

副溶血性弧菌温度-盐度双因素预测模型的建立

李涛 宁喜斌*

(上海海洋大学 上海 201306)

摘要: 本文以副溶血性弧菌 VP BJ1.1997 为研究对象, 采用均匀设计试验方法, 建立并验证了温度范围为 7°C~43°C, 盐度范围为 0.5%~9.5%NaCl 的生长动力学模型。结果表明, 所选一级模型的拟合效果优劣依次为 Logistic 方程>Gompertz 方程>Linear 方程, 以 Logistic 方程为一级模型计算生长参数; 二级模型采用平方根模型进行拟合, 得到模型相关系数 r 为 0.9863, 最低生长温度 T_{\min} 为 9.0506°C, 最高生长盐度为 5.93%NaCl(对应最低生长水分活度 $A_{w \min}$ 为 0.9227), 经 F 检验、残差分析和偏差因子、准确因子验证, 模型可接受。

关键词: 预测模型, 副溶血性弧菌, 均匀设计

Development of Predictive Model for Combined Effect of Temperature and Salinity on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus*

LI Tao NING Xi-Bin*

(College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Based on the standard strain-*Vibrio parahaemolyticus* BJ1.1997, temperature (7°C~43°C) and salinity (0.5%~9.5% NaCl) which affected its growth status was studied with uniform design. The results showed that Logistic equation is optimal in primary models, the second is Gompertz equation, the last is Linear equation, so growth parameters can be calculated from Logistic equation. The secondary model was developed by square root models, its r value was 0.9863, the lowest growth temperature was 9.0506°C and the highest growth salinity was 5.93% [the corresponding lowest growth water activity ($A_{w \min}$) was 0.9227]. Through F test, residual analysis and evaluation by bias factor and accuracy factor, the model can exactly describe the relationship between the growth rate and combined effect of temperature and salinity (water activity).

Keywords: Predictive Model, *Vibrio parahaemolyticus*, Uniform Design

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP)又称嗜盐菌, 广泛分布于海湾、海岸线区域、盐湖及海产品中, 温热地带较多, 是沿海地区引起微

生物性食物中毒的重要病原菌。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已高居微生物性食物中毒的首位^[1]。该菌在水

产品中的天然带菌率较高, 温暖季节在海虾中可高达 90%^[2], 生长繁殖达一定量可引发人体病变, 因此研究副溶血性弧菌在水产品中的生长动力学状况, 建立预警机制, 对于保证水产品安全性具有重要意义。

影响副溶血性弧菌生长的因素众多, 如温度、盐度、pH 值等。目前国内学者多以温度为对象进行生长动力学研究, 已建立了副溶血性弧菌的温度预测模型以及低温失活模型等^[3,4], 但对温度、盐度等多因素协同作用模型的建立方法报道较少。本文以温度-盐度交互作用为对象进行研究, 鉴于副溶血性弧菌所涉及单因素生存范围较宽、研究二因素交互作用时所取水平数较多而采用均匀设计, 对副溶血性弧菌二级双因素模型的建立方法进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种: 副溶血性弧菌 VP BJ1.1997, 购于中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 主要试剂及培养基: 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB), 上海市疾病预防控制中心; TCBS 培养基, 上海康润生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器: 低温生化培养箱 LRH-250CL(温度波动 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$), 上海一恒科学仪器有限公司; HD-4 型智能水分活度测定仪, 无锡市华科仪器仪表有限公司。

1.2 菌种活化

挑取 24 h 斜面培养的 VP BJ1.1997 一环接种于 10 mL TSB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 备用。

1.3 菌体生长的测定

取制备好的菌悬液 0.1 mL 接种于装有 10 mL TSB 液体培养基的试管中(接种量为 10^2 CFU/mL $\sim 10^4$ CFU/mL), 将试管按设计条件培养, 每隔 1 h 取样测定, 采用平板计数法计数。每组培养条件平行 2 次。

1.4 试验方案设计

1.4.1 均匀试验设计因素水平表的选择: 本试验温度范围为 7 $^{\circ}\text{C}$ ~43 $^{\circ}\text{C}$, 盐度为 0.5%~9.5%NaCl, 因素水平表如表 1 所示。

1.4.2 均匀设计试验安排: 采用 10 因素 11 水平的 $U_{11}(11^{10})$ 均匀设计表。根据均匀设计表的使用原则, 2 因素的 $U_{11}(11^{10})$ 均匀设计表选第 1、7 列, 其他列和第 11 行为空。试验安排见表 3。

表 1 因素水平表
Table 1 The factor and level for uniform designing

| 因素 (Factors) | 水 平(Levels) | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 温度($^{\circ}\text{C}$) Temperature | 7 | 11 | 15 | 19 | 23 | 27 | 31 | 35 | 39 | 43 |
| 盐度(%) Salinity (Water activity) | 0.5 (0.9758) | 1.5 (0.9660) | 2.5 (0.9560) | 3.5 (0.9470) | 4.5 (0.9360) | 5.5 (0.9270) | 6.5 (0.9170) | 7.5 (0.9072) | 8.5 (0.8974) | 9.5 (0.8876) |

1.5 生长动力学模型的建立

1.5.1 一级模型: 选定 Linear 方程、Gompertz 模型及 Logistic 模型对试验数据进行拟合, 三种模型生物学意义表达式如表 2^[5]。

表 2 三种模型生物学意义表达式
Table 2 Biological equation of models

| 模型名称 Models' name | 生物学意义表达式 Biological equation |
|----------------------------------|---|
| Linear 方程 Linear equation | $\lg N = \lg N_0 + U * t$ |
| Gompertz 模型 Gompertz equation | $\lg N = \lg N_0 + A * \exp\{-\exp[U * e(M-t)/A+1]\}$ |
| Logistic 模型 Logistic equation | $\lg N = \lg N_0 + A / \{1 + \exp[4U(M-t)/A+1]\}$ |

式中, N : 微生物在时间 t 时的生物量; N_0 : $t=0$ 时的初始菌数; A : $t=+\infty$ 时的 $\lg N/N_0$, 即当 N 达到最大时所对应的值; U : 生长速率; M : 达到最大相对速率需要的时间。相关生长参数计算如下:

$$\text{最大比生长速率 } u_{\max} = U * e / A, e = 2.7148$$

$$\text{迟滞期 } LPD = M - (1/u_{\max})$$

$$\text{最大菌数 } MPD = \lg N_0 + A$$

模型之间拟合效果的差异可通过比较相关系数 r 和残差平方和(RSS)来获知。 r 越接近于 1, RSS 越小说明模型的拟合效果越好。

1.5.2 二级模型: 二级模型选用平方根模型, 数学描述如下^[6]:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = a(T - T_{\min})\sqrt{A_w - A_{w\min}} \quad (1)$$

为避免当温度 T 小于 T_{\min} 或水分活度 A_w 小于 $A_{w\min}$ 时, μ_{\max} 为负值的情况, 对模型修改如下:

$$\mu_{\max} = a^2 * (T - T_{\min})^2 * (A_w - A_{w\min}) \quad (2)$$

式中, μ_{\max} 是最大比生长速率; T_{\min} 是最低生长温度; A_w 为水分活度, $A_{w\min}$ 是微生物最低生长水分活度, 本实验中 A_w 大小以盐度进行调节; a 为系数。

1.5.3 模型验证: 对 μ_{\max} 实测值和模型预测值进行残差分析, 并应用偏差因子(Bias factor)和准确因子(Accuracy factor)对模型预测效果进行验证和评价,

计算公式如下。

$$Bf = 10^{(\sum \lg(\text{预测值}/\text{实测值})/n)}$$

$$Af = 10^{(\sum |\lg(\text{预测值}/\text{实测值})|/n)}$$

2 结果与分析

2.1 不同温度-水分活度条件下 VP 生长曲线的测定

根据 VP BJ1.1997 在不同温度-盐度组合条件下的生长数据, 绘制 VP 在不同培养条件下的生长曲线, 并据生长趋势不同区分为图 1(A)和(B)。

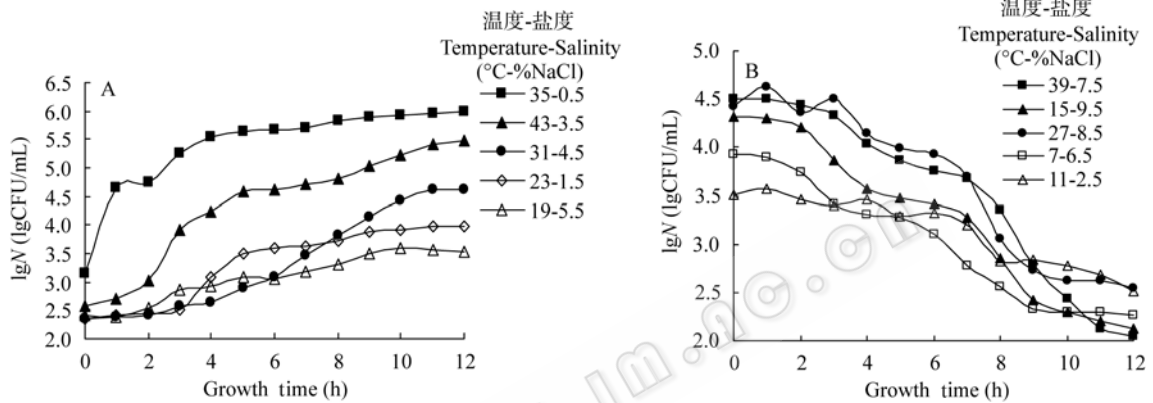


图 1 VP BJ1.1997 不同组合培养条件下的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of VP BJ1.1997 at different combined conditions

注: A: VP BJ1.1997 正增长生长曲线; B: VP BJ1.1997 负增长生长曲线。

Note: A: The positive growth curve of VP BJ 1.1997; B: The negative growth curve of VP BJ1.1997.

从图 1(A)看出, 在图中设定条件下培养 VP 呈正增长。温度-盐度组合为 35-0.5 时增长幅度最快, 迟滞期最短, 其次为 43-3.5, 再次为 31-4.5, 23-1.5 和 19-5.5 增长趋势较为缓和。此组条件比较发现, 第一组与第三组温度在 VP 最适生长范围(30°C~35°C)内, 而第二组温度稍高于最适生长温度, 但盐度在最适生长范围(2%~4%)内。

从图 1(B)看出, 在图中在设定条件下培养 VP 呈负增长。温度-盐度组合为 39-7.5 时下降幅度最大, 其次为 15-9.5, 27-8.5 和 7-6.5 下降幅度相当, 11-2.5 时下降幅度最小, 下降趋势最为缓和。此组条件比较发现, 除 11-2.5 组合条件外, 其余各组合盐度均不低于 6.5, 而 7-6.5 与 11-2.5 组合中温度较低。

2.2 一级模型的拟合

运用 DPS 数据处理系统, 对各条件下 VP 的生长曲线进行回归, 得到部分统计分析结果, 如表 3。

Linear 方程多用于微生物在低温条件下生长曲

线的拟合, Gompertz 方程、Logistic 方程为 S 形曲线函数方程, 在微生物生长动力学研究中较为常用。三种方程的拟合效果进行比较, 10 组实验数据中, 有 7 组通过 Logistic 方程拟合所得的 r 值最高, 对应的 RSS 值最小; 有 3 组通过 Gompertz 方程拟合所得的 r 值最高, 对应的 RSS 值最小; 而通过 Linear 方程拟合所得的 r 值均在同组比较中最低, 对应的 RSS 值最大。由此得出, Logistic 方程在本试验中拟合效果优于 Gompertz 方程, 为最好; Linear 方程的拟合效果最差。对 Logistic 方程拟合结果进一步做统计学验证如表 4。

从表中可看出, 在显著性差异分析中, 10 组数据的 F 值均大于 $F_{0.01}(2, 10)$, 即 $P < 0.01$, 因此在 $\alpha = 0.01$ 水平上差异极显著, 说明模型回归效果较好; 计算得 Bf 最小值为 0.9999, 最大值为 1.0055, 均接近 1, 说明模型预测效果较好; Af 最小值为 1.0190, 最大值为 1.0853, 均接近 1, 说明预测值与实测值的

表 3 不同一级模型的统计分析结果
Table 3 The statistical-analytical data of different primary models

| 序号 No. | 温度—盐度 Temperature-Salinity | Linear | | Gompertz | | Logistic | |
|-----------|-------------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | | <i>r</i> | <i>RSS</i> | <i>r</i> | <i>RSS</i> | <i>r</i> | <i>RSS</i> |
| 1 | 7-6.5 | 0.9754 | 0.1788 | 0.9774 | 0.1644 | 0.9780 | 0.1604 |
| 2 | 11-2.5 | 0.9569 | 0.1331 | 0.9746 | 0.0790 | 0.9754 | 0.0768 |
| 3 | 15-9.5 | 0.9613 | 0.5445 | 0.9630 | 0.5207 | 0.9616 | 0.5404 |
| 4 | 19-5.5 | 0.9747 | 0.3501 | 0.9758 | 0.3355 | 0.9761 | 0.3315 |
| 5 | 23-1.5 | 0.9610 | 0.1517 | 0.9717 | 0.1105 | 0.9720 | 0.1094 |
| 6 | 27-8.5 | 0.9464 | 0.9411 | 0.9591 | 0.7224 | 0.9612 | 0.6859 |
| 7 | 31-4.5 | 0.9567 | 0.8011 | 0.9585 | 0.7256 | 0.9583 | 0.7346 |
| 8 | 35-0.5 | 0.8051 | 2.8665 | 0.9630 | 0.5910 | 0.9601 | 0.6377 |
| 9 | 39-7.5 | 0.9331 | 1.0433 | 0.9615 | 0.6089 | 0.9636 | 0.5766 |
| 10 | 43-3.5 | 0.9775 | 0.4212 | 0.9860 | 0.2629 | 0.9862 | 0.2607 |

表 4 Logistic 模型的统计学验证
Table 4 The statistical-evaluation of Logistic model

| 序号 No. | <i>F</i> 值 <i>F</i> value | <i>Bf</i> Bias factor | <i>Af</i> Accuracy factor |
|-----------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 87.8111 | 1.0005 | 1.0352 |
| 2 | 97.7124 | 1.0002 | 1.0190 |
| 3 | 49.0890 | 1.0038 | 1.0583 |
| 4 | 100.7528 | 1.0011 | 1.0402 |
| 5 | 85.5998 | 1.0005 | 1.0258 |
| 6 | 60.7036 | 1.0012 | 1.0571 |
| 7 | 56.2450 | 1.0055 | 1.0853 |
| 8 | 58.8808 | 1.0018 | 1.0367 |
| 9 | 64.9468 | 1.0009 | 1.0602 |
| 10 | 176.7868 | 0.9999 | 1.0394 |

注: $F_{0.01}(2, 10)=7.56$.

Note: $F_{0.01}(2, 10)=7.56$.

平均误差合理, 模型可以接受。因此选定 Logistic 方程作为本试验的一级生长模型, 计算得相关生长参数如表 5。

从表 5 中可以看出, μ_{\max} 最大培养条件组合为第 8 组, 即 35-0.5, μ_{\max} 可达 0.9190 h^{-1} , 对应迟滞期为 0.5972 h , 为各试验组中最小值; 生长速率最小组合为第 9 组, 即 39-7.5, μ_{\max} 为 -0.3289 h^{-1} , 对应迟滞期为 5.2786 h , 为各试验组中最大值, 表 5 拟合得到 μ_{\max} 的大小排列情况与图 1 直接观察结果基本相符。

2.3 二级模型的拟合

根据表 5 中所得的 μ_{\max} , 用平方根方程式(2)进行拟合建立二级模型。所得模型为:

$$\mu_{\max} = 0.1605^2 * (T - 9.0506)^2 * (A_w - 0.9227)$$

表 5 Logistic 模型生长参数表
Table 5 The growth parameters from Logistic equation

| 序号 No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|
| $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ | -0.1002 | -0.0633 | -0.1104 | 0.1106 | 0.1546 | -0.2842 | 0.4409 | 0.9190 | -0.3289 | 0.7374 |
| <i>LPD</i> (h) | 3.1725 | 2.9028 | 3.3090 | 2.0471 | 1.6917 | 4.4644 | 1.6443 | 0.5972 | 5.2786 | 3.8975 |
| <i>MPD</i> (lg CFU/mL) | 2.6213 | 3.1927 | 2.2528 | 4.4341 | 3.6201 | 2.0736 | 9.1532 | 5.9052 | 1.9831 | 4.3803 |

模型相关系数 $r=0.9863$, 其中 $a=0.1605$, $T_{\min}=9.0506$, 盐度 5.93% 为最高生长盐度(对应 $A_{w\min}=0.9227$), T_{\min} 和 $A_{w\min}$ 预测值与文献报道值较为吻合^[3,7]。据模型预测, 试验中第 1、3、6、9 组 μ_{\max} 预测值为负, 其余为正值, 实测值除第 2 组为负值, 与模型预测值不符外, 其余均符合; 另外, 试验测得本株 VP 在预测极限条件下的 μ_{\max} 为 -0.1732 h^{-1} ,

与预测值有出入, 这是由于微生物在极限生长条件下的生长速率难以准确测定, 因此模型预测的最低生长温度可能不是该菌的最低生长温度, 一般 VP 可观测最低生长温度为 10°C 左右, 故实测值为负可解释。可观测的 T_{\min} 值与 $A_{w\min}$ 值因选用不同菌株或使用不同培养基而有差异, 但预测的 T_{\min} 值与 $A_{w\min}$ 值是微生物的固有属性, 不随培养基变化而变化^[7]。二

级模型的部分统计分析结果如表 6 所示。

模型总体的显著性可以通过 F 统计量进行假设实验。从模型的统计分析结果来看, 模型 $F > F_{0.01}(2,7)$, 即 $P < 0.01$, 因此在 $\alpha = 0.01$ 水平上差异极显著, 说明模型整体回归效果较好。对模型回归系数进行统计分析, 如表 7 所示。

从表中可看出, A_{wmin} 的 t 值大于 $t_{0.01}(7)$, 即 $P < 0.01$, 回归系数达到极显著水平, 其对应最高生长盐度的 95% 置信区间为 $5.93\% \pm 0.50\%$; T_{min} 的 t 值大于 $t_{0.05}(7)$, 即 $P < 0.05$, 回归系数达到显著水平。

利用函数绘制平台 1.2 版绘制模型三维曲面拟合图, 如图 2。

表 6 二级模型统计分析结果
Table 6 The statistical-analytical data of secondary model

| 方差来源 Source | 平方和 SS | 自由度 df | 均方 MS | F 值 F value | p-值 |
|---------------|--------|--------|--------|-------------|--------|
| 回归 Regressive | 1.4798 | 2 | 0.7399 | 124.7280 | 0.0001 |
| 剩余 Residual | 0.0415 | 7 | 0.0059 | | |
| 总的 Total | 1.5213 | 9 | 0.1690 | | |

注: $F_{0.01}(2, 7) = 9.55$.

Note: $F_{0.01}(2, 7) = 9.55$.

表 7 模型回归系数统计分析结果
Table 7 The statistical-analytical data of regressive coefficients

| 方程系数 Coefficient | 回归值 Regressive value | 标准误 Se | t 值 t value | p -值 p value | 95% 置信区间 95% confidence interval |
|------------------|----------------------|----------|-----------------|------------------|----------------------------------|
| a | 0.1605 | 0.0219 | 7.3268 | 0.0002 | 0.1605 ± 0.0518 |
| T_{min} | 9.0506 | 3.4689 | 2.6090 | 0.0350 | 9.0506 ± 8.2028 |
| A_{wmin} | 0.9227 | 0.0021 | 438.8153 | 0.0001 | 0.9227 ± 0.0021 |

注: $t_{0.05}(7) = 2.365$, $t_{0.01}(7) = 3.499$.

Note: $t_{0.05}(7) = 2.365$, $t_{0.01}(7) = 3.499$.

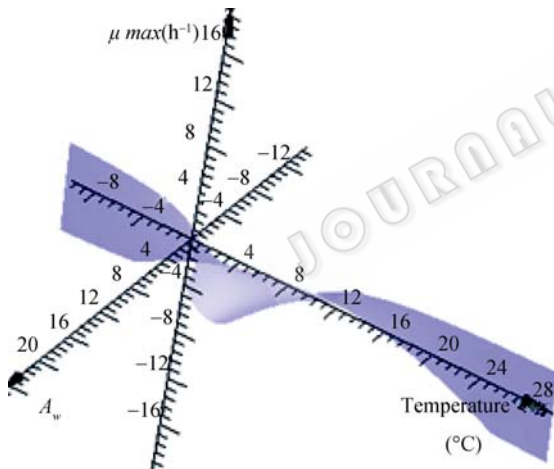


图 2 模型拟合图

Fig. 2 The fitting chart of the secondary model

2.4 模型验证

2.4.1 残差分析: 对 VP 的最大比生长速率 μ_{max} 进行残差分析, 作出残差分析图和标准化残差分析图, 如图 3 和图 4。

从图 3 看出, 以 $e = 0$ 为中心, 各残差值均落在 ± 0.10 范围内, 无证据显示残差存在系统变化趋势。从图 4 看出, 所有点均落在 ± 2 内, 没有离群值, 因此所对应的观测值比较可信。实验组中 70% 残差值为正, 说明 μ_{max} 的预测值大于实测值, 即模型预测

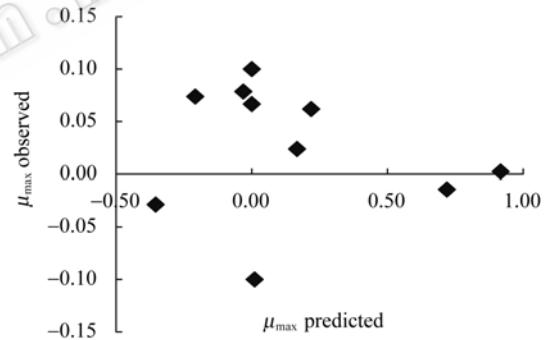


图 3 残差分析图

Fig. 3 Residual analysis chart

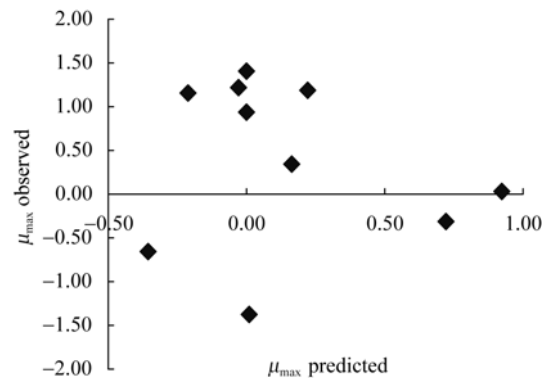


图 4 标准化残差分析图

Fig. 4 Standard residual analysis chart

的 VP 生长比实际快, 预测结果比较保险可靠。

2.4.2 培养基数据验证: 以 TSB 培养基为基质, 将 VP 在任意 7 组组合培养条件下培养, μ_{\max} 实测值和预测值进行比较分析, 结果如表 8 所示。

| 温度-盐度 (Temperature- Salinity) | μ_{\max} 预测值(h ⁻¹) Predicted value | μ_{\max} 实测值(h ⁻¹) Observed value | Bf Bias factor | Af Accuracy factor |
|-------------------------------------|--|---|----------------------|--------------------------|
| 15-0.5 | 0.0484 | 0.0809 | 0.8025 | 1.3414 |
| 19-6.5 | -0.0145 | -0.0629 | | |
| 23-2.5 | 0.1669 | 0.1227 | | |
| 27-7.5 | -0.1286 | -0.1071 | | |
| 31-3.5 | 0.3016 | 0.2748 | | |
| 39-1.5 | 1.0005 | 0.9457 | | |
| 43-5.5 | 0.2553 | 0.3115 | | |

利用 Bf 和 Af 对模型进行验证, Bf 为 0.8025(n=7), Af 为 1.3414(n=7)。Bf 小于 1 表明生长速率预测值比实测值大, 一般认为 Bf 在 0.75~1.25 之间, 模型即可接受; Af 等于 1 表明预测值与实测值完全吻合, 一般在 1.1~1.9 之间均可接受^[8]。该模型 Bf 和 Af 值均在合理范围内, 说明模型可接受。

3 结论与讨论

3.1 利用 DPS 数据处理系统对不同温度-盐度条件下 VP BJ1.1997 的实验数据进行拟合, 结果表明 Logistic 模型比 Gompertz 模型及线性模型能更好地拟合副溶血性弧菌的生长, 在 $\alpha=0.01$ 水平上模型极显著。拟合结果表明, 培养温度-盐度组合为 35-0.5 时, VP 比生长速率最大, 组合为 39-7.5 时, VP 比生长速率最小。

3.2 利用平方根模型对 VP 进行最大比生长速率与温度-盐度之间关系的拟合, 得到 VP 生长的二级双因素模型。预测得知, VP 的最低生长温度为 9.0506°C, 最高生长盐度为 5.93%($A_{w\min}=0.9227$)。F 检验表明模型在 $\alpha=0.01$ 显著, 培养基数据 Bf 和 Af

验证值在可接受范围内, 回归系数分析显示回归显著, 说明此模型能较好描述 VP 最大比生长速率与温度-盐度之间的对应关系。

3.3 本文尝试将均匀设计方法引入到微生物生长预测模型的建立过程中, 并得到较好的试验效果。均匀设计在多水平试验研究中有重要意义, 在试验点均匀分散的同时可大大减少工作量, 缩短试验周期, 在医药、化工、食品及生物工程等领域都有应用。在微生物生长动力学研究中, 大量数据的积累十分重要, 均匀设计虽在水平数不变的条件下可减少试验次数, 但其精准性应进一步进行验证比对。

参 考 文 献

- [1] 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. 卫生研究, 2004, 33(6): 725-727.
- [2] 俞 莺, 宁喜斌. 对虾副溶血性弧菌的风险评估. 现代食品科技, 2006, 23(5): 184-186.
- [3] 王璐华, 宁喜斌. 副溶血性弧菌生长预测模型的建立与应用探讨. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 263-267.
- [4] 杨振泉, 焦新安. 副溶血性弧菌在低温贮藏过程中的失活动力学特征. 食品科学, 2008, 29(7): 47-51.
- [5] Ratkowsky DA 著, 洪再吉, 等译. 非线性回归模型统一的实用方法. 南京: 南京大学出版社, 1986, pp.71-81.
- [6] McMeekin TA, Chandler RE, Doe PE, et al. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *staphylococcus xylosum*. *Appl Bacteriol*, 1987, 62: 543-550.
- [7] 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*. *Food Microbiol*, 1997, 38: 133-142.
- [8] Braun P, Sutherland JP. Predictive modeling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp.. *Food Microbiol*, 2003, 86: 271-282.