著,温度、pH 值之间交互作用显著。获得志贺氏菌 F2b 的最佳生长条件为温度 35.8 °C, pH 值 7.7, 盐度 0.76 g/dL。经过验证,实测值和预测值之间偏差为 1.1%,表明响应面法优化 F2b 培养条件真实、快速、有效。

关键词: 福氏志贺氏菌 F2b; Box-Behnken; 响应面法; 温度; pH 值; 盐度

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimization of Cultivation Condition of *Shigella flexneri* 2b by Interaction Experiments among Temperature, pH and Sodium Chloride Concentration

ZHANG Ya-qiong, NING Xi-bin*

(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The aim of this study was to get the optimum culture condition of foodborne pathogenic microorganism *Shigella flexneri* 2b, under the interaction of temperature, pH and sodium chloride concentration. Based on the single factor experiments of *Shigella flexneri* 2b, Box-Behnken center-united principle was used to design interaction experiments among those three factors. The response factors were temperature, pH, and sodium chloride concentration, the OD₅₅₀ was chosen as response value. The data were processed with the Response Surface Methodology. At the range of the factors and levels, the results exhibited that the influence of temperature, pH and the interaction between them were significant. The optimum cultivation condition were temperature 35.9 °C, pH 7.7, sodium chloride concentration 0.76% which was calculated by the quadratic equation in three unknown. Then the Verification showed that the deviation between predicted value and measured value was 1.1% which is approximately.

Key words: *Shigella flexneri* 2b, Box-Behnken, response surface methodology, temperature, pH, sodium chloride concentration

收稿日期:2008-06-10

基金项目:上海出入境检验检疫局科研项目(HK053-2007)。

作者简介:宁喜斌(1964-),男,黑龙江鹤岗人,工学博士,教授,硕士生导师,主要从事食品安全与微生物学方面的研究。Email:xbning@shou.edu.cn

志贺氏菌属(*Shigella*)的细菌是细菌性痢疾的病原菌^[1],常发生于食源性和水源性污染,尤其幼儿极易被感染,死亡率很高。目前在发达国家中,志贺氏菌感染主要为D群,中国流行菌则以B群为主,在B群中2b居多^[2],国外对于宋内氏菌的研究较全面,但是在中国有关福氏志贺氏菌多因素交互作用对生长的影响研究较少。

由于卫生条件不合格,经常有水源或食品受到志贺氏菌的污染而引发疾病^[3],作者以福氏志贺氏菌为研究对象,在试验中测定温度、pH值以及盐度交互作用下福氏志贺氏菌生长的变化,应用Box-Behnken设计建立响应曲面模型,对志贺氏菌F2b的生长条件进行优化,旨在了解福氏志贺氏菌在不同条件下的生长状况。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株 福氏志贺氏菌F2b,作者所在试验室保存。

1.1.2 培养基 革兰氏阴性杆菌增菌液,杭州天和微生物试剂有限公司提供;GN增菌液、营养肉汤、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB);上海市疾病预防控制中心提供。

1.1.3 仪器 台式pH精密测试仪:德国WTW产品;UV2300分光光度计:上海天美科学仪器有限公司产品;AL204电子天平:梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品;XW-80A漩涡混合器:上海沪西仪器厂产品;LRH-250CL型生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基优选试验 配置TSB、GN、营养肉汤和革兰氏阴性菌增菌液各100 mL,分别分装12只试管,灭菌后按照体积分数2%的接种量接种,37℃培养12 h后,测定OD₅₅₀。

1.2.2 单因素试验

1) 温度试验:斜面菌种F2b接种到1.2.1优选的灭菌培养基中,37℃培养12 h后,按照体积分数2%的接种量接种,在7个不同温度(4、25、30、33、35、37、40℃)下培养,每隔1 h取样,连续取样12次,记录OD₅₅₀值。

2) pH值试验:斜面菌种F2b接种到1.2.1优选的培养基中,37℃培养12 h后,按照体积分数2%的接种量接种于不同初始pH值(4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0)的灭菌优选培养基(分别用1 mol/L的HCl和NaOH调节pH值)。

万方数据

37℃培养,每间隔1 h取样,连续取样12次,以新鲜培养基为空白对照,测定OD₅₅₀,优选适合F2b生长的pH值范围。

3) 盐度试验:优选培养基中补充NaCl,使培养基最终盐度达到0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、4.0、6.0 g/dL,接种、培养、取样、测定方法同pH值试验。

1.2.3 响应面试验 通过对影响F2b生长的单因素进行分析,获得在单因素条件下适合F2b生长的温度、pH值、盐度范围,确定三个因素的水平。采用Box-Behnken中心组合试验原理设计交互试验,进行13次析因试验,3次零点试验,依据响应面分析法得到三维曲面图,曲面最高点即为理论最佳培养条件,对所得的方程求导,可以求得顶点对应的温度、pH值、盐度。该法试验次数少、周期短、求得的回归方程精度高^[4]。

2 结果与讨论

2.1 F2b培养基的优化选择

F2b在4种常见的细菌增菌液中的生长趋势见图1。在TSB中F2b生长速度快,迟滞期最短,培养5 h后OD₅₅₀即大于1.2。而GN、营养肉汤和革兰氏阴性菌增菌液培养12 h后均未达到1.0。因此F2b最适合在TSB中生长,以下培养基均采用TSB。

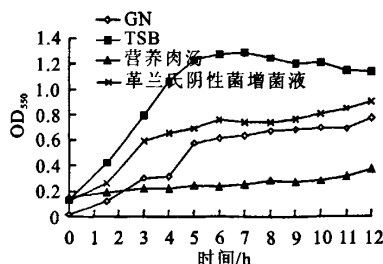


图1 不同培养基对F2b生长的影响

Fig. 1 Growth of F2b in different media

2.2 不同条件下培养F2b的单因素试验

2.2.1 温度对F2b生长的影响 从图2可知,F2b在不同温度范围内生长差异较大,F2b在4~25℃范围内生长缓慢,4℃基本不生长,25℃迟滞期长达9 h。30、33℃迟滞期约5 h,33℃保持11 h后进入稳定期。35~40℃随着温度的提高,OD₅₅₀明显提高,约10 h后进入稳定期。35、37℃迟滞期为3 h,40℃迟滞期缩短为1.5 h。但在40℃保持10 h后,OD值出现明显下降,F2b进入衰亡期。最适培养温度范围确定为35~40℃。

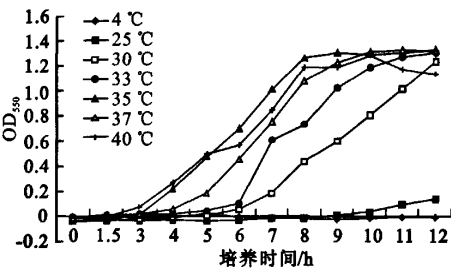


图 2 温度对 F2b 生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature on growth of F2b

2.2.2 pH 值对 F2b 生长的影响 不同 pH 值的培养基接种后,在 37 ℃下连续培养 12 h,结果见图 3。pH 为 4.0、5.0 时,F2b 基本不生长,pH 6.0 生长缓慢。在 pH 6.5~8.0 范围内曲线 OD₅₅₀ 较高,中性偏碱的环境较适合 F2b 的存活。

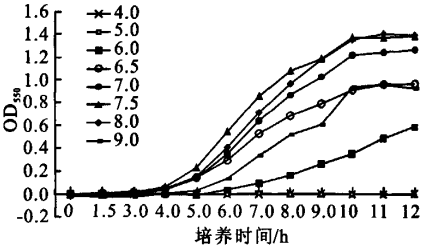


图 3 pH 值对 F2b 生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on growth of F2b

2.2.3 盐度对 F2b 生长的影响 由图 4 可知,F2b 在高盐质量浓度 6 g/dL 时不生长,随着盐度的降低,OD₅₅₀ 明显上升。最适培养范围确定为 0.5~1.0 g/dL。培养 4 h 后,进入对数生长期,OD₅₅₀ 增长幅度较大。

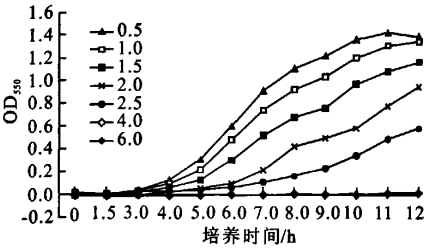


图 4 NaCl 质量浓度对 F2b 生长的影响

Fig. 4 Effect of salinity on growth of F2b

2.3 Box-Behnken 交互试验设计及响应面分析

2.3.1 因素水平的确定 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[5],选取三个因素即培养温度、pH 值、盐度,每个因素取三个水平,以-1,0,1 编码。根据相应的试验设计表进行试验后,对数据进行二次回归拟合,得到带交互和平方相的二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,之后在一定的水平范围内求最佳值^[6]。作者采用三因素三

万方数据

水平的响应面分析方法,参考单因素试验结果选取因素水平,试验因素水平设计见表 1。

表 1 3 因素 3 水平
Tab. 1 3 factors and 3 levels

因素	编码	水平		
		-1	0	+1
温度/℃	A	35.0	37.5	40.0
pH 值	B	6.5	7.5	8.5
盐度/(g/dL)	C	0.50	0.75	1.00

2.3.2 试验设计及试验结果

1) 试验设计: 试验设计见表 2。其中 1~12 是析因试验,13~15 是中心试验,用来估计试验误差。每组试验取两个平行,求平均值。从表 2 可以看出,预测值和实际测量值之间较接近,偏差小于 10.6%,表明本试验因素水平取值范围适当,模型可以很好地反映 F2b 在不同交互环境条件下的生长趋势。

表 2 试验设计及测量值

Tab. 2 Experiment design of response surface method and the measured value

试验 编号	A pH 值	B 盐度	C 温度	预测 OD	实测 OD	偏差/ %
1	-1	-1	0	0.734	0.792	5.8
2	-1	1	0	1.126	1.081	4.0
3	1	-1	0	0.705	0.751	4.5
4	1	1	0	0.313	0.302	1.1
5	0	-1	-1	0.928	0.829	3.8
6	0	-1	1	0.981	0.877	10.6
7	0	1	-1	0.964	1.068	10.4
8	0	1	1	0.946	1.045	10.5
9	-1	0	-1	1.408	1.349	4.2
10	1	0	-1	0.960	1.014	5.6
11	-1	0	1	1.399	1.345	3.9
12	1	0	1	1.064	1.005	5.9
13	0	0	0	1.299	1.304	0.5
14	0	0	0	1.299	1.306	0.5
15	0	0	0	1.299	1.306	0.5

2) 结果分析: 以 OD₅₅₀ 为响应值,根据表 2 中 Box-Behnken 设计的试验结果,利用 Design-Expert 7.1.4(试用版)软件进行二次回归分析,回归方程为:

$$Y=1.3-0.18A+0.031B+0.009C-0.2AB+0.013AC-0.018BC-0.16A^2-0.4B^2+0.05C^2$$

回归方程的方差分析见表 3,可以看出,OD₅₅₀ 曲面模型在 $\alpha>0.01$ 水平上显著;温度、pH 值对于生长的影响显著,温度、pH 值之间交互作用显著($P<0.05$ 为显著)。pH 值、盐度、温度对响应值即 OD₅₅₀ 的影响,由 P 值的大小来反映, P 值越小对菌体生长的影响越显著。同时,复相关系数 $R^2=0.9609$,说明 OD₅₅₀ 和 96.09% 的变化源于所选因素,因素选择合理,可以用此模型对 F2b 在不同条件下的生长进行有效预测和分析。综上所述,回归

方程可以很好地反应 3 因素与 OD₅₅₀ 的关系,用该方程确定 F2b 最佳培养条件可行。

3) 响应面分析及最佳培养条件的确定:图 5 为回归方程得出的温度和 pH 值之间交互作用的响应面图和等高线图,在 35.8~40.0 ℃ 范围内,OD₅₅₀ 随着温度的增加而下降,但是下降速度不是很快。温度小于 35.8 ℃ 时,OD₅₅₀ 也出现下降。pH 7.5~8.5 范围内,当 pH 大于 7.7 时,随 pH 值的升高,OD₅₅₀ 降低,但是降低的幅度较小;pH 小于 7.7 时,OD₅₅₀ 迅速下降。此外,温度和 pH 值交互作用显著,表现在较低温度下,pH 值越低,OD₅₅₀ 下降越快,对菌体的生长越不利。

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

变异来源	总偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	P 值	显著水平
模型	1.12	9	0.12	13.65	0.005 1	显著
A	0.26	1	0.26	28.38	0.003 1	显著
B	7.626×10^{-3}	1	7.626×10^{-3}	0.84	0.401 7	
C	6.301×10^{-4}	1	6.301×10^{-4}	0.069	0.802 8	
AB	0.14	1	0.14	14.98	0.0118	显著
AC	7.291×10^{-4}	1	7.290×10^{-4}	0.080	0.788 4	
BC	1.26×10^{-3}	1	1.26×10^{-3}	0.14	0.724 9	
A2	0.10	1	0.10	11.44	0.019 6	显著
B2	0.61	1	0.61	66.98	0.000 4	显著
C2	0.011	1	0.011	1.25	0.314 5	—
误差相	0.045	5	9.089×10^{-3}	—	—	—
纯误差	2.667×10^{-6}	2	1.333×10^{-6}	—	—	—
所有项总和	1.16	14	—	—	—	—

注:决定系数 $R^2=0.9609$

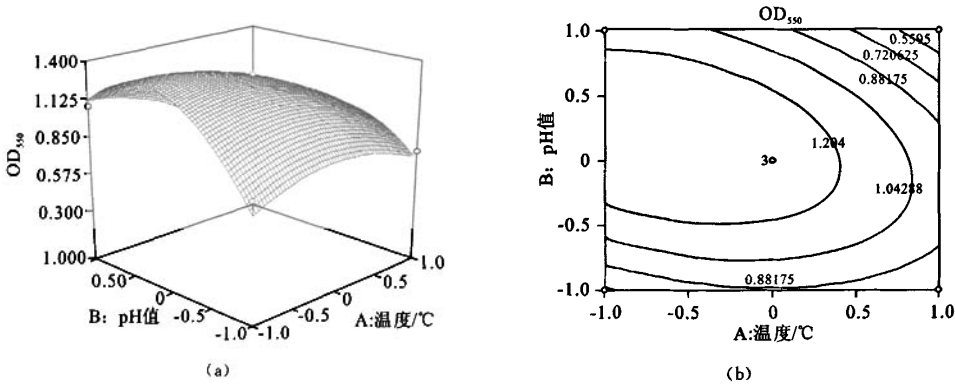


图 5 pH 值和盐度交互作用对 F2b 生长的影响
Fig. 5 Effect of interaction of pH and salinity on growth of F2b

通过对方程求导得到极大值对应的各主要因素(A: 温度, B: pH 值, C: 盐度)的编码值分别为(-0.67, 0.19, 0.03), OD_{550} 最高为 1.390 时对应 F2b 生长条件是 35.8 °C, pH 7.7, 盐度 0.76 g/dL。

2.3.3 验证试验 以 2.3.2 确定的优化生长条件将 F2b 培养 12 h, 测 OD_{550} , 做两个平行试验并取平均值, OD_{550} 实际测量值与方程的预测值偏差为 1.1%, 吻合度较高, 见表 4。

表 4 验证结果表
Tab. 4 Result of verification

	最佳培养条件	OD_{550}
验证试验	温度 35.8, pH 7.7, 盐度 0.76 g/dL	1.405
预测值	A=-0.67, B=0.19, C=0.03	1.390

3 结 语

通过 F2b 在温度为 4~40 °C、pH 值为 4.0~

9.0、盐度为 0.5~6.0 g/dL 间的单因素分析, 确定其合适的生长条件范围为: 温度 35~40 °C, pH 6.5~8.5, 盐度 0.5~1.0 g/dL。在单因素分析的基础上, 综合考虑温度和 pH 值、盐度三个因素对菌体生长的影响, 确定三因素的三个水平。根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 共设计 15 个交互作用试验点, 实际测量值和模型预测值之间的偏差小于 10.6%, 证明因素和水平选择合理, 可以很好地预测 F2b 在不同交互环境条件下的生长趋势。采用响应面方法分析交互作用数据, 得到菌体生长的三维曲面模型, 模型显著。在因素水平范围内, 温度、pH 值对 F2b 生长影响显著, 温度和 pH 值交互作用显著。拟合三元二次方程求最大值, 得到 F2b 的最优培养条件为: 温度 35.8 °C, pH 值 7.7, 盐度 0.76 g/dL。验证试验得到最佳培养条件试验 OD_{550} 值和预测 OD_{550} 值之间偏差为 1.1%, 非常接近, 说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响, 用响应面法优化 F2b 最佳培养条件真实、快速、有效。

参考文献(References):

- [1] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 868—870.
- [2] 张开瑞. 志贺氏菌感染的研究进展[J]. 临床内科杂志, 1996, 13(4): 4—5.
ZHANG Kai-rui. Advance in the infection of *Shigella*[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 1996, 13(4): 4—5. (in Chinese)
- [3] 胡建华, 李洁莉, 马兆飞, 等. 牛奶样品中志贺氏菌的快速 PCR 检测技术研究[J]. 中国食品添加剂, 2007, 28(8): 433—437.
Hu An-hua, LI Jie-li, MA Zhao-fei, et al. Detection of *Shigella* in milk by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time PCR[J]. *China Food Additives*, 2007, 28(8): 433—437. (in Chinese)
- [4] 廖春丽, 余晓斌, 刘海丽. 响应面法优化 β -胡萝卜素液体发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 95—99.
MIAO Chun-li, YU Xiao-bin, LIU Hai-li. Optimize the submerged fermentation media of β -carotene by using response surface methodology[J]. *Journal of Food Science And Biotechnology*, 2007, 26(3): 95—99. (in Chinese)
- [5] Giovinni, M. Response surface methodology and product optimization[J]. *Food Technology*, 1982, 37: 41—45.
- [6] 欧宏宇, 贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J]. 天津轻工业学院学报, 2001, 1: 14—17.
OU Hong-yu, JIA Shi-ru. The application of SAS system in optimization of microbial culture conditions[J]. *Journal of Tianjin University of Light Industry*, 2001, 1: 14—17. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)