

环境因子交互作用下蜡样芽孢杆菌生长/非生长界面模型的建立与评价

陈琛^{1,2}, 李学英¹, 杨宪时¹, 王丽丽¹

(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)

摘要: 本文旨在建立一种生长/非生长界面模型来预测蜡样芽孢杆菌在环境因子交互作用下的生长概率。选取五株蜡样芽孢杆菌菌株的混合菌株作为研究对象, 研究温度、pH、Aw 对混合菌株生长概率的交互影响。获得的生长/非生长实验数据用 logistic 回归方程拟合, 建立了环境因子交互作用下蜡样芽孢杆菌生长/非生长界面模型。实验采取部分析因设计方案, 选定 80% 的实验数据用做模型的拟合, 20% 的数据用做模型的验证。并从已发表的文献中选取 30 个数据作为测试集, 通过比较预测值和观察值来检测已建模型的适用度。实验结果表明, 训练集的一致性指数为 0.991, 验证集的一致率为 0.988, 说明模型对同类数据预测准确度高; 同时模型的 R²-Nagelkerke 值也较高, 为 0.949; Hosmer-Lemeshow 检验中的 $\chi^2=0.012$, P=1, logistic 回归模型拟合度较高。模型对测试集的预测准确率达 83.3%, 该模型对所选数据具有较高的预测能力, 说明模型具有较广的适用范围。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 生长/非生长界面模型; logistic 回归模型

文章编号: 1673-9078(2015)12-205-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.031

Modeling and Evaluating the Growth/No Growth Boundaries of *Bacillus cereus*: Effect of Temperature, pH, and Water Activity

CHEN Chen^{1,2}, LI Xue-ying¹, YANG Xian-shi¹, WANG Li-li¹

(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)

Abstract: *Bacillus cereus* is an opportunistic pathogen, implicated in two main food-borne diseases: emetic syndrome and diarrheal syndrome. The aim of this study was to establish a probabilistic model to predict the growth/no growth conditions or growth probability of *B. cereus* as a function of temperature, pH, and water activity (Aw). Using a cocktail of five strains of *B. cereus*, a logistic regression model was chosen to study the effects of different values of temperature, pH, A_w on the growth probability of *B. cereus*. A fractional factorial design was applied and the experimental data were divided into two parts: 80% data was chosen as model data and 20% data was chosen as validation data. A comparison was made between the predicted and observed values by selecting 30 experimental data from the literature, to test the model. The results showed that the concordance index of the model data was 0.991, while that of the validation data was 0.988. This indicated that the model showed high predictive accuracy for homogeneous data. Additionally, the performance statistics obtained indicated a reasonable goodness-of-fit of the model obtained, mainly owing to the high values of R²-Nagelkerke (0.949) and $\chi^2 = 0.012$, $p = 1$ of the Hosmer-Lemeshow statistic. A high predictive accuracy was obtained (83.3%) with test data, showing a wide range of possible applications.

Key words: *Bacillus cereus*; growth/no growth; logistic regression model

蜡样芽孢杆菌是一种能产芽孢、兼性好氧的革兰氏阳性杆菌, 其分布较为广泛, 常见于灰尘、土壤和污水中, 在许多生熟食品中也常见。蜡样芽孢杆菌为

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 上海市农业科技成果转化项目(沪农科转字(2015)第2-1号);

农业部引进国际先进农业科学技术项目(2011-Z12)

作者简介: 陈琛(1988-), 女, 硕士研究生, 从事食品质量安全的研究

通讯作者: 杨宪时(1954-), 男, 研究员, 从事水产品贮藏加工和品质保障技术的研究

条件致病菌, 主要产生呕吐毒素和腹泻毒素导致食物中毒, 当其污染食品且菌数达到 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g 时, 便可引起食物中毒^[1]。蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒是比较常见的, 具有明显季节性, 以夏秋季节最高, 且被污染的食品种类也较广泛, 例如米、乳品、蒸煮的米饭和炒饭、干制品(面粉、奶粉等)、调料、肉制品、豆类食品、焙烤食品、海鲜和蔬菜等^[2]。

许多有关蜡样芽孢杆菌的生长动力学模型被建立^[3-4]。但是生长动力学模型只能预测生长情况信息却

不能描述微生物的非生长情况,而生长/非生长界面模型能够表征更为详细的有关微生物的生长与非生长信息。生长/非生长界面模型是一种概率模型,它能预测微生物在不同环境条件下的生长概率情况。对于含有潜在致病菌和产毒素菌株的食品来说,描述其生长/非生长情况比描述其生长速率更有意义。

本文选取五株蜡样芽孢杆菌菌株分别为 CCL1、CCL2、CCL3、ATCC49064 和 DSMZ4313 的混合菌株作为研究对象,研究了温度(10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃)、pH(4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5)、Aw(14 水平,从 0.992 到 0.932)对混合菌株生长概率的交互影响,建立和验证了环境因子交互作用下蜡样芽孢杆菌生长/非生长界面模型,并从已发表的文献中选取数据作为测试集,通过比较预测值和观察值来检测已建模型的适用度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蜡样芽孢杆菌标准菌株 ATCC49064 和 DSMZ4313 购于无锡赛维科技有限公司,菌株 CCL1、CCL2 和 CCL3 分离自高水分烤虾制品,三株菌株经相关鉴定,确认为蜡样芽孢杆菌。所有菌株经活化后,运用微生物鉴定和药敏分析仪对菌株做进一步的确认。各菌株分别接种至加有 30% (V/V) 甘油的 BHI 液体培养基中并于 -80℃ 冰箱中保藏。常用菌株采取斜面低温保藏法于 4℃ 冰箱中保藏,每月移种一次。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器设备

MIR153、253 高精度培养箱,日本 Sanyo 公司; CX41 电子光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司; SA-960-II SHJ-系列净化工作台,上海净化设备厂; Power wave XS 酶标仪,美国 Biotek 公司; IUL 均质器,上海德记行科技发展有限公司; DK-S24 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司; pHs-2C 酸度计,上海伟业仪器厂; Lab MASTER-aw 水分活度仪,瑞士 Novasina 公司; Sensitire Automated Microbiology System 微生物鉴定和药敏分析仪,英国 TECK Diagnostic Systems 公司。

1.2.2 主要试剂

脑心浸液肉汤培养基(BHI, OXOID)、胰蛋白大豆琼脂(TSA,北京陆桥)、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP),购于无锡赛维科技有限公司;氯化钠、氢氧化钠、磷酸二氢钾、盐酸(均为国产分析纯),购

于上海国药化学试剂公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计和培养基的准备

本实验采用部分析因设计方案,因子和水平的选择主要基于前期进行的单因素实验以及一些学者的报道^[5-6]。选择温度、水分活度和 pH 值三个因素,温度选择 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃和 35℃ 六个水平,水分活度选择 0.992、0.989、0.986、0.983、0.977、0.974、0.971、0.967、0.964、0.954、0.947、0.943、0.938 和 0.932 十四个水平,pH 值选择 4.5、5、5.5、6、6.5、7 和 7.5 七个水平进行部分设计实验。

实验选择 BHI 肉汤培养基为基质,通过添加适量的甘油来调节培养基的水分活度,并用水分活度仪来监测控制;培养基的 pH 通过 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 来调节,并用酸度计来监测控制。将培养基调配好后进行高温灭菌,灭完菌后进行最终水分活度和 pH 值的确认。

1.3.2 菌悬液的准备

无菌挑取一环各菌株斜面培养物接种到装有 10 mL 无菌 BHI 肉汤培养基的试管中,置于 37℃ 培养,培养 24 h 后从该试管中吸取 1 mL 培养液接种于装有 9 mL 无菌 BHI 肉汤培养基中置于 37℃ 培养 24 h,再吸取 1 mL 培养液接种于装有 9 mL 无菌 BHI 肉汤培养基中置于 37℃ 培养 18 h,以使菌株达到生长稳定期,菌悬液备用。

1.3.3 混合菌株的准备和菌株的接种

本实验采用混合菌株作实验(鸡尾酒法)^[7],将各菌株菌悬液用磷酸缓冲溶液稀释适当倍数后,浓度均达到 10⁸ CFU/mL 左右。取 10 mL 各稀释菌液到灭菌锥形瓶中,混合震荡备用。

用磷酸缓冲溶液适当稀释上述混合菌液到约 5×10³ CFU/mL,无菌吸取稀释混合菌液 1 mL 连续稀释适当倍数,并吸取各稀释菌液 0.1 mL 到 MYP 琼脂平板上进行涂布,并于 37℃ 培养 24 h 后计算菌落总数,确定初始菌量。同时将调配好的液体培养基灭菌后无菌移取到 96 孔板中,每个小孔分装 200 μL,每种组合作 4 个平行,取上述稀释混合菌液 50 μL 接种至各小孔中,以获得约 10³ CFU/mL 菌浓度。每种组合下多留 2 个孔分装 300 μL 不接种的培养基以进行空白对照。最后在小孔中分别滴加 50 μL 灭菌石蜡油,覆上板盖封口后于相应的温度中培养 30 d。

1.3.4 生长/非生长情况的评估

蜡样芽孢杆菌的生长情况通过测定小孔中培养基的 OD 值来确定,其 OD 值主要用 BiotekPower-

Wave™ 微孔板扫描分光光度仪来检测。隔天从培养箱中取出平板读数, 如果微孔中出现明显的沉淀物或混浊且 OD 值读数 ≥ 0.3 (空白样品 OD 值在 0.105 左右), 则确定蜡样芽孢杆菌生长了; 当 OD 值 $\in (0.105, 0.3)$ 时或对小孔中的菌悬液有疑惑时(相邻左右的组合条件都呈现相同规律而该条件下未呈现此规律)或该组合条件处于边界条件时, 则通过涂布 TSA 琼脂平板来验证, 同时也涂布 MYP 琼脂培养基用来验证。如果两种平板均出现典型的菌落状态, 且菌数大于初始菌量 0.5 lgCFU/mL 时^[8], 则确定蜡样芽孢杆菌生长, 否则确定为不生长。由前期预备实验可以得出小孔中 OD 值=0.3(空白 OD 值为 0.105)时, 菌落总数对应于 7 lgCFU/mL 左右, 即明显多于初始量 0.5 lgCFU/mL。当结果确定蜡样芽孢杆菌生长了, 便记为“1”, 反之则记为“0”。

1.3.5 模型的拟合和验证

实验数据用 EXCEL 表格处理, 在拟合模型前去删除个别数据异常点, 并用 logistic 多项式回归模型来拟合数据。该模型如下:

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

式中: p 为微生物的生长概率; $a_0 \sim a_9$ 为方程的拟合系数; T 为培养温度; $b_w = \sqrt{1 - A_w}$ (A_w 为培养基水分活度); $\logit(p) = \ln(p/1-p)$ 。

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。模型数据分为两个部分, 选定 80% 的数据为训练集用来拟合模型, 20% 的数据为验证集用来验证模型, 模型的拟合优度通过以下统计指标来验证: Hosmer-Lemeshow 拟合优度指标, 一致率(%), R^2 -Nagelkerke 值。

为了更好地阐述模型的拟合效果以及生物学意义, 令方程 $p=0.1$ 、 $p=0.5$ 和 $p=0.9$ 时, 绘制该条件下的温度、水分活度和 pH 的生长/非生长界线图。最后与 Combase 数据库以及已经发表的相关文献数据进行比较, 并运用该模型获得上述数据的生长概率预测值, 通过比较预测值和真实值计算出预测正确率和错误率, 来进一步检测模型的适用度。数据的生长与非生长判别主要通过比较观测时间内初始菌量和最终菌量。

2 结果与分析

2.1 模型拟合结果与分析

模型的参数估计值, 以及相应的标准偏差, P 值

和 Z 值见表 1。从表中可以看出除了平方项之外, 其余各项参数都很显著 ($P < 0.05$)。说明蜡样芽孢杆菌混合菌株的生长概率受温度、水分活度、pH 以及它们之间的交互作用影响较大。模型的拟合优度指标分析结果见表 2。

表 1 logistic 回归模型参数估计值和性能分析

Table 1 Parameter estimates and performance statistics of the logistic regression model for *B. cereus*

参数	估计值	标准误差	Z 值	P 值
常数项(a_0)	-134.103	31.853	-4.210	<0.001
$T(a_1)$	2.0472	0.574	3.564	<0.001
$\text{pH}(a_3)$	30.426	7.280	4.180	<0.001
b_w	-221.658	101.120	-2.192	0.028
$T * \text{pH}$	-0.315	0.111	-2.837	0.005
$T * b_w$	7.028	2.437	2.884	0.004
$\text{pH} * b_w$	-46.191	15.196	-3.04	0.002
b_w^2	-	-	-	*
pH^2	-	-	-	*
T^2	-	-	-	*

注: *表示 $P > 0.05$ 。

一致率^[9]一般用来反映模型的预测能力, 其通常作为模型预测精确度的评价指标, 它反映了预测值和实际值的一致性。从表 2 可以看出, 训练集的一致率为 99.10%, 假阳性率为 0.30%, 假阴性率为 0.60%; 验证集的一致率为 98.81%, 假阳性率为 0%, 假阴性率为 1.19%, 训练集的一致率和验证集的一致率较接近, 对于同一性质的数据预测准确度也较高; 从验证集来看, 一致性指数较大, 即模型对验证集的预测准确度较高。 R^2 -Nagelkerke^[10]为 R^2 -Cox&Snell 值的修正形式。 R^2 -Cox&Snell 值是似然的基础上模仿线性回归模型的 R^2 解释回归模型, 但是由于其最大值小于 1, 用来解释模型时比较困难, 因此 Nagelkerke^[11]将 R^2 -Cox&Snell 进一步调整, 使取值范围在 0~1 之间。 R^2 -Nagelkerke 用来表示自变量对因变量的解释程度, 从表中可以看出模型具有较高的 R^2 -Nagelkerke 值为 0.949, 说明模型的拟合优度高。Hosmer 和 Lemeshow 的拟合优度检验^[10]通常把样本数据根据预测概率分为十组, 然后根据观测频数和期望频数构造卡方统计量最后根据自由度为 8 的卡方分布计算其 P 值并对 Logistic 模型进行检验。HL 指标的 P 值越大, 卡方值越小, 越不能拒绝原假设, 即说明模型拟合度越高。从表中可以得到 Hosmer-Lemeshow 检验中的 $\chi^2=0.012$, $P=1$, 说明该模型的拟合优度高。

表 2 logistic 回归模型的拟合优度检验结果

Table 2 Results for the goodness-of-fit of the logistic regression model

参数	一致率/%		R ² -Nagelkerke	Hosmer-Lemeshow 数据	假阳性率/%		假阴性率/%	
	训练集	验证集			训练集	验证集	训练集	验证集
	99.10	98.81	0.949	df=8	0.30	0	0.60	1.19
	$\chi^2=0.012$							
	P=1							

注：假阳性率：模型预测为生长的，实际观察中未生长的占总数据的百分比（当生长概率 $p>0.5$ ）；假阴性率：模型预测为不生长的，实际观察中确定为生长的占总数据的百分比（当生长概率 $p<0.5$ ）。

2.2 环境因子对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响

2.2.1 水分活度对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响

A_w 为 0.985、0.970、0.96 和 0.95 时，蜡样芽孢杆菌混合菌株的生长概率等高线图见图 1。

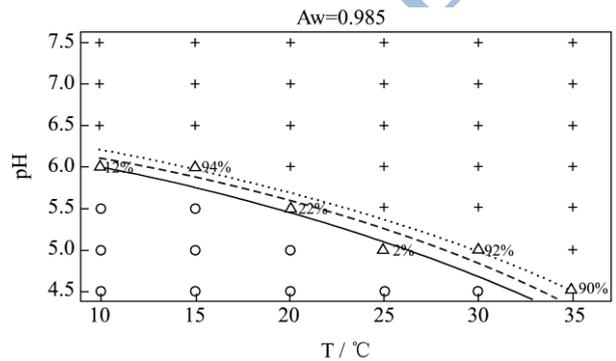
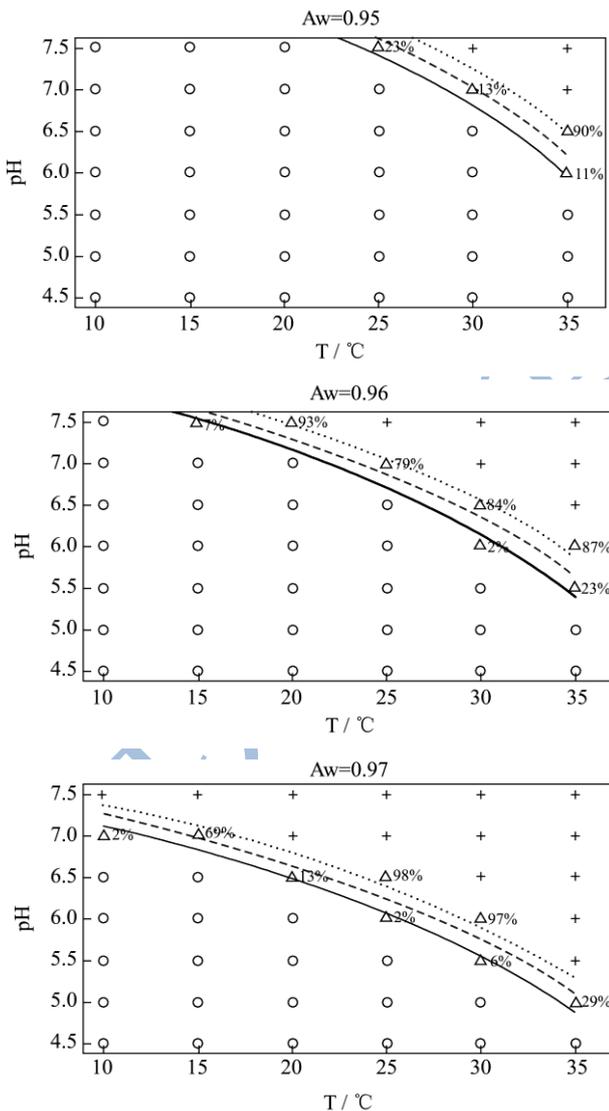


图 1 A_w 分别为 0.985、0.97、0.96 和 0.95 时蜡样芽孢杆菌混合菌株在 $p=0.1、0.5、0.9$ 时的生长/非生长界线图

Fig.1 Growth/no growth boundaries at $A_w = 0.985, A_w = 0.97, A_w = 0.96, A_w = 0.95$ for the predicted growth probability of the *B. cereus* cocktail by using the logistic regression model at probability values of 0.1, 0.5, and 0.9. Growth: $p = 1$; transition zone: $0 < p < 1$; no growth: $p = 0$

注： $p=0.1$ (-), 0.5 (-), 0.9 (...); $p=0$ (□), $p \in [0,1]$ (△), $p=1$ (+).

图中“□”表示蜡样芽孢杆菌生长概率为 0；“△”表示蜡样芽孢杆菌生长概率为 0~1；“+”表示蜡样芽孢杆菌生长概率为 1。实线表示 p 为 0.1 的生长/非生长界线，虚线表示 p 为 0.5 的生长/非生长界线，点线表示 p 为 0.9 的生长/非生长界线。三条线之间的区域为 $p \in [0.1, 0.9]$ 转换区域。转换区域之外的空间即为微生物生长和不生长两种状态，这对实际生产来说是最有意义。从图 1 中可以看出，水分活度越低，其转换区域往温度高的地方移动。图中很明显地看出，水分活度对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响较大。 pH 值很低时，水分活度对蜡样芽孢杆菌的抑制作用增强。当水分活度较低时，可以在较高的温度下，抑制蜡样芽孢杆菌的生长。例如当水分活度为 0.95 时，温度在 20 °C 以下时，蜡样芽孢杆菌在任何 pH 下均受到抑制，说明温度较低时，水分活度成了主要的影响因素。当水分活度较高时，温度和 pH 值的交互作用对抑制蜡样芽孢杆菌的影响较大。本实验中测得的蜡样芽孢杆菌在 0.938 时仍有生长情况，而 0.932 时未观察到生长情



况。有研究表明蜡样芽孢杆菌的最低的水分活度在 0.912~0.95 之间不等^[6]。而 Lanciotti^[5]等人计算得到蜡样芽孢杆菌的最低生长水分活度为 0.951。可能因为本实验采用的是混合菌株，而混合菌株所获得的生长范围会比单个菌株要广^[9]。同时实验中采用甘油来调节水分活度，因为用甘油做调节试剂，会比用 NaCl 和糖来调节时微生物所耐受的水分活度的范围更大一点。液体培养基中的 NaCl 和糖达到一定量会形成高渗透压，对细菌有着一定的抑制作用，而甘油能够迅速地渗透到微生物细胞中去，它对细菌的抑制作用较弱，所以甘油对实验的干扰性较小，微生物也能在较低的水分活度下生长。类似地，也可以绘制不同温度和 pH 条件下蜡样芽孢杆菌的生长概率等高线图以此来分析其它交互作用对混合菌株生长概率的影响。

2.2.2 pH 对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响

产品中初始 pH 也是影响微生物生长的关键因素，本实验中主要选择食用柠檬酸来调节样品的 pH 值，pH 在 5.5、5.9、6.3、6.8 时，温度和水分活度的交互作用对蜡样芽孢杆菌混合菌株的生长概率的影响见图 2。蜡样芽孢杆菌的最适生长 pH 在中性至偏碱性范围，而越酸的环境越不利于其生长，从图 2 中也可以明显地看出，pH 越低，图中“ \blacksquare ”越多，说明越不利于混合菌株生长；图中 $p \in [0.1, 0.9]$ 生长/非生长区域随着 pH 的增大，往水分活度和温度较低的方向移动。同时，pH 的降低加强了温度和水分活度的交互作用对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响，例如在 pH=6.8， $A_w=0.942$ ， $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ 时，混合菌株的生长概率为 1，而当 pH=6.3 时，其生长概率为 0.24。而在实际生产中，过低的 pH 值会影响产品的口感，李贤良^[12]等人研究了不同的柠檬酸添加量对产品的 pH 和感官的影响，实验表明当 pH 为 5.89 时（0.6% 柠檬酸），便开始有酸味，而在 5.68 时（0.8% 柠檬酸）便开始有较明显的酸味，感官评分低至 4 分。因此在样品分析时，既要结合模型的预测值也要结合其实际的感官评分。

2.2.3 温度对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响

温度是影响微生物生长的最直接的因素之一。从图 3 中可以很明显地看出，储藏温度对混合菌株的生长/非生长界线影响较大。当储藏温度为 15 $^\circ\text{C}$ ， $\text{pH} < 6$ 时，混合菌株在任何水分活度下都不生长，当温度升至 20 $^\circ\text{C}$ ，则 $\text{pH} < 5.5$ 。当温度为 30 $^\circ\text{C}$ 时， $A_w > 0.95$ 时，其生长概率大于 0.9，不利于对蜡样芽孢杆菌的控制。从图中也可以看出，温度越低，越有利于抑制蜡样芽孢杆菌的生长，一些蜡样芽孢杆菌的菌株可以在低于 10 $^\circ\text{C}$ 以下的温度生长^[4]。

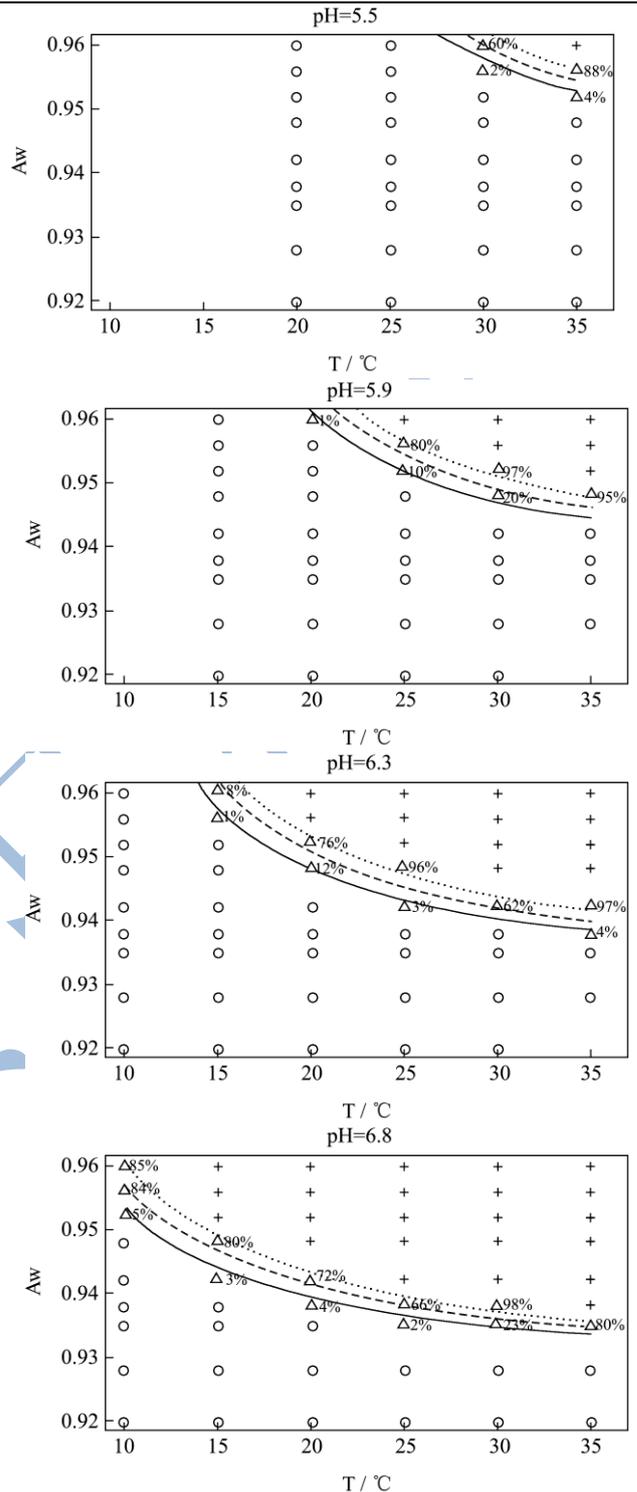


图 2 pH 分别为 5.5、5.9、6.3 和 6.8 时菌株 CCL1、CCL2 和 CCL3 混合菌株在 $p=0.1$ 、0.5、0.9 时的生长/非生长界线图

Fig.2 Growth/no growth boundaries at pH values of 5.5, 5.9, 6.3, and 6.8 for predicted growth probability of the *B. cereus* cocktail by using the logistic regression model at probability values of 0.1, 0.5, and 0.9. Growth: $p = 1$; transition zone: $0 < p < 1$; no growth: $p = 0$

注: $p=0.1(-)$ 、 $0.5(-)$ 、 $0.9(\dots)$; $p=0(\blacksquare)$ 、 $p \in [0,1](\Delta)$ 、 $p=1(+)$ 。

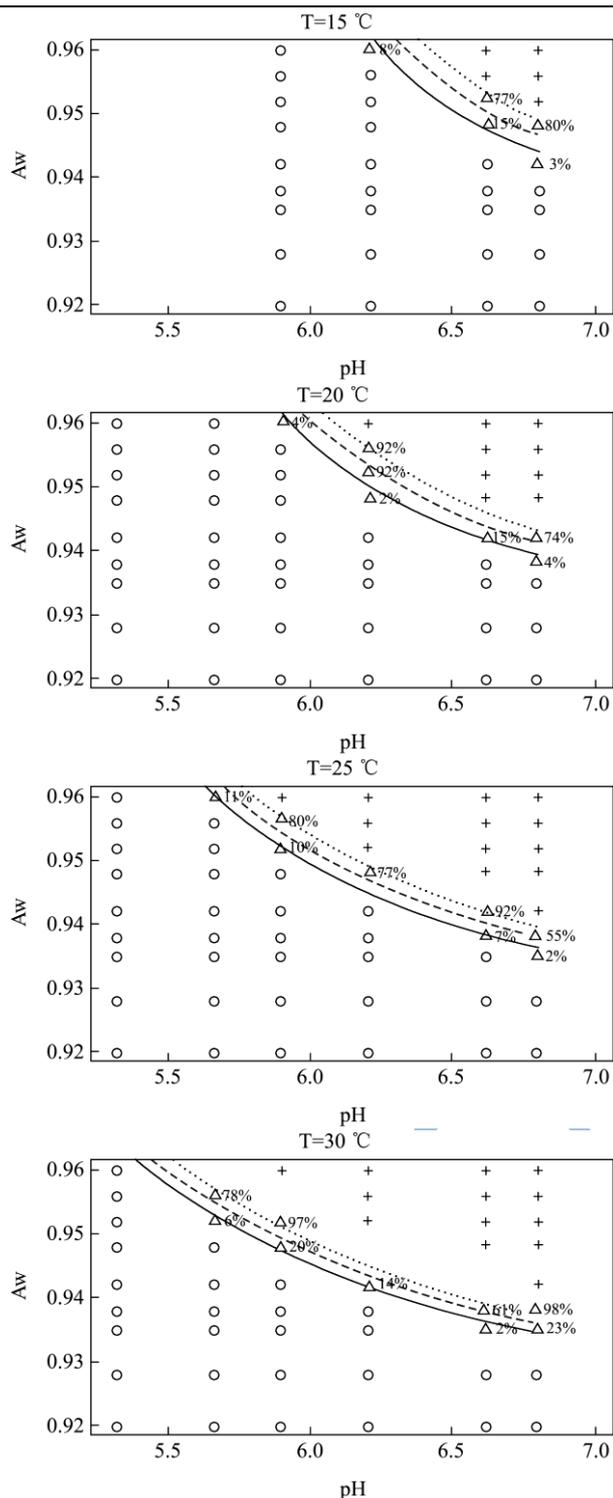


图3 T分别为15、20、25和30℃时菌株CCL1、CCL2和CCL3混合菌株在p=0.1、0.5、0.9时的生长/非生长界线图

Fig.3 Growth/no growth boundaries at temperatures of 10 °C, 20 °C, 25 °C, and 30 °C for predicted growth probability of the *B. cereus* cocktail containing strains CCL1, CCL2, and CCL3 by using the logistic regression model at probability values of 0.1, 0.5, and 0.9. Growth: $p = 1$; transition zone: $0 < p < 1$; no growth: $p = 0$

注: $p=0.1(-)$ 、 $0.5(-)$ 、 $0.9(\dots)$; $p=0(\square)$ 、 $p \in [0,1](\Delta)$ 、 $p=1(+)$ 。
 本文没有选取 10 °C 以下的温度作为研究, 因为

在实际生产中, 储藏温度较低, 会增加其产品的成本, 同时 10 °C, 蜡样芽孢杆菌生长较不稳定, 很容易影响模型拟合结果, 因此适当地提高其储藏温度, 并与水分活度和 pH 值的协同作用来抑制微生物的生长不仅可以得到较好的模型, 同时也可以减少其能耗的损失。蜡样芽孢杆菌在生长概率为 0.5 的情况下, 其部分预测储藏温度的值见表 3。

表 3 $p=0.5$ 时部分最低温度预测值结果

Table 3 A few predicted values of temperature at $p = 0.5$

A_w	pH	预测 T 值
0.948	5.9	31.56
	6.21	23.75
	6.62	16.42
	6.80	13.92
0.956	5.9	23.98
	6.21	18.41
	6.62	12.53
0.96	6.80	10.36
	5.9	21.89
	6.21	16.82
	6.62	11.28
	6.80	9.18

从表 3 中可以看出, 当产品的水分活度为 0.956, pH 值为 6.21 时, 其储藏温度预测值为 18.41 °C, 由于选取的生长概率为 $p=0.5$, 即生长和非生长事件为等概率事件, 令 $T < 18.41$ °C 时, 可以获得 $A_w=0.956$, pH=6.21 条件下, $p < 0.5$ 的生长概率事件。类似地, 预测 pH 值和预测 A_w 也可以通过此方法求出。本文中只选取了 $p=0.5$ 时的情况, 在实际生产中, 食品研发者也可以根据其相应的企业标准或者国家标准, 选择更为严格的条件, 例如令 $p < 0.01$ 等以获得相应的环境因子预测值, 制定出更为安全的栅栏因子条件。

2.3 与其它研究的对比

选取已发表文献中 30 个数据作为测试集, 测试集的观察值和通过运用生长/非生长模型得到的预测值见表 4。测试集也选取了部分以特定食品为基质的实验数据。同时表 4 中也包含了实验的观察时间和其它的附加条件, 例如 Lanciotti 等人^[5]除了选取温度, 水分活度和 pH 之外, 还通过添加酒精这一因子来研究蜡样芽孢杆菌生长/非生长情况; 而这些条件对模型的预测结果有着很大的影响。同时实验以 $p=0.5$ 作为预测的分界线, 如果 $p < 0.5$, 则蜡样芽孢杆菌被判定为不生长; $p > 0.5$ 时, 则蜡样芽孢杆菌被判定为生长。在实际生产或需要时, 也可以重新划定生长/非生长的

界限。例如, 食品企业为了制定更为安全的食品配方时, 可以选取 $p=0.01$, 或者更低值。

表 4 与已发表数据的对比结果

Table 4 Results of comparison with the literature

作者	T/°C	pH	A _w	生长情况	观察时间/h	实验基质	附加条件	生长情况(预测)
Lanciotti ^[5] et al	32.5	6.5	0.96	是	48	BHI 肉汤	1.5%(V/V)酒精	是(1.00)
Lanciotti et al	25	5	0.97	否	48	BHI 肉汤	1%(V/V)酒精	否(0.02)
Lanciotti et al	25	6	0.97	否	48	BHI 肉汤	1%(V/V)酒精	是(0.86)
Lanciotti et al	17.5	6.5	0.98	是	48	BHI 肉汤	1%(V/V)酒精	是(1.00)
Lanciotti et al	25	6	0.99	是	48	BHI 肉汤	1%(V/V)酒精	是(1.00)
Little ^[14] et al	20	6.8	0.978	是	<50	布里干酪	2%NaCl	是(1.00)
Mahakarnchanakul ^[15] et al	10	6.1	0.996	是	<200	鸡肉汁	0.7% NaCl	是(1.00)
Mahakarnchanakul et al	10	5.8	0.977	否	<200	鸡肉汁	4% NaCl	否(0.00)
Mahakarnchanakul et al	10	6	0.989	是	<200	鸡肉汁	2% NaCl	是(1.00)
Mahakarnchanakul et al	30	6.1	0.996	是	<200	鸡肉汁	0.7% NaCl	是(1.00)
Mahakarnchanakul et al	30	6	0.989	是	<200	鸡肉汁	2% NaCl	是(1.00)
Mahakarnchanakul et al	30	5.8	0.977	是	<200	鸡肉汁	4% NaCl	是(1.00)
Benedict ^[4] et al	12	6.8	0.992	是	<50	肉汤培养基	1.5% NaCl	是(1.00)
Benedict et al	19	6	0.986	是	<50	肉汤培养基	2.5% NaCl	是(1.00)
Benedict et al	12	5.25	0.992	否	750	肉汤培养基	1.5% NaCl	否(0.02)
Benedict et al	28	5.25	0.98	否	750	肉汤培养基	0.5%	否(0.18)
Chorin ^[3] et al	10	5	0.987	否	-	BHI 肉汤培养基	7%(V/V)甘油	否(0.00)
Chorin et al	20	5.5	0.95	否	-	BHI 肉汤培养基	21%(V/V)甘油	否(0.00)
Chorin et al	30	5.5	0.975	是	-	BHI 肉汤培养基	14%(V/V)甘油	是(0.64)
Chorin et al	20	5	0.991	否	-	BHI 肉汤培养基	无	否(0.06)
Chorin et al	30	5	0.975	否	-	BHI 肉汤培养基	无	否(0.00)
Raeuori ^[16] et al	23	6.6	0.957	是	<50	大米糕点	7%NaCl	否(0.00)
FSA-CCFRA ^a	15	4.8	0.977	否	<1000	肉汤培养基	4% NaCl	否(0.00)
FSA-CCFRA	15	5.5	0.989	否	696	肉汤培养基	2% NaCl	否(0.23)
FSA-CCFRA	20	6	0.989	否	720	肉汤培养基	2% NaCl	是(1.00)
FSA-FMBRA ^b	22	6.5	0.972	是	142.5	香肠	-	是(0.94)
FSA-FMBRA	16	6.5	0.972	是	142.5	香肠	-	否(0.02)
Asplund ^[17]	15	6	0.991	是	<1000	香肠	1.7%NaCl	是(1.00)
FSA-FMBRA	22	5.1	0.983	否	720	奶油燕麦粥	-	否(0.03)
FSA-FMBRA	28	5	0.983	否	244	奶油冻	-	是(0.95)

注: a: 汉普登乔利伍德食品研究协会英国, b: 食品标准代理机构(汉普登乔利伍德食品研究协会)英国。

对测试集的预测结果和真实值之间的比较分析结果主要通过统计预测的准确率来测试模型的实用度。从表中可以明显地看出, 以纯培养为基质时, 模型预测蜡样芽孢杆菌生长的准确率达到 100% (6/6); 11 个不生长事件中, 模型能预测出 9 个, 错误判断事件为 2 个, 分别是蜡样芽孢杆菌生长在 T=25 °C, pH=6, Aw=0.97, 酒精含量为 1% (V/V) 的 BHI 肉汤中和在 T=22 °C, pH=6, Aw=0.989 的肉汤培养基中。从这两个条件来看, 很有可能是观察时间和水分活度

的调节剂(例如运用 NaCl 来调节水分活度)不一样所导致的。例如 Lanciotti 等人^[5]选取的观察时间为 48 h, 而在本实验中, 选取的时间为 30 d, 很有可能 48 h 内, 蜡样芽孢杆菌仍处在生长延滞期阶段。另外训练集也选取了部分以特定食品为基质的实验数据。从表中可以看出, 对产品为基质的实验数据预测效果良好, 但是预测准确度没有在纯培养基中高, 因为实际产品的环境比纯培养复杂得多, 而且在实际产品中, 蜡样芽孢杆菌需要和其他微生物一起竞争生长, 同时调节

食品 pH 所添加的不同种有机酸类有别于实验中的无机酸, 真空包装所创造的无氧环境等也会使得模型对产品的预测准确下降^[13]。因此进一步建立以食品为基质的生长/非生长模型对食品企业的生产指导才具有更为实用的价值。

3 结论

3.1 本文选取五株菌株的混合菌株来进行实验, 菌株的鸡尾酒法目前很流行^[7], 用混合菌株建立的模型更具有准确性和代表性。由于其中的耐受菌株的存在, 混合菌株能够获得较宽泛的生长/非生长区域。同时也能减少因多次对单个菌株的研究而进行的实验重复次数和资源能耗。本文选用了 logistic 回归模型, 它是描述平缓生长/非生长转换区域最常用的方法。而微生物生长与不生长之间存在平缓转换区域的可能性已经被证实^[18]。该模型的表达方程为自变量的多项式, 由于多项式模型为直线型的, 因此它能包含几乎所有影响微生物生长的环境因子和它们之间的交互作用^[19]。但是同时也可能会出现过度拟合的结果, 因此后期的数据选择和模型的验证显得尤为重要。

3.2 从界面图中可以很明显的看出不同生长温度、pH 值和水分活度的协同作用对蜡样芽孢杆菌的生长/非生长界线的影响较大, 通过适当降低生长温度、培养基的水分活度和 pH 可以有效地抑制蜡样芽孢杆菌的生长。等概率图很直观地描述了不同环境因子之间的交互作用对蜡样芽孢杆菌生长概率的影响。随着温度的降低, 生长/非生长转换区域在缩小, 例如当 $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, pH 和水分活度发生较小变化时, 便会会对蜡样芽孢杆菌的生长概率造成极大的影响。当水分活度较低时, 蜡样芽孢杆菌只能在最适生长温度和 pH 7.0~7.5 之间生长。当 $\text{pH}=4.5$ 、 $T\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 蜡样芽孢杆菌在任何温度下都不生长。从模型拟合优度检验的结果来看, 训练集的一致率为 99.1%; 验证集的一致率为 98.81%, 假阳性率为 0%, 假阴性率为 1.19%, 训练集的一致率和验证集的一致率相接近, 数据的划分较为合理, 而同时训练集和验证集的假阳性率和假阴性率都较低, 说明模型的预测精度较高, 模型的 R^2 -Nagelkerke 值也较高, 为 0.949, Hosmer-Lemeshow 检验中的 $\chi^2=0.012$, $P=1$, 说明用 logistic 回归模型拟合蜡样芽孢杆菌生长/非生长实验数据, 拟合度较高。运用模型对已发表文献的数据进行预测, 得到了较高的预测准确度, 因此可以用来预测一定范围内蜡样芽孢杆菌的生长情况。但是由于测试集的生长环境条件与实验中所建模型不完全一致, 因此预测结果只能提供有限参考。生长/非生长界面模型能给出微生物不生长情况, 通过得到

抑制微生物生长的环境因子组合可以有效地防止微生物对产品的污染。本文中建立的 logistic 回归模型可以给出合理的抑制蜡样芽孢杆菌生长的环境因子条件范围, 对于有潜在蜡样芽孢杆菌污染的产品来说, 这为加强产品的栅栏因子, 优化工艺条件以提高其安全度提供了重要的参考。但是由于试验中采用的基质是 BHI 液体培养基, 相对于实际产品来说, 条件较为苛刻, 而实际产品更利于微生物的生长, 同时由于各企业的标准不一样, 因此划定生长/非生长的界线标准也与本文中 ($p=0.5$) 不一样, 这样也会导致生长/非生长界面模型的差异。因此需要进一步以实际产品为基质, 研究蜡样芽孢杆菌的生长情况并建立特定产品的生长/非生长界面模型。

参考文献

- [1] Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, et al. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 150(1): 34-41
- [2] Cronin U P, Wilkinson M G. The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse [J]. Food Control, 2009, 20(9): 822-828
- [3] Chorin E, Thuault D, Clret J J, et al. Modelling *Bacillus cereus* growth [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 38(2): 229-234
- [4] Benedict R, Partridge T, Wells D, et al. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics [J]. Journal of food protection, 1993, 56(3):211-214
- [5] Lanciotti R, Sinigaglia M, Gardini F, et al. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration[J]. Food microbiology, 2001, 18(6): 659-668
- [6] Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk Profile: *Bacillus spp.* in Rice [R]. Institute of Environmental Science and Research Limited, Christchurch. 2004
- [7] Valero A, Hervas C, Garcia-Gimeno R M, et al. Product unit neural network models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Microbiology, 2007, 24(5): 452-464
- [8] Skandamis P, Stopforth J, Kendall P, 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
- [9] 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): 186-194
- [10] Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 14: Logistic regression [J]. Crit Care, 2005, 9(1): 112-118
- [11] Nagelkerke N J. A note on a general definition of the coefficient of determination [J]. Biometrika, 1991, 78(3): 691-692
- [12] 李贤良,杨宪时,郭全友,等.水分活度及pH值对高水分烤虾品质和贮藏性的影响[J].安徽农业科学,2009,37(24): 11709-11711
LI Xian-liang, YANG Xian-shi, GUO Quan-you, et al. Effects of water activity and pH value on quality and storage property of baked penaeus vannamei with high moisture[J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2009, 37(24): 11709-11711
- [13] Hwang C A, Tamolin M L. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102(3): 277-285
- [14] Little C, Knöchel S. Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8 and 20 °C [J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 24(1): 137-145
- [15] Mahakarnchanakul W, Beuchat L R. Influence of temperature shifts on survival, growth, and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 47(3): 179-187
- [16] Raevuori M. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on growth of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in rice filling of Karelian pasty [J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1976, 2(3): 205-213
- [17] Asplund K, Nurmi E, Hill P, et al. The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage [J]. International Journal of Food Microbiology, 1988, 7(4): 349-52
- [18] Membr J M, Lambert R J. Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 128(1): 10-15
- [19] Ross T, Dalgaard P. Secondary models [J]. Modeling Microbial Responses in Food, 2004: 63-150