

论著

金黄色葡萄球菌在生乳中生长预测模型的建立

闫 军¹ 遇晓杰¹ 汤 岩² 薛成玉¹ 董 锐¹ 谢平会¹

(1. 黑龙江省疾病控制中心,黑龙江 哈尔滨 150030;
2. 东北农业大学理学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:目的 建立生乳中金黄色葡萄球菌的生长预测模型。方法 采用 GB/T 4789.37—2008 第三法,测定不同温度下金黄色葡萄球菌在生乳中的生长曲线,利用麦夸特法和通用全局优化法将曲线数据分别拟合 Gompertz 方程、Logistic 方程、Richards 方程、Weibull 方程、Baranyi 方程和 Monod 方程,确定最适方程,建立一级模型。同时应用响应面方程建立二级生长预测模型。结果 金黄色葡萄球菌在生乳中的最适预测模型为 Gompertz 模型。结论 通过与多模型比较,建立了金黄色葡萄球菌在生乳中的生长预测模型。为该菌在生乳中的风险评估理论体系的建立提供理论基础,也为乳制品的安全生产和流通提供了科学依据。

关键词:金黄色葡萄球菌;生乳;预测模型

中图分类号:Q93;TS2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)06-0502-04

Establishment of a Model for Predicting the Growth of *Staphylococcus aureus* in Raw Milk

YAN Jun, YU Xiao-jie, TANG Yan, XUE Cheng-yu, DONG Rui, XIE Ping-hui

(Heilongjiang Province Center for Disease Control, Heilongjiang Harbin 150030, China)

Abstract: Objective To establish a model for predicting the growth of *Staphylococcus aureus* in raw milk. **Method** The growth curve of *Staphylococcus aureus* in raw milk under different temperatures was developed by the method of GB/T 4789.37—2008. On fitting growth curves with Gompertz equation, Logistic equation, Richards equation, Weibull equation, Baranyi equation and Monod equation, the primary model was established by Levenberg-Marquardt and Universal Global Optimization, and the secondary predictive growth model was established by a response surface model. **Results** Gompertz model was the optimal model for predicting the growth of *Staphylococcus aureus* in raw milk. **Conclusion** A model for predicting the growth of *Staphylococcus aureus* in raw milk was built by comparing multiple models. The predictive model can provide theory basis for the risk assessment of *Staphylococcus aureus* in raw milk, and also can provide a scientific basis for safety production and circulation of dairy products.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Raw Milk; Predictive Model

金黄色葡萄球菌广泛存在于自然界中,易被金黄色葡萄球菌污染的食品主要有奶、肉、蛋、鱼及其制品^[1]。食品中存在金黄色葡萄球菌肠毒素是个世界性卫生问题,据美国 CDC 报告,由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒仅次于大肠埃希菌,居第 2 位^[2],在我国它是引起食物中毒的主要病原菌^[1]。由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的 50%^[3]。据 2008 年我国食源性疾病监测网及黑龙江省疾病预防控制中心对生乳中金黄色葡萄球菌监测结果显示,生乳样品中金黄色葡萄球菌居于所监测的致病菌之首^[4]。本实验通

通过对生乳中金黄色葡萄球菌在不同温度下生长情况的研究,拟合多种数学方程,建立该菌在生乳中的生长预测模型,进而为预测金黄色葡萄球菌在生乳中的生长情况提供理论依据,为生乳中金黄色葡萄球菌的风险评估奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

选取黑龙江省具有代表性的大型奶站,榨乳完毕后,立即用无菌的大三角烧瓶无菌采集储奶罐中的新鲜混合生乳 2 000 ml,低温冷藏,在 2 h 内运输至本实验室。

1.2 培养基及设备

3M 金黄色葡萄球菌快速测试片、确认片、增菌液(BPW)涂布棒均购自美国 3M 公司;其他培养基及试剂购自北京陆桥生物技术有限公司。所有培养

收稿日期:2010-07-10

基金项目:黑龙江省卫生厅计划项目(2009-488)

作者简介:闫 军 女 硕士 研究方向为食源性致病菌风险评估

E-mail:yanjunch@126.com

通信作者:遇晓杰 女 主任医师 研究方向为食品安全

基及试剂均在有效期内使用。

恒温培养箱、低温恒温生化培养箱购自上海爱朗仪器有限公司,低温恒温水浴槽购自宁波新芝生物科技股份有限公司,均通过技术监督部门检定;比浊仪由法国生物梅里埃公司提供;螺旋混匀器购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 样品前处理

待新鲜生乳样品恢复室温后,混匀,采用 GB/T 4789.37—2008《食品卫生微生物学检验》第三法^[5],以无菌操作,利用 3M 金黄色葡萄球菌快速测试片、确认片进行初始菌落计数。将剩余新鲜生乳样品混匀分装在带塞的无菌中试管中,每管 10 ml,每 15 管为一组,共 10 组 150 管。

1.4 生乳中金黄色葡萄球菌生长曲线的测定

将分装好的含有 10 ml 样品的 10 组试管分别置于 10、12、14、16、18、20、22、24、26 和 30 °C 温度中进行培养,培养温度在 20 °C 以上(含 20 °C)使用恒温培养箱,20 °C 以下时使用低温恒温生化培养箱、低温恒温水浴槽,温度波动均为 ±0.1 °C。根据预实验结果,为了更好地反映该菌在生乳中的生长特性,每隔一定时间取出一支试管,用 GB/T 4789.37—2008《食品卫生微生物学检验》第三法^[5],以无菌操作,利用 3M 金黄色葡萄球菌快速测试片、确认片进行菌落计数,通常每条生长曲线测定 10~15 个点,测定终点为生乳变质。每次计数用生理盐水做 3 个稀释倍数,每个稀释度做 2 个平行样。

1.5 生乳中金黄色葡萄球菌预测模型的建立

利用麦夸特法和通用全局优化法将生长曲线数据分别拟合 Gompertz 方程、Logistic 方程、Richards 方程、Weibull 方程、Baranyi 方程和 Monod 方程,确定最适方程,建立一级模型。同时根据一级模型建立二级生长预测模型。各方程形式如下:

Gompertz 方程:

$$L(t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$$

其中 $L(t)$:菌数的对数值(log CFU/g); A :菌数的初始值(log CFU/g); C :细菌的最大生长量(log CFU/g); M :细菌生长率最大时对应的时间(h); B : M 时刻的生长率[log CFU/(g·h)]; t :时间(h)。

Logistic 方程:

$$dN/dt = rN(1 - N/N_{\max})$$

其中 N :菌数; t :时间; r :速度定数; N_{\max} :菌数最大值。

Richards 方程:

$$y = \frac{a}{(1 + \exp(b - cx))^{(1/d)}}$$

其中 y :菌数; x :时间; a :总生长量饱和值; c :生

长速率; b :与初始菌数有关的参数; d :与异速生长参数有关的参数。

Weibull 方程:

$$\ln y = a - (x/b)^c$$

其中 y :菌数; x :时间; a :菌数的初始值(log CFU/g); b :细菌数量第一次减少 10 倍的时间; c :形式参数。

Baranyi 方程:

$$y = y_0 + \frac{y_1}{\ln(y)} + \frac{y_2}{\ln(y)}$$

$$y_1 = \mu_m t + \ln[e^{-\mu_m t} - e^{-\mu_m(t+t_{lag})} + e^{-\mu_m t_{lag}}]$$

$$y_2 = \ln[1 + 10^{(y_0 - y_{\max})} (e^{\mu_m(t-t_{lag})} + e^{-\mu_m t_{lag}})]$$

其中 y_0 :最初菌落数; y_{\max} :最终菌落数; μ_m :最大表观生长率; t_{lag} :迟滞期时间。

Monod 方程:

$$y = a \exp[b(x - c)]$$

其中 y :菌数; x :时间; a :菌数的初始值(log CFU/g); b :生长速率(log CFU/g); c :迟滞期。

2 结果与分析

2.1 不同温度下生乳中金黄色葡萄球菌生长曲线的研究

通过测定生乳中金黄色葡萄球菌的生长曲线,将所测定数据进行分析,拟合得到不同温度下该菌的生长趋势图(见图 1)。从图中可以看出,温度越高,金黄色葡萄球菌生长得越快。由于 26 °C 与 30 °C 生长数据接近,并且存在统计误差,因此二者趋势曲线有部分交叉。

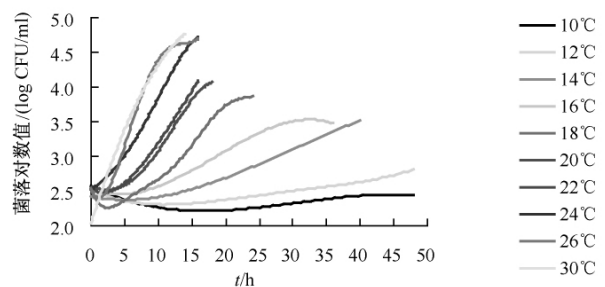


图 1 生乳中金黄色葡萄球菌生长趋势

2.2 一级生长模型的建立

利用麦夸特法和通用全局优化法,将实验数据与 6 种方程进行拟合,所建模型的相关系数(r)值均在 0.98 以上,拟合效果较好,因此要针对均方差(RMSE)和残差平方和(SSE)进行比较,结果见表 1,表明 Gompertz 模型为最适合模型。Gompertz 模型各参数见表 2。

2.3 二级生长模型的建立

针对 Gompertz 模型,采用二级响应面方程(多

表 1 生乳中金黄色葡萄球菌生长数据拟合模型结果

温度 (°C)	Gompertz		Logistic		Richards		Weibull		Baranyi		Monod	
	RMSE	SSE	RMSE	SSE	RMSE	SSE	RMSE	SSE	RMSE	SSE	RMSE	SSE
10	0.05	0.03	0.05	0.04	0.06	0.04	0.05	0.03	0.05	0.04	0.06	0.04
12	0.03	0.02	0.04	0.02	0.05	0.03	0.03	0.02	0.04	0.02	0.05	0.03
14	0.04	0.02	0.05	0.03	0.05	0.03	0.04	0.02	0.05	0.03	0.05	0.03
16	0.03	0.01	0.05	0.03	0.04	0.02	0.03	0.01	0.05	0.03	0.04	0.02
18	0.05	0.04	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.04	0.07	0.06	0.06	0.05
20	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05	0.04
22	0.02	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01
24	0.03	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01
26	0.03	0.01	0.06	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.06	0.04	0.04	0.02
30	0.06	0.05	0.08	0.09	0.07	0.06	0.06	0.05	0.08	0.09	0.07	0.06

表 2 不同温度下 Gompertz 模型的参数

参数	温度 (°C)									
	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
A	0.83708	0.86318	0.85478	0.90672	0.86523	0.95431	0.91676	0.88514	0.91186	0.87177
C	0.13730	0.19774	0.51170	0.37357	0.57241	0.43564	0.66972	0.86378	0.63464	0.67973
B	0.06700	0.09742	0.07693	0.14947	0.17985	0.49508	0.19375	0.15725	0.44137	0.44241
M	44.0776	33.2821	23.1142	15.5338	12.7342	10.2917	10.0788	7.03332	5.07138	4.24943

项式方程)^[6],以自然对数的方式进行结合建立二级模型^[7]。采用麦夸特法和通用全局法,对一级模型中参数 B 和 M 的自然对数形式建立模型,结果见图 2、图 3。

$$\ln B = -4.377 + 0.193T - 0.003T^2$$

(r = 0.81354)

$$\ln M = 5.743 - 0.223T + 0.003T^2$$

(r = 0.99998)

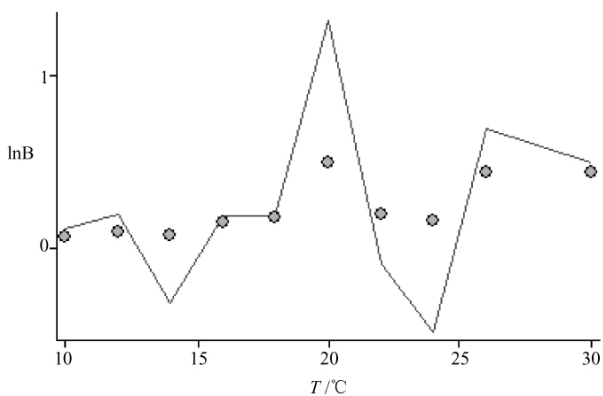


图 2 一级模型中参数 B 与温度 T 的关系

图 2 和图 3 结果显示,随着温度的升高,参数 B 逐渐增大,表示生长速率逐渐增大;参数 M 逐渐减小,表示达到最大生长速率的时间逐渐缩短。

3 讨论

以上结果表明,通过将实验数据与 Gompertz 方程、Logistic 方程、Richards 方程、Weibull 方程、Baranyi 方程和 Monod 方程 6 个方程进行拟合,确定 Gompertz 方程拟合度最高,为最适模型。虽然各个模型的 r 值均很高,但是结合 RMSE 和 SSE 比较,

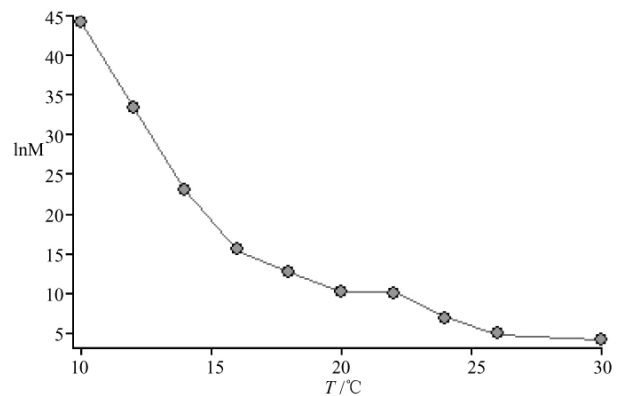


图 3 一级模型中参数 M 的自然对数与温度 T 的关系

Gompertz 模型的预测值更接近实验数据。通过图 2 和图 3 可以看出随着温度的升高,生长速率逐渐增大,达到最大生长速率的时间逐渐缩短。通过分析,Gompertz 模型与其余模型相比,各个参数值均具有生物学意义,更符合生物学规律。

生乳中金黄色葡萄球菌生长情况复杂,模型建立的影响因素很多。首先,生乳中的金黄色葡萄球菌菌龄不完全一致,这会对模型的参数产生影响;其次,不同来源不同地域的生乳中金黄色葡萄球菌菌株构成和初始菌数也存在差异;另外有研究表明,早期的环境和生长阶段都影响细胞转入新环境中适应和重新生长所用的时间的长短^[8]。

充分考虑以上各种原因,本项研究中的生乳取自于黑龙江省具有代表性的大型奶站,该奶站生乳来源广泛,基本能够代表哈尔滨市生乳中的菌株构成。同时,10 个温度培养的生乳来源相同,即生乳成分、微生物组成及其中金黄色葡萄球菌初始浓度均相同,因此具有更好地可比性。为了更好地建立

模型,本研究选取了更多的方程进行分析,从中选取最佳方程,建立了最适生长预测模型,能够更好地达到预测目的。经过大量实验,本研究基本上能够体现该菌生长的大体趋势,而且可以预测其在不同温度下的生长情况,对乳制品生产具有重要的实际指导意义。

预测微生物学模型是定量风险评估的重要工具,可以通过预测模型来预测微生物的复杂生长过程。目前国内外关于金黄色葡萄球菌的预测模型一般只采用 Gompertz 方程和 Logistic 方程作为初级模型,再相应地采用二级模型(响应面方程和 Arrhenius 方程、平方根方程)来描述环境参数对初级模型参数的影响^[6,9-11],况且对生乳中金黄色葡萄球菌研究比较少见。本项研究从生产实际出发,针对生乳中存在的金黄色葡萄球菌混合菌株进行研究,将大量实验数据与多个方程相拟合,确定最适模型,在国内乃至国际上都处于领先地位。该模型可以在不进行检测的情况下,预测生乳中金黄色葡萄球菌的生长繁殖情况,进而控制和判断生乳的安全性和危害程度,保证生乳贮运过程的安全性。本模型对于黑龙江省,特别是哈尔滨市的生乳具有很强的针对性。据此建立的预测模型能够成为有效控制生乳中金黄色葡萄球菌生长繁殖的科学依据,可以为金黄色葡萄球菌在生乳中的风险评估提供理论依据,有利于保证生乳的质量,实现从源头上杜绝由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的乳制品中毒事件。

参考文献

- [1] 杨红,刘桂华,龚云伟,等.食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及检测方法[J].中国卫生工程学,2006,5(2):107-108.
- [2] 张严峻,张俊彦,梅玲玲,等.金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分型和分布[J].中国卫生检验杂志,2005,15(6):682-684.
- [3] 萨日娜.一起由金黄色葡萄球菌引起的奶粉食物中毒[J].中国卫生检验杂志,2005,15(5):636.
- [4] 闫军,遇晓杰,苏华.原料乳中金黄色葡萄球菌风险评估基础研究[J].中国公共卫生管理,2010,26(1):39-40.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.37—2008 食品卫生微生物学检验[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [6] BAHK G J, HONG C H, OH D H, et al. Modeling the level of contamination of *Staphylococcus aureus* in ready-to eat Kimbab in Korea[J]. J Food Prot, 2006, 69(6):1340-1346.
- [7] BUCHANAN RL, STAHL H G, WHITING R C. Effects and interactions of temperature, pH atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. J Food Prot, 1989, 52: 844-851.
- [8] WHITING R C, BAGI L. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 73:291-295.
- [9] STEWART C M, COLE M B, LEGAN J D, et al. Modeling the growth boundary of *Staphylococcus aureus* for risk assessment purposes [J]. J Food Prot, 2001, 64(1):51-57.
- [10] FUJIKAWA H, NOROZUMI S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk [J]. Food Microbiol, 2006, 23:260-267.
- [11] FUJIKAWA H, YANO K, NOROZUMI S, et al. Development of a predictive program for microbial growth under various temperature conditions [J]. 食衛誌, 2006, 47(6):288-292.

法规文件

关于废止《食品生产经营单位废弃食用油脂管理的规定》的通知

卫监督发〔2010〕77号

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团卫生厅(局)、环保厅(局)、住房城乡建设厅(委、局)、工商局:

根据《国务院办公厅关于认真贯彻实施食品安全法的通知》(国办发〔2009〕25号)要求,我部组织对原《食品卫生法》配套的规范性文件进行了清理。现决定废止2002年卫生部、工商总局、环保总局、建设部联合印发的《食品生产经营单位废弃食用油脂管理的规定》(卫法监发〔2002〕99号)。

对于食品生产经营单位的废弃食用油脂监督管理工作,应当依据《食品安全法》、《食品安全法实施条例》、《城市市容和环境卫生管理条例》、《固体废物污染环境防治法》、《水污染防治法》等相关法律法规,以及《国务院办公厅关于加强地沟油整治和餐厨废弃物管理的意见》(国办发〔2010〕36号)文件执行。

本通知自发布之日起施行。

卫生部 环境保护部 住房城乡建设部 工商总局

二〇一〇年八月二十日