

单增李斯特菌在营养肉汤中 最大比生长速率的预测模型*

丁甜¹ 董庆利² 王璐² 马美湖³ 金永国^{3**}

1. 韩国国立江原大学食品科学与生物技术学科, 韩国春川 200701;

2. 上海理工大学食品科学与工程研究所, 上海 200093;

3. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

摘要 在不同温度下,对单增李斯特菌在营养肉汤中的生长建立动力学模型,并对所建立的模型进行验证。使用 Gompertz 模型描述特定温度下单增李斯特菌随储藏时间变化的生长状况,对得出的最大比生长速率分别建立 Linear、Square root 和 Ratkowsky 预测模型,并对所建立的模型进行比较验证。结果表明:Ratkowsky 模型对最大比生长速率-温度拟合度最高($R^2=0.9997$),经验证,该模型可以很好地预测单增李斯特菌在营养肉汤中的生长情况。

关键词 单增李斯特菌; 营养肉汤; 预测模型; 验证

中图分类号 Q 939 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0522-05

单核细胞增生性李斯特菌(简称单增李斯特菌, *Listeria monocytogenes*)是四大食源性病原菌之一,也是一种人畜共患的致病菌^[1-3]。为了较好地预测单增李斯特菌的生长状况,控制其致病率及其给人们生活带来的危害,笔者调查研究不同温度下单增李斯特菌在营养肉汤中的生长特性,建立其生长预测模型。Ding 等^[4-5]介绍过优秀的预测模型可以用来预测食品的货架寿命和微生物学安全,并为微生物风险评估(quantitative microbial risk assessment, QMRA)和 HACCP(hazard analysis critical control point)提供科学依据。因此,大量的验证工作针对所建立的预测模型展开,做出模型可靠性评价,旨在建立精确的单增李斯特菌生长预测模型,为实验和生活中单增李斯特菌的生长作出值得信赖的预测。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1) 菌株。本试验的目标菌株为单增李斯特菌的混合菌株,包括 *L. monocytogenes* Scott A、*L. monocytogenes* ATCC 19116 和 *L. monocytogenes* ATCC 19118。分别取 10 μ L 原种菌液到 10 mL TSBYE(TSB, Difco, Sparks, MD, USA)中,置于

35 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱里单独培养。24 h 后,将单增李斯特菌细胞悬浮液转移到离心管中,5 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,得到的菌体用质量分数为 0.1% 的蛋白胍缓冲溶液(buffered peptone water, Difco, USA)冲洗,然后在相同的条件下再次离心,重复上述操作,从而得到浓度为 10^9 cfu/mL 的单增李斯特菌 3 种不同菌株的细胞悬浮液。用移液管分别取出等量的细胞悬液混合于已消毒的 20 mL 试管中,并将菌体细胞悬液稀释到 10^5 cfu/mL,保存在 4 $^{\circ}$ C 的恒温箱中备用。

2) 培养基制备。称取 57.5 g 牛津培养基(Oxford medium base)置于 2 L 锥形瓶中,缓慢加入 1 L 蒸馏水,搅拌均匀。随后将牛津培养基溶液置于加热器上缓慢加热至沸腾,使其混合均匀,当观察到锥形瓶底部有小气泡连续均匀上升时,开始计时,1 min 后,转移到高压灭菌锅中在 121 $^{\circ}$ C 下灭菌 10 min,冷却至 45~50 $^{\circ}$ C,加入 10 mL 二次水合抗菌素添加剂(rehydrated oxford antimicrobial supplement, Oxford 公司生产),混合均匀后,在无菌条件下制备平板。

3) 营养肉汤的制备。称取 30 g Tryptic Soy Broth(Bacto TM, France)置于装有 1 L 蒸馏水的锥

收稿日期:2009-11-07; 修回日期:2010-01-18

* 国家自然科学基金项目(30800864)资助

** 通讯作者。E-mail: jinyongguo@mail.hzau.edu.cn

丁甜,男,1985年生,韩国国立江原大学博士研究生。研究方向:食品安全和微生物风险评估。E-mail: tding@kangwon.ac.kr

形瓶中,混合均匀后,转移 10 mL 营养肉汤溶液至试管中;然后在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min,冷却后保存在 4 °C 的恒温箱中备用。

1.2 试验方法

1) 试验操作。取出 0.1 mL 混合菌体细胞悬液置于 10 mL 的营养肉汤中,使得营养肉汤中单增李斯特菌的初始菌体浓度为 10^3 cfu/mL;然后分别放置于 4、10、15、20、25、30、35 °C 的恒温培养箱中进行培养。根据不同的温度选定不同的测试时间段,每隔一定时间分别取出一定量样品进行菌数测定,取合适稀释度,用平板计数法得出活菌数。

2) 初级模型的建立。利用 GraphPad Prism (Version 4, GraphPad software, Inc, San Diego, CA, USA) 对试验数据进行 Gompertz 模型曲线拟合,建立初级预测模型。Gompertz 模型(1)公式如下所示:

$$Y = A \exp\{-\exp[\mu e / A(\lambda - t) + 1]\} \quad (1)$$

式(1)中 Y 表示最终菌落数(log cfu/g), μ 表示最大比生长速率(log cfu/h), λ 表示延滞期(h), A 是模型的参数。

3) 二级模型的建立与可靠性评价。针对初级模型中得出的最大比生长速率与储藏温度的关系,建立二级模型 Linear (2)、Square root (3) 和 Ratkowsky(4)模型。并对 3 个不同的二级模型进行拟合度比较。

$$\mu = aT + b \quad (2)$$

$$\mu = a(T - T_0) \quad (3)$$

$$\mu = a(T - T_0)^2 \{1 - \exp[b(T - T_{\max})]\} \quad (4)$$

式中 μ 表示最大比生长速率(log cfu/g), T 是实验中设定的某一个生长温度(°C), T_0 和 T_{\max} 是理论上单增李斯特菌生长的最低温度和最高温度, a 和 b 是模型的参数。

模型的可靠性评价主要通过以下几个参数进行:误差平方和 SSE, 相关系数 R^2 , 矫正相关系数 adjusted R^2 和均方根误差/标准误差 RMSE。

2 结果与分析

2.1 初级模型的建立

Gompertz 模型是预测微生物领域应用广泛的初级模型之一,大量的研究报道过 Gompertz 模型能够很好地描述微生物的生长。例如 Juneja 等^[6]发现,与 Logistic 模型和 Baranyi 模型相比较,Gompertz 模型能够更好地描述不同温度下沙门氏

菌在鸡肉中的生长;Zhou 等^[7]报道了 *Brochothrix thermosphacta* 的生长曲线能够更好地与 Gompertz 模型相拟合,其次是 Baranyi 模型,最后是 Logistic 模型。在本研究中,Gompertz 模型对试验得出的单增李斯特菌的生长数据拟合很好,相关系数均在 0.99 以上(图 1),表明单增李斯特菌在各个温度下的生长状况均能与 Gompertz 模型很好地吻合,本研究中选用 Gompertz 模型来建立初级模型是一个合适的选择。

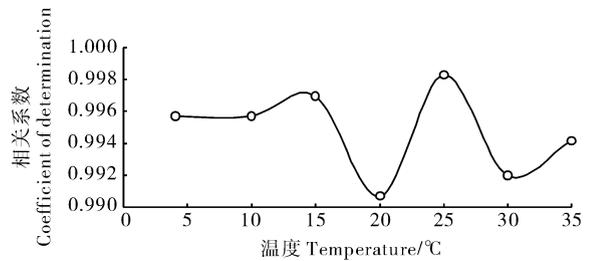


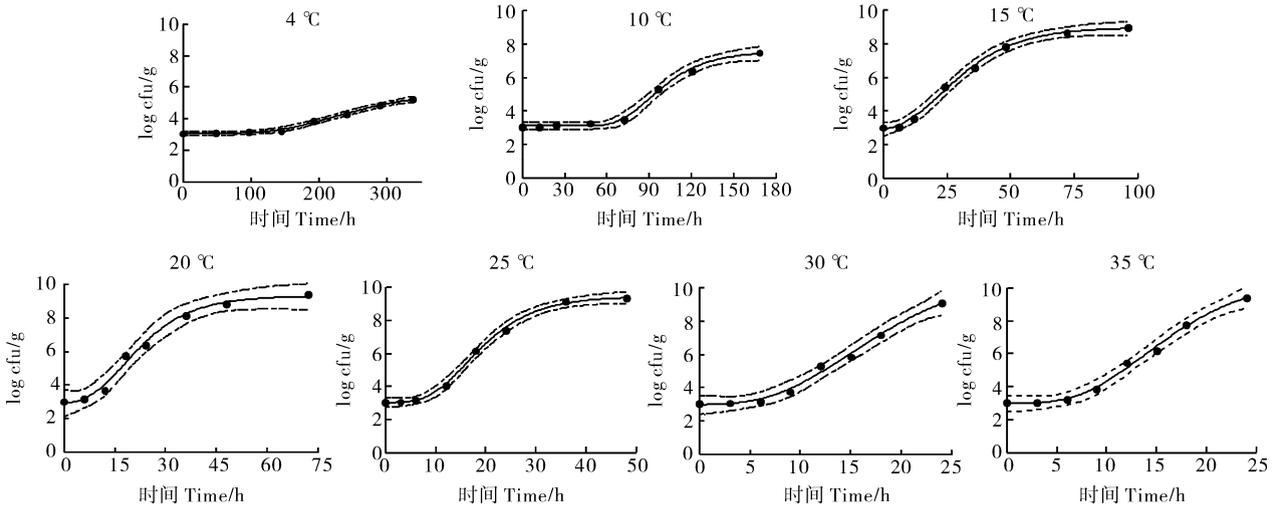
图 1 不同温度下 Gompertz 模型对单增李斯特菌生长曲线拟合得出的相关系数

Fig. 1 The coefficient of determination obtained from Gompertz model fitted with the growth data of *L. monocytogenes* at different temperatures

营养肉汤中单增李斯特菌的初始菌体细胞浓度为 10^3 cfu/mL。将不同温度下测定的单增李斯特菌的生长状况选用 Gompertz 模型进行拟合,所得的生长曲线如图 2 所示。在 4 °C 时,单增李斯特菌的生长极其缓慢,在初始的 150 h 之内几乎没有生长;随着温度的升高,单增李斯特菌的生长逐渐加快,10 °C 时,在 60 h 内,单增李斯特菌没有明显的生长,当温度达到 35 °C 时,单增李斯特菌的菌数不到 24 h 便达到了 10^9 cfu/mL。另外,单增李斯特菌在不同温度下的最大比生长速率如表 1 所示,随着温度的增加,最大比生长速率也随之增加。

2.2 二级模型的建立与可靠性评价

根据初级模型得出的单增李斯特菌在不同温度下的最大比生长速率,建立 Linear、Square root 和 Ratkowsky 模型。不同的模型描述相同的数据也会有不同的效果,因此,对不同的二级模型进行比较研究是十分必要的。笔者着重对 3 种不同的二级模型的效果进行比较,选出表达效果最好的一个模型来描述单增李斯特菌最大比生长速率和温度之间的关系。利用 Matlab 7.0 进行非线性回归分析^[8],得出 3 种不同模型的参数,从而建立二级模型,分析结果如图 3 所示。



图中分布在生长曲线上下方的曲线是预测值 95% 的置信区间 The dotted curves are upper and lower prediction limits at a 95% confidence level.

图 2 Gompertz 模型所描述的李斯特菌在不同温度下(4、10、15、20、25、30、35 °C)的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *L. monocytogenes* gained from Gompertz model at different temperatures for 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C, respectively

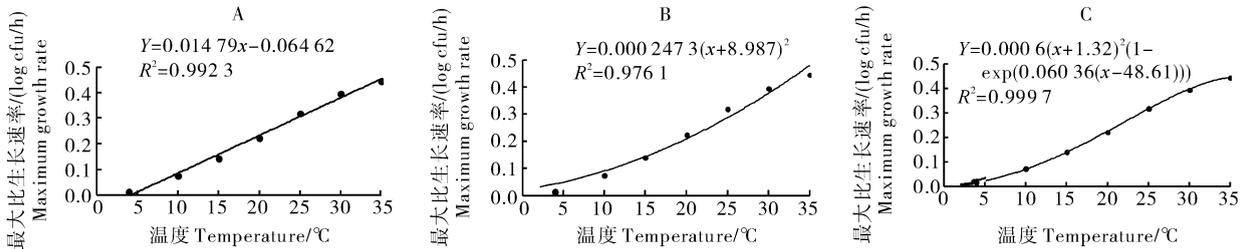


图 3 利用 Matlab 7.0 非线性回归分析得出的 Linear 模型(A), Square root model(B) 和 Ratkowsky(C) 模型

Fig. 3 Linear model (A), Square root model (B) and Ratkowsky model (C) obtained from nonlinear regression analysis using Matlab 7.0 software

表 1 不同温度下单增李斯特菌的最大比生长速率的观测值和预测值¹⁾

Table 3 The observations and predictions of maximum growth rate of *L. monocytogenes* at different temperatures

温度/°C Temperature	观测值/ (log cfu/h) Observed SGRs	预测值/(log cfu/h) Predicted SGRs		
		Linear model	Square root model	Ratkowsky model
4	0.012 B	-0.005 A	0.042 C	0.016 B
10	0.073 A	0.083 B	0.089 B	0.069 A
15	0.140 A	0.157 B	0.142 A	0.139 A
20	0.222 B	0.231 C	0.208 A	0.224 B
25	0.318 B	0.305 A	0.286 A	0.316 B
30	0.394 B	0.379 A	0.376 A	0.397 B
35	0.445 A	0.453 B	0.478 C	0.443 A

1) 在每一行中,数值后不同的大写字母表示数值之间存在显著性的差异(P < 0.05)。Within the same row, values not followed by the same capital letter are significantly different(P < 0.05).

对模型进行可靠性分析是建立模型的过程中必不可少的一步,没有经过验证的模型是无法投入到实际应用中的。图像分析比较(graphical comparison)是模型验证中常用的一个方法,它是指通过用图表示代表预测值的散点与代表实验值的直线之间的线性关系^[9]。图 4 描述了本研究中所建立的 3 种不同模型得出的预测值与观测值之间的线性关系,结果显示 Linear 和 Square root 模型的散点有一定的偏差,而 Ratkowsky 模型的散点则全部分布在直线上,体现了 Ratkowsky 模型的预测值能够很好地吻合观测值。

此外,通过一些数学或者工程学参数对模型进行直观的可靠性评价也是非常必要的。表 2 中给出了 Linear、Square root 和 Ratkowsky 模型的误差平

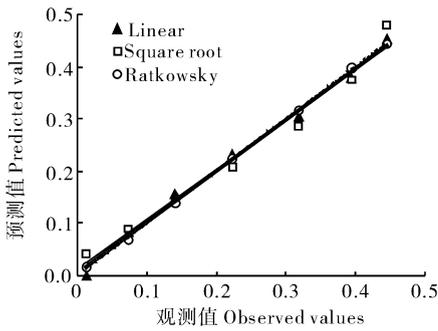


图 4 二级模型的预测值与观察值之间的线性关系

Fig. 4 Observed values versus predicted values of secondary models

方和 SSE, 相关系数 R^2 , 矫正相关系数 (adjusted R^2) 和均方根误差的值。Ratkowsky 模型的误差平方和仅为 5.185×10^{-5} , 说明 Ratkowsky 模型的预

表 2 Linear、Square root 和 Ratkowsky 模型的误差平方和、相关系数、矫正相关系数和均方根误差的值

Table 2 Mathematical or statistical indices such as the sum of squares due to error, coefficient of determination, adjusted R^2 and root mean square error of Linear model, Square root model and Ratkowsky model

模型 Models	误差平方和 SSE	相关系数 R^2	矫正相关系数 Adjusted R^2	均方根误差 RMSE
Linear model	0.001 2	0.992 3	0.990 7	0.015 8
Square root model	0.003 8	0.976 1	0.971 4	0.027 7
Ratkowsky model	5.185×10^{-5}	0.999 7	0.999 6	0.003 2

综合以上评价, 结果显示 Ratkowsky 模型表现出了很高的预测精确性, 极小的误差, 说明该模型能够很好的预测单增李斯特菌在营养肉汤中的生长, 为 HACCP 和 QMRA 提供值得信赖的预测数据。

3 讨 论

预测微生物学 (predictive microbiology) 是一个将微生物学、数学和统计学结合在一起的研究领域, 通过建立一些数学模型来预测微生物在一系列环境条件下的生长、残存和死亡情况。预测模型的建立被称为是预测微生物学的核心部分, 一般来讲, 预测模型分为初级模型, 二级模型和三级模型 3 个部分。初级模型通常用来描述在特定的条件下微生物随时间变化而生长或残存的状况, 其中比较经典的初级模型有 Gompertz 模型, Logistic 模型, Baranyi 模型等; 二级模型是用来表达环境中的一些影响因子和微生物在生长过程中最大比生长速率关系, 常用的二级模型有 Square root 模型, Polynomial 模型和 Ratkowsky 模型; 三级模型是建立在初级模型和二级模型的基础上, 基于前人的研究而组成的数据库通过开发一些软件而直接进行预测, 例如 Pathogen modeling program (PMP), Food spoilage predictor 和 Combined database (Combase)^[10]。

测值相对于实验得出的观察值偏差很小, 相关系数为 0.999 7, 一般来说相关系数越接近于 1, 说明该模型的预测值越精确; 矫正相关系数为 0.999 6, 表明总体上只有 0.04% 的变异无法通过该模型表达出来; 均方根误差为 0.003 2, 通常均方根误差越接近于 0, 说明该模型的误差越小。同时, 根据所建立的二级模型, 求得不同温度下单增李斯特菌的最大比生长速率 (表 1), 并对观测值和 3 组来自不同二级模型的预测值进行 Tukey's multiple range 分析 ($P > 0.05$); 由结果可见, Ratkowsky 模型的预测值与实验中的观测值并无显著性差异, 相反, Linear 和 Square root 模型得出的预测值大都与观测值存在显著的差异。由以上可知, 相比较于 Linear 和 Square root 模型, Ratkowsky 模型表达效果最好。

还是二级模型, 已经有大量的工作被前人研究并发表了。例如单增李斯特菌在营养肉汤^[11]、莴苣^[12]、洋白菜^[13]、海产品^[14]、猪肉^[15] 上的生长模型, 大肠杆菌在猪肉^[16]、牛肉^[17] 上的生长模型等; 然而预测模型的比较学至今仍处在发展的初级阶段。目前, 关于报道初级、二级模型的比较研究^[5, 6, 18] 的文献十分有限。因此, 笔者着重选择了几个经典的二级模型, 并展开不同模型间对相同数据表达效果的研究工作, 具有一定的指导意义。

参 考 文 献

[1] NAKAMA A, MATSUDA M. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan by pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Vet Med Sci, 1998, 60(6): 749-752.

[2] 陈道利, 陶勇, 霍开兰, 等. 直接入口食品中单核细胞李斯特菌污染调查及其检验方法比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 8(4): 492-493.

[3] 朱堂明. 淡水水产品中单增李斯特菌双重 PCR 检测及基因分型[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2008.

[4] OH D H, DING T, HA S D, et al. The risk estimation of *Listeria monocytogenes* for ready-to-eats fresh cut-vegetables[J]. J Food Hyg Saf, 2009, 24(1): 50-55.

[5] DING T, DONG Q L, RAHMAN S M E, et al. Response surface modeling of *Listeria monocytogenes* inactivation on lettuce treated with electrolyzed oxidizing water[J]. J Food Process Eng, 2010(in

实际上, 关于预测模型的建立, 不管是初级模型

- Press).
- [6] JUNEJA V K, MELENDRES M V, HUANG L, et al. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken[J]. Food Microbiol, 2007, 24: 328-335.
- [7] ZHOU K, FU P, LI P L, et al. Predictive modeling and validation of growth at different temperatures of *Brochothrix thermosphacta* [J]. J Food Saf, 2009, 29: 460-473.
- [8] 张春艳, 沈忠, 周志权, 等. 波尔山羊羔羊生长发育规律研究[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(6): 640-644.
- [9] BANG W S, CHUNG H J, JIN S S, et al. Prediction of *Listeria monocytogenes* growth kinetics in sausages formulated with antimicrobials as a function of temperature and concentrations [J]. Food Sci Biotechnol, 2008, 17(6): 1316-1321.
- [10] DING T, JIN Y G, RAHMAN S M E, et al. Prediction of growth of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce treated with alkaline electrolyzed water at different temperatures[J]. J Food Hyg Saf, 2009, 24(3): 232-237.
- [11] JIN S S, KHEN B K, YOON K S, et al. Effects of temperature, pH and potassium lactate on growth of *Listeria monocytogenes* in broth [J]. Food Sci Biotechnol, 2005, 14(6): 847-853.
- [12] KOSEKI S, ISOBE S. Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 101: 217-225.
- [13] KOSEKI S, ITOH K. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions[J]. J Food Prot, 2001, 64(12): 1935-1942.
- [14] ABOU-ZEID K A. Modeling the antimicrobial effect of lactate on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* on ready to eat seafood ready-to-eat seafood [C]. [S. l.]: JIFSAN Research Grant Symposium, 2004.
- [15] GILL C O, GREER G G, DILTS B D. The aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in broths and on pork[J]. Int J Food Microbiol, 1997, 35: 67-74.
- [16] SHIMONI E, LABUZA T P. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges[J]. Trends Food Sci Technol, 2000, 11: 394-402.
- [17] DING T, RAHMAN S M E, PUREV U, et al. Modelling of *Escherichia coli* O157:H7 growth at various storage temperatures on beef treated with electrolyzed oxidizing water [J]. J Food Eng, 2010, 97: 497-503.
- [18] PAL A, THEODORE P, LABUZA T P, et al. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries[J]. Food Microbiol, 2008, 25: 460-470.

Establishment and Validation of Predictive Model for *Listeria monocytogenes* in Broth

DING Tian¹ DONG Qing-li² WANG Lu² MA Mei-hu³ JIN Yong-guo³

1. Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200701, Korea;

2. Institute of Food Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

3. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth under different temperatures were investigated and the models established were validated. Firstly, Gompertz model was employed to describe the growth of *L. monocytogenes* at constant temperatures as a function of storage time. Secondly, Linear model, Square root model and Ratkowsky model were established for the obtained maximum growth rate, and then current models were verified by several indices such as the sum of squares due to error (SSE), coefficient of determination (R^2), adjusted R^2 and root mean square error (RMSE). The results showed that Ratkowsky model had a better statistic fitness than the other two models and the verification indicated the model established was able to make reliable prediction in the future.

Key words *L. monocytogenes*; broth; predictive model; validation