

酱鸭中优势背景菌群对金黄色葡萄球菌生长影响的预测模拟

张子叶¹, 闫晓彤¹, 王晔茹², 丁甜³, 王军⁴, 王翔⁵,
董庆利⁵, 方婷¹, 李长城^{1*}

¹福建农林大学食品科学学院 福州 350002

²国家食品安全风险评估中心 北京 100022

³浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310030

⁴青岛农业大学食品科学与工程学院 山东青岛 266109

⁵上海理工大学健康科学与工程学院 上海 200093

摘要 为研究酱鸭中优势背景菌群对金黄色葡萄球菌生长的影响,构建和验证相关生长预测模型,将金黄色葡萄球菌单独接种或与优势背景菌群混合接种至已灭菌的酱鸭样品中,置于不同恒定温度(10,12,16,20,25,30℃)条件下培养,开展非竞争和竞争生长试验。采用一步法分析非竞争生长和竞争生长数据,同步构建初级模型(非竞争生长模型和竞争生长模型)和二级模型,并通过另设的恒定温度生长试验对模型进行验证。结果表明,一步法适用于酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群的生长分析,模型估计的非竞争状态下金黄色葡萄球菌的最低生长温度为 9.28℃,最大生长浓度为 9.39 lg(CFU/g)。与非竞争生长相比,竞争状态下金黄色葡萄球菌的迟滞期略长,最大比生长速率无显著差异;然而,当背景菌群的生长进入稳定期后,金黄色葡萄球菌的生长速率显著降低,表现出抑制效应($\alpha = 0.556$),模型估计的金黄色葡萄球菌的最低生长温度为 9.40℃,背景菌群的最大生长浓度为 9.93 lg(CFU/g)。验证试验表明:构建的模型能准确描述酱鸭中金黄色葡萄球菌及背景菌群的生长。本研究结果可为酱鸭中金黄色葡萄球菌的定量风险评估和货架期预测提供参考。

关键词 酱鸭;金黄色葡萄球菌;背景菌群;竞争模型;一步法

文章编号 1009-7848(2022)04-0243-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.04.024

酱鸭,味道鲜美,营养丰富,是我国传统的熟制禽肉食品之一。长期以来,酱鸭制品的加工和零售贮存方式相对粗放,仅有少数商超配以低温冷藏销售。在大量的前店后坊式卤味店中,产品通常暴露于常温环境下,直接现斩售卖,极易受到微生物的污染^[1]。作为熟制禽肉制品,为了避免口感发柴,酱鸭产品通常不经过再次加热烹煮或其它消毒措施处理而被直接食用,这使得食用该类食品存在一定的感染食源性致病菌的风险。研究表明^[2-4],在我国,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是危害熟肉制品安全的常见病原菌之一,其中熟制鸭肉制品中,金黄色葡萄球菌的检出率为 8.11%。金黄色葡萄球菌所产生的肠毒素是引起该类食物中毒的主要原因^[5],食用被金黄色葡萄球菌污染的食品可引起恶心、呕吐、腹泻等症

状^[6-7]。研究酱鸭制品中金黄色葡萄球菌的生长规律对完善该类食品中金黄色葡萄球菌的安全风险评估,保障其食用安全性具有重要意义。

预测微生物学模型以数学和计算机语言为基础,描述食品中微生物的生长、失活规律,是微生物定量风险评估的基础^[8-9]。目前,国内外已有关于生鲜猪肉^[10-11]、广式腊肠^[12]、烤鸭^[13]、牛奶^[14]等畜禽产品中金黄色葡萄球菌生长预测模型的研究,而未见有关酱鸭制品中预测微生物学模型报道,且上述文献中关于金黄色葡萄球菌的生长预测建模均未考虑食品基质中背景微生物对其生长的影响。文献研究表明,食品中微生物的生长除受环境因子(温度、水分活度、pH 值)的影响外,还可能受其它种类微生物的制约^[15-17],构建基于菌间竞争效应的相互作用模型可以更准确地描述目标微生物的生长。另外,从数值分析的角度,上述文献中金黄色葡萄球菌模型的构建均基于传统的两步法,相比于该领域近年来提出的一步法,其累积误差更大^[18]。使用一步法建模,将可缩小累积误差,提

收稿日期: 2021-04-23

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2021J01112)

作者简介: 张子叶(1995—),女,硕士生

通信作者: 李长城 E-mail: changcheng_li@fafu.edu.cn

高模型准确度^[19]。

本研究拟研究酱鸭中金黄色葡萄球菌单独生长或与背景菌群共同存在时的生长特性,采用一步法构建酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群的生长预测模型,旨在为有效监控以酱鸭为代表的熟肉制品中金黄色葡萄球菌的风险评估提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

酱鸭,福州山姆会员超市。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)菌株(CI-CC10786、CICC10787),中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。

利福平(Rifampin, Rif),北京索莱宝科技有限公司;胰酪大豆胨琼脂培养基(Tryptose soya agar medium, TSA)、脑-心浸出液肉汤(Brain heart infusion broth, BHI),广东环凯微生物科技有限公司;蛋白胨粉,杭州微生物试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Bag Mixer-400 均质拍打器,法国 Interscience 公司;H-1850R 高速冷冻离心机,湖南相仪实验室仪器有限公司;SHP-250 细菌生化培养箱、LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海精宏实验设备有限公司;AIRTECH 生物安全柜,苏州安泰空气技术有限公司;KB115 低温恒温箱,德国 BINDER 公司;Whirl-Pak-207 mL 无菌均质袋,美国 Nasco 公司;VORTEX-5 漩涡混合器,上海习仁科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌培养与接种菌液的制备 参照 Fang 等^[20]的方法,使用利福平逐步诱导金黄色葡萄球菌,获得对利福平耐受质量浓度为 100 mg/L 的抗性菌株,并划线于利福平添加质量浓度为 100 mg/L 的 TSA 平板(TSA/R)培养,再于 8 ℃ 保存。每次试验前,挑取 2 株金黄色葡萄球菌的单菌落,分别转移至 10 mL 利福平添加质量浓度为 100 mg/L 的 BHI 中,于 37 ℃ 培养 18~20 h。菌液于 4 ℃ 条件下 5 000 r/min 离心 15 min,去掉上清液,菌体经无菌蛋白胨水(质量分数 0.1%)清洗 2 次后,分别悬浮于 5 mL 蛋白胨水中。将 2 株金黄色葡萄球菌悬浮液按 1:1 的体积比混合,梯度稀

释至~4.5 lg(CFU/mL),备用。

1.3.2 背景菌株分离及接种菌液的制备 在无菌条件下,称取(5±0.05)g 酱鸭样品置于均质袋中,加入 20 mL 0.1%蛋白胨水,于均质拍打器中正、反两面各拍打 2 min,均质液经梯度稀释后涂布于 TSA 平板上,并于 37 ℃ 培养 18~24 h。从 TSA 平板上挑取不同形态的典型菌落,经连续分离纯化后获得 3 株优势背景菌株(编号 BG-1、BG-2、BG-3)。背景菌株经 TSA 平板划线后保存于 8 ℃ 培养箱。每次试验前,挑取单菌落接种至 10 mL BHI 溶液中,37 ℃ 培养 18~20 h,菌液于 4 ℃ 条件下离心(5 000 r/min)15 min,菌体再经无菌蛋白胨水(0.1%)清洗 2 次后,分别悬浮于 5 mL 蛋白胨水中。3 株背景菌液等量混合后,梯度稀释至~5.5 lg(CFU/mL),备用。

1.3.3 样品接种 将酱鸭去皮、去骨,抽真空(2 kPa)包装,并于 115 ℃ 杀菌 15 min,以消除样品中的背景菌群。冷却后在无菌环境下将其切分,称取(5±0.05)g 若干份样品,装入无菌均质袋中。将称取的样品分为两大组,其中一组样品单独接种上述已制备的金黄色葡萄球菌悬浮液(0.1 mL),另一组样品混合接种上述已制备的金黄色葡萄球菌和背景菌群悬浮液(各 0.1 mL)。两组接种方式样品中,金黄色葡萄球菌的浓度均约 10^{2.5}~10^{3.0} CFU/g,混合接种的样品中背景菌群的浓度约 10^{3.5}~10^{4.0} CFU/g。

1.3.4 生长实验与取样计数 将接种后的样品分别置于 10,12,16,20,25,30 ℃ 的恒温培养箱中培养,按预设时间间隔取样,以测定其生长浓度。取样时,向样品袋中加入 20 mL 无菌蛋白胨水,并置于均质拍打器中正、反两面各拍打 2 min。根据实际情况,将均质液经梯度稀释,并吸取合适稀释度下的均质液 0.1 mL 或 1 mL 涂布于 TSA/R^[20]培养基或 TSA 培养基,其中,TSA/R 平板用于测定金黄色葡萄球菌菌落数,TSA 平板用于测定背景菌菌落数。将涂布后的平板置于 37 ℃ 条件下培养,24 h 后计数,单位为 lg(CFU/g)或 ln(CFU/g)。所有生长试验均至少独立重复 2 次。

1.4 生长模型

1.4.1 酱鸭中金黄色葡萄球菌的非竞争生长 金黄色葡萄球菌接种至灭菌的酱鸭样品单独培养

时,因不受其它微生物的影响,其生长行为可用式(1)所示的微分方程进行描述,式(1)即 Huang 模型^[21],可用于包含迟滞期、对数期和稳定期的微生物生长描述。

$$\frac{dY}{dt} = \frac{1}{1+\exp[-4(t-\lambda)]} \mu_{\max}[1-\exp(Y-Y_{\max})] \quad (1)$$

式中, Y 、 Y_{\max} —— t 时刻和稳定期的细菌浓度, $\ln(\text{CFU/g})$; μ_{\max} ——细菌最大比生长速率(h^{-1}); λ ——迟滞期(h)。

温度对酱鸭中金黄色葡萄球菌最大比生长速率的影响可用 Huang Square-Root(HSR)模型^[22]予以描述,其表达式如式(2)所示;最大比生长速率与迟滞期的关系可用式(3)表示。

$$\sqrt{\mu_{\max}} = a(T-T_{\min})^{0.75} \quad (2)$$

$$\lambda = A \times \mu_{\max}^{-m} \quad (3)$$

式中, T ——环境温度($^{\circ}\text{C}$); T_{\min} ——细菌的最低生长温度($^{\circ}\text{C}$); a 、 A 和 m ——回归系数。

1.4.2 酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群的竞争生长 当背景菌群与金黄色葡萄球菌混合接种于酱鸭样品共同生长时,由于前者本身是酱鸭样品中的优势分离菌株,一般更能适应样品的环境条件。另外,前者的初始浓度高于后者的初始浓度,由生长数据的直观体现可知,酱鸭样品中金黄色葡萄球菌与背景菌群共同生长时,未能完全表现其生长潜力,可能受到背景菌群的抑制作用。因此,本文假设酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长受到背景菌群的单向抑制,其生长规律可由式(4)(根据 Lotka-Volterra(LV)方程演化而来)表示^[23-24];另外,背景菌群的生长受金黄色葡萄球菌的影响很小,忽略竞争效应和迟滞期,其生长规律可由式(5)表示。

$$\frac{dY_S}{dt} = \frac{1}{1+\exp[-4(t-\lambda_S)]} \mu_{\max,S} \left(1 - \frac{\exp(Y_S) + \alpha \exp(Y_B)}{\exp(Y_{\max})} \right) \quad (4)$$

$$\frac{dY_B}{dt} = \mu_{\max,B} \left(1 - \frac{\exp(Y_B)}{\exp(Y_{\max})} \right) \quad (5)$$

式中, S 和 B ——金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和背景菌群(Background microflora); Y 、 λ 、 μ_{\max} 与式(1)相同; Y_{\max} ——酱鸭样品的最大载菌量, $\ln(\text{CFU/g})$ 。式(4)中的 $\alpha \exp(Y_B)$ 一项代表背景菌

群对金黄色葡萄球菌的抑制效应, α ——抑制系数。

竞争生长中,温度对金黄色葡萄球菌和背景菌群生长速率的影响仍可由 HSR 模型来描述,分别如式(6)、式(7)所示。

$$\sqrt{\mu_{\max,S}} = a_S (T - T_{\min,S})^{0.75} \quad (6)$$

$$\sqrt{\mu_{\max,B}} = a_B (T - T_{\min,B})^{0.75} \quad (7)$$

式中,下标 S 和 B ——金黄色葡萄球菌和背景菌群; T_{\min} 和 a 与式(2)相同。

1.5 数据处理与分析

将 2 次独立试验下,不同恒定温度对应的试验数据合并成数据集 $\{Y\}$,通过一步法^[18,24]估计细菌的生长动力学参数。若将初级模型和二级模型中待求的参数和系数记为 $\{P\}$,则酱鸭中金黄色葡萄球菌单独接种生长时, $\{P\}=\{a, T_{\min}, A, m, Y_{\max}\}$;金黄色葡萄球菌和背景菌群混合接种生长时, $\{P\}=\{a_S, a_B, T_{\min}, T_{\min,B}, A, m, Y_{\max}, \alpha\}$ 。本研究数值分析过程通过 MATLAB 2018 软件编程来实现,分析过程中,采用四阶龙格-库塔法求解微分方程(1)或(4)、(5),获得细菌生长浓度的预测值 $\{\hat{Y}\}$,再结合最小二乘法求解预测值 $\{\hat{Y}\}$ 与实测值 $\{Y\}$ 之间的最小残差平方和(RSS)^[25],其表达式如式(8),式中, n ——总观察值的数量。当 RSS 最小时,对应的 $\{P\}$ 即为所求。

$$\text{RSS} = \sum_1^n (Y - \hat{Y})^2 \quad (8)$$

1.6 模型验证

通过另设不同温度条件下的生长试验,对模型和参数进行验证,采用均方根误差(RMSE)衡量预测值与观测值之间的差异,其表达式如式(9)。式中, n ——观测值总数; p ——模型中参数数量。

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\text{RSS}}{n-p}} \quad (9)$$

2 结果与分析

2.1 动力学参数估计与模型构建

2.1.1 金黄色葡萄球菌单独接种至酱鸭中的非竞争生长 本研究将金黄色葡萄球菌单独接种至已灭菌处理的酱鸭样品中,以考察其不受背景菌群干扰时的生长状况。试验时,酱鸭样品中金黄色葡

萄球菌的初始接种浓度约为 $2.5\sim 3.0 \lg(\text{CFU}/\text{g})$ 。10℃贮藏时,在观测时间内(288 h),酱鸭样品中金黄色葡萄球菌的数量未见有显著增长(图1中未显示)。在12,16,20,25,30℃贮藏时,酱鸭样品中金黄色葡萄球菌的生长良好,总体呈S型增长趋势;在观测时间内,除12℃贮藏条件下的最大

生长浓度偏低以外,其余温度对应的生长曲线均包含滞后期、对数期及稳定期3个阶段(图1)。因此,本研究仅将12,16,20,25,30℃条件下酱鸭样品中金黄色葡萄球菌的生长数据合并,再开展建模分析。

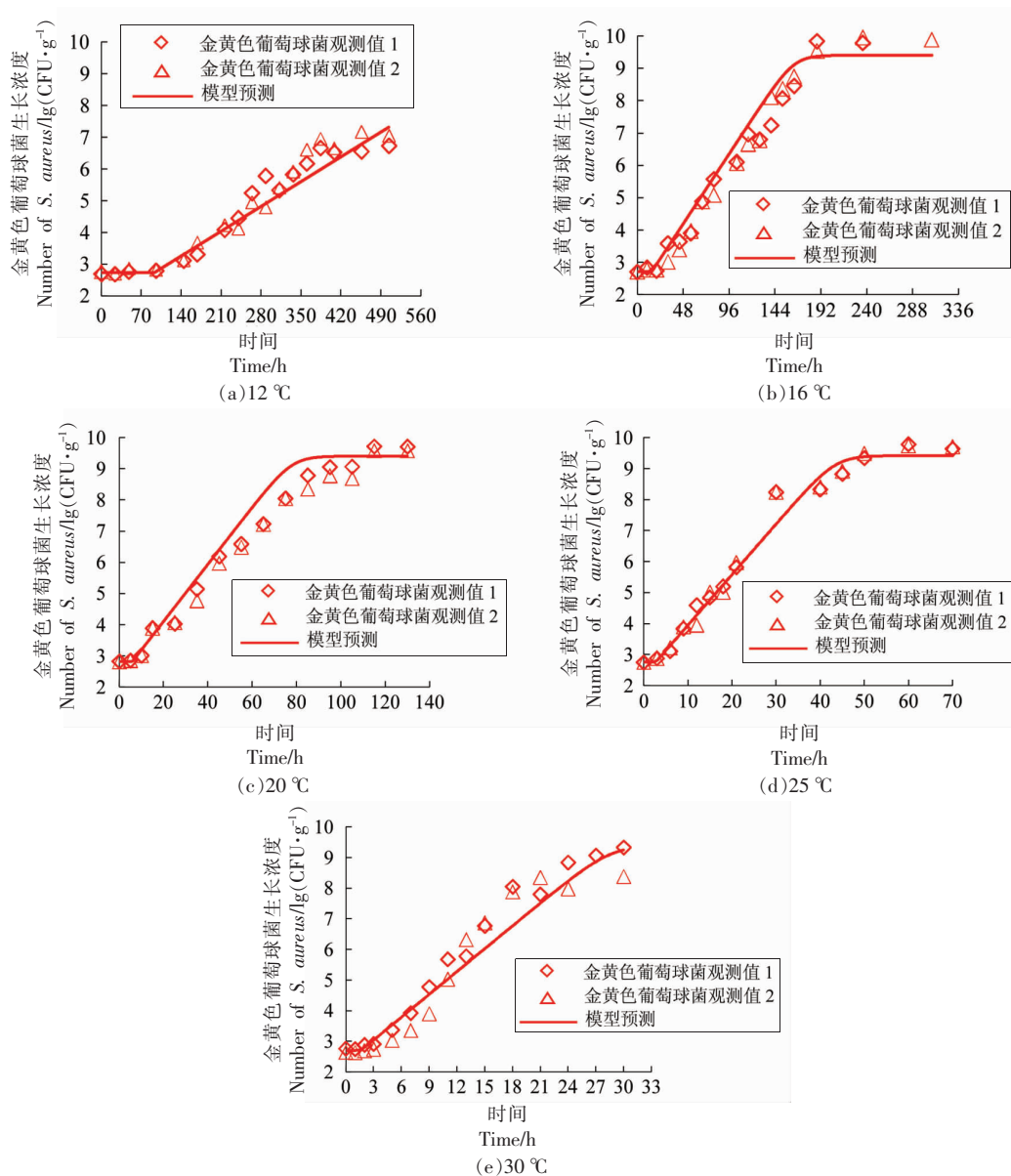


图1 酱鸭中金黄色葡萄球菌生长曲线一步法拟合分析

Fig.1 One-step analysis of growth curves of *S. aureus* in sauced duck

通过一步法对12~30℃条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长数据(共计151个数据点)进行分析,构建包含初级模型(Huang模型)和二级模型

(HSR模型)的组合模型,求解最低生长温度、最大生长浓度、二级模型系数等参数,即 $\{P\}=\{a, T_{\min}, A, m, Y_{\max}\}$,其结果如表1所示。

表 1 酱鸭中金黄色葡萄球菌非竞争生长一步法分析结果
Table 1 One-step analysis of non-competitive growth of *S. aureus* in sauced duck

参数	估计值	标准差	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	95%置信区间	
					上区间	下区间
<i>a</i>	0.076	0.002	45.631	2.695×10^{-88}	0.073	0.080
T_{\min}	9.28	0.167	55.592	3.907×10^{-100}	8.952	9.612
<i>A</i>	0.824	0.313	2.631	9.421×10^{-3}	0.205	1.320
<i>m</i>	1.301	0.141	9.204	3.350×10^{-16}	1.022	1.580
Y_{\max}	21.63*	0.265	81.528	1.207×10^{-123}	21.109	22.158
数据点=151			自由度=146		RMSE=0.47	

注:*. 21.63 ln(CFU/g)= 9.39 lg(CFU/g)。

由表 1 可知,构建的 Huang-HSR 模型的均方根误差(RMSE)为 0.47 lg(CFU/g),5 个生长参数的估计值均达到显著水平($P < 0.05$)。通过一步法估计酱鸭中金黄色葡萄球菌的最大生长浓度为 21.63 ln(CFU/g),或 9.39 lg(CFU/g),最低生长温度为 9.28 °C,其 95%置信区间为 [8.95 °C, 9.61 °C]。酱鸭中金黄色葡萄球菌最低生长温度的估计值及其置信区间的上限均略低于 10 °C,然而这并不与前述提及的 10 °C 贮藏条件下,金黄色葡萄球菌的数量未见显著增长的现象相矛盾。本研究中,10 °C 条件下的测试时长(288 h)相对较短,而将 *a*、*A* 和 *m* 的估计值(0.076, 0.824 和 1.301)代入式(2)、式(3)可计算得 10 °C 对应的迟滞期约为 2 000 h,或 83 d,这远大于酱鸭产品的货架期,因此,可以认为 10 °C 条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌不能正常生长。邹彦桐^[12]、宇盛好等^[13]、张微等^[1]分别研究了广式烧腊、烤鸭和盐水牛肉中金黄色葡萄球菌的生长规律,其研究表明,10 °C 贮藏条件下,金黄色葡萄球菌仍能生长,这可能与食品基质不同有关,本研究所用的酱鸭样品在卤制加工过程中吸收的辛香料或其它添加成分可能对金黄色葡萄球菌的生长具有抑制作用。将一步法求解的参数{*P*}代入式(1)、式(3),可正向计算出各试验温度条件下酱鸭样品中金黄色葡萄球菌生长的预测曲线(图 1),由图 1 可知,模型预测值与试验观测值相近,说明所构建的 Huang-HSR 模型能够较准确地描述酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长。

2.1.2 金黄色葡萄球菌与背景菌群混合接种至酱鸭中的竞争生长 将金黄色葡萄球菌与分离的优势背景菌群混合接种至无菌酱鸭中,以考察两者

之间的竞争效应。不同培养温度(12~30 °C)条件下,两者的生长曲线如图 2 所示。混合接种生长试验中,金黄色葡萄球菌和背景菌群的初始浓度分别为 2.5~3.0 lg(CFU/g)和 3.5~4.0 lg(CFU/g)。由图 2 可知,各温度条件下,样品中背景菌群生长良好,且与金黄色葡萄球菌相比,背景菌群的迟滞期不明显或可忽略不计,接种后即可快速进入对数生长期,当其生长浓度达到约 10 lg(CFU/g)时,进入稳定期,这表明背景菌群更能适应酱鸭样品的环境,其生长受金黄色葡萄球菌的影响较小。同时,如图 2 所示,金黄色葡萄球菌的生长曲线具有显著的迟滞期,且通过图形的直观对比可知,进入对数生长期之后,其生长速率均不同程度地小于背景菌群的生长速率,其生长浓度也始终低于背景菌群的生长浓度;当背景菌群的生长进入稳定期后,金黄色葡萄球菌的生长速率显著降低,其数量随着时间的延长而缓慢增长。因此,在混合接种的酱鸭样品中,金黄色葡萄球菌的生长受到背景菌群的抑制,且两者之间的竞争关系主要表现为后者对前者的单向抑制。

通过一步法对酱鸭中金黄色葡萄球菌和背景菌群的竞争生长数据(共计 308 个数据点)进行分析,构建包含竞争模型和二级模型的组合模型,求解最大生长浓度、最低生长温度、二级模型系数和抑制效应系数等参数,即 {*P*}={*a_S*, *a_B*, T_{\min} , $T_{\min,B}$, *A*, *m*, Y_{\max} , α },其结果如表 2 所示。由表 2 可知,构建的 LV-HSR 模型均方根误差(RMSE)为 0.51 lg(CFU/g),8 个参数的估计值均达到显著水平($P < 0.05$)。通过一步法估计的金黄色葡萄球菌和背景菌群的最低生长温度分别为 9.40 °C 和 7.80 °C,其

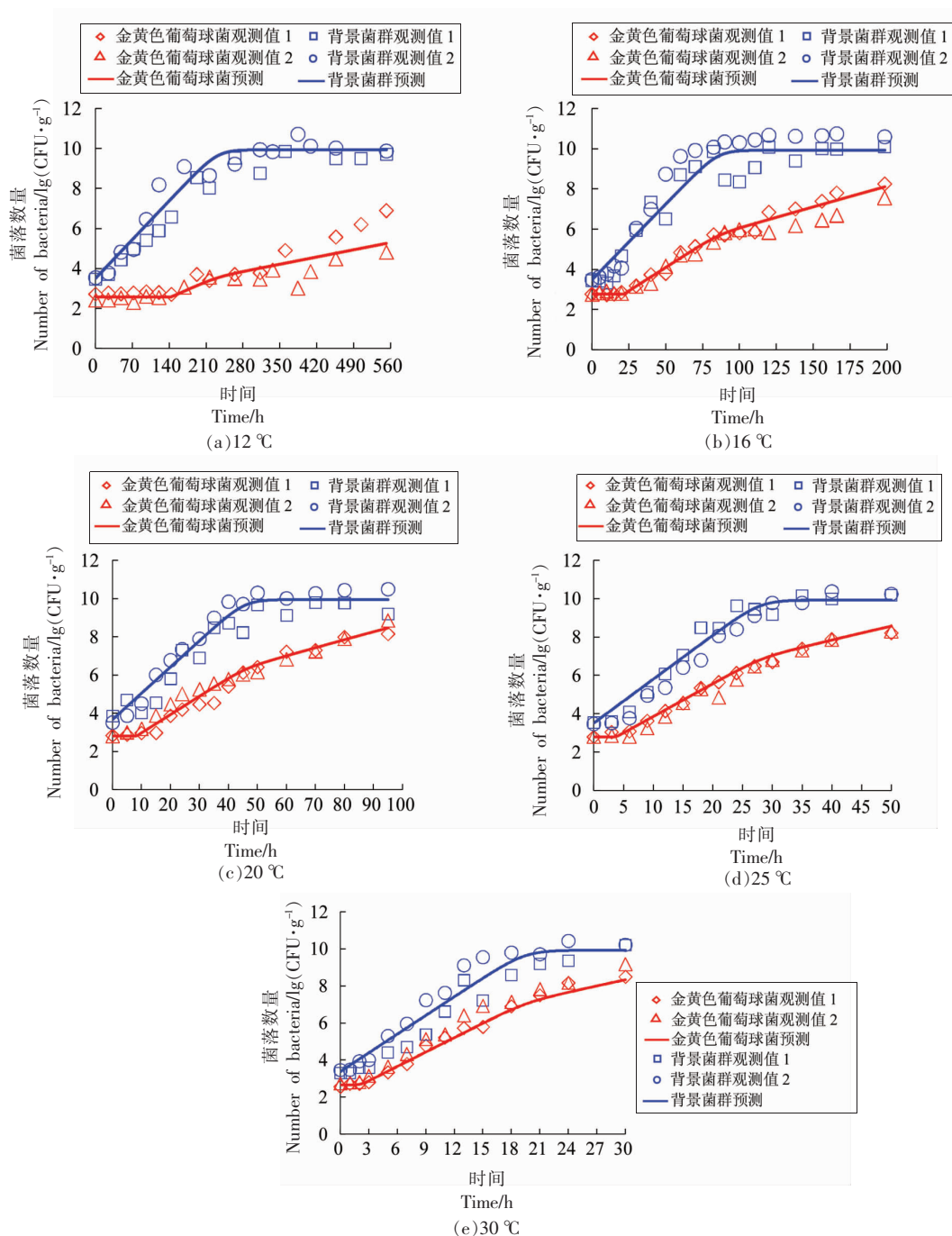


图2 酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群竞争生长一步法拟合分析

Fig.2 One-step analysis of the competitive growth curves of *S. aureus* and background microflora in sauced duck

中,关于金黄色葡萄球菌最低生长温度的预测与前述非竞争生长试验中预测的最低生长温度(9.28 °C)几乎一致;估计的背景菌群的最大生长浓度(即酱鸭样品的最大载菌量)为 22.87 ln(CFU/g),或 9.93 lg(CFU/g),与前述非竞争生长

试验中预测的金黄色葡萄球菌的最大生长浓度 21.63 ln(CFU/g),或 9.39 lg(CFU/g)相接近;此外,背景菌群对金黄色葡萄球菌的抑制效应系数为 0.556。

表 2 酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群竞争生长一步法分析结果

Table 2 One-step analysis of competitive growth of *S. aureus* and background microflora in sauced duck

参数	估计值	标准差	t 值	P 值	95%置信区间	
					上区间	下区间
a_s	0.080	0.002	33.313	8.149×10^{-103}	0.075	0.085
a_B	0.086	0.001	65.012	7.588×10^{-179}	0.083	0.089
$T_{\min,S}$	9.40	0.362	25.933	1.341×10^{-78}	8.684	10.111
$T_{\min,B}$	7.80	0.170	45.806	1.897×10^{-137}	7.460	8.130
A	1.074	0.389	2.764	6.071×10^{-3}	0.309	1.838
m	1.352	0.163	8.286	3.942×10^{-15}	1.031	1.674
Y_{\max}	22.87*	0.167	136.56	3.920×10^{-272}	22.539	23.198
α	0.556	0.063	8.807	1.053×10^{-16}	0.431	0.680

数据点=308

自由度=300

RMSE=0.51

注：*. 22.87 ln(CFU/g) = 9.93 lg(CFU/g)。

2.1.3 迟滞期及生长速率比较分析 图 3 比较了温度对单独接种和混合接种状态下金黄色葡萄球菌的迟滞期及生长速率的影响。由图 3a 可以看出,在同等温度条件下,非竞争状态下的金黄色葡萄球菌其迟滞期要低于混合接种状态下的金黄色葡萄球菌,表明背景菌群对金黄色葡萄球菌存在抑制效应。图 3b 再次表明,金黄色葡萄球菌与背景菌群竞争生长过程中,前者的生长速率小于后者的生长速率,同时竞争状态与非竞争状态下的金黄色葡萄球菌的生长速率无显著差异,如前所述,当背景菌群的生长进入稳定期后,金黄色葡萄球菌的生长速率会显著降低,其数量随时间的延

长而缓慢增长。图 3b 还将本研究中金黄色葡萄球菌的生长速率与相关文献报道结果进行对比。当温度大于 15 °C 时,本研究结果与广式烧腊^[12]、烤鸭^[13]、盐水牛肉^[1]中金黄色葡萄球菌的生长速率相近,然而当温度低于 15 °C 时,其生长速率低于上述文献报道结果。产生这种差异的原因有二,其一,正如前所述,金黄色葡萄球菌在酱鸭上与上述文献报道的产品中的生长本身存在差异;其二,本研究选择的二级模型(式 2)和上述文献选择的二级模型^[26] $[\sqrt{\mu_{\max}} = a(T - T_0)]$ 不同,前者中 T_{\min} 为细菌的实际最低生长温度,而后者中 T_0 为表观最低生长温度,一般而言, $T_{\min} > T_0$ ^[27]。

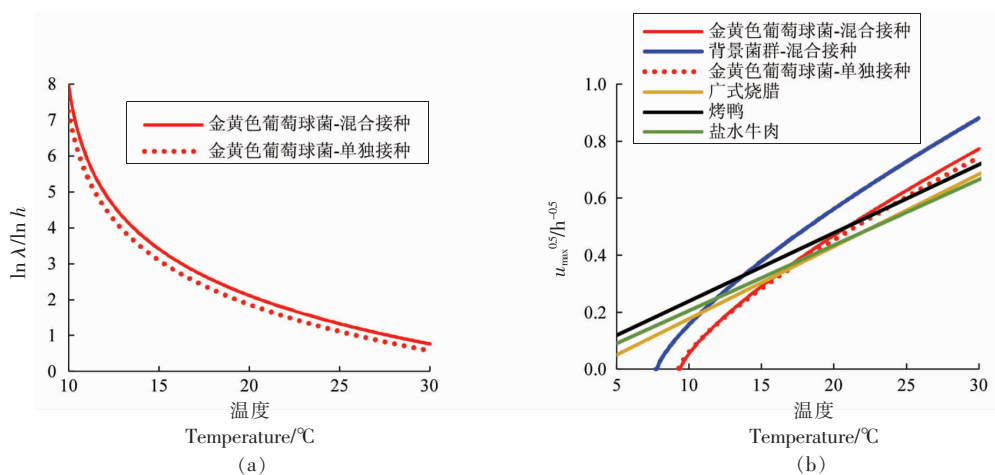


图 3 金黄色葡萄球菌迟滞期(a)及生长速率(b)的比较分析

Fig.3 Comparative analysis of lag time (a) and growth rate (b) of *S. aureus*

2.2 模型验证

2.2.1 非竞争模型验证 本研究构建酱鸭中金黄色葡萄球菌的非竞争生长模型时,因 10℃条件下观测期内未见显著生长,仅选取 12~30℃的数据用于一步法分析,而 10℃条件下的数据仍可用于模型验证,图 4 表明模型预测值与试验观测值相接近, RMSE 为 0.16 lg(CFU/g)。此外,本研究还通过另设的恒温条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长试验(20℃)来验证模型和所求解参数的准确性,由图 4 可知,模型的预测值与观测值的差异较小,其 RMSE 为 0.56 lg(CFU/g),表明一步法构建的非竞争模型可准确地预测无菌酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长。

2.2.2 竞争模型验证 本研究通过另设 13℃和 20℃条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群混合接种的生长试验来验证所构建的竞争模型及其参数的准确性(图 5)。图 5a 和图 5b 分别比较了 13℃和 20℃条件下金黄色葡萄球菌和背景菌群竞争生长时,模型预测值和实测值之间的差异,由

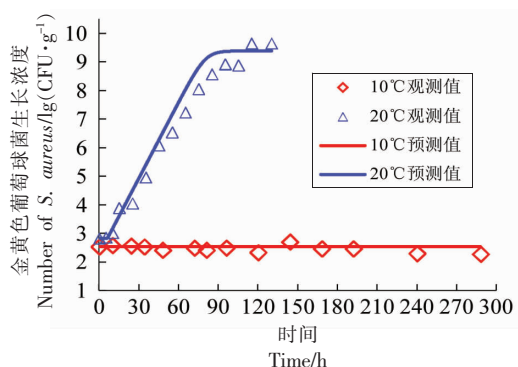


图 4 非竞争模型验证:不同温度条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌的生长

Fig.4 Validation of the non-competitive model: growth curves of *S. aureus* in sauced duck at different temperatures

图可知,其差异较小,均方根误差(RMSE)分别为 0.49 lg(CFU/g)和 0.63 lg(CFU/g),表明所构建的模型可较为准确地描述酱鸭中金黄色葡萄球菌与背景菌群的竞争生长。

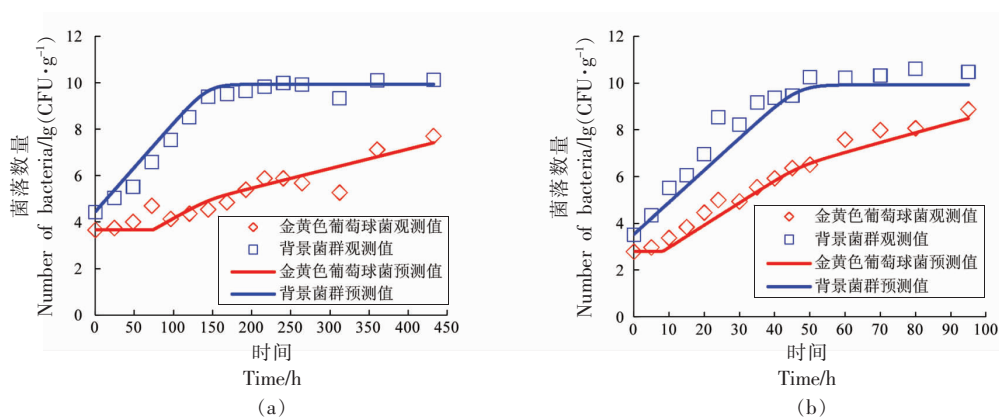


图 5 竞争模型验证:13℃(a)和 20℃(b)条件下酱鸭中金黄色葡萄球菌和背景菌群的生长

Fig.5 Validation of the competitive model: growth curves of *S. aureus* and background microflora in sauced duck at 13℃ (a) and 20℃ (b)

3 结论

本文考察了不同温度条件下,金黄色葡萄球菌单独接种或与背景菌群混合接种至酱鸭中的生长特性,并通过一步法构建包含初级模型(非竞争或竞争模型)和二级模型的组合模型;无菌酱鸭样品中单独接种金黄色葡萄球菌时,由非竞争模型估计的金黄色葡萄球菌的最低生长温度为 9.28℃,最大生长浓度为 9.39 lg(CFU/g);与非竞争状

态相比,金黄色葡萄球菌与背景菌群混合接种时的迟滞期略长,最大比生长速率无显著差异,然而当背景菌群的生长进入稳定期时,金黄色葡萄球菌的生长速率显著降低,表现出抑制效应(抑制效应系数 $\alpha = 0.556$);竞争状态下,由竞争模型估计的金黄色葡萄球菌和背景菌群的最低生长温度分别为 9.40℃和 7.80℃,背景菌群的最大生长浓度为 9.93 lg(CFU/g);验证试验表明构建的模型能

够较为准确地预测酱鸭中金黄色葡萄球菌的非竞争生长及其与背景菌群的共同竞争生长。综上所述,一步法是预测微生物学建模的有效分析方法,本文所构建的预测模型可用于描述酱鸭中金黄色葡萄球菌和背景菌群的生长,为相关产品中金黄色葡萄球菌的定量风险评估及货架期的预测提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] 张微, 宇胜好, 曹慧, 等. 熟肉制品中金黄色葡萄球菌生长模型的建立[J]. 工业微生物, 2018, 48(3): 40-45.
ZHANG W, YU S H, CAO H, et al. Establishment of *Staphylococcus aureus* growth model in cooked meat products [J]. Industrial Microbiology, 2018, 48(3): 40-45.
- [2] 方太松, 王军, 王晔茹, 等. 我国熟肉制品中金黄色葡萄球菌污染状况 Meta 分析[J]. 生物加工过程, 2020, 18(3): 386-391.
FANG T S, WANG J, WANG Y R, et al. Cooked meat products contamination with *Staphylococcus aureus* in China: A Meta-analysis Chinese[J]. Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(3): 386-391.
- [3] 周少君, 梁辉, 朱海明, 等. 广东省熟肉制品中金黄色葡萄球菌的污染调查及初步风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 496-500.
ZHOU S J, LIANG H, ZHU H M, et al. *Staphylococcus aureus* contamination and risk evaluation in ready-to-eat meat products in Guangdong Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(5): 496-500.
- [4] JIA K, FANG T S, WANG X, et al. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates from retail foods in mainland China: A meta-analysis[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2020, 17(5): 296-307.
- [5] SCHELIN J, WALLIN C N, THORUP C M, et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment[J]. Virulence, 2011, 2(6): 580-592.
- [6] SARAH D, LAURENCE D, YACINE N, et al. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: High diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection[J]. Toxins, 2017, 9(12): 407-419.
- [7] 姬瑞, 曹慧, 徐斐, 等. 即食熟肉制品中主要致病菌的风险排序[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 197-201.
JI R, CAO H, XU F, et al. Risk ranking of main pathogenic bacteria in deli meat [J]. Food Science, 2015, 36(11): 197-201.
- [8] LUCA D, DALL A C, GIANN G. Toxicodynamics of mycotoxins in the framework of food risk assessment—an in silico perspective[J]. Toxins, 2018, 10(2): 1-23.
- [9] DELHALLE L, DAUBE G, ADOLPHE Y, et al. A review of growth models in predictive microbiology to ensure food safety[J]. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2012, 16(3): 369-381.
- [10] MANSUR A R, PARK J H O, DEOG H. Predictive model for growth of *Staphylococcus aureus* on raw pork, ham, and sausage [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(1): 132-137.
- [11] YONG J L, BYEONG S J, KEE T K, et al. Predictive model for the growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using integrated pathogen modeling program (IPMP) 2013[J]. Meat Science, 2015, 107(4): 20-25.
- [12] 邹彦桐. 金黄色葡萄球菌在广式烧腊制品中的生长特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
ZOU Y T. Study on the growth of *Staphylococcus aureus* in Cantonese Barbecue[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [13] 宇盛好, 曹慧, 徐斐, 等. 烤鸭中金黄色葡萄球菌生长模型的建立[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 154-159.
YU S H, CAO H, XU F, et al. Predictive models for the growth of *Staphylococcus aureus* in roast duck[J]. Food Science, 2015, 36(13): 154-159.
- [14] BEDNARKO M E, SZTEYN J, BIALOBRZEWSKI I, et al. Modeling the kinetics of survival of *Staphylococcus aureus* in regional yogurt from goat's milk[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2015, 18(1): 39-45.
- [15] L'UBOMIR V, PAVEL A, ALZBETA M. Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk [J]. Food Control, 2018, 87(5): 145-152.
- [16] GAO Z H, DALIRI E B M, WANG J, et al. In-

- hibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review[J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(3): 441–453.
- [17] DONG Q L, BARKER G C, GORRIS L G M, et al. Status and future of quantitative microbiological risk assessment in China[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 42(1): 70–80.
- [18] 李晓婷, 李长城, 刘丽敏, 等. 基于一步法的金枪鱼生鱼片沙门氏菌生长数值模拟[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(4): 197–205.
- LI X T, LI C C, LIU L M, et al. Numerical simulation of growth of *Salmonella* in tuna sashimi – One-step kinetic analysis[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(4): 197–205.
- [19] HUANG L H. IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 262(12): 38–48.
- [20] FANG T, HUANG L H, LIU L, et al. Mathematical modeling of growth of *Salmonella spp.* and spoilage microorganisms in raw oysters[J]. *Food Control*, 2015, 53(7): 140–146.
- [21] HUANG L H. Optimization of a new mathematical model for bacterial growth[J]. *Food Control*, 2013, 32(1): 283–288.
- [22] HUANG L H. A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Bělehrádek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(4): 770–776.
- [23] MOLLER C O A, ILG Y, AABO S, et al. Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella spp.* in fresh pork – A predictive microbiology approach[J]. *Food Microbiology*, 2013, 34(2): 284–295.
- [24] JIA Z, BAI W J, LI X T, et al. Assessing the growth of *Listeria monocytogenes* in salmon with or without the competition of background microflora – A one-step kinetic analysis[J]. *Food Control*, 2020, 114: 107139.
- [25] HUANG L H. Mathematical modeling and validation of growth of *Salmonella enteritidis* and background microorganisms in potato salad – One-step kinetic analysis and model development[J]. *Food Control*, 2016, 68(10): 69–76.
- [26] RATKOWSKY D A, LOWRY R K, MCMEEKIN T A, et al. Model for bacterial culture growth rate through the entire biokinetic temperature range[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(3): 1222–1226.
- [27] HUANG L H, HWANG C A, PHILLIPS J. Evaluating the effect of temperature on microbial growth rate – the Ratkowsky and a Bělehrádek-type models[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(8): 547–557.

Predictive Modeling of the Effect of Dominant Background Microflora on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Sauced Duck

Zhang Ziye¹, Yan Xiaotong¹, Wang Yeru², Ding Tian³, Wang Jun⁴, Wang Xiang⁵,
Dong Qingli⁵, Fang Ting¹, Li Changcheng^{1*}

¹College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002

²China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022

³College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310030

⁴College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong

⁵School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093)

Abstract The objective of this study was to investigate the effect of dominant background microflora (BM) on the growth of *Staphylococcus aureus* in sauced duck, and then to develop and validate the predictive models. Non-competitive and competitive growth experiments of *Staphylococcus aureus* under 10, 12, 16, 20, 25, 30 °C were conducted respectively by inoculating *Staphylococcus aureus* alone or mixed with BM into the sterile sauced duck samples. Growth data under non-competitive or competitive experiments was used to directly construct both primary model (non-competitive growth model and competitive growth model) and secondary model through one-step kinetic analysis, and growth experi-

ments from newly designed constant temperature conditions were chosen for model validation. The results showed that one-step approach can be used to predict the growth of *Staphylococcus aureus* and BM in sauced duck. Under non-competitive conditions, the estimated minimum growth temperature and maximum growth density of *Staphylococcus aureus* were 9.28 °C and 9.39 lg(CFU/g), respectively. The lag period of *Staphylococcus aureus* under competitive growth was slightly longer than those under non-competitive conditions, while there was no significant difference on the maximum specific growth rate. However, the growth rate of *Staphylococcus aureus* decreased significantly after the growth of BM entered into the stationary phase, indicating the inhibitory effect of BM on the growth *Staphylococcus aureus* ($\alpha = 0.556$). And the estimated minimum growth temperature of *Staphylococcus aureus* was 9.40 °C, and the maximum growth density of BM was 9.93 lg(CFU/g). Validation tests showed that the models could accurately describe the growth of *Staphylococcus aureus* and BM in sauced duck. The results of this study can provide scientific basis for quantitative risk assessment of *Staphylococcus aureus* in sauce duck and predict its shelf life.

Keywords sauced duck; *Staphylococcus aureus*; background microflora; competitive model; one-step kinetic analysis