

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240923006

引用格式: 李江珊, 倪云龙, 乔昕, 等. 不同血清型副溶血性弧菌生长预测模型研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 170–179.

LI JS, NI YL, QIAO X, *et al.* Growth prediction models of *Vibrio parahaemolyticus* with different serotypes [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 170–179. (in Chinese with English abstract).

不同血清型副溶血性弧菌生长预测模型研究

李江珊¹, 倪云龙², 乔昕², 王燕梅², 杜佳露², 霍翔^{1,2,3,4*}

(1. 南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009;

3. 江苏省卫生应急工程研究中心, 南京 210009; 4. 江苏省新发突发重大传染病

病原微生物重点实验室, 南京 210009)

摘要: **目的** 研究不同血清型的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)在不同培养条件下的生长异质性, 并建立流行株(血清型 O3:K6、O10:K4)的生长预测模型。**方法** 选取 17 株不同血清型的 VP 菌株为研究对象, 设置不同培养条件, 包括盐度(0.5%~10.0%)、pH (3.0~11.0)和温度(16~50 °C), 采用修正的 Gompertz 模型建立其一级生长模型, 比较其最大生长 OD 值($Y_{\max}$)、延滞期(λ)和最大比生长速率($\mu_{\max}$)确定其最适生长范围, 用 Design-Expert 13 软件建立其二级响应面生长模型。**结果** VP 菌株之间存在生长异质性, 在盐度为 1.0%~3.0%、pH 为 7.0~9.0、温度为 20~40 °C 时菌株生长参数 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 之间的变异系数低于其他培养条件, 盐度为 7.0%、pH 为 10.0、温度为 16 °C 时流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)的生长能力强于其他血清型菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 不同盐度和温度下拟合的一级生长模型的确定系数均大于 0.98, 不同酸碱度下相关系数均大于 0.9; 二级响应面生长模型是显著的($P<0.05$), 确定系数均大于 0.94。**结论** VP 菌株之间存在生长异质性, 但在某些极端条件下, 不同血清型之间会表现出更明显的生长差异, 修正的 Gompertz 模型和二级响应面生长模型适用于分析和预测不同实验条件下 VP 的生长情况, 可以为 VP 的生长趋势提供可靠安全的预测。

关键词: 副溶血性弧菌; 血清型; 生长预测模型

Growth prediction models of *Vibrio parahaemolyticus* with different serotypes

LI Jiang-Shan¹, NI Yun-Long², QIAO Xin², WANG Yan-Mei², DU Jia-Lu², HUO Xiang^{1,2,3,4*}

(1. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China; 3. Jiangsu Province Engineering Research Center of Health Emergency, Nanjing 210009, China; 4. Jiangsu Provincial Medical Key Laboratory of Pathogenic Microbiology in Emerging Major Infectious Diseases, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: Objective To study the growth heterogeneity of different serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* (VP)

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 江苏省社会发展重大科技示范项目(BE2022837); 江苏省卫生健康委科研基金血地寄项目(x202314)

第一作者: 李江珊(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: lijianshan09@foxmail.com

*通信作者: 霍翔(1981—), 男, 博士, 主任医师, 主要研究方向为传染病防控。E-mail: huox@foxmail.com

under different culture conditions, and to establish growth prediction models for epidemic strains (O3:K6, O10:K4).

Methods Seventeen VP strains of different serotypes were selected as the research objects, and different culture conditions were set, including salinity (0.5%–10.0%), pH (3.0–11.0) and temperature (16–50 °C). The modified Gompertz model was used to establish the primary growth model. The optimal growth range was determined by comparing the maximum OD value ($Y_{\max}$), the Lag time (λ) and maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$). The second-order response surface growth model was established by Design-Expert 13 software. **Results** There was growth heterogeneity among VP strains. The coefficient of variation for differences in growth parameters $\mu_{\max}$ and $Y_{\max}$ between VP strains at salinity levels of 1.0%–3.0%, pH of 7.0–9.0, and temperatures of 20–40 °C was lower than that under other culture conditions. The growth ability of the epidemic strains (serotype O3:K6, O10:K4) was significantly greater than that of other serotypes when the salinity was 7.0%, the pH was 10.0, and the temperature was 16 °C, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The determination coefficients of the first-order growth models fitted under different salinity and temperature were greater than 0.98, and the correlation coefficients under different pH were greater than 0.9. The second-order response surface growth model was significant ($P < 0.05$), and the determination coefficient was greater than 0.94. **Conclusion** There is growth heterogeneity among VP strains, but in certain extreme conditions, there are more obvious growth differences between different serotypes. The modified Gompertz model and the second-order response surface growth model can be used to analyze and predict the growth of VP under different experimental conditions, which can provide reliable and safe prediction for the growth trend of VP.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; growth prediction model

0 引 言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)作为一种重要的食源性致病菌, 主要栖息于浅海近岸环境, 对水产品及其制品的安全构成了重大威胁^[1]。VP 能够侵袭人体, 诱发急性胃肠炎, 典型症状包括腹泻、腹痛及呕吐, 重者可导致败血症和休克, 其危害性不容忽视^[2]。在日、韩等沿海国家, VP 已成为最常见的食源性致病菌之一, 尤其在水产品中的检出率可达 70.1%^[3–4]。2011—2020 年我国由微生物污染导致的食源性疾病暴发事件中, 致病菌中 VP 占比高达 30.5%^[5]。血清型 O3:K6、O4:K12 和 O1:KUT 是 VP 大流行分离株中的主要血清型, 这些大流行血清型不仅能够从临床样本中检测出来, 从水产品中也能分离出来^[6–8]。近期研究显示, O10:K4 是我国新出现的 VP 血清型, 其占比逐年升高, 2020 年达到 VP 分离菌株的 71.1%, 成为国内仅次于 O3:K6 的第二优势血清型^[9]。在 VP 的生长过程中, 盐度、pH 和温度是 3 个至关重要的环境因素。这些环境因素不仅直接影响 VP 的生长速率和趋势, 还可能通过改变其代谢途径和毒力因子表达等方式, 进而影响 VP 的致病性和传播能力^[10]。然而, 过往的研究多集中在单一因素对 VP 生长的影响上, 忽视了各因素之间的交互作用^[11]。在自然环境和食品加工过程中, VP 所面对的环境条件是复杂多变的, 盐度、pH 和温度往往同时作用于微生物, 共同决定其生长状况。因此, 仅仅基于单因子效应的

分析, 难以全面准确地反映 VP 在实际环境中的生长特性, 也无法为食品安全风险评估提供可靠依据。本研究针对不同血清型的 VP, 分析其在不同条件(盐度、酸碱度和温度)下的生长特性, 建立多重环境因子中 VP 的生长预测模型, 对现有生长预测模型进行系统的优化与完善, 为预防和控制致病性 VP 感染提供科学依据, 同时为食品安全风险评估提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选择从 2022 年江苏省食源性疾病事件临床病例中分离出的 15 株 VP 菌株。

3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(3% NaCl tryptic soy agar, 3% NaCl TSA)、脑心浸出液肉汤(brian heart infusion, BHI)(北京陆桥技术有限公司); 氯化钠、氢氧化钠、盐酸(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 无菌蒸馏水、0.5 麦氏单位比浊管(美国赛默飞世尔科技有限公司); VP 检测用诊断血清(日本生研株式会社)。

1.2 仪器与设备

Micro-GCM 微生物生长曲线监测系统(德国 BMG LABTECH 公司); IMP400 微生物培养箱、Sensititre 比浊仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); AB204-S 分析天平(精度 0.001 g)、FE28 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器有限

公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 生长曲线的测定

在 3% NaCl TSA 平板上复苏 15 株 VP 菌株, 36 °C 培养 24 h。从 3% NaCl TSA 平板上挑取典型菌落至无菌蒸馏水中, 调节麦氏浊度至 0.5, 作为初始菌液备用。盐度梯度实验, 配制 100 mL 盐度为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%和 10.0%的 BHI 增菌液; 酸碱度梯度实验, 100 mL 3% NaCl BHI 增菌液的 pH 分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10、11; 吸取初始菌液 100 μL 与 900 μL 不同盐度梯度和不同酸碱度梯度的增菌液混合, 用移液器吹吸混匀后, 从中吸取 200 μL 至无菌 96 孔板, 将加好菌液的 96 孔板放入 Micro-GCM 的样品槽中, Micro-GCM 设置为每 10 min 读取一次, 于 600 nm 波长检测吸光度, 培养温度为 36 °C, 500 r/min 振荡培养 20 h。温度梯度实验, 吸取初始接种液 100 μL 与 900 μL 3%NaCl BHI 增菌液混合, 接种至 96 孔板中, 并使用 Micro-GCM 系统在不同温度(16、20、30、40、45 和 50 °C)下 500 r/min 振荡培养 20 h。每组实验重复 2 次。

1.3.2 一级生长模型的构建

采用 Origin Pro 2021 软件对 VP 的生长数据进行拟合, 利用 Bioscreen 梯度稀释法^[12]结合修正的 Gompertz 模型^[13], 经过调整后得到公式(1), 该公式能够直接以 OD₆₀₀*h⁻¹ 为单位表示菌株的最大生长率。根据模型参数比较不同盐度、酸碱度和温度等条件对不同血清型的 VP 的影响, 确定其最适生长范围。同时根据变异系数(coefficient of variation, CV)公式(2), 对不同血清型的 VP 进行生长变异性研究。

$$Y(t)=Y_0+(Y_{\max}-Y_0)\exp\{-\exp[\frac{\mu_{\max}e(\lambda-t)}{Y_{\max}-Y_0}+1]\} \quad (1)$$

$$CV=\frac{SD}{Mean} \quad (2)$$

式中: $Y_{\max}$ 为最大生长 OD 值; Y_0 为初始 OD 值; λ 为延滞期(h); $\mu_{\max}$ 为最大比生长速率(OD₆₀₀*h⁻¹); $e=\exp(1)$; SD 为标准差; Mean 为平均值。

1.3.3 二级生长模型的构建

根据不同血清型的 VP 的最适生长范围设计响应面实验, 对实验数据进行二元多次拟合, 建立生长参数与盐度、酸碱度和温度的二级响应面模型^[14], 公式(3)如下:

$$Y=b_0+\sum_{j=1}^k b_j x_j+\sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2+\sum_j \sum_{i=2}^k b_{ji} x_j x_i+\varepsilon \quad (3)$$

式中: Y 为响应预测值; b_0 为常数项; b_j 、 b_{jj} 和 b_{ji} 为线性系数; x_j 、 x_i 为模型的自变量因素; ε 为模型误差。

1.3.4 模型拟合优度的评价

本研究采用决定系数(R^2)评价模型的拟合优度, R^2 取值范围在 0 到 1 之间, 越接近 1 表示模型对观测值的解释能力越强, 计算如公式(4)所示^[15]:

$$R^2=1-\frac{\sum(y_i-\hat{y}_i)^2}{\sum(y_i-\bar{y})^2} \quad (4)$$

式中: y_i , 观测值; $\hat{y}_i$, 模型预测值; $\bar{y}$, 数据集的均值。

1.4 数据处理

本研究采用 Excel 2021 进行数据统计和处理, 采用 Origin Pro 2021 软件建立一级生长模型及作图, 采用 Design-Expert 13 软件建立二级响应面模型, 将模型的生长参数纳入广义线性模型(generalized linear models, GLMs), 采用 SPSS 22.0 软件分析各因素对 VP 生长参数的影响, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株血清型鉴定

按照 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》对 15 株 VP 菌株进行血清型分型, 包括 4 株血清型 O3:K6 菌株(VP01~VP04)、5 株血清型 O10:K4 菌株(VP05~VP09)和 6 株其他血清型菌株(VP10~VP15)。

2.2 一级生长模型

2.2.1 不同盐度下 VP 的生长特性

不同盐度下 VP 模型的调整后的 R^2 (Adj R^2)均大于 0.98, 表明修正的 Gompertz 模型能够很好地拟合不同盐度下 VP 的生长曲线。盐度为 8.0%~10.0%时 VP 菌株均未见明显生长, 盐度为 5.0%~6.0%时仅有 VP09、VP10 明显生长, 盐度为 7.0%时仅有流行株 VP09 明显生长(表 1)。盐度为 0.5%~7.0%时, VP 菌株的 $\mu_{\max}$ 值分别为 (0.60±0.17)、(0.63±0.02)、(0.77±0.03)、(0.54±0.07)、(0.22±0.08)、(0.08±0.05)、(0.08±0.05)、(0.03±0.03) (OD₆₀₀*h⁻¹); $Y_{\max}$ 值分别为 (0.78±0.16)、(2.01±0.02)、(2.34±0.02)、(2.06±0.22)、(0.70±0.24)、(0.29±0.20)、(0.38±0.26)、(0.12±0.11); λ 值分别为 (13.67±0.82)、(0.647±0.38)、(4.60±0.24)、(4.59±0.25)、(9.41±2.25)、(6.44±0.06)、(11.67±2.30)、9.37 h(图 1)。当盐度大于 2.0%, 随着盐度的升高, 菌株的 $\mu_{\max}$ 、 $Y_{\max}$ 逐渐减小, λ 逐渐增大, 同时菌株 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的 CV 值也逐渐增大, 而同一盐度条件下菌株间 λ 的 CV 值均较小(图 1)。因此本研究中盐度 1.0%~3.0%为 VP 的最适生长区间, VP 所处的盐度环境离最适生长盐度条件越远, 菌株之间 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的变异系数越大。统计流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)和其他血清型菌株在不同盐度下的生长参数的平均值进行显著性差异分析: 在盐度为 0.5%时 O3:K6 菌株 λ 值大于 O10:K4 菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 在盐度为 3.0%时 O3:K6 菌株 $Y_{\max}$ 值小于 O10:K4 菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 其他条件下差异不显著($P>0.05$)(图 2)。

表 1 不同盐度下 VP 的 $\mu_{\max}$ 值											
Table 1 $\mu_{\max}$ values of VP under different salinities											
菌株	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%	6.0%	7.0%	8.0%	9.0%	10.0%
VP01	2.20	0.64	0.64	0.44	-	-	-	-	-	-	-
VP02	-	0.56	0.72	-	-	-	-	-	-	-	-
VP03	-	0.76	0.98	-	-	-	-	-	-	-	-
VP04	0.51	0.49	0.55	0.49	0.47	-	-	-	-	-	-
VP05	0.53	0.57	0.76	0.48	0.56	-	-	-	-	-	-
VP06	-	0.61	0.64	0.51	-	-	-	-	-	-	-
VP07	-	0.65	0.78	0.62	0.97	-	-	-	-	-	-
VP08	1.63	0.73	0.69	0.50	-	-	-	-	-	-	-
VP09	0.43	0.52	0.77	0.61	0.42	0.44	0.54	0.46	-	-	-
VP10	1.04	0.70	0.77	0.81	0.38	0.70	0.66	-	-	-	-
VP11	0.64	0.68	0.98	1.11	-	-	-	-	-	-	-
VP12	0.68	0.54	0.83	0.79	-	-	-	-	-	-	-
VP13	0.95	0.73	0.87	0.72	-	-	-	-	-	-	-
VP14	-	0.69	0.84	0.65	-	-	-	-	-	-	-
VP15	0.38	0.57	0.74	0.40	0.46	-	-	-	-	-	-

注: -表示菌株未见明显生长, 未能拟合 $\mu_{\max}$ 值, 表 2、3 同。

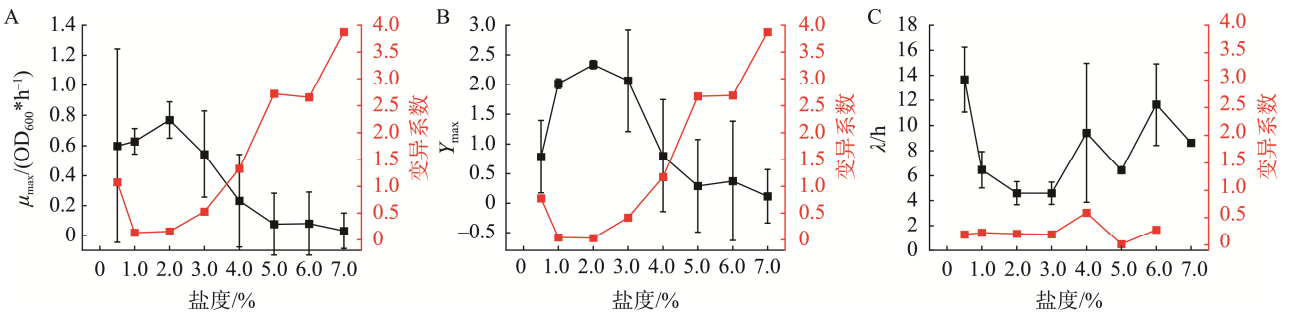
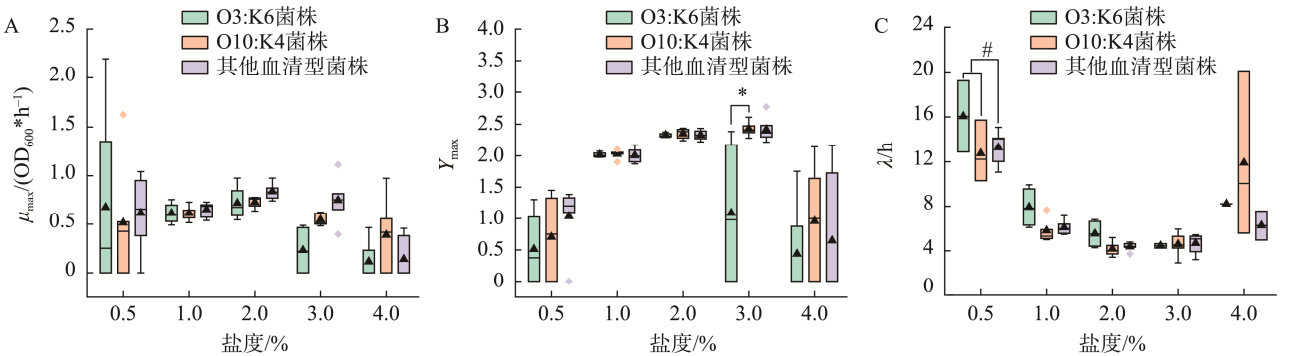


图 1 不同盐度下 VP 的平均生长参数和变异系数图
Fig.1 Curves of VP average growth parameters and coefficient of variation under different salinity



注: *表示 O3:K6 菌株与 O10:K4 菌株相比差异显著($P<0.05$); #表示流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)与其他血清型菌株相比差异显著($P<0.05$); 图 4、6 同。

图 2 不同盐度下不同血清型 VP 的生长参数
Fig.2 Growth parameters of different serotypes of VP under different salinity

2.2.2 不同酸碱度下 VP 的生长特性

不同酸碱度下 VP 模型的 Adj R^2 均大于 0.9, 表明修正的 Gompertz 模型能够很好地拟合不同酸碱度下 VP 的生长曲线。pH 为 3.0~5.0 和 11.0 时 VP 菌株均未见明显生长, pH 为 10.0 时仅有 VP01、VP04、VP06、VP15 明显生长(表 2)。pH 6.0~10.0 的培养条件下, VP 菌株的 $\mu_{\max}$ 值分别为(0.83±0.12)、(0.50±0.01)、(0.71±0.07)、(0.39±0.07)、(0.13±0.06) ($\text{OD}_{600} \cdot \text{h}^{-1}$); $Y_{\max}$ 值分别为 (0.73±0.08)、(2.40±0.04)、(2.03±0.15)、(1.38±0.23)、(0.45±0.20); λ 值分别为(7.34±0.47)、(4.33±0.29)、(4.75±0.27)、(6.16±0.39)、(6.76±0.60) h(图 3)。当 pH 大于 7.0, 随着酸碱度的增加, 菌

株的 $\mu_{\max}$ 、 $Y_{\max}$ 逐渐减小, λ 逐渐增大, 同时菌株 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的 CV 值也逐渐增大, 而同一酸碱度条件下菌株间 λ 的 CV 值均较小(图 3)。因此本研究中 pH 7.0~9.0 为 VP 的最适生长区间, VP 所处的酸碱度环境离最适生长酸碱度条件越远, 菌株之间 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的变异系数越大。统计流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)和其他血清型菌株在不同酸碱度下的生长参数的平均值进行显著性差异分析: 在 pH 为 9.0 时 O3:K6 菌株 $Y_{\max}$ 值大于 O10:K4 菌株, 存在显著性差异 ($P<0.05$); 在 pH 为 10.0 时流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4) $Y_{\max}$ 值大于其他血清型菌株, 存在显著性差异 ($P<0.05$); 其他条件下差异不显著 ($P>0.05$)(图 4)。

表 2 不同酸碱度下 VP 的 $\mu_{\max}$ 值
Table 2 $\mu_{\max}$ values of VP under different pH

菌株	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0	pH 11.0
VP01	-	-	-	0.95	0.48	0.93	0.60	0.48	-
VP02	-	-	-	1.57	0.49	0.90	0.53	-	-
VP03	-	-	-	1.23	0.49	0.73	0.52	-	-
VP04	-	-	-	0.24	0.44	0.54	0.52	0.52	-
VP05	-	-	-	0.27	0.50	0.53	0.48	-	-
VP06	-	-	-	1.33	0.50	0.81	0.62	0.48	-
VP07	-	-	-	0.87	0.58	-	-	-	-
VP08	-	-	-	0.91	0.45	0.97	-	-	-
VP09	-	-	-	0.61	0.45	0.55	0.46	-	-
VP10	-	-	-	1.27	0.48	0.99	0.66	-	-
VP11	-	-	-	1.22	0.56	0.98	-	-	-
VP12	-	-	-	0.31	0.57	0.60	0.40	-	-
VP13	-	-	-	-	0.54	0.69	0.48	-	-
VP14	-	-	-	0.67	0.51	0.54	-	-	-
VP15	-	-	-	1.02	0.49	1.01	0.60	0.44	-

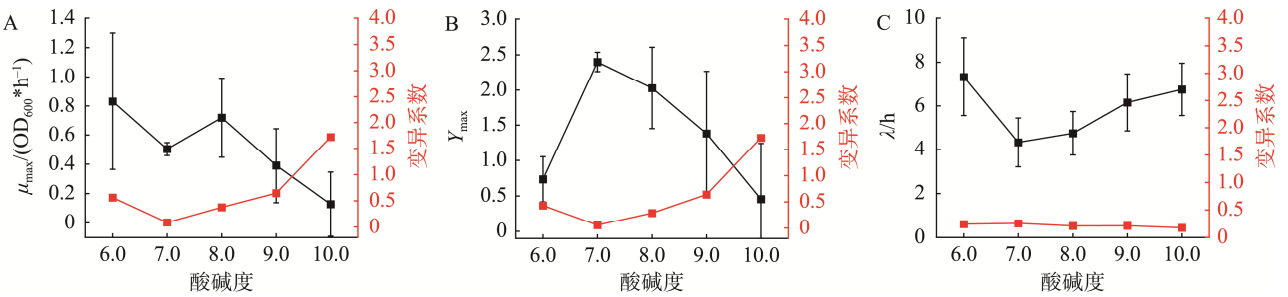


图 3 不同酸碱度下 VP 的平均生长参数和变异系数曲线图
Fig.3 Curves of VP average growth parameters and coefficient of variation under different pH

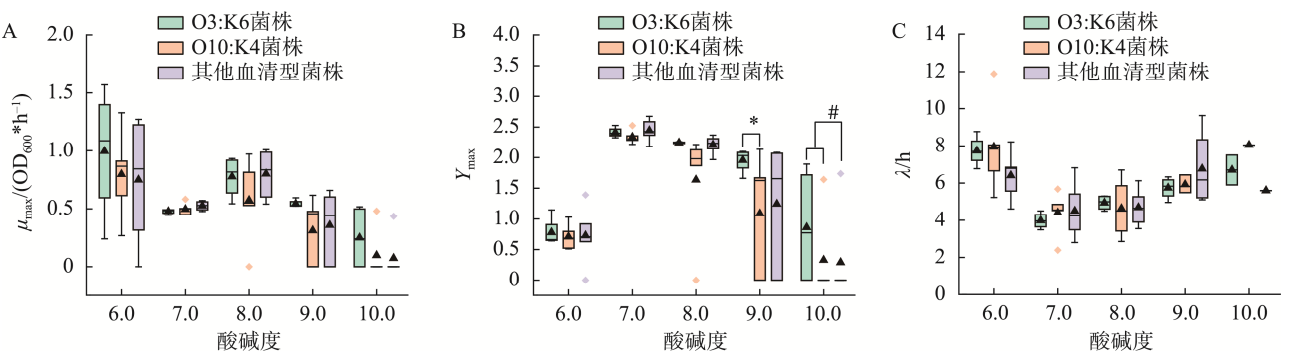


图 4 不同酸碱度下不同血清型 VP 的生长参数
Fig.4 Growth parameters of different serotypes of VP under different pH

2.2.3 不同温度下 VP 的生长特性

不同温度下 VP 模型的 Adj R^2 均大于 0.98, 表明修正的 Gompertz 模型能够很好地拟合不同温度下 VP 的生长曲线。在 50 °C 环境中 VP 菌株均未见明显生长, 在 45 °C 环境中仅有 VP08、VP09、VP10、VP11、VP13 明显生长(表 3)。温度 16~45 °C 的培养条件下, VP 菌株的 $\mu_{\max}$ 值分别为 (0.52±0.02)、(0.67±0.02)、(0.74±0.03)、(0.59±0.07)、(0.16±0.06) (OD₆₀₀*h⁻¹); $Y_{\max}$ 值分别为 (1.41±0.16)、(2.60±0.04)、(2.53±0.03)、(1.73±0.14)、(0.22±0.08); λ 值分别为 (15.73±0.58)、(7.80±1.00)、(6.24±0.42)、(5.26±0.25)、(13.51±0.91) h(图 5)。当温度高于 30 °C, 随着温度的升高, 菌株的 $\mu_{\max}$ 、 $Y_{\max}$ 逐渐减小, λ 从 40 °C 开始逐渐增大, 菌株 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的 CV 值也逐渐增大; 当温度低于 30 °C, 随着温度的降低, 菌株的 $\mu_{\max}$ 逐渐减小, $Y_{\max}$ 从 20 °C 开始减小, λ 逐渐增大, 菌株 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$

的 CV 值也增大, 而同一温度条件下菌株间 λ 的 CV 值均较小(图 5)。因此本研究中温度 20~40 °C 为 VP 的最适生长区间, VP 所处的温度环境离最适生长温度条件越远, 菌株之间 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 的变异系数越大。统计流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)和其他血清型菌株在不同温度下的生长参数的平均值进行显著性差异分析: 在温度为 16 °C 时流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4) $Y_{\max}$ 值大于其他血清型菌株, O3:K6 菌株 $Y_{\max}$ 值小于 O10:K4 菌株, O3:K6 菌株 λ 值大于 O10:K4 菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 在温度为 20 °C 时 O3:K6 菌株 λ 值大于 O10:K4 菌株和其他血清型菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 在温度为 40 °C、45 °C 时 O3:K6 菌株 $\mu_{\max}$ 值小于 O10:K4 菌株和其他血清型菌株, O3:K6 菌株 $Y_{\max}$ 值小于 O10:K4 菌株和其他血清型菌株, 存在显著性差异($P<0.05$); 其他条件下差异不显著($P>0.05$)(图 6)。

表 3 不同温度下 VP 的 $\mu_{\max}$ 值
Table 3 $\mu_{\max}$ values of VP under different temperatures

菌株	16 °C	20 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C
VP01	0.56	0.79	0.73	0.56	-	-
VP02	0.59	0.71	0.81	0.53	-	-
VP03	0.41	0.72	0.80	0.51	-	-
VP04	0.54	0.75	0.94	-	-	-
VP05	0.47	0.69	0.79	0.48	-	-
VP06	0.56	0.78	0.76	0.73	-	-
VP07	0.53	0.80	0.89	0.52	-	-
VP08	0.66	0.56	0.70	0.62	0.57	-
VP09	0.55	0.67	0.78	0.85	0.58	-
VP10	0.49	0.72	0.65	0.46	0.37	-
VP11	0.61	0.64	0.67	0.83	0.42	-
VP12	0.62	0.57	0.64	0.65	-	-
VP13	0.49	0.53	0.52	0.31	0.44	-
VP14	0.47	0.50	0.61	0.75	-	-
VP15	0.32	0.68	0.77	1.12	-	-

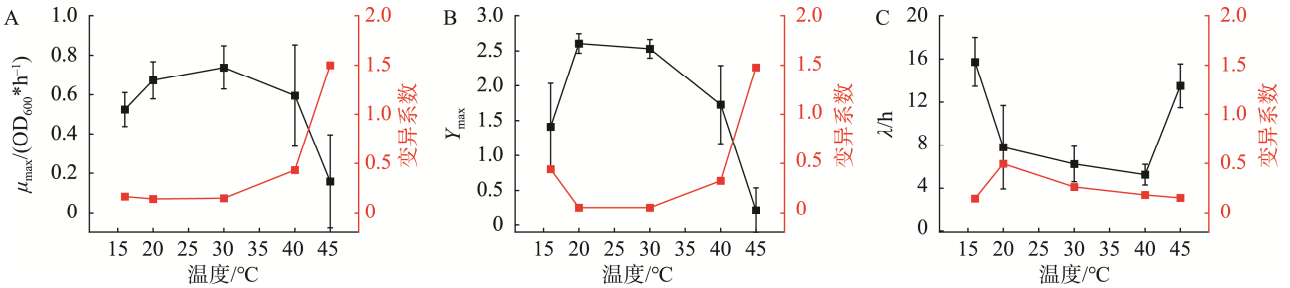
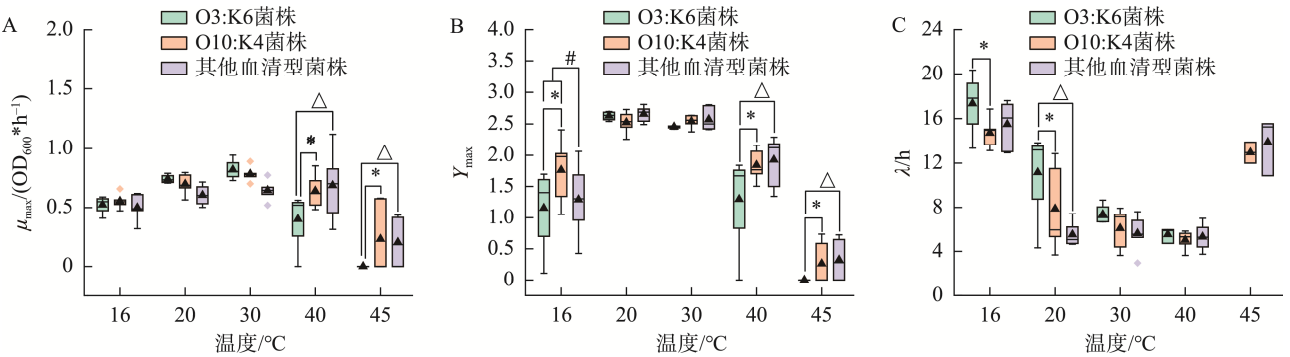


图 5 不同温度下 VP 的平均生长参数和变异系数曲线图
Fig.5 Curves of VP average growth parameters and coefficient of variation at different temperatures



注: Δ: 表示 O3:K6 菌株与其他血清型菌株相比差异显著($P<0.05$)。
图 6 不同温度下不同血清型 VP 的生长参数
Fig.6 Growth parameters of different serotypes of VP under different temperatures

2.2.4 VP 一级生长模型

根据不同盐度、酸碱度和温度条件得到的 VP 的平均生长参数, 构建了适用于各特定条件下 VP 的一级生

长模型, 包括不同盐度(0.5%~7.0%)、酸碱度(pH 6.0~10.0)和温度(16~45 °C), 其中 $Y(t)$ 代表在时间 t 时的 VP 的 OD_{600} 值(表 4)。

表 4 VP 的一级生长模型
Table 4 First-order growth model of VP

实验条件	一级生长模型
盐度 0.5%	$Y(t)=0.1285+0.6576*\exp\{-\exp[(0.5979e(13.6678-t)/0.6576)+1]\}$
盐度 1.0%	$Y(t)=0.1078+1.9058*\exp\{-\exp[(0.6286e(6.4747-t)/1.9058)+1]\}$
盐度 2.0%	$Y(t)=0.0865+2.2491*\exp\{-\exp[(0.7693e(4.6027-t)/2.2491)+1]\}$
盐度 3.0%	$Y(t)=0.0665+1.9881*\exp\{-\exp[(0.5433e(4.5941-t)/1.9981)+1]\}$
盐度 4.0%	$Y(t)=0.0780+0.6668*\exp\{-\exp[(0.2170e(9.4081-t)/0.6668)+1]\}$
盐度 5.0%	$Y(t)=0.0807+0.2123*\exp\{-\exp[(0.0760e(6.4430-t)/0.2123)+1]\}$
盐度 6.0%	$Y(t)=0.1180+0.2573*\exp\{-\exp[(0.0306e(11.6668-t)/0.2573)+1]\}$
盐度 7.0%	$Y(t)=0.1059+0.0109*\exp\{-\exp[(0.4597e(8.6271-t)/0.0109)+1]\}$
pH 6.0	$Y(t)=0.0946+0.6392*\exp\{-\exp[(0.8314e(7.3365-t)/0.6392)+1]\}$
pH 7.0	$Y(t)=0.0501+2.3489*\exp\{-\exp[(0.5027e(4.3274-t)/2.3489)+1]\}$
pH 8.0	$Y(t)=0.0748+1.9534*\exp\{-\exp[(0.7190e(4.7482-t)/1.9534)+1]\}$
pH 9.0	$Y(t)=0.0994+1.2831*\exp\{-\exp[(0.4185e(6.1636-t)/1.2831)+1]\}$
pH 10.0	$Y(t)=0.1011+0.3537*\exp\{-\exp[(0.1273e(6.7607-t)/0.3537)+1]\}$
16 °C	$Y(t)=0.0901+1.3216*\exp\{-\exp[(0.5245e(15.7343-t)/1.3216)+1]\}$
20 °C	$Y(t)=0.0878+2.5176*\exp\{-\exp[(0.6728e(7.8020-t)/2.5176)+1]\}$
30 °C	$Y(t)=0.0798+2.4500*\exp\{-\exp[(0.7383e(6.2404-t)/2.4500)+1]\}$
40 °C	$Y(t)=0.0881+1.7661*\exp\{-\exp[(0.5950e(5.2564-t)/1.7661)+1]\}$
45 °C	$Y(t)=0.1128+0.5560*\exp\{-\exp[(0.1582e(13.5130-t)/0.5560)+1]\}$

2.3 VP 二级响应面模型

根据 VP 的最适生长范围设计三因素三水平的响应面分析实验(表 5), 对各条件下血清型为 O3:K6、O10:K4 的 VP 培养 20 h 后的 OD₆₀₀ 值、μ_{max} 和 λ 进行二次多元回归拟合, 得到预测值 Y 对自变量 A、B 和 C 的二次多项回归方程(表 6、7)。对回归模型进行方差分析, 结果表明, μ_{max} 的二级响应面生长模型差异不显著(P>0.05), OD₆₀₀ 值和 λ 二级响应面生长模型差异均显著(P<0.05), OD₆₀₀ 值的二级响应面生长模型 R² 均大于 0.94, λ 的二级响应面生长模型 R² 均大于 0.95, 表明建立的响应面模型能较好地拟合盐度、

酸碱度和温度对血清型 O3:K6、O10:K4 VP 最大生长 OD 值和延滞期的影响。

表 5 VP 的响应面分析实验设计 Table 5 Design of response surface analysis test for VP				
变量	编码	水平		
		-1	0	+1
盐度/%	A	1	2	3
酸碱度	B	7.0	8.0	9.0
温度/°C	C	25	30	35

表 6 VP OD₆₀₀ 值的二级响应面模型
Table 6 Secondary response surface model for the OD₆₀₀ values of VP

菌株	二级响应面模型	F	P(显著水平)	R ²
VP01	$Y=2.3894+0.0039A-0.3335B-0.0147C+0.0270AB-0.0203AC+0.0118BC-0.2223A^2-0.2182B^2-0.2093C^2$	22.42	0.0016*	0.9758
VP02	$Y=2.2824+0.046A-0.2075B-0.0400C+0.0017AB+0.0653AC+0.1356BC-0.1158A^2-0.0543B^2-0.1974C^2$	9.79	0.0109*	0.9463
VP03	$Y=2.2639+0.0823A-0.2893B-0.0358C+0.0015AB+0.1301AC+0.0837BC-0.1801A^2-0.2767B^2-0.1126C^2$	13.35	0.0054*	0.9601
VP04	$Y=2.2546+0.1168A-0.2497B+0.0154C-0.0711AB+0.1099AC+0.1065BC-0.0432A^2-0.1149B^2-0.1613C^2$	19.48	0.0022*	0.9723
VP05	$Y=2.3400+0.0683A-0.2184B-0.005C-0.05242AB+0.1338AC+0.0189BC-0.1190A^2-0.1407B^2-0.0857C^2$	25.84	0.0011*	0.9790
VP06	$Y=2.3748+0.0710A-0.2291B-0.0367C-0.0709AB+0.0995AC+0.1261BC-0.1390A^2-0.1357B^2-0.1490C^2$	33.80	0.0006*	0.9838
VP07	$Y=2.3138+0.0458A-0.3229B+0.0952C-0.1092AB+0.1053AC+0.03675BC-0.2543A^2-0.2424B^2-0.1020C^2$	9.20	0.0125*	0.9431
VP08	$Y=2.4827-0.0355A-0.1555B-0.0285C-0.0152AB-0.0202AC+0.0982BC-0.3610A^2-0.1505B^2-0.1925C^2$	10.91	0.0085*	0.9515
VP09	$Y=2.2538+0.0742A-0.3061B+0.0224C+0.0525AB+0.0248AC+0.0618BC-0.1868A^2-0.1051B^2-0.0763C^2$	8.92	0.0133*	0.9414

注: *模型是显著的, 下同。

表 7 VP 延滞期的二级响应面模型
Table 7 Secondary response surface model for the Lag time of VP

菌株	二级响应面模型	F	P(显著水平)	R ²
VP01	$Y=5.2104+0.5109A+0.8052B-1.7111C-0.1702AB-0.2959AC+0.2751BC+0.7242A^2+1.4496B^2+1.2213C^2$	26.69	0.0011*	0.9796
VP02	$Y=5.5731+0.1067A+0.4230B-1.7316C-0.4907AB-0.5063AC+0.2874BC+0.3529A^2+0.7701B^2+0.9077C^2$	21.50	0.0018*	0.9748
VP03	$Y=5.6291+0.2707A+0.6738B-2.0894C-0.0327AB-0.3175AC-0.1387BC+0.4692A^2+0.9054B^2+1.5379C^2$	27.40	0.0010*	0.9801
VP04	$Y=5.2364+0.3476A+1.1302B-1.7205C-0.3323AB-0.1892AC+0.2670BC+0.5349A^2+1.1518B^2+1.3420C^2$	124.82	<0.0001*	0.9956
VP05	$Y=4.9890+0.5229A+0.8748B-1.9481C-0.2605AB-0.1387AC+0.1502BC+1.0806A^2+1.6697B^2+0.9784C^2$	191.52	<0.0001*	0.9971
VP06	$Y=5.1330+0.1424A+0.9306B-1.8918C-0.3784AB-0.2894AC+0.1922BC+0.0504A^2+1.0542B^2+1.3264C^2$	55.82	<0.0001*	0.9901
VP07	$Y=6.0626+0.6327A+0.9201B-2.4331C-0.4804AB-0.3492AC+0.1649BC+1.1429A^2+1.7650B^2+0.7701C^2$	99.39	<0.0001*	0.9944
VP08	$Y=5.6655+0.1800A+0.6686B-2.2415C-0.2348AB-0.3781AC+0.2465BC+0.9637A^2+0.8163B^2+0.7524C^2$	99.39	0.0001*	0.9917
VP09	$Y=5.1969-0.7294A+0.5239B-2.5358C-0.8476AB-1.2762AC+0.0650BC-0.2726A^2+1.3435B^2+0.7702C^2$	13.18	0.0055*	0.9596

3 讨论与结论

在预测微生物学领域,针对食品安全的研究与应用日益深入,国内外学者普遍聚焦于初级模型与二级模型的构建与优化,以期精准把握微生物的生长动态变化。在众多模型中,修正的 Gompertz 模型因其卓越的拟合优度,已成为预测 VP 随时间变化的生长动态的首选模型^[16-18]。本研究采用此模型作为一级生长模型的拟合工具,发现其在不同盐度、酸碱度及温度条件下均展现出高度的适用性和准确性,能够精细描绘 VP 的生长曲线,为食品安全管理提供了更为可靠与科学的预测依据。此外,响应面方法作为生物膜及病原微生物生长条件优化的重要技术手段,在食源性病原菌生长曲线的二级模型拟合中展现出显著优势^[19]。本研究在已有的初级模型框架之上,进行了深入的拓展与优化,成功构建了针对 VP 大流行菌株(O3:K6、O10:K4)在复杂环境条件下最大生长 OD 值和延滞期的二级响应面生长模型。该模型综合考虑了温度、盐度及 pH 这 3 个关键因素对菌株生长的多维度影响。经过统计分析验证,结果显示,无论是对于 O3:K6 还是 O10:K4 血清型,所建立的二级响应面生长模型均展现出了显著的差异性($P<0.05$),这表明模型能够精准捕捉到不同环境条件下菌株的生长差异。尽管响应面法在构建模型方面有着广泛的应用,但在针对 VP 菌株最大比生长速率的预测上,所构建的二级预测模型效果并未达到预期,显示出一定的局限性。值得注意的是,环境中的流行毒株发生了一定程度的血清变异,许多新的血清型正在不断涌现,例如血清型 O1:K25、O3:K68 和 O5:KUT 等,这些血清型在世界各地都引起了多起疫情和散发病例^[20]。VP 的 O 抗原和 K 抗原正在积极进化,这将可能导致 VP 蛋白质表达谱的改变,及其毒力因子表达的改变^[21-22]。当前模型在捕捉 VP 菌株生长特性的复杂性和多样性方面尚存不足,为了更准确地预测 VP 的生长行为及其对环境变化的响应,未来研究应进一步对现有生长预测模型进行系统的优化与完善,以应对日益复杂的公共卫生与食品安全挑战。

本研究设置不同盐度、酸碱度和温度等环境压力,对不同血清型的 VP 的生长特性进行研究,研究结果表明 VP 菌株之间存在生长异质性。LIU 等^[23]对 50 株不同来源的 VP 分离株的最大比生长速率所对应的生长动力学特征进行了评估,结果表明低、中等盐度条件下不同来源 VP 的最大比生长速率高于其他条件,这与本研究结果一致。随着 NaCl 浓度的升高,VP 在高盐环境下的生长能力受到抑制,盐度为 7%时仅有 1 株血清型为 O10:K4 的菌株见明显生长。不同的 VP 菌株拥有不同的基因组序列和基因表达模式,O10:K4 型菌株可能携带了与盐度适应相关的特定基

因或基因簇,这些基因编码的蛋白质或酶类能够增强其在高盐环境下的生存和繁殖能力^[24]。本研究结果显示 VP 对酸性环境敏感,TANAKA 等^[25]的研究表明 VP 只有在有外源赖氨酸存在的情况下才能耐受低 pH。既往关于酸碱度与 VP 生长变异性关联的研究通常限制在 pH 5.0~9.0 范围之间^[11,26-27],而对于高 pH 的讨论较少。本研究将 pH 范围拓宽至 3.0~11.0,发现在高 pH 环境下流行株(血清型为 O3:K6、O10:K4)的生长能力强于其他血清型菌株。这些流行株可能携带了与高 pH 环境适应性相关的特定基因或基因簇,这些基因在高 pH 条件下会被诱导表达,从而赋予菌株更强的生长能力^[28]。此外,本研究结果表明在高温条件下 VP 大多无法生长,不同血清型之间的生长差异不显著,但有一部分菌株能够适应高温环境(45 °C),这种差异可能是由于不同菌株之间的热应激适应性谱系不同^[29-30]。在深入探讨低温环境对细菌生长及生物膜形成的影响时,已有研究明确指出,包括 *aphA*、*hapR*、*vpsR* 和 *vpsT* 等在内的关键生物膜调节因子,通过其转录调控作用,显著影响着细菌在低温条件下的生物膜形成能力^[31]。本研究观察到低温环境(16 °C)下流行株(O3:K6 和 O10:K4)具备更强的生长优势,可能归因于其低温生物膜基因表达的特异性调控。当 VP 所处的环境离最适生长条件越远,菌株之间在 $\mu_{\max}$ 和 $Y_{\max}$ 上展现出的差异性会显著增大,这一现象与先前的研究结果相吻合^[32]。频繁的突变、基因重组以及基因横向转移等分子机制,赋予了 VP 菌株高度的基因组可塑性,使它们能够在面对极端或不环境条件时,迅速调整其遗传构成以优化生存策略^[33]。因此,部分 VP 菌株能够迅速适应环境变迁,在不利条件下依然保持较强的生长能力和生存竞争力。

综上所述,VP 菌株之间存在生长异质性,但在某些极端条件下,不同血清型之间会表现出更明显的生长差异,修正的 Gompertz 模型和二级响应面生长模型适用于分析和预测不同实验条件下 VP 的生长情况,且二级响应面生长模型能够为 VP 提供额外的环境参数阈值,为有效预测和控制 VP 的生长和行为提供数据支持。

参考文献

- [1] PAZHANI GP, CHOWDHURY G, RAMAMURTHY T. Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival, host colonization, and infection [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 737299.
- [2] JIANG H, SUN Z, GUO Q, *et al.* Microfluidic thread-based electrochemical aptasensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biosensors & Bioelectronics: The International Journal*, 2021, 182: 113191.
- [3] KUMAGAI Y, PIRES SM, KUBOTA K, *et al.* Attributing human foodborne diseases to food sources and water in Japan using analysis of outbreak surveillance data [J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(12):

- 2087–2094.
- [4] LEE SH, LEE HJ, MYUNG GE, *et al.* Distribution of pathogenic *Vibrio* species in the coastal seawater of South Korea (2017–2018) [J]. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2019, 10(6): 337–342.
- [5] 陈婷, 周庆琼, 戚平, 等. 2011–2020 年中国食源性疾病流行病学分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(10): 1545–1550.
- CHEN T, ZHOU QQ, QI P, *et al.* Epidemiological analysis of foodborne diseases in China from 2011 to 2020 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(10): 1545–1550.
- [6] ZHOU M, CHEN W, SHI C, *et al.* Combination of multilocus sequence typing and GS-PCR reveals an association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* clone with clinical and seafood isolates [J]. *Journal Food Science*, 2018, 83(10): 2536–2543.
- [7] MARTINEZ-URTAZA J, BAKER-AUSTIN C. *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Trends Microbiology*, 2020, 28(10): 867–868.
- [8] LI J, XUE F, YANG Z, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* strains of pandemic serotypes identified from clinical and environmental samples from Jiangsu, China [J]. *Front Microbiology*, 2016, 7: 787.
- [9] HUANG Y, DU Y, WANG H, *et al.* New variant of *Vibrio parahaemolyticus*, sequence type 3, serotype O10:K4, China, 2020 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2022, 28(6): 1261–1264.
- [10] PURGAR M, KAPETANOVIĆ D, GEČEK S, *et al.* Investigating the ability of growth models to predict *in situ* *Vibrio* spp. abundances [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1765.
- [11] VELEZ KEC, LEIGHTON RE, DECHO AW, *et al.* Modeling pH and temperature effects as climatic hazards in *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* planktonic growth and biofilm formation [J]. *GeoHealth*, 2023, 7(4): e2022GH000769.
- [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): 828–837.
- [13] ZWIETERING MH, JONGENBURGER I, ROMBOUTS FM, *et al.* Modeling of the bacterial growth curve [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1875–1881.
- [14] ABHINI KN, RAJAN AB, FATHIMATHU ZK, *et al.* Response surface methodological optimization of *L*-asparaginase production from the medicinal plant endophyte *Acinetobacter baumannii* ZAS1 [J]. *Journal, Genetic Engineering & biotechnology*, 2022, 20(1): 22.
- [15] STAHEL W, WILCOX RR. Introduction to robust estimation and hypothesis testing [J]. *Journal of the American Statistical Association*, 1998, 93(443): 1240.
- [16] WANG Y, ZHAO Y, PAN Y, *et al.* Comparison on the growth variability of *Vibrio parahaemolyticus* coupled with strain sources and genotypes analyses in simulated gastric digestion fluids [J]. *Front Microbiology*, 2020, 11: 212.
- [17] 王梦雪, 梁思源, 张崇武, 等. 不同酒精度、盐度及酸碱度条件下醉泥螺中副溶血性弧菌的一级生长预测模型[J]. *工业微生物*, 2019, 49(4): 27–33.
- WANG MX, LIANG SY, ZHANG CW, *et al.* First-order growth prediction model of *Vibrio parahaemolyticus* in wine-soaked bullacta exarata with different alcohol, salinity and acidity [J]. *Industrial Microbiology*, 2019, 49(4): 27–33.
- [18] 寇力丹, 朱梦, 罗小菊, 等. 5 种致泻性大肠埃希氏菌在生菜和圣女果上的生长特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(18): 137–145.
- KOU LD, ZHU M, LUO XJ, *et al.* Study on the growth characteristics of 5 strains of diarrheagenic *Escherichia coli* on lettuces and cherry tomatoes [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(18): 137–145.
- [19] GRYGORCEWICZ B, GLIŹNIEWICZ M, OLSZEWSKA P, *et al.* Response surface methodology application for bacteriophage-antibiotic antibiofilm activity optimization [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2352.
- [20] HUANG Y, DU Y, WANG H, *et al.* New variant of *Vibrio parahaemolyticus*, sequence type 3, serotype O10:K4, China, 2020 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2022, 28(6): 1261–1264.
- [21] PAUDYAL N, PAN H, LIAO X, *et al.* A Meta-analysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016 [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2018, 15(4): 187–197.
- [22] YANG C, PEI X, WU Y, *et al.* Recent mixing of *Vibrio parahaemolyticus* populations [J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(10): 2578–2588.
- [23] LIU B, LIU H, PAN Y, *et al.* Comparison of the effects of environmental parameters on the growth variability of *Vibrio parahaemolyticus* coupled with strain sources and genotypes analyses [J]. *Front Microbiology*, 2016, 7: 994.
- [24] SINGH M, SINGH H, KAUR K, *et al.* Characterization and regulation of salt upregulated cyclophilin from a halotolerant strain of *Penicillium oxalicum* [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 17433.
- [25] TANAKA Y, KIMURA B, TAKAHASHI H, *et al.* Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: Kinetics of transcription and role in acid resistance [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(5): 1283–1293.
- [26] 贺群, 黄和, 刘亚, 等. 面包虾中副溶血性弧菌在 pH 影响下生长预测模型的建立[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(20): 107–110, 116.
- HE Q, HUANG H, LIU Y, *et al.* Establishment of growth predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* in bread shrimp under different pH condition [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(20): 107–110, 116.
- [27] NISHINA T, WADA M, OZAWA H, *et al.* Growth kinetics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 under varying conditions of pH, NaCl concentration and temperature [J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2004, 45(1): 35–37.
- [28] HEISTERING L, DOHM JC, PAES BG, *et al.* Genotypic and phenotypic diversity among *Komagataella* species reveals a hidden pathway for xylose utilization [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 70.
- [29] POURMOZAFFAR S, TAMADONI JS, GOZARI M, *et al.* The first reporting of prevalence *Vibrio* species and expression of HSP genes in rayed pearl oyster (*Pinctada radiata*) under thermal conditions [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108907.
- [30] MIWA T, TAGUCHI H. *Escherichia coli* small heat shock protein IbpA plays a role in regulating the heat shock response by controlling the translation of σ^{32} [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(32): e2304841120.
- [31] TOWNSLEY L, SISON MMP, MEHIC S, *et al.* Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4441–4452.
- [32] 牛丽, 巴永兵, 白凤佳, 等. 耐药性副溶血性弧菌生长异质性比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 1802–1809.
- NIU L, BA YB, BAI FJ, *et al.* Comparative study on growth heterogeneity of antimicrobial resistant *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(8): 1802–1809.
- [33] OBERBECKMANN S, FUCHS BM, MEINERS M, *et al.* Seasonal dynamics and modeling of a vibrio community in coastal waters of the North Sea [J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(3): 543–551.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)