

# 三因子金黄色葡萄球菌生长/非生长模型构建

## Establishment of Model on growth/no growth boundary of *Staphylococcus aureus* based for three factors

赵学广<sup>1,2</sup> 李学英<sup>1</sup> 杨宪时<sup>1</sup>

ZHAO Xue-guang<sup>1,2</sup> LI Xue-ying<sup>1</sup> YANG Xian-shi<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

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

**摘要:**运用统计分析 R 软件,建立金黄色葡萄球菌在温度、pH、盐浓度 3 种环境因子影响下的生长/非生长模型,构建的回归模型参数值  $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$ 、 $a_4$ 、 $a_5$ 、 $a_6$  值均低于 0.01, 具有高度显著的拟合效果。分析各因子不同取值得到的方程式曲线图得出:在温度为 10~25 °C, pH 值为 4.5~5.5, 盐浓度为 0.5%~14.5% 时,单因子对金黄色葡萄球菌生长/非生长影响显著;其他选值范围,3 种因子协同影响。

**关键词:**生长/非生长模型;金黄色葡萄球菌;Logistic 回归;三因子

**Abstract:** Establishes growth/no growth model of *Staphylococcus aureus* in the factors of temperature, pH and salt concentration, by R, a software for statistical analysis. The P value was obtained by the model for model parameter values were below 0.01, so reached highly significant. When the temperature at 10 °C to 25 °C, the pH at 4.5 to 5.5, the Sodium chloride salt concentration from 0.5% to 14.5%, each single factor's effect on *Staphylococcus aureus*' growth/no growth was significant, and three factors affected collaborative in other selected range of values.

**Keywords:** growth/no growth model; *Staphylococcus aureus*; ogistic regression; three factors

金黄色葡萄球菌是引起食源性胃肠炎的一个主要因子,是食品加工和食品储藏中重点监控的菌种之一<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌在 30 °C 左右会大量增长并产生肠毒素(SE)<sup>[2]</sup>,当食品中 SE 含量超过 1.0 μg 时会引起食物中毒<sup>[3]</sup>。抑制食品中微生物生长的方法有高温处理、低温冷藏冻结、降低水分活度( $a_w$ )、调节 pH、降低氧化还原值和添加防腐剂<sup>[4]</sup>等,

但高温容易破坏食品品质,添加防腐剂可能对健康有危害且消费者容易产生抵触心理<sup>[5]</sup>,而控制温度、pH、水分活度等因子能够在抑制微生物生长基础上最大程度保持感官质量和营养价值<sup>[6]</sup>,因此成为现阶段的最佳选择。微生物生长/非生长模型是研究微生物数量和控制其生长的方法,该法能够预测各种外界因子对微生物生长/非生长界面的影响,为食品等的保藏提供更多的参考<sup>[7]</sup>。目前微生物生长/非生长模型的构建方法有确定性方法<sup>[8]</sup>、最小凸多面体法<sup>[9]</sup>、Logistic 回归模型<sup>[10-11]</sup>、神经网络<sup>[12]</sup>、简化式方法<sup>[13]</sup>,经验判断法等多采用实时测定的经验数据,不准确且冗杂难操作<sup>[14]</sup>,而 Logistic 回归模型模拟程度高,表达直观,应用方便<sup>[10-11]</sup>,更适合多种环境因子不同水平的生长/非生长模型的建立。本研究拟运用统计分析 R 软件,建立金黄色葡萄球菌在温度、pH、盐浓度 3 种环境因子影响下的生长/非生长模型,旨在实际生产中金黄色葡萄球菌生长情况的预测提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538;中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

#### 1.1.2 培养基

脑心浸液肉汤培养基(BHI);英国 OXOID 公司;

胰蛋白胍大豆肉汤培养基(TSB)和胰蛋白胍大豆琼脂培养基(TSA);北京陆桥技术股份有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株的准备 在无菌工作台上,用接种环挑取 1~2 环用液体石蜡封存于 4 °C 冰箱中的金黄色葡萄球菌 ATCC 6538,置于已灭菌冷却至室温的 BHI 试管中,37 °C 下培养 12 h。用接种环沾取培养液于 TSA 平板划线,37 °C 培养 24 h,挑取明显菌落划线到 TSA 试管斜面培养基,于 4 °C 冰

**基金项目:**农业部引进国际先进农业科学技术项目(编号:2011-Z12)

**作者简介:**赵学广,男,上海海洋大学在读硕士研究生。

**通讯作者:**杨宪时(1954—)男,中国水产科学研究院研究员,硕士生导师。E-mail: xianshiyang@126.com

**收稿日期:**2015-09-03

箱中保藏,每月移种1次,以保持菌种的活性。

1.2.2 试验设计 金黄色葡萄球菌生长范围较广,温度、pH、盐浓度等因子中能够生长的空间较大<sup>[15]</sup>。为了更加有效地描述各个因子的影响情况,根据食品安全和食品性质,选择变量为温度、pH和盐浓度3个因子,3种因子任意组合,温度选择10,15,20,25,30,35,40℃;pH选择4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0;盐浓度选择0.5%,2.5%,4.5%,6.5%,8.5%,10.5%,12.5%,14.5%。根据金黄色葡萄球菌的生长特性,10℃培养8d,15℃培养4d,20,25℃培养2d,30,35,40℃培养12h<sup>[15]</sup>。结果以培养最终得到的菌量比初始接种量多于0.5lg(CFU/mL)为生长,否则不生长。

1.2.3 金黄色葡萄球菌生长/非生长试验 无菌挑取斜面保藏菌株,接种到装有10mL无菌TSB培养基的试管中,37℃培养12h。无菌吸取1mL培养液稀释到装有9mL 0.8%的灭菌生理盐水得到10<sup>-1</sup>菌悬液,按上述方法逐级梯度稀释,制成10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>,10<sup>-5</sup>,10<sup>-6</sup>6个梯度菌悬液,分别从6个梯度菌悬液中各取0.1mL接种到TSA平板上37℃培养2d,计数,选择数量在10<sup>3</sup>CFU/mL的梯度为接种梯度。按照试验设计取接种梯度菌悬液1mL接种到配制好的各因子的9mL无菌TSB培养基试管中,分别置于设计的温度(±0.1℃)中,培养不同时间,然后分光光度法测菌悬液,达到ΔOD≥0,则说明生长,已经生长的试管其生长情况标记为1。对于试管菌悬液不能够判断是否已经生长的,通过涂布TSA培养基平板37℃下培养2d,统计其菌落总数来确定,如果有杂菌出现,则表示试管已经污染并放弃该数据且从新试验测定,菌落全部呈现金黄色葡萄球菌特定的菌落形态则统计菌落总数。根据试验中涉及到的稀释梯度,依据已经测得的菌落总数计算单位体积的菌落总数(CFU/mL),并与初始的接种量比较,如果最终的菌量比初始接种量多于0.5lg(CFU/mL),则判定金黄色葡萄球菌已生长,生长/非生长情况标记为1,否则标记为0<sup>[16]</sup>。

1.2.4 模型的建立和检验 试验数据先用Microsoft Excel进行归纳处理,在拟合模型前去除个别数据异常点,然后用Logistic多项式回归模型来拟合数据。选择具体模型如下:

$$\text{Logit}(p) = a_0 + a_1 T + a_2 pH + a_3 b_w + a_4 T pH + a_5 T b_w + a_6 pH b_w + a_7 T^2 + a_8 pH^2 + a_9 b_w^2, \quad (1)$$

$$\text{Logit}(p) = \ln(p/1-p), \quad (2)$$

$$b_w = \sqrt{1-c}, \quad (3)$$

式中:

$p$ ——微生物的生长概率(取值范围为0~1);

$a_0 \sim a_9$ ——方程的拟合系数;

$T$ ——培养温度,℃;

$pH$ ——氢离子浓度指数;

$c$ ——盐浓度,g/mL;

Logistic公式中选用更适合方程拟合的 $b_w$ <sup>[7,15,17]</sup>。

分析方法通过R软件的GLM函数来实现,并通过逐步回归程序来选择最优模型。模型的拟合优度通过标准误差和P值来验证。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Logistic回归模型拟合结果

通过R软件对数据进行拟合,得到表1中各个参数的估计值、标准误差以及P值,标准误差较小,P值都低于1,且除了 $a_7$ 、 $a_8$ 以外的各个参数值都在0.01以下,说明拟合方程式对于数据具有高度显著的拟合性。

表1 Logistic回归模型拟合结果

Table 1 The results equations obtained by fitting the Logistic regression model

参数	预估值	标准误差	P值
$a_0$	2.790 641E+03	1.028 253E+01	6.648 334E-03
$a_1$	1.723 378E+00	2.738 826E+00	5.291 920E-03
$a_2$	-1.578 395E+02	4.516 998E+01	4.752 258E-04
$a_3$	-5.231 226E+03	1.941 686E-02	7.056 485E-03
$a_4$	-4.005 703E-02	7.478 249E-03	8.486 280E-08
$a_5$	-1.856 189E+00	3.953 518E-01	2.665 669E-06
$a_6$	2.266 810E+03	9.070 079E+02	1.244 681E-04
$a_7$	2.177 372E-02	5.467 010E-02	6.904 277E-01
$a_8$	7.886 836E-01	2.518 463E+00	7.541 586E-01
$a_9$	1.955 996E+02	4.770 142E+01	4.122 620E-05

### 2.2 不同温度下金黄色葡萄球菌生长/非生长与pH值和盐浓度的关系

由图1可知:

(1)温度为10℃时,pH值≥5.5,金黄色葡萄球菌开始生长;盐浓度≤6.5%,金黄色葡萄球菌生长;pH值7.0~8.0,金黄色葡萄球菌生长最为明显。

(2)温度为15℃时,pH值≥5.5,金黄色葡萄球菌开始生长;盐浓度≤10.5%,金黄色葡萄球菌生长;pH值在7.5附近生长最为明显。

(3)温度为20℃时,pH值>4.5,金黄色葡萄球菌开始生长;盐浓度≤14.5%,金黄色葡萄球菌生长;pH值6.0~8.0,金黄色葡萄球菌生长最为明显。

(4)温度为25℃时,pH值≥5.0,金黄色葡萄球菌开始生长;盐浓度0.5%~14.5%,金黄色葡萄球菌生长较为明显;pH值5.5~7.5,金黄色葡萄球菌生长最为明显。

总而言之,10~25℃时温度对金黄色葡萄球菌的影响较为显著;25~40℃时金黄色葡萄球菌生长区间较大,pH和盐浓度相同的情况下,25~40℃区间内其生长情况基本一致,故温度对其生长/非生长影响不显著。

### 2.3 不同pH值下金黄色葡萄球菌生长/非生长与温度和盐浓度的关系

由图2可知:

(1)pH值为4.5时,且盐浓度为0.5%,温度为35℃,金黄色葡萄球菌生长。

(2)pH值为5.5时,金黄色葡萄球菌生长已极为显著,在盐浓度取值范围内且温度25,30,35℃均能生长。

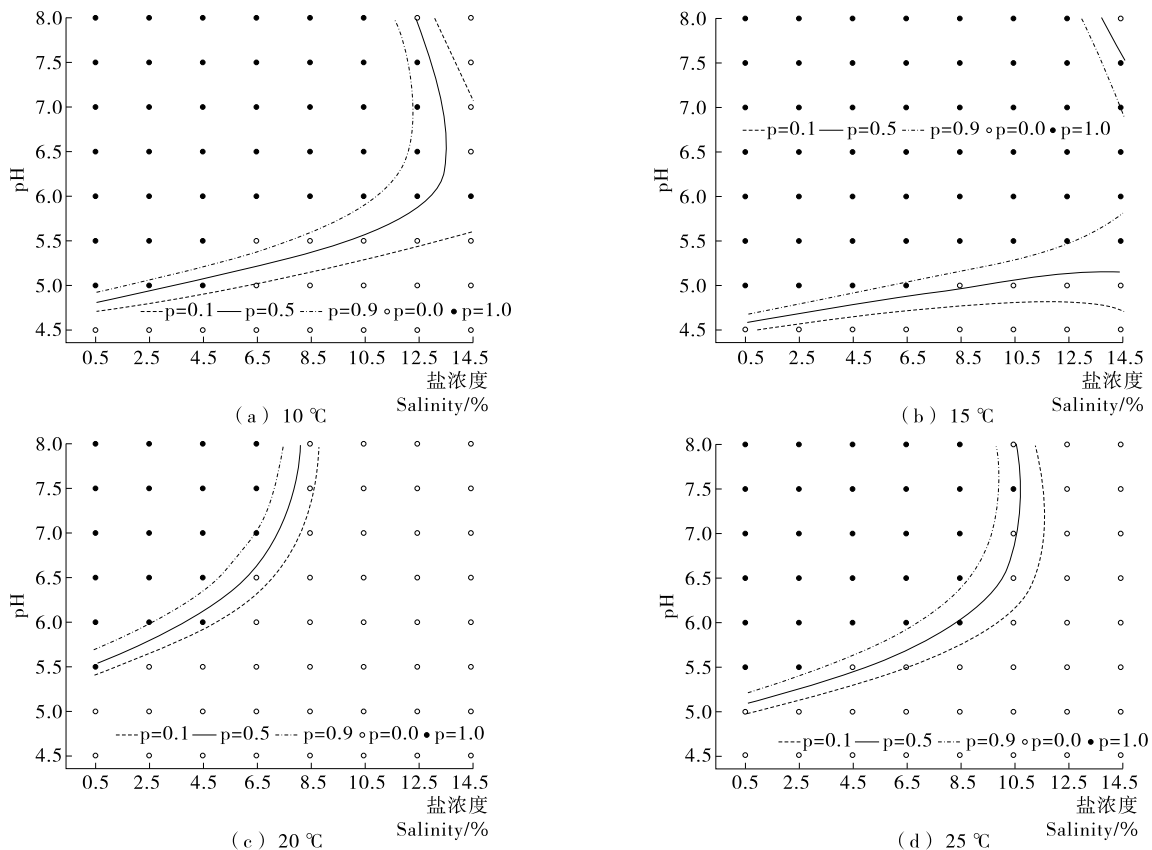


图 1 10,15,20,25 °C 时金黄色葡萄球菌生长/非生长界线图

Figure 1 Growth/no growth boundaries for the *Staphylococcus aureus* while temperature was 10, 15, 20 and 25 °C

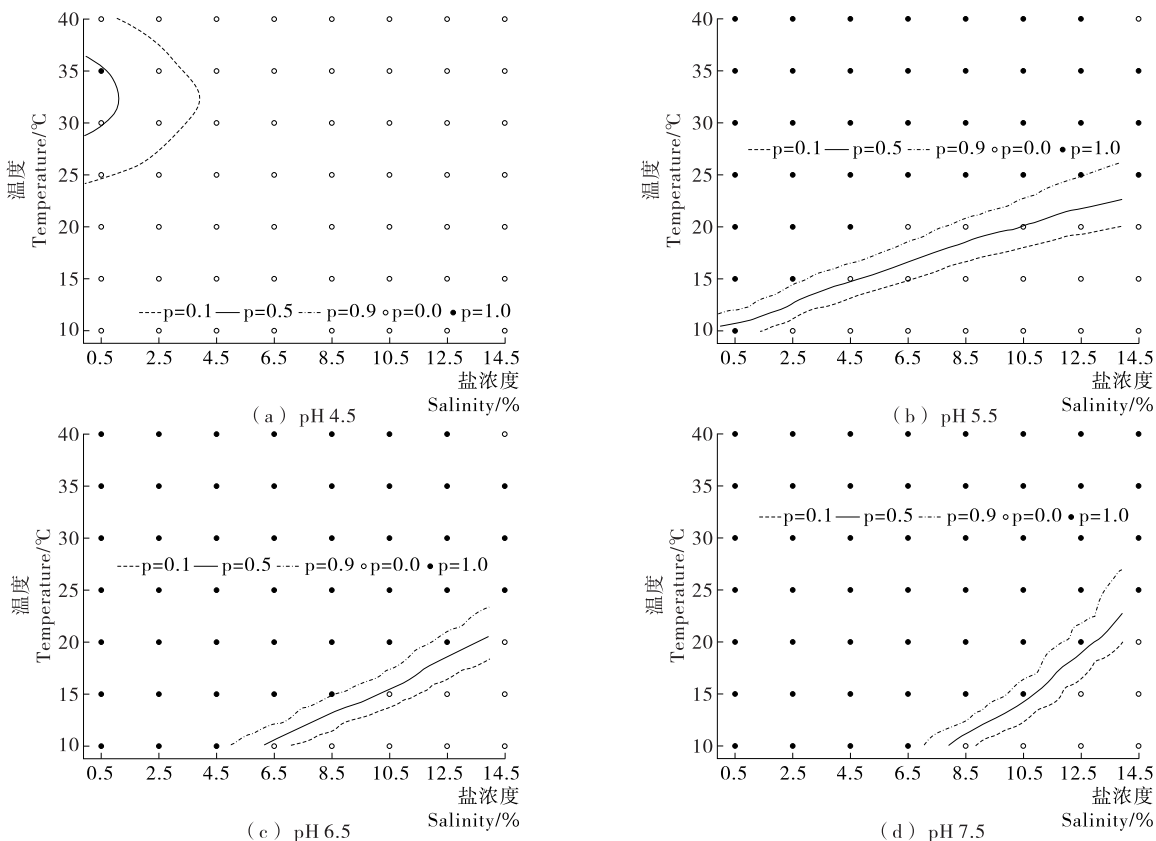


图 2 pH 4.5,5.5,6.5 和 7.5 时金黄色葡萄球菌生长/非生长界线图

Figure 2 The *Staphylococcus aureus* growth/no growth equation's curve while pH was 4.5, 5.5, 6.5 and 7.5

(3) pH 值为 6.5 和 7.5 时, pH 对金黄色葡萄球菌生长/非生长的影响很小。

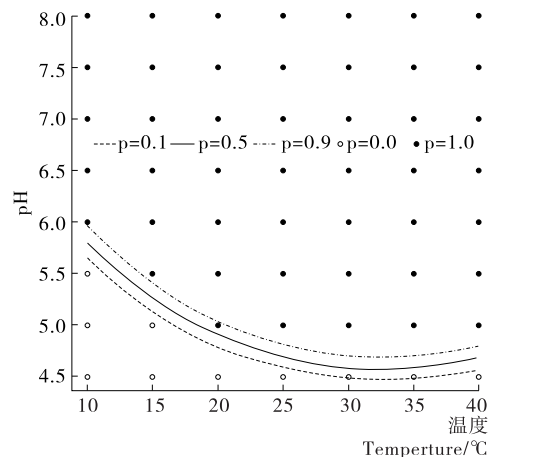
总而言之, pH 在 4.5~5.5 时, pH 对金黄色葡萄球菌生长/非生长影响显著, 在 5.5~8.0 时, 其影响不显著。

### 2.4 不同盐浓度下金黄色葡萄球菌生长/非生长与 pH 和温度的关系

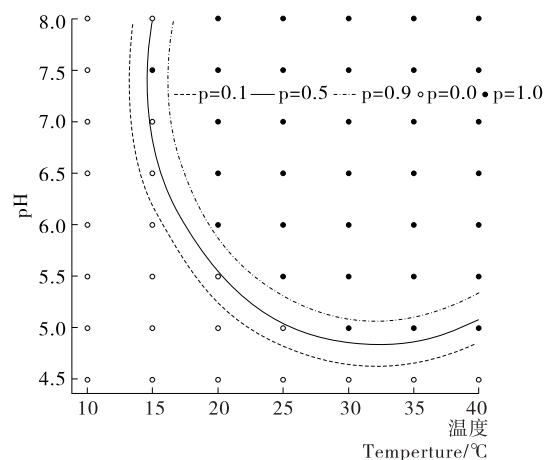
由图 3 可知:

(1) 盐浓度为 2.5% 时, 金黄色葡萄球菌生长范围很宽, pH  $\geq 6.0$ , 试验温度取值范围内均能生长; pH  $\leq 4.5$ , 不生长; pH 5.0~5.5、温度 20~40 °C 条件下, 均能生长。

(2) 盐浓度为 6.5% 时, pH  $\geq 7.0$ , 试验温度取值范围内



(a) 2.5%



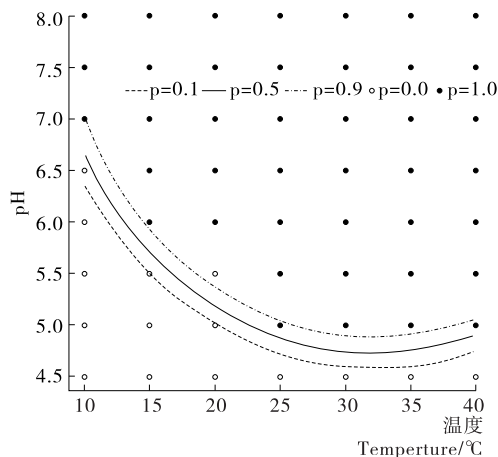
(c) 10.5%

金黄色葡萄球菌均能生长; pH  $\leq 4.5$ , 金黄色葡萄球菌不生长; pH 5.0~6.5, 温度 20~40 °C 条件下, 金黄色葡萄球菌均能生长。

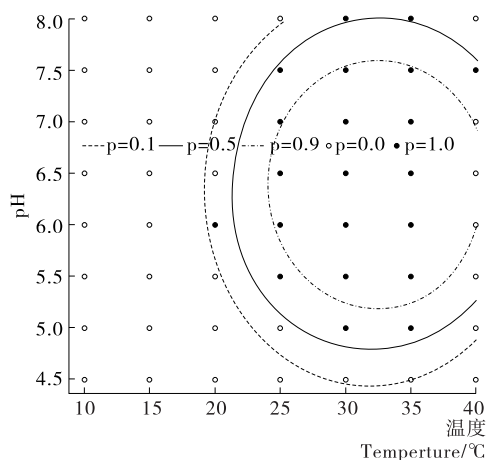
(3) 盐浓度为 10.5% 时, 金黄色葡萄球菌在温度 15 °C、pH 7.5, 温度 20~25 °C、pH  $\geq 5.5$  及温度  $> 25$  °C 的条件下均能生长。

(4) 盐浓度为 14.5% 时, 取值范围内金黄色葡萄球菌生长的因子组合中在温度 30~35 °C、pH 5.0~8.0 条件下, 生长区间呈椭圆分布。

总而言之, 随着盐浓度的升高, 金黄色葡萄球菌生长逐渐受到抑制, 生长区间变小, 高盐浓度能够有效抑制其生长。



(b) 6.5%



(d) 14.5%

图 3 盐浓度 2.5%、6.5%、10.5%、14.5% 时金黄色葡萄球菌生长/非生长界限图

Figure 3 The *Staphylococcus aureus* growth/no growth equation curve while salinity was 2.5%, 6.5%, 10.5% and 14.5%

### 2.5 讨论

从图 1~3 中的结果来看, 3 种因子对于金黄色葡萄球菌影响各不同。所选的 7 个温度中, 10~25 °C, 金黄色葡萄球菌的生长因子组合明显增多, 影响最为明显。从 10 °C, pH  $\geq 5.5$  时金黄色葡萄球菌开始生长, 盐浓度  $\geq 8.5\%$  时金黄色葡萄球菌不生长, 温度升高到 25 °C 时最大盐浓度条件下仍然可以生长, 该过程温度起着明显的作用, 但 25~40 °C 时金黄色葡萄球菌均生长良好, 温度对其生长/非生长影响不显著。所选择的 8 个 pH 值中, 由最初的 pH 为 4.5, 金黄色葡萄球菌几乎不生长, pH 值 5.5 时生长范围很大, 可知

pH 起到了关键的作用。所选择的 8 个盐浓度中, 低盐浓度到高盐浓度的变换过程中, 金黄色葡萄球菌的生长范围越来越大, 选值范围内影响较为显著。

综合温度、pH 和盐浓度 3 种因子对金黄色葡萄球菌生长/非生长进行研究, 并且依据 R 软件对所得的数据进行 Logistic 方程拟合, 得到方程式为:

$$\text{Logit}(p) = 2.791 \times 10^3 + 1.723T - 1.578 \times 10^2 pH - 5.231b_w - 4.006 \times 10^2 T pH - 1.856T b_w + 2.267 \times 10^3 pH b_w + 2.177 \times 10^2 T^2 + 0.789 pH^2 + 1.956 \times 10^2 b_w^2 \quad (4)$$

用 R 软件对拟合结果进行分析, 具有高度显著性。可在

一般环境中根据各个因子给定的值,准确快速地预测金黄色葡萄球菌是否具有生长的可能性。

### 3 结论

本研究以金黄色葡萄球菌为研究对象,得到了金黄色葡萄球菌生长/非生长模式方程,经拟合性分析该方程能够准确地预测金黄色葡萄球菌的生长情况,可应用于实际生产中。在实际生产中,数据的科学性较前人<sup>[18]</sup>的经验推测更具说服力,且能够更快捷地预算。本试验仅考察了温度、pH 值、盐浓度 3 种因子,后续将通过选定更多的环境因子以及测定更多的数据来增加模型的准确性。

#### 参考文献

- [1] 徐振波, 刘晓晨, 李琳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J]. 现代食品科技, 2013(9): 2 317-2 324.
- [2] Notermans S, Heuvelman C J. Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Science, 1983(48): 1 832-1 835.
- [3] Wendlandt S, Schwarz S, Silley P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A 22 foodborne pathogen[J]. Food Science and Technology, 2013(4): 117-139.
- [4] 孟晓荣, 张敏, 胡新婷, 等. 壳聚糖对食品中常见菌的抑制研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 90-92.
- [5] Vermeulen A, Dang T D T, Geeraerd A H, et al. Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and aw on the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008(124): 79-90.
- [6] Gysemans K P M, Bernaerts K, Vermeulen A, et al. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Microbiology, 2007(114): 316-331.
- [7] Chen Chen, Yang Xian-shi, Li Xue-ying. Establishment of growth/no growth model for *Bacillus cereus* on different temperature, pH and water activity[J]. Advanced Materials Research, 2013(p): 1 558-1 565.
- [8] Couvert O, Pinon A, Bergis H, et al. Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010(144): 236-242.

- [9] Theys T E, Geeraerd A H, Devlieghere F, et al. On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media[J]. Food Microbiology, 2010(27): 220-228.
- [10] Van Impe J F. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009(135): 83-89.
- [11] Zhang D, McQuestin O J, Mellefont L A, et al. The influence of non-lethal temperature on the rate of inactivation of vegetative bacteria in inimical environments may be independent of bacterial species. Food Microbiology, 2010(27): 453-459.
- [12] Bolton L F, Frank J F. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(6): 601-609.
- [13] Hajmeer M, Basheer I. A probabilistic neural network approach for modeling and classification of bacterial growth/no-growth data [J]. Journal of microbiological methods, 2002, 51 (2): 217-226.
- [14] Polese P, Del Torre M, Spaziani M, et al. A simplified approach for modelling the bacterial growth/no growth boundary [J]. Food microbiology, 2011, 28(3): 384-391.
- [15] Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, et al. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*; Effect of temperature, pH and water activity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133(1/2): 186-194.
- [16] Fujikawa H, Morozumi S. Modelling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk[J]. Food Microbiology, 2006, 23(3): 260-267.
- [17] Skandamis P N, Stopforth J D, Kendall P A, et al. Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(3): 237-249.
- [18] Borneman D L, Ingham S C, Ane C. Predicting growth/no growth of *Staphylococcus aureus* on vacuum-packaged ready-to-eat meats [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(3): 539-549.

(上接第 115 页)

的市场利用价值。这种将伺服原理与力学机械结构结合的方法亦可以推广到其它控制程度与精度不需很高的场合,均能起到较好的自调整、自适应效果。另外,本研究将局部运动结构与传送带结合在一起,亦为节约资源及简化结构提供了新的范本。

#### 参考文献

- [1] 牛奶, Julian. 鸡蛋果[J]. 环球人文地理, 2013(23): 109.
- [2] 杨锋, 黄永春, 何仁, 等. 百香果加工适性的测定及提高其出汁率的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 82-86.
- [3] 王天陆. 鸡蛋果的综合加工技术[J]. 食品与机械, 1991(2): 14-15.
- [4] 韩希婉, 李潮生. 一种有推广价值的热带植物—鸡蛋果[J]. 热带作物研究, 1983(4): 63-64.

- [5] 魏定耀. 借鉴国内外经验加速我省鸡蛋果业的开发[J]. 热带作物研究, 1995(4): 67-72.
- [6] 李国, 庞观胜. 热带特色水果鸡蛋果特征特性及栽培技术[J]. 现代农业科技, 2013(13): 112-121.
- [7] 郑冠标. 鸡蛋果病害文献综述[J]. 热带作物研究, 1991(2): 83-88.
- [8] 黄循精. 鸡蛋果[J]. 世界农业, 1994(7): 31-32.
- [9] 韩希婉, 李潮生. 鸡蛋果资源的开发利用[J]. 食品科学, 1985 (3): 1-6.
- [10] 何忠春. 亟待开发的新兴热带高级饮料水果——鸡蛋果[J]. 福建热作科技, 1986(2): 11-13.
- [11] 谭季秋. 位置伺服自动测量装置设计[J]. 机电产品开发与创新, 2003(6): 74-76.
- [12] 姚茂欣, 欧忠庆. 6PG-300 型鸡蛋果破果机喂入和压榨部分参数设计分析[J]. 热带作物机械化, 1996(1): 20-22.