doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.12.033

基于不同初始接菌量的铜绿假单胞菌生长模型*

董庆利'王忻'苏亮'刘箐'

(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)

摘要:基于单细胞生长流动成像系统,探究铜绿假单胞菌单细胞生长规律,并运用随机建模方法建立单细胞与群体 细胞生长之间的关系,获得不同初始接菌量下铜绿假单胞菌生长迟滞时间以及最大生长速率的分布,通过代入 Baranyi 模型修改式,结合单细胞水平建模(Individual-based modeling,IbM)的方法,对不同初始接菌量下铜绿假单 胞菌的随机生长过程进行模拟。结果表明,随着初始接菌量的增大,铜绿假单胞菌生长迟滞期减小,25℃下平均迟 滞时间由 2.91 h 减小至 2.55 h,变异系数由 29.90% 减小至 2.96%,35℃下平均迟滞时间由 1.49 h 减小至 0.99 h, 变异系数由 22.53% 减小至 4.64%。最大生长速率随不同初始接菌量变化不明显,其主要受温度的影响,由 25℃ 下约 0.70 InCFU/h 增加至 35℃下约 1.00 InCFU/h,变异系数变化无明显规律。通过 IbM 模拟群体细胞生长发现, 虽然单细胞的生长具有随机性,但随着初始接菌量的增大,微生物群体细胞生长的变异性逐渐降低,最终呈现出决 定性生长的状态。相较于传统采用确定性模型进行的微生物生长建模,单细胞水平的生长动力学研究可为食品安 全风险评估以及风险决策者提供更加准确与直观的风险指导。

关键词:铜绿假单胞菌 初始接菌量 生长模型 预测微生物学

中图分类号: TS251.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2015)12-0246-07

Modeling on Growth of Pseudomonas aeruginosa with Different Inoculum Sizes

Dong Qingli¹ Wang Xin¹ Su Liang² Liu Qing¹

(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)

Abstract: A single cell growth image system was used to study the growth of *Pseudomonas aeruginosa* single cells. A stochastic modeling process was applied to connect the growth of P. aeruginosa single cells and cell populations, which made it possible to simulate the growth of *P. aeruginosa*. The lag time and specific growth rate distributions with different inoculum sizes were obtained as a result of the simulation's repetitive executions which were further introduced into the reduced Baranyi model for establishing an individual-based model. Then a stochastic growth process of P. aeruginosa was conducted by using Monte Carlo simulation. Results showed that a negative relationship existed between lag time and inoculum size. As the inoculum size increased from 1 cell to 100 cells, the lag time decreased from 2.91 h to 2.55 h at 25°C and from 1.49 h to 0.99 h at 35°C. The coefficient of variation decreased from 29.90% to 2.96% at 25℃ and from 22.53% to 4.64% at 35℃. The specific growth rate was more affective to the temperature changes which increased from 0.70 lnCFU/h at 25 °C to 1.00 lnCFU/h at 35 °C. Meanwhile, the stochastic growth of *P. aeruginosa* with different inoculum sizes demonstrated that the growth of P. aeruginosa showed a determinate tendency as inoculum sizes increasing, in spite of the stochastic growth property of bacterial single cells. Compared with the traditional determinate predictive modelling, studying bacterial population growth from stochastic single cell dynamics opened the door for applications in risk assessment and prediction of shelf life.

Key words: Pseudomonas aeruginosa Inoculum size Growth model Predictive microbiology

收稿日期: 2015-04-21 修回日期: 2015-05-25

^{*}国家自然科学基金资助项目(31271896)、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

引言

传统的预测微生物学研究普遍认为初始接菌量 对微生物的生长没有太大的影响^[1-2]。然而,许多 学者发现微生物处于临界状态,例如饥饿、热处理以 及温差变化等条件下,初始接菌量会对其生长的迟 滞时间造成一定的影响^[3-4]。Augustin 等^[5]通过建 模描述温度与预接种条件对单增李斯特菌生长迟滞 期的影响,发现当细胞处于临界状态时,生长迟滞期 随着初始接菌量减小而相应延长。同样, Pin 等^[6] 通过随机建模的方法探究不同初始接菌量对大肠杆 菌生长迟滞期的影响,发现初始接菌量越小,微生物 生长迟滞时间越长。初始接菌量对微生物生长迟滞 期的影响主要受到单细胞生长变异性的影响。处在 适应生存状态的单细胞在微生物生长初期占据主导 优势,随着适应行为的发生,进入指数增长状态的单 细胞又会逐渐占据主导优势,使微生物生长加速直 到进入指数增长期^[7]。

传统的预测微生物研究常采用大于 10³个/mL 的接菌量,从而忽略了低接菌量下微生物在生长初 期适应生存能力的变异性。对微生物而言,食品是 一个复杂的生存介质,且食品污染往往是由少量细 菌细胞生长繁殖造成的,探究不同初始接菌量下微 生物生长迟滞期,尤其是低接菌量下的生长变异性, 对食品安全监控以及货架期的建立尤为重要。本课 题组在微生物单细胞研究方面已取得一定进展,即 通过随机建模的方法建立了铜绿假单胞菌单细胞与 群体细胞生长之间的关系^[8],本文继续采用先前研 究中随机建模模拟方法,获得不同初始接菌量下铜 绿假单胞菌生长迟滞时间以及最大生长速率分布并 进行拟合。同时运用蒙特卡洛模拟,结合单细胞水 平建模(IbM)的建模方法,模拟不同初始接菌量下 铜绿假单胞菌的随机生长过程。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

实验材料包括:营养肉汤(NB, pH值7.4±0.1),含鱼粉蛋白胨10g、牛肉浸膏3g、NaCl5g、水1000mL;磷酸盐缓冲液(PBS, pH值7.4±0.1),含NaCl8g、KCl0.2g、Na₂HPO₄1.44g、KH₂PO₄0.24g、水1000mL;假单胞菌培养基(pH值7.1±0.1),含多价蛋白胨16g、水解酪蛋白10g、MgCl1.4g、K₂SO₄10g、琼脂14g、甘油10mL、水1000mL,培养基的配制参照文献[9]。

仪器与设备包括:YXQ-LS-75S11型立式压 力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备 厂); THZ - 103B 型恒温培养摇床(上海一恒科学 仪器有限公司); SW - CJ - IC 型净化工作台(上海 跃进医疗器械厂); HWS - 250 型恒温恒湿培养箱 (上海比朗仪器有限公司); HL - 2 型恒流泵(上海 嘉鹏科技有限公司); BX41TF - 5 型生物显微镜(日 本奥林巴斯株式会社); Nikon DS - Fi1 型显微镜数 码摄像头(日本奥林巴斯株式会社); Nikon DS - U2 型 CCD 计算机端控制器(日本奥林巴斯株式会 社)。

1.2 菌悬液制备

铜绿假单胞菌分离自市售冷鲜猪肉,于4℃冰箱中储存。实验时进行平板划线,在27℃下活化3次。取一环菌苔接种于100 mL的磷酸盐缓冲液(PBS)中混匀制得PBS菌悬液备用。另取一环菌苔接种于300 mL营养肉汤培养基(NB)中,使用恒温培养摇床,35℃下220 r/min培养18 h使菌液菌体浓度约达到10⁸个/mL备用。

1.3 单细胞生长流动成像系统搭建

单细胞生长流动成像系统搭建参照文献[8]。

1.4 铜绿假单胞菌生长随机建模与迟滞期分布

采用单细胞生长流动成像系统,分别对 25℃和 35℃下约 30 个铜绿假单胞菌单细胞进行培养观察, 记录单细胞前 4 次生长分裂时间,并对铜绿假单胞 菌生长进行随机建模,模拟群体细胞生长,建模方法 参照文献[8]。

先前的研究表明,随机建模模拟铜绿假单胞菌 群体细胞生长的方法可以实现对低接菌量下微生物 生长的模拟预测。故继续采用随机建模的模拟方法 对不同初始接菌量下铜绿假单胞菌生长迟滞期进行 探究。通过编写的 Java 应用程序,对 25℃和 35℃ 下,初始接菌量为 1、10、100 个铜绿假单胞菌生长至 10⁵个分别进行 50 次模拟,采用 Excel – in DMFit 2.0 对 模拟结果进行拟合,拟合模型选用 Baranyi 模型^[10], 表达式为

$$N_{t} = N_{0} + \mu_{\max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\max}A(t) - 1}}{e^{N_{\max} - N_{0}}}\right)$$
(1)

式中 N_t、N₀、N_{max}——时间 t 时细菌细胞数、初始时 细菌细胞数、最大细菌细胞

μ_{max}——最大生长速率

h₀——微生物生理学参数

对 50 条生长曲线进行拟合获得的铜绿假单胞 菌生长迟滞期及最大生长速率分布、迟滞期分布结 果采用 OriginPro 8.0 软件做图。

1.5 铜绿假单胞菌生长参数拟合

采用 Excel – in @ Risk 5.5 软件(美国 Palisade 公司)对由随机建模获得的迟滞期和最大生长速率 分布进行拟合,通过卡方检验(χ^2)^[11],获得迟滞期 与最大生长速率的最优分布,卡方检验公式为

$$\chi^{2} = \sum_{1}^{k} \frac{(f_{0} - f_{e})^{2}}{f_{e}}$$
(2)

式中 k——类别数目

f₀——实际观测值

f,----理论(期待)值

1.6 铜绿假单胞菌随机生长模拟

Baranyi 等^[10]认为微生物的迟滞时间是细胞之前与现生长状态共同作用的结果,并采用生理学状态参数 $\alpha(t)$ 来定量表示微生物适应现在生存环境的现象,参数 h_0 与 $\alpha(t)$ 的关系为

$$h_0 = -\ln\alpha(0) \tag{3}$$

而参数 h₀在数值上等于迟滞期 λ 与最大生长 速率的乘积,即

$$h_0 = \mu_{\max} \lambda \tag{4}$$

将 μ_{max} 和 λ 的最优分布代入式(4),获得 h_0 最优分布,然后将拟合后这3个参数的最优分布代入 Baranyi 模型修改式^[12],模型表达式为

$$N_{t} = N_{0} + \mu_{\max}t + \ln(e^{-\mu_{\max}t} + e^{-h_{0}} - e^{-\mu_{\max}t - h_{0}}) \quad (5)$$

其中时间 *t* 为 Uniform (0,8) 分布。采用蒙特卡罗 方法对 *N*_{*i*}与 *t* 进行 10 000 次迭代模拟,并对 *N*_{*i*}与 *t* 进行相关性分析,获得不同初始接菌量下铜绿假单 胞菌的随机生长分布图,分析与做图均采用@ Risk 5.5 软件。

1.7 铜绿假单胞菌生长变异性

为了更好地展现初始接菌量对铜绿假单胞菌生 长变异性的影响,对生长 8 h 后铜绿假单胞菌细胞 总数(*N*_{sh})的分布进行 拟合与比较, 拟合采用 @ Risk 5.5 软件。不同初始接菌量下生长 8 h 后铜 绿假单胞菌细胞总数的最优分布及变异系数采用 Excel 做图。

2 结果与分析

2.1 不同初始接菌量下铜绿假单胞菌生长迟滞期 分布

对 25℃和 35℃下,初始接菌量为 1、10、100 个 铜绿假单胞菌生长至 10⁵个细菌细胞的过程分别进 行 50 次模拟,并采用 Baranyi 模型进行拟合,获得铜 绿假单胞菌生长迟滞期及最大生长速率分布,迟滞 期分布结果如图 1 所示。由图 1 可知,迟滞期随着 初始接菌量的增大呈递减趋势,且分布范围也随初 始接菌量增大而减小,具体分布参数见表 1。



Fig. 1 Lag time distributions of *P. aeruginosa* with different inoculum sizes

(a) 25℃ (b) 35℃

表 1 不	同初始接菌量	下铜绿假单胞菌	50 次模拟生	长曲线拟合	参数
-------	--------	---------	---------	-------	----

Tab. 1 Fitted growth parameters of P. aeruginosa for 50 simulations with different inoculum sizes

温度/ ℃	初始 一 接菌量/个	迟滞期 λ		最大生长速率 μ_{max}			
		平均值/	标准偏差/	变异系数/	平均值/	标准偏差/	变异系数/
		h	h	%	$(\ln CFU \cdot h^{-1})$	$(\ln CFU \cdot h^{-1})$	%
25	1	2.91	0.87	29.90	0.76	7. 59 $\times 10^{-3}$	0. 999 3
	10	2.74	0.20	7.25	0.80	6. 14 × 10 $^{-3}$	0.7715
	100	2.55	0.08	2.96	0.77	4. 17 × 10 $^{-3}$	0.5410
35	1	1.49	0.34	22. 53	0.99	1.56 $\times 10^{-2}$	1.5690
	10	1.24	0.09	7.20	1.02	9. 30 × 10 $^{-3}$	0.9151
	100	0.99	0.05	4.64	0.96	1. 20 × 10 $^{-2}$	1.2460

表1列出了不同初始接菌量下铜绿假单胞菌模 拟生长分布的拟合参数,随着初始接菌量的增大, 25℃下平均迟滞时间由 2.91 h 减小至 2.55 h,变异 系数由 29.90% 减小至 2.96%,35℃下平均迟滞时 间由 1.49 h 减小至 0.99 h,变异系数由 22.53% 减 小至4.64%。即在初始接菌量小于100个细菌细 胞时,随着接菌量增大,铜绿假单胞菌生长迟滞期减 小。与本研究结论相符,Baranyi^[13]通过比较随机模 型与决定性模型对微生物生长迟滞期的拟合效果, 认为低接菌量下微生物群体细胞生长迟滞期分布会 更加分散。Pin 等^[6]和 Baranyi 等^[14]对初始接菌量 影响微生物生长迟滞期的研究结果表明,当初始接 菌量减少,微生物生长迟滞期增加,目增加的数量取 决于单细胞生长迟滞期以及最大生长速率,同时,随 着初始接菌量的增加,微生物生长迟滞期的变异性 减小。

Aguirre 等^[15]对无害李斯特菌生长迟滞期与变 异性的研究表明,生长迟滞期与微生物初始接菌量 以及生长温度呈反比,且初始接菌量对生长迟滞期 的影响既有随机性因素又有微生物生理本身的因素。与此类似,本研究中35℃下铜绿假单胞菌生长迟滞时间明显小于25℃(表1)。最大生长速率随不同初始接菌量变化不明显,其主要受温度的影响,25℃下约0.70 lnCFU/h,35℃下约1.00 lnCFU/h,变异系数变化无明显规律。由于铜绿假单胞菌最适生长温度约为35~37℃^[16],故在35℃下,铜绿假单胞菌的生长迟滞期比25℃短,最大生长速率比25℃下大。

2.2 铜绿假单胞菌生长参数分布拟合

对不同初始接菌量下铜绿假单胞菌生长迟滞时 间与最大生长速率分布进行拟合获得最优分布,如 表 2 所示。分布函数为 BetaGeneral (γ_1 , γ_2 , min, max)、Extvalue (a, b)、Logistic (γ , δ)、Weibull (γ , δ)、Lognorm (ε , σ)、Normal (ε , σ)、Loglogistic (min, δ , α)、Pearson5(γ , δ)。其中,参数 γ 、 γ_1 、 γ_2 为尺度 参数, δ 为形状参数, ε 为分布平均值, σ 为分布标准 偏差,min 为分布最小值,max 为分布最大值,a、b为 分布所在的闭合区间的边界值。

表 2 不同初始接菌量下铜绿假单胞菌模拟生长参数最优分布

Tab. 2 Best-fitted growth parameters distributions of P. aeruginosa with different inoculum sizes

温度/℃	初始接菌量/个	迟滞期λ分布	最大生长速率 μ_{max} 分布	h_0 分布
	1	BetaGeneral (3. 95, 6. 38, 0. 56, 6. 68)	Extvalue(0.76, 0.00536)	BetaGeneral (3. 97, 6. 46, 0. 43, 5. 10)
25	10	Extvalue(2.64,0.18)	Logistic (0.80, 0.00347)	Logistic(0.80, 0.00347)
	100	Logistic(2.56,0.04)	Normal(0.77, 0.00426)	Logistic (1.97,0.03)
	1	Weibull(10.40,3.04)	Lognorm (0. 23, 0. 02)	Weibull(9.91,2.90)
35	10	Logistic(1.25,0.05)	BetaGeneral(2.59,2.33,0.99,1.04)	Logistic (1. 27, 0. 05)
	100	Lognorm(0.07,0.05)	Loglogistic (0.95, 0.008 41, 2.77)	Pearson5(6.23,0.49)

2.3 铜绿假单胞菌的随机生长过程

将表 2 中各参数最优分布相应代入式(5)获得 不同初始接菌量下铜绿 假单胞菌生长细胞总数 (*N_i*)分布,通过与时间 *t* 进行相关性分析,获得不同 初始接菌量下铜绿假单胞菌随机生长过程图,如 图 2 所示。

由图 2 可以看出,在 25 ℃ 和 35 ℃ 下,铜绿假单 胞菌随着初始接菌量的增加均呈现集中生长的趋势。Koutsoumanis 等^[17]通过对沙门菌单细胞随机生 长的研究也得出了类似的结论,虽然单细胞的生长 具有随机性,但随着初始接菌量的增大,微生物生长 的变异性逐渐降低,最终呈现出决定性生长的状态。

2.4 铜绿假单胞菌生长变异性

为了更好地展现初始接菌量对铜绿假单胞菌生 长变异性的影响,对生长8h后铜绿假单胞菌细胞 总数(N_{sh})的分布进行拟合,如图3所示。由图3可 以看出,随着初始接菌量的增加,N_{sh}分布数值增大, 分布范围变窄,且其相关变异系数减小,生长变异性 降低。与此类似, Alonso 等^[18]通过建立随机微分方程(Stochastic differential equation, SDE)模型来描述单细胞生长与分裂的变异性,并通过模拟群体细胞生长发现, 初始接菌量增大, 群体细胞生长变异性降低。

3 讨论

3.1 初始接菌量对微生物生长迟滞期的影响

由图 1 可以看出,初始接菌量对铜绿假单胞菌 生长迟滞期有影响,而这种影响在特定条件下才会 产生,这个条件就是低初始接菌量,即小于 100 个细 菌细胞。Pin 等^[6]探究初始接菌量对微生物生长迟 滞期的影响也得出类似的结论,并认为群体细胞生 长迟滞期主要受到单细胞生长迟滞时间的影响。许 多研究表明,高接菌量下微生物生长迟滞期随初始 接菌量变化是因为细菌细胞处在生长与不生长的边 缘、饥饿或者受到热处理的结果^[3,19]。Kaprelyants 等^[20]对初始接菌量影响微生物生长迟滞期的原因





(a) 25℃下铜绿假单胞菌生长8h后细胞总数的变异性
(c) 35℃下铜绿假单胞菌生长8h后细胞总数的变异性

进行了研究,认为当细菌群体细胞数目较大时,产生 的生长信号物质较多,从而导致单细胞可以很快接 受到信号分子开始生长分裂;相反,如果群体细胞的 初始数目少,则需要更多的时间去合成并释放信号 分子继而开始生长繁殖。同时,细胞与细胞之间的 交流可以降低生长迟滞时间,且这种交流取决于初 始细胞浓度以及单细胞之间的接近程度。

(b) 25℃下铜绿假单胞菌生长 8 h 后细胞总数的变异系数
(d) 35℃下铜绿假单胞菌生长 8 h 后细胞总数的变异系数

3.2 微生物生长迟滞期预测

很多研究都提到微生物生长迟滞期比最大生长 速率更难准确预测^[21-23],这是由于迟滞期不仅取决 于细胞当前的生长环境,还受到之前的生存环境与 状态的影响^[10]。由于每个生长模型都有其判断曲 线进入指数增长期的标准^[24],数据点数目越多,尤 其是处在迟滞期与指数增长期之间的数据点数目越 多, 拟合所得的迟滞期越精确^[25]。Baranyi 等^[26] 对 不同初始接菌量下微生物生长参数进行估计也得出 了类似的结论, 认为单细胞生长迟滞期变异性的准 确估计依赖于准确获取处在检测水平的细胞个数。 传统平板计数法或 OD 值比浊法预测微生物生长曲 线的方法无法获得足够量的生长点, 因而对迟滞期 的拟合结果也存在较大误差, 而结合单细胞生长数 据进行随机建模, 通过概率分布的形式获得微生物 生长迟滞期, 兼顾单细胞生长的变异性与不确定性, 较传统点估计的方法准确可靠。

3.3 微生物生长参数最优分布拟合

本试验中,对铜绿假单胞菌单细胞的分裂时间 进行最优分布拟合,是进行单细胞水平建模以及随 机生长模拟的必要条件,通过拟合,将分裂时间分布 整合为建模的单元变量,继而进行蒙特卡罗模拟,可 反映接近真实情况的概率分布情况。将拟合后的分 布代入预测模型中,考虑了输入量的各种可能性,并 推测输出量可能遵循的可能性^[27],由此获得铜绿假 单胞菌随机生长的过程。

探究微生物生长迟滞期以及生长变异性对于食品微生物定量风险评估至关重要^[28],由于食品污染常由少量微生物生长繁殖造成,从预防和降低食品安全风险的角度出发,对低接菌量下微生物生长迟滞期以及变异性进行监控,能够实现在真正引发食

品腐败变质的状态之前就对其风险进行预警,从而 及时有效地控制食品中有害微生物的生长与繁殖。 相较于传统的采用确定性模型预测微生物生长建 模,IbM 的建模方法能够有效利用单细胞生长数据, 并以概率分布的形式,对不同初始接菌量下铜绿假 单胞菌的随机生长过程进行展示,为食品安全风险 评估以及风险决策者提供更加准确与直观的风险指 导。

4 结论

(1)运用随机建模模拟群体细胞生长的方法, 获得不同初始接菌量下铜绿假单胞菌生长迟滞时间 以及最大生长速率分布,表明随着初始接菌量的增加,铜绿假单胞菌生长迟滞期减小,而最大生长速率 随不同初始接菌量变化不明显,其主要受温度的影响,即温度越高,最大生长速率越大。

(2)对模拟获得的生长迟滞期和最大生长速率 分布进行拟合,并运用蒙特卡罗模拟,结合 IbM 的 建模方法,模拟不同初始接菌量下铜绿假单胞菌的 随机生长过程。同时,通过对铜绿假单胞菌生长 8 h 后细胞总数的变异性进行探究表明,虽然单细胞的 生长具有随机性,但随着初始接菌量的增大,微生物 群体细胞生长的变异性逐渐降低,最终呈现出决定 性生长的状态。

参考 文 献

- 1 Buchanan R L, Phillips J G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Food Protection, 1990, 53: 370-376.
- 2 Duffy G, Sheridan J J, Buchanan R L, et al. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of Listeria monocytogenes in selective enrichment broths [J]. Food Microbiology, 1994, 11(5):429-438.
- 3 Gay M, Cerf O, Davey K R. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of Listeria monocytogenes at 14°C [J]. Journal of Applied Microbiology, 1996, 81(4):433-438.
- 4 Stephens P J, Joynson J A, Davies K W, et al. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured Salmonella cells [J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 83(4):445-455.
- 5 Augustin J C, Rosso L, Carlier V. A model describing the effect of temperature history on lag time for Listeria monocytogenes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 57(3): 169-181.
- 6 Pin C, Baranyi J. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 2163-2169.
- 7 Malakar P K, Barker G C. Estimating risk from small inocula by using population growth parameters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6399 6401.
- 8 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)
- 9 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995:179-181.
- 10 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.
- 11 Karl P. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling [J]. Philosophical Magazine Series 5, 1990, 50 (302): 157 175.

- 12 Baranyi J, Roberts T A. Mathematics of predictive microbiology [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26(2): 199-218.
- 13 Baranyi J. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag [J]. Journal of Theoretical Biology, 1998, 192(3): 403-408.
- 14 Baranyi J, George S M, Kutalik K Z. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times [J]. Journal of Theoretical Biology, 2009, 259(1): 24 - 30.
- 15 Aguirre J S, González A, Özçelik N, et al. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 164(1): 60-69.
- 16 Chris T D O B. Evaluation of the impact of short-term temperature abuse on the microbiology and shelf life of a model ready-to-use vegetable combination product [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 59(1-2): 47-57.
- 17 Koutsoumanis K P, Lianou A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2294 2301.
- 18 Alonso A A, Molina I, Theodoroopoulos C. Modeling bacterial population growth from stochastic single-cell dynamics [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(17): 5241 - 5253.
- 19 Pascual C, Robinson T P, Ocio M J, et al. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria* monocytogenes to initiate growth under suboptimal conditions [J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(5): 357-361.
- 20 Kaprelyants A S, Kell D B. Do bacteria need to communicate with each other for growth [J]. Trends in Microbiology, 1996, 4(6): 237-242.
- 21 Davey K R. Review of predictive microbiology—theory and application, by T. A. McMeekin, J. N. Olley, T. Ross and D. A. Ratkowsky[J]. Food Microbiology, 1994,11(1):85-86.
- 22 Swinnen I A M, Bernaerts K, Dens E J J, et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(2): 137-159.
- 23 Niven G W, Fuks T, Morton J S, et al. A novel method for measuring lag times in division of individual bacterial cells using image analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(2): 311-317.
- 24 Mckellar R C, Lu X. 食品预测微生物学 [M]. 董庆利,译. 上海:上海理工大学出版社, 2008:27-38.
- 25 Swinnen I A, Bernaerts K, Gysemans K, et al. Quantifying microbial lag phenomena due to a sudden rise in temperature: a systematic macroscopic study [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 100(1-3): 85-96.
- 26 Baranyi J, Pin C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 732-736.
- 27 董庆利, 王忻, 王海梅, 等. 冷却猪肉中气单胞菌暴露评估的不确定性和变异性 [J]. 食品科学, 2014, 35(15): 21-24. Dong Qingli, Wang Xin, Wang Haimei, et al. Uncertainty and variability of quantitative exposure assessment of *Aeromonas spp*. in chilled pork [J]. Food Science, 2014, 35(15): 21-24. (in Chinese)
- 28 Baranyi J, Roberts T A. Mathematics of predictive microbiology [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26(2): 199 - 218.