

# 食源性致病菌单细胞观测与预测的研究进展\*

董庆利<sup>1</sup> 刘阳泰<sup>1</sup> 苏亮<sup>2</sup> 王忻<sup>1</sup> 刘箐<sup>1</sup> 丁甜<sup>3</sup>

(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 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 310058)

**摘要:** 微生物在单细胞水平下的生长普遍具有随机性和变异性,同时低菌量污染食品所造成的危害风险亦不可忽视,因此食源性致病菌单细胞的生长观测及预测研究逐渐成为食品预测微生物学及食源性致病菌风险评估的研究热点。在分析现有相关文献的基础上,将目前主要的食源性致病菌单细胞生长观测研究分为间接推断和直接观测两类方法;同时对食源性致病菌单细胞生长预测的模型参数与建模过程进行概述,比较了传统预测微生物的决定模型与微生物单细胞的随机模型二者之间的区别,强调了单细胞生长模型需在随机建模的基础上开展,并通过个体建模方法进一步联系其与所在食品环境之间的关系。最后,分析了食源性致病菌单细胞生长观测与预测的现状,并展望了其未来与食品安全风险评估相结合的发展趋势。

**关键词:** 单细胞 食品预测微生物学 随机模型 个体建模方法 风险评估

**中图分类号:** TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)11-0221-09

## Progress of Observation and Prediction for Foodborne Pathogen Single Cell

Dong Qingli<sup>1</sup> Liu Yangtai<sup>1</sup> Su Liang<sup>2</sup> Wang Xin<sup>1</sup> Liu Qing<sup>1</sup> Ding Tian<sup>3</sup>

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology,

Shanghai 200093, China 2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China

3. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** The research on the growth of the foodborne pathogen in the single cell level is popular and necessary for its random and variability, which is different from it in the population level. Based on the related research literatures, the observation methods of the pathogen single cell are summarized as indirect and direct methods. The indirect method is based on the turbidity method and theoretical hypothesis, meanwhile, the direct method is using the optical devices to record the division process of the cells. For the character of the growth in single cell level, the single cell growth prediction model should be built on the stochastic model rather than the deterministic model used in the traditional predictive microbiology. Modelling the stochastic division process by the individual-based method makes it possible to explain the relations between the single cell and its living environments. The observation and prediction for foodborne pathogen single cell is the foundation to control the risk of the food with low-contamination. Analysis indicates that the pathogen single cell growth prediction tends to be combined with food risk assessment.

**Key words:** Single cell Food predictive microbiology Stochastic model Individual-based method Risk assessments

### 引言

细胞是生命的基本单位,是能够形成组织的原

子与分子的集合体,自然界的各类介质中都普遍存在着各种各样的微生物细胞,人类摄入的食物也可以被视为一种自然介质的拓展<sup>[1]</sup>。在现有的灭菌

收稿日期: 2015-10-10 修回日期: 2015-11-01

\* 国家自然科学基金资助项目(31271896、31401608)、上海市科委重点支撑资助项目(13430502400)、上海市科委长三角科技联合攻关领域项目(15395810900)和国家食品安全风险评估中心2015年委托项目

作者简介: 董庆利,副教授,主要从事畜产品安全和质量控制研究, E-mail: qdong@usst.edu.cn

加工过程中,常将食物通过高温、高压等方式处理,使食源性致病菌数量级降至一定限量以下以达到控制其生长的目的<sup>[2]</sup>。然而,不彻底的食品加工过程及二次污染等原因,导致少量的致病微生物细胞仍可能以芽孢或亚致死状态,甚至以正常状态留存于食品当中,并在适宜的条件下再次进入快速生长状态,最终引起危害发生<sup>[3-4]</sup>。

在传统的预测微生物学方法中,利用微生物群体水平下的细胞数量变化构建生长模型来描述其生长规律已是较为成熟的手段<sup>[5-6]</sup>,而单细胞或低数量级水平下微生物的生长规律存在较大的随机性和变异性,从而不能直接使用群体细胞水平的微生物生长规律进行解释<sup>[7-8]</sup>。因此,国内外学者开展单细胞或低数量级水平下的食源性致病菌生长规律研究工作日益增多<sup>[9]</sup>。

食源性致病菌单细胞(以下简称单细胞)的生长研究是基于预测微生物学、生态学、分子生物学及计算机科学等学科发展起来的综合性研究,其利用了统计学模型、光学检测、细胞染色等多种技术使之得以实现。本文以归纳食源性致病菌单细胞生长规律相关研究成果为出发点,总结食源性致病菌单细胞生长观测的主要方法,阐述构建食源性致病菌单细胞生长预测模型的基本构建过程和关键参数,并展望和探讨微生物单细胞观测与预测研究以及与食源性致病菌风险评估相结合的可行性。

## 1 食源性致病菌单细胞的生长观测

在微生物单细胞水平研究中,由于数量级较低,并不能使用传统的平板计数方法开展定量分析,因此微生物单细胞的观测方法及观测设备是开展微生物单细胞生长建模研究的先决条件<sup>[10]</sup>。同时,微生物单细胞生长具有复杂的随机性和变异性,在相关观测研究中应采用连续观测的方法,方能较为准确地记录微生物单细胞个体在生长过程中的数量变化<sup>[11]</sup>。在现有的食源性致病菌单细胞生长观测研究中,可根据数据获取方式的不同大致将其分为间接推断方法与直接观测方法,由于两类方法各有局限,因此也各有利弊,需根据研究目的的不同进行选择。

### 1.1 间接推断方法

在单细胞研究初期,由于光学显微技术的发展不能满足持续观测并记录致病菌单细胞生长分裂情况的需要,因此研究食源致病菌单细胞生长规律主要是采用以理论建模与比浊法验证相结合为代表的间接推断方法<sup>[12-14]</sup>。

比浊法又名浊度测定法,其通过测定菌悬液的

透光量间接获知菌悬液中的菌量,常通过光密度(Optimal density)值来表征菌液的浓度<sup>[15]</sup>。因该方法具有操作便捷、省时省力、可连续测定等优点,已被广泛应用于传统微生物群体细胞水平的检测及建模研究中<sup>[16-17]</sup>。

比浊法的检测限仅能达到 $10^6 \sim 10^7$  cells/well,为解决与单细胞研究微生物数量级较低的矛盾,Baranyi等<sup>[13]</sup>曾测定了不同稀释度的低初始接种量的3种假单胞菌属生长至 $10^7$  cells/well时所需要的时间,即最短测量时间(Detection time,  $T_{det}$ )用以推断微生物单细胞水平下的生长情况。该方法先将连续稀释的菌悬液接种至微型多孔板,使每个孔约容纳1个微生物单细胞,即1 cell/well,继而利用Bioscreen设备对孔板内的菌悬液光密度值进行连续监测,从开始测量至光密度值发生变化的时间即为 $T_{det}$ 。为使该指标能推断出更多微生物单细胞生长信息,该方法假设细胞分裂过程符合等式

$$T_{det}(x_0) = \lambda(x_0) + \frac{\ln \frac{x_{det}}{x_0}}{\mu} \quad (1)$$

式中  $x_0$ ——细胞初始个数,个

$\lambda$ ——群体迟滞期, h

$\mu$ ——群体最大比生长速率,  $h^{-1}$

$x_{det}$ ——最低细胞检测数(检测限),个

联系微生物生长曲线(图1)可更为直观地理解该方法的原理。

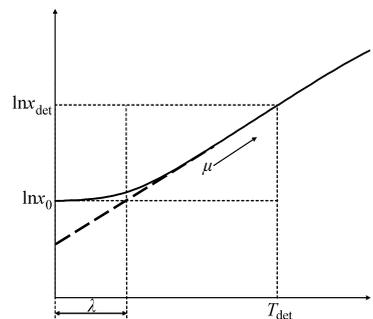


图1 微生物生长曲线

Fig. 1 Microbial growth curve

该方法使利用传统检测工具开展微生物单细胞研究成为可能。相关学者也借鉴了通过测定最短测量时间( $T_{det}$ )可快速推出部分微生物单细胞生长参数的方法,进一步细化和丰富了对低菌量水平下微生物随机生长规律的研究,并验证了部分单细胞随机生长建模理论假设。表1归纳了部分利用间接推断方法进行食源性致病菌单细胞生长规律探索的研究。

间接推断方法为早期的微生物单细胞生长规律研究提供了主要的研究思路和途径,并构建起了部

表 1 部分应用间接推断方法的食源性致病菌单细胞生长研究

Tab. 1 Typical researches on the growth of foodborne pathogen single cell using indirect method

菌种	控制变量	检测指标	主要研究者
<i>Listeria monocytogenes</i>	温度	单细胞迟滞时间、单细胞生长速率	Augustin J C 等 (1999) <sup>[12]</sup>
		单细胞迟滞时间、群体最大比生长速率	Wu Y 等 (2000) <sup>[18]</sup>
	温度/pH 值	单细胞迟滞时间	Francois K 等 (2005) <sup>[4]</sup>
	温度/pH 值/水分活度	单细胞迟滞时间	Francois K 等 (2005) <sup>[19]</sup>
	预处理温度/预处理 pH 值	单细胞迟滞时间	Staert Arnout R 等 (2007) <sup>[20]</sup>
<i>Listeria innocua</i>	水分活度	最小检测时间方差	Métris A 等 (2003) <sup>[22]</sup>
	温度/pH 值/水分活度/ 细胞生理状态	单细胞迟滞时间、群体迟滞期、群体最大比生长速率	Guillier L 等 (2006) <sup>[23]</sup>
	有机酸种类	单细胞迟滞时间、细胞生理状态、群体最大比生长速率	George S M 等 (2008) <sup>[24]</sup>
<i>Escherichiacoli</i> O157:H7	变量分布类型	单细胞迟滞时间、细胞生理状态	Mckellar R C 等 (2006) <sup>[25]</sup>
	温度/pH 值	单细胞迟滞时间、变量分布	Li Y 等 (2006) <sup>[26]</sup>
<i>Escherichia coli</i> K12	温度骤变	群体迟滞期	Dens E J 等 (2005) <sup>[27]</sup>
<i>Pseudomonas</i>	接种量	细胞生理状态、群体迟滞期、群体最大比生长速率	Baranyi J 等 (1999) <sup>[13]</sup>
<i>Cronobacter turicensis</i>	热刺激/恢复温度	单细胞迟滞时间、群体最大比生长速率	Xu Y Z 等 (2015) <sup>[28]</sup>

分食源性致病菌单细胞分裂基础理论,然而比浊法在应用于单细胞水平的研究中受到了检测限的限制,远远超出了单细胞水平数量级的范畴,只能依靠一定的细胞分裂理论假设来解释微生物单细胞生长情况,难以做到“眼见为实”,无法直接对细胞生长过程中的变化进行监测和考量,也不能深入解释细胞生长分裂的不确定性,置信度较低。

## 1.2 直接观测方法

随着光学显微硬件技术与计算机图像处理技术的快速发展,利用显微镜结合计算机的方法也逐渐达到了满足持续观测记录单细胞生长分裂过程的要求。由于观测对象及研究目标的不同,直接观测方法吸纳了各类高新技术的优势,衍生出了许多不同的研究方法。

早期的微生物单细胞水平生长直接观测可追溯到 Kelly 等的相关研究<sup>[29]</sup>,其将少量微生物接种于琼脂薄膜上并置于显微镜下观测微生物单细胞个体的分裂过程,发现随着细胞传代次数的增加,其分裂时间间隔也随之下降,该研究亦成为细胞个体生长直接观测的经典方法。Koutsoumanis 等<sup>[30]</sup>也使用了相似方法对 *Salmonella enterica* 由单细胞个体生长至单菌落的过程进行观测,所获得的 220 组单细胞生长结果证实了微生物单细胞生长具有很高的随机性,这种随机性主要是由环境因素所造成;同时,不同的初始接种量也会影响微生物单细胞的生长情况。琼脂接种方法便捷易操作,但随着微生物细胞数量的增加,观测视野会逐渐被细胞所充满并模糊难辨,获得细胞的分裂次数数据有限。

与固定培养观测不同的是,Elfwing 等<sup>[31]</sup>提出了另一种思路,其结合流体力学原理设计了一种流

动槽装置用于 *E. coli* 单细胞的生长观测,该设备通过控制流动槽内液体组分的流速将新分裂的子细胞带走,目标母细胞因具有较强的粘附力得以保留在视野范围内。该方法目标细胞的分裂并不受子代细胞所影响,能持续观测一个目标细胞多次分裂情况,同时通过改变液体组份性状亦可探究不同环境下微生物单细胞的生长情况。流动槽的方法也获得了许多学者的认可,其中周康等<sup>[32]</sup>利用相同装置与间接推断方法相对比,对 *S. enterica* 单细胞在不同 NaCl 浓度环境下的生长进行模型建立与验证。王忻等<sup>[11,33]</sup>在该方法的基础上改进了观测装置,分别探讨了 *Pseudomonas Aeruginosa* 单细胞个体在不同初始接菌量以及温度骤变条件下的生长规律。

随着直接观测方法的日趋成熟,Pin 等<sup>[34]</sup>结合细胞二分裂及随机分裂的特性,利用微生物单细胞的分裂数据构建了模拟单细胞生长过程的方法,该方法进行了 3 点假设:单细胞的第 1 次分裂时间包含单细胞的迟滞时间;单细胞分裂时间逐渐趋于固定分布;不考虑单细胞的死亡情况。具体过程如下:

定义系统状态  $(Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$ ,  $Y_1$  为未进行分裂的细胞个数,  $Y_2$  为处于第 2 次分裂状态的细胞个数,  $Y_k$  为处在第  $k$  次分裂状态的细胞个数 ( $k$  通常取 3 或 4)。初始细菌细胞个数为  $N$  ( $N$  为大于 1 的整数)。单细胞第 1 次分裂时间分布为  $(F_1, F_2, \dots, F_N)$ , 第 2 次分裂时间分布为  $(SG_1, SG_2, \dots, SG_N)$ , 第 3 次分裂时间分布为  $(TG_1, TG_2, \dots, TG_N)$ , 第 4 次分裂时间分布为  $(FG_1, FG_2, \dots, FG_N)$ 。各次分裂时间分布由实验所得单细胞分裂时间按照频率分布随机给出。

令  $t_1 = \min(F_1, \dots, F_N)$ 。当  $t = t_1$  时,只有一个

细胞分裂,系统状态为 $(N-1, 2, \dots, 0)$ ,系统中细菌细胞的总个数为 $N-1+2=N+1$ 个。

令 $t_2 = \min(F_1, \dots, F_{N-1}, t_1 + SG_1, t_1 + SG_2)$ 。 $SG_1$ 、 $SG_2$ 为新分裂出的两个子细胞进行第2次分裂所需的时间。当 $t=t_2$ 时,细胞分裂存在两种情况:

(1)未进行分裂的 $N-1$ 个单细胞中的一个细胞分裂。此时,系统状态为 $(N-2, 4, \dots, 0)$ 。则 $t_3 = \min(F_1, \dots, F_{N-2}, t_1 + SG_1, t_1 + SG_2, t_2 + SG_3, t_2 + SG_4)$ 。

(2)新分裂出的两个子细胞中的一个细胞分裂。此时,系统状态为 $(N-1, 1, 2, \dots, 0)$ 。则 $t_3 = \min(F_1, \dots, F_{N-1}, t_1 + SG_1, t_2 + TG_1, t_2 + TG_2)$ 。

对于第2种情况,当 $t=t_4$ 时,又存在3种情况:

(1)未发生分裂的细胞分裂。此时系统状态为 $(N-2, 3, 2, \dots, 0)$ 。 $t_4 = \min(F_1, \dots, F_{N-2}, t_1 + SG_1, t_2 + TG_1, t_2 + TG_2, t_3 + SG_2, t_3 + SG_3)$ 。

(2)分裂过一次的细胞分裂。此时系统状态为 $(N-1, 0, 4, \dots, 0)$ 。 $t_4 = \min(F_1, \dots, F_{N-1}, t_2 + TG_1, t_2 + TG_2, t_3 + TG_3, t_3 + TG_4)$ 。

(3)分裂过两次的细胞分裂。此时系统状态为 $(N-1, 1, 1, 2, \dots, 0)$ 。 $t_4 = \min(F_1, \dots, F_{N-1}, t_1 + SG_1, t_2 + TG_1, t_3 + FG_1, t_3 + FG_2)$ 。

以此类推,第4次分裂之后的分裂时间按照第4次分裂时间计算,直至系统状态为 $(0, 0, \dots, N_T)$ 。 $N_T$ 为细胞完成分裂后总个数,其分裂时间符合第 $k$ 次分裂时间分布。

根据以上方法,可通过微生物单细胞个体的部分初始分裂数据模拟获得单细胞的生长曲线,并利用已有生长模型进行拟合,进而获得微生物单细胞分裂至群体水平的生长参数。

直接观测方法是微生物单细胞生长观测模式的发展,让学者更为直观地观测到食源性致病菌单细胞或低菌量情况下细胞个体的生长分裂过程,为进一步构建和验证单细胞生长预测模型提供了重要的数据支持。依靠其他学科的发展,在近几年来还衍生出了较多的新式细胞直接观测技术,如荧光染色技术<sup>[35]</sup>、扫描探针显微技术<sup>[36]</sup>、显微光谱技术<sup>[37]</sup>、微流控芯片技术<sup>[38]</sup>、流式细胞术<sup>[39]</sup>等,大大拓展了相关研究的深度和广度,但由于新型技术具有难度大、造价高等限制,在目前具体研究中仍较难普及,相关研究也较少涉及微生物单细胞生长分裂的过程监测。

## 2 食源性致病菌单细胞的生长预测

在获得食源性致病菌单细胞生长数据后,如何利用数据构建微生物动力学预测模型进而与食源性

致病菌风险评估工作相结合是更值得关注的问题。与此同时,愈来愈多的学者意识到:在未来的预测微生物建模工作中,必须将微生物单细胞的行为考虑在内,食源性致病菌单细胞的生长建模工作应受到更多重视<sup>[40]</sup>。

### 2.1 预测微生物生长模型

食品预测微生物学产生于20世纪80年代,由Roberts和Jarvis等提出,随着计算机科学的飞速发展,相关预测微生物模型已成为食品微生物定量风险评估的基础工具之一,并在实际应用中得到不断改进<sup>[41]</sup>。

在传统预测微生物模型中,通常根据变量类型将其分为一级模型、二级模型和三级模型<sup>[42]</sup>,传统预测微生物模型的构建基础基本来源于微生物群体水平下的生长数据,模型多以决定模型(Deterministic model)的形式表示,不能反映微生物单细胞或低菌量水平下的生长分裂特点,不适用于解释该情况下微生物的生长规律<sup>[7-8]</sup>。因此,在传统预测微生物决定模型的基础上构建符合微生物单细胞水平条件下生长特性的模型是对其进行预测的关键。

Renshaw等<sup>[8]</sup>曾指出,由于生物个体的不确定性,研究低数量级群体情况时应采用随机模型(Stochastic model)描述更为合理。随机模型是统计学中与决定模型进行区分的一类模型,构建该类模型的方法称为随机建模。其本质是随机过程,简单来说即通过输入一个或多个随机变量获得结果可能性分布的过程<sup>[43]</sup>。由于微生物单细胞的生长分裂过程可视为随机过程,因此随机建模方法为开展微生物单细胞相关建模工作提供了数学理论基础。

与此同时,纯粹的数学随机建模理论并不能较好地适用于实际微生物的生长建模中,因此从生态学引入的个体建模方法(Individual-based modelling, IbM)与随机建模方法相结合进一步完善了微生物单细胞生长模型的构建思想<sup>[44-45]</sup>。个体建模是一个自下而上构建模型的过程,在单细胞应用研究中,其从微生物个体角度出发对整个系统的动力学变化进行描述,引入了对个体随机性和变异性的规律探讨,突出了微生物个体在系统中的相互作用及与系统环境的交互作用<sup>[46-47]</sup>。

随机建模与个体建模思想是现有微生物单细胞生长建模的基础,二者均强调了个体随机性的概念,其过程考虑了不同情况的可能性,弥补了传统预测微生物生长模型仅能进行点估计的不足,同时通过该方法所建立的模型结果是以概率分布的形式表示,故更易与后续食源性致病菌的风险评估工作相

结合<sup>[48]</sup>。

## 2.2 单细胞的生长速率与生长迟滞期

不论在微生物群体生长建模还是微生物单细胞生长建模过程中,生长速率与生长迟滞期均是模型建立的基本参数。微生物的本质属性及环境作用共同决定了微生物细胞个体的生理状态与其在不同环境下的表现,由于现有研究对于细胞生理状态没有统一的定义且缺少研究成果,因此这种表现只能通过生长速率与生长迟滞期来反映<sup>[49]</sup>。

对于微生物的生长速率来说,不论群体还是个体水平下,其绝对生长速率通常不易衡量,为便于模型的构建,通常使用比生长速率(Specific growth rate,  $\mu$ )的概念替代生长速率作为参数。目前统一的最大比生长速率定义指的是微生物生长曲线指数增长期部分所能达到的最大斜率<sup>[50]</sup>,比生长速率可参考图 1,等式为

$$\mu(x)x = \frac{d}{dt}x \quad (0 \leq t < \infty; x > 0) \quad (2)$$

式中  $x$ ——微生物细胞数量,个

在决定模型中,相同环境下的最大比生长速率为一个定值;而在随机模型中,由于对象是不同的微生物单细胞个体,即使环境条件相同,不同微生物单细胞个体的最大比生长速率也因生长分裂情况而异,因此最终最大比生长速率表现为概率分布形式。

微生物的生长迟滞期是较微生物的生长速率更难定义和获取的生长参数,一般指的是在实际观测中,当微生物突然进入新环境时其生长过程出现的延后生长现象,该时期又称为微生物生长延滞期或调整期<sup>[51]</sup>。

需要特别说明的是,虽然微生物的生长迟滞期反映了微生物进入新环境后的适应过程,但微生物群体水平下与微生物单细胞水平下的生长迟滞期具体概念并不相同。本文参考 Baranyi<sup>[7]</sup>相关研究,将微生物群体水平下的生长迟滞期定义为群体迟滞期(Population lag phase,  $\lambda$ ),将微生物单细胞水平下的生长迟滞期定义为单细胞迟滞时间(Individual lag time,  $\tau$ )。

群体迟滞期指的是微生物指数增长期达到最大比生长速率时,生长曲线切线的反向延长线和初始菌量水平线交点在时间轴上的投影点与零时刻的时间间隔(图 1)。群体迟滞本质是由微生物生长曲线得到的数学意义上的迟滞概念。在传统预测微生物生长决定模型中,群体迟滞期随着生长曲线的确定而确定。

单细胞迟滞时间指的是微生物细胞个体进入新环境后至进入传代过程前的时间间隔,与细胞的传

代时间共同构成了微生物单细胞个体的第一次分裂时间。单细胞迟滞时间更强调微生物单细胞个体的生理迟滞概念。在单细胞生长随机模型中,单细胞的迟滞时间并不确定,具有随机性。在一个多细胞的系统中,不同单细胞迟滞时间符合一定的概率分布,该分布通常通过单细胞生长分裂情况及理论假设获得。

由于通过部分实验方法所获取的微生物单细胞生长参数数据通常十分有限,因此,在实际建模前,通常会对已掌握的实际生长参数数据进行蒙特卡罗模拟(Monte Carlo simulation)工作<sup>[28,30,52-53]</sup>。蒙特卡罗模拟又名随机抽样方法,源于物理模拟方法,用以实现从已知概率分布抽样获得目标估计量<sup>[54]</sup>。由于蒙特卡罗模拟方法是统计学中重要的模拟工具,此处不再展开论述,在微生物单细胞研究中,通过使用该工具扩大生长参数的数据量,弥补因数据匮乏导致的最终评估结果不具代表性的缺点,使得随机模型更具普适性。

## 2.3 单细胞生长模型构建

现有的单细胞随机建模方法因研究目的与模型假设前提不同均有一些出入,但学者们普遍关注的是对于单细胞迟滞时间的精确描述<sup>[7,31,34,55]</sup>以及细胞生长的可能性问题<sup>[30,56-57]</sup>,前者更偏向在纯培养条件下使用统计学工具构建模型理论基础,而后者则更多联系了不同食品实际环境条件与微生物单细胞生长参数之间的关系。

在微生物单细胞随机建模基础研究中,Baranyi<sup>[7]</sup>建立的随机模型获得相关学者的普遍认可,其在线型方程的基础上结合了细胞的分裂规律,模型只考虑了最受关注的微生物迟滞期和指数生长期两个阶段,同时说明了单细胞迟滞时间与群体迟滞期的联系。

假设一个有  $N$  个微生物单细胞的系统,该系统随时间  $t$  变化的细胞总量为  $x_N(t)$ ,系统比生长速率为  $\mu$ ,系统中某个单细胞的生长迟滞时间为  $\tau_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ ),可得等式

$$x_N(t) = \sum_{i=1}^N e^{\mu \max(t - \tau_i, 0)} \quad (3)$$

令等式(3)取自然对数可得线型形式方程

$$\ln x_N(t) = \ln N + \mu \left( t - \frac{-\ln \frac{\sum_{i=1}^N e^{-\mu \tau_i}}{N}}{\mu} \right) \quad (t > \max(\tau_i)) \quad (4)$$

假设  $N$  个细胞系统的群体迟滞为  $\lambda(N)$ ,结合线型方程与群体迟滞概念<sup>[7]</sup>,可得群体迟滞与单细

胞迟滞时间关系

$$\lambda(N) = -\frac{1}{\mu} \ln \frac{\sum_{i=1}^N e^{-\mu\tau_i}}{N} \quad (5)$$

该方法通过较为简单的形式阐明了单细胞生长分裂所符合的基本规律,同时进一步指出单细胞迟滞时间与群体迟滞的区别。

随后 Baranyi 等<sup>[58]</sup>又进一步完善了该理论,通过数学推导的方式证明了随机建模理论的科学性,并针对不同单细胞迟滞时间的假设情况提出了更为具体的群体迟滞期与单细胞迟滞时间的关系。此外,研究还将微生物单细胞的随机生长建模方法引伸至微生物单细胞随机失活建模中,进一步扩大了随机模型的应用范围。

表2 部分应用个体建模方法的食物中微生物单细胞生长研究

Tab.2 Typical researches on the growth of microbial single cell in food using IbM

食品介质	菌种	影响因素	生长参数	一级/二级模型	主要研究者
软质干酪	<i>L. monocytogenes</i>	介质参数 (温度/pH值/水分活度)	群体迟滞/ 生长速率	Baranyi 模型 平方根模型	Ferrier R 等(2013) <sup>[60]</sup> Couvert O 等(2010) <sup>[61]</sup>
		加工及储藏过程(温度/时间) 污染情况(初始污染量/污染时间)			
烟熏三文鱼	<i>L. monocytogenes</i>	介质参数 (pH值/水分活度)	群体迟滞/ 生长速率	Baranyi 模型 平方根模型	Augustin J C 等(2015) <sup>[48]</sup> Pouillot 等(2007) <sup>[61]</sup>
		加工及储藏过程(温度/时间) 污染情况(初始污染量/污染时间)			
酸奶	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	介质参数(温度/pH值/营养量)	生长速率/ 群体密度/ 新陈代谢量	INDISIM 模型	Ginovart M 等(2002) <sup>[63, 64]</sup>
			生长速率/ 群体密度/ 新陈代谢量		
胶状食品	<i>E. coli</i> K12	介质参数(温度/pH值/营养量)	生长速率/ 群体密度/ 新陈代谢量	INDISIM 模型	Tack 等(2015) <sup>[46]</sup>
鸡蛋	<i>S. enteritidis</i>	介质参数(温度/pH值/营养量)	生长速率/ 生长趋势/ 移动速度	BacSim 模型	Grijpspeerd 等(2005) <sup>[65]</sup>

在个体建模中,微生物的生理状态问题是最主要的考虑对象,而微生物生理状态的不同本质上是由于细胞个体内外生物化学组分发生了改变,在单细胞水平下,这种改变的诱导原因是环境因素,因此愈来愈多的相关研究逐渐侧重开展微生物生物组分与环境因素的建模工作<sup>[46, 63-66]</sup>,而并不是只通过微生物的细胞数量来反映其生长情况。这有利于从本质上解释微生物单细胞水平下个体的生长随机和变异特性,为进一步开展微生物单细胞个体在复杂环境组分的建模研究提供充足的依据。

### 3 结论与展望

食源性致病菌单细胞的观测与预测研究较传统

McKellar 等<sup>[40]</sup>曾针对系统中单细胞的生长可能性问题建立了微生物单细胞生长两组分模型(Two-compartment model),后经 Kotalik 等<sup>[59]</sup>验证,其实质上是 Baranyi 随机模型的一种特殊情况,因此,Baranyi 随机模型依然是目前食源性致病菌单细胞随机生长模型的主要基础理论模型。

在随机模型基础上,由于个体建模方法及思想的引入,使学者们更多地考虑环境因素对微生物单细胞个体生长参数的影响,通过增加复杂的环境参数改进随机模型的预测能力和范围。个体建模方法因研究目的的不同,在参数设置、模型选取和建模过程等均有较大差别,在现有的食源性致病菌单细胞相关研究中也并无固定的建模方式。表2归纳了部分应用个体建模方法对食品中微生物生长规律开展的研究。

预测微生物学研究的区别,主要体现于数量级低、随机性大、变异性大,且更重视环境因素以及微生物细胞个体状态对其生长情况的影响。随着细胞观测技术的精细化与相关研究数据量的丰富,食源性致病菌单细胞生长模型将日趋完善统一,必将对未来食源性致病菌风险评估工作起到推动作用。当前食源性致病菌单细胞生长观测与预测大致的发展方向将包含4方面:

(1)单细胞观测技术有待改进。食源性致病菌单细胞的生长观测方法虽已得到了较大发展,但依然存在精度低、控制难、耗时长等问题。早期的间接推断方法作为单细胞难以进一步探究微生物单细胞的生长规律,而目前占主导地位的直接观测方法单

次试验获取数据少, 抽样方法也并不完善。在单细胞观测方法上的创新, 是更深入的开展相关研究的前提条件。

(2) 单细胞建模方法和内容有待丰富。个体建模方法思想和工具的引入使得单细胞生长模型更具实际意义, 但大部分研究中随机模型仍是基于传统预测微生物生长模型所建立, 由于细胞分裂机理与群体效应的知识仍较匮乏, 并不能很好地连接个体与群体的关系。建立和丰富单细胞生长模型体系研究值得深入探讨。

(3) 食源性致病菌单细胞危害识别有待细化。现有的食源性致病菌单细胞的研究中, 所涉及到的菌种范围与食品介质范围较窄。对于风险的预估不足通常是出现食品安全问题的原因, 而风险评估工

作的开展首要是对危害进行识别, 在现有研究基础上, 应更多地考虑不同食品微生物低污染量的情况, 如加工不完全及交叉污染等, 以完善风险识别工作。

(4) 基于食源性致病菌单细胞建模方法和思想开展风险评估工作将成为未来的重点研究方向之一。由于在暴露评估阶段更多地考虑了食源性致病菌单细胞的低数量级情况, 以及其随机生长、生长变异等特性, 在后期所获得的风险评估结果具有更广的适用范围, 这无疑丰富了食源性致病菌风险评估的实用性。然而由于目前食源性致病菌单细胞的相关研究并不深入全面, 因此, 进一步提高微生物单细胞研究的实际有效性, 是其与风险评估工作得以结合的要求。

#### 参 考 文 献

- Brehm-Stecher B F. New technologies for imaging and analysis of individual microbial cells[M] // Sharte S L, Frischknecht F. Imaging Cellular and Molecular Biological Functions, Part of the Series Principles & Practice, 2006:313 - 343.
- 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- Uyttendaele M, Troy P D, Debever J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1):75 - 80.
- Francois K, Devlieghere F, Smet K, et al. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 100(1 - 3):41 - 53.
- 郑丽敏, 董庆利, 丁甜, 等. 即食凉拌菜中单增李斯特菌生长模型的建立[J]. 食品科学, 2013, 34(15):22 - 26. Zheng Limin, Dong Qingli, Ding Tian, et al. Predictive modeling of *Listeria monocytogenes* growth in ready-to-eat dishes[J]. Food Science, 2013, 34(15):22 - 26. (in Chinese)
- 董庆利, 高翠, 丁甜, 等. 冷却猪肉中气单胞菌生长预测模型的建立和检验[J]. 生物加工过程, 2012, 10(2):50 - 54. Dong Qingli, Gao Cui, Ding Tian, et al. Establishment and evaluation of predictive model for growth of *Aeromonas* spp. from chilled pork [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2012, 10(2):50 - 54. (in Chinese)
- Baranyi J. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag[J]. Journal of Theoretical Biology, 1998, 192(3):403 - 408.
- Renshaw E. Modelling biological populations in space and time [M]. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1991.
- Cummins E, Frias J M, Valdramidis V P. Modelling at a single cell level[C]. Proceedings of the 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011:41 - 57.
- Kortmann H, Blank L M, Schmid A. Single cell analytics: an overview [J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2010, 124:99 - 122.
- 董庆利, 王忻, 丁甜, 等. 铜绿假单胞菌单细胞与群体细胞生长规律模拟与验证[J]. 农业机械学报, 2014, 45(9):204 - 209. Dong Qingli, Wang Xin, Ding Tian, et al. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* single cells and cell colonies[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(9):204 - 209. (in Chinese)
- Augustin J C, Rosso L, Carlier V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 38(1 - 2):137 - 146.
- Baranyi J, Pin C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2):732 - 736.
- Mckellar R C, Knight K. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 54(3):171 - 180.
- Haven M C, Tetrault G A, Schenken J R. Laboratory instrumentation[M]. New York: John Wiley and Sons, 1994.
- 马秀玲, 陈蕊君, 王飞, 等. 吸光度法快速确定菌悬液浓度及其适用范围[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(4):90 - 92. Ma Xiuling, Chen Ruijun, Wang Fei, et al. Determination of bacterial suspension concentration & the scope of application using absorbance method[J]. Journal of Microbiology, 2014, 34(4):90 - 92. (in Chinese)
- GB 4789.2—2010 食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 2010.
- Wu Y, Griffiths M W, Mckellar R C. A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of

- individual cells of *Listeria monocytogenes*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30(6):468-472.
- 19 Francois K, Devlieghere F, Smet K, et al. Modelling the effect of environmental parameters (temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Horticulturae, 2005, 674:39-48.
- 20 Standaert A R, Francois K, Devlieghere F, et al. Modeling individual cell lag time distributions for *Listeria monocytogenes*[J]. Risk Analysis, 2007, 27(1):241-254.
- 21 Francois K, Valero A, Geeraerd A H, et al. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures[J]. Food Microbiology, 2007, 24(1):32-43.
- 22 Métris A, George S M, Peck M W, et al. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(3):821-827.
- 23 Guillier L, Augustin J C. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(3):241-251.
- 24 George S M, Metris A, Stringer S C. Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(2):204-210.
- 25 Mckellar R C, Hawke A. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(2):169-175.
- 26 Li Y, Odumeru J A, Griffiths M, et al. Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of *Escherichia coli* O157:H7[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 110(3):278-285.
- 27 Dens E J, Bernaerts K, Standaert A R, et al. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag - Part II. Modeling lag phenomena induced by temperature shifts[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101(3):319-332.
- 28 Xu Y Z, Métris A, Stasinopoulos D M, et al. Effect of heat shock and recovery temperature on variability of single cell lag time of *Cronobacter turicensis*[J]. Food Microbiology, 2015, 45:195-204.
- 29 Kelly C D, Rahn O. The growth rate of individual bacterial cells [J]. Journal of Bacteriology, 1931, 23(2):147-153.
- 30 Koutsoumanis K P, Lianou A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7):2294-2301.
- 31 Elfving A, LeMarc Y, Baranyi J, et al. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2):675-678.
- 32 周康, 李平兰. 不同浓度沙门氏菌细胞生长分布规律研究[J]. 食品科学, 2012, 33(13):254-258.  
Zhou Kang, Li Pinglan. Modeling the growth distribution of salmonella at different inoculum levels[J]. Food Science, 2012, 33(13):254-258. (in Chinese)
- 33 董庆利, 王忻. 基于不同初始接菌量的铜绿假单胞菌生长模型[J]. 农业机械学报, 2015, 46(12):1-12.  
Dong Qingli, Wang Xin. Modeling on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* with different inoculum sizes[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(12):1-12. (in Chinese)
- 34 Pin C, Baranyi J. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(3):2163-2169.
- 35 Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level [J]. Library Consortium Management: An International Journal, 2000, 2(12):1523-1535.
- 36 Hansma H G. Varieties of imaging with scanning probe microscopes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(26):14678-14680.
- 37 Pasteris J D, Freeman J J, Goffredi S K, et al. Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria [J]. Chemical Geology, 2001, 180(1):3-18.
- 38 高健, 殷学锋, 方肇伦. 微流控芯片系统在单细胞研究中的应用[J]. 化学进展, 2004, 16(6):975-983.  
Gao Jian, Yin Xuefeng, Fang Zhaolun. Application of microfluidic chip systems for the research of single cell[J]. Progress in Chemistry, 2004, 16(6):975-983. (in Chinese)
- 39 李萍, 温平威, 许恒毅, 等. 流式细胞术在食源致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14):375-379.  
Li Ping, Wen Pingwei, Xu Hengyi, et al. Research progress in application of flow cytometry in detection of foodborne pathogen [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(14):375-379. (in Chinese)
- 40 Mckellar R C. Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(3):407-413.
- 41 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.
- 42 陈晓宇, 朱志强, 张小栓, 等. 食品货架期预测研究进展与趋势[J]. 农业机械学报, 2015, 46(8):192-199.  
Chen Xiaoyu, Zhu Zhiqiang, Zhang Xiaoshuan, et al. Research progress and trend of food shelf life prediction[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(8):192-199. (in Chinese)
- 43 Zastawniak, Brzezniak Z. Basic stochastic processes: a course through exercises [M]. NK: Springer, 1999.

- 44 Huston M, DeAngelis D, Post W. New computer models unify ecological theory[J]. *BioScience*, 1988, 38(10): 682 – 691.
- 45 Grimm V. Ten years of individual-based modelling in ecology: what have we learned and what could we learn in the future? [J]. *Ecological Modelling*, 1999, 115(2): 129 – 148.
- 46 Tack I L M M, Logist F, Impe J F M V. An individual-based modeling approach to simulate the effects of cellular nutrient competition on *Escherichia coli* K-12 MG1655 colony behavior and interactions in aerobic structured food systems [J]. *Food Microbiology*, 2015, 45:179 – 188.
- 47 Ferrer J, Prats C, Lopez D. Individual-based modelling: an essential tool for microbiology [J]. *Journal of Biological Physics*, 2008, 34(1 – 2): 19 – 37.
- 48 Augustin J C, Ferrier R, Hezard B, et al. Comparison of individual-based modeling and population approaches for prediction of foodborne pathogens growth[J]. *Food Microbiology*, 2015, 45:205 – 215.
- 49 Baty F, Delignette-Muller M L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 91(3):261 – 277.
- 50 Baranyi J, Roberts T A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 23(3 – 4):277 – 294.
- 51 Dens E J, Bernaerts K, Standaert A R, et al. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag: part I. The theory of cell division[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(3):303 – 318.
- 52 Baranyi J, George S M, Kotalik Z. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2009, 259(1):24 – 30.
- 53 Alonso A A, Ignacio M, Constantinos T. Modeling bacterial population growth from stochastic single cell dynamics[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2014, 80(17):5241 – 5253.
- 54 Kroese D P, Brereton T, Taimre T, et al. Why the Monte Carlo method is so important today [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2014, 6(6): 386 – 392.
- 55 Métris A, George S M, Mackey B M, et al. Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(22): 6949 – 6955.
- 56 Augustin J C. Single-cell growth probability of *Listeria monocytogenes* at suboptimal temperature, pH, and water activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3:1 – 5.
- 57 Konstantinos K, Angelidis A S. Probabilistic modeling approach for evaluating the compliance of ready-to-eat foods with new European union safety criteria for *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15):4996 – 5004.
- 58 Baranyi J, Pin C. A parallel study on bacterial growth and inactivation[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2001, 210(3):327 – 336.
- 59 Kotalik Z, Razaz M, Baranyi J. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 232(2): 285 – 299.
- 60 Ferrier R, Hezard B, Lintz A, et al. Combining individual-based modeling and food microenvironment descriptions to predict the growth of *Listeria monocytogenes* on smear soft cheese[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5870 – 5881.
- 61 Pouillot R, Miconnet N, Afchain A L, et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon: I. quantitative exposure assessment[J]. *Risk Analysis*, 2007, 27(3): 683 – 700.
- 62 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(2): 236 – 242.
- 63 Ginovart M, López D, Valls J. INDISIM, an individual-based discrete simulation model to study bacterial cultures. [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, 214(2):305 – 319.
- 64 Ginovart M, López D, Valls J, et al. Simulation modelling of bacterial growth in yoghurt [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 73(2 – 3):415 – 425.
- 65 Grijspeerdt K, Kreft J U, Messens W. Individual-based modelling of growth and migration of *Salmonella enteritidis* in hens' eggs [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 100(1 – 3):323 – 333.
- 66 Ferdi L Hellweger, Vanni Bucci. A bunch of tiny individuals—individual-based modeling for microbes[J]. *Ecological Modelling*, 2009, 220(1):8 – 22.