

DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA-PIEŃKOWSKA

## ZAŁOŻENIA, ZASADY I PRZYSZŁOŚĆ PROGNOZOWANIA MIKROBIOLOGICZNEGO

### Streszczenie

W publikacji przedstawiono główne zasady modelowania matematycznego w mikrobiologii żywności. Omówiono przykładowe modele prognostyczne wzrostu, inaktywacji i przeżywalności drobnoustrojów. Ustosunkowano się także do zastrzeżeń zgłaszanych w stosunku do istniejących modeli mikrobiologicznych i realnych możliwości ich praktycznego zastosowania.

*„Wszystkie modele są złe,  
praktycznym pytaniem jest jak bardzo złe muszą być  
aby stać się bezużytecznymi”*

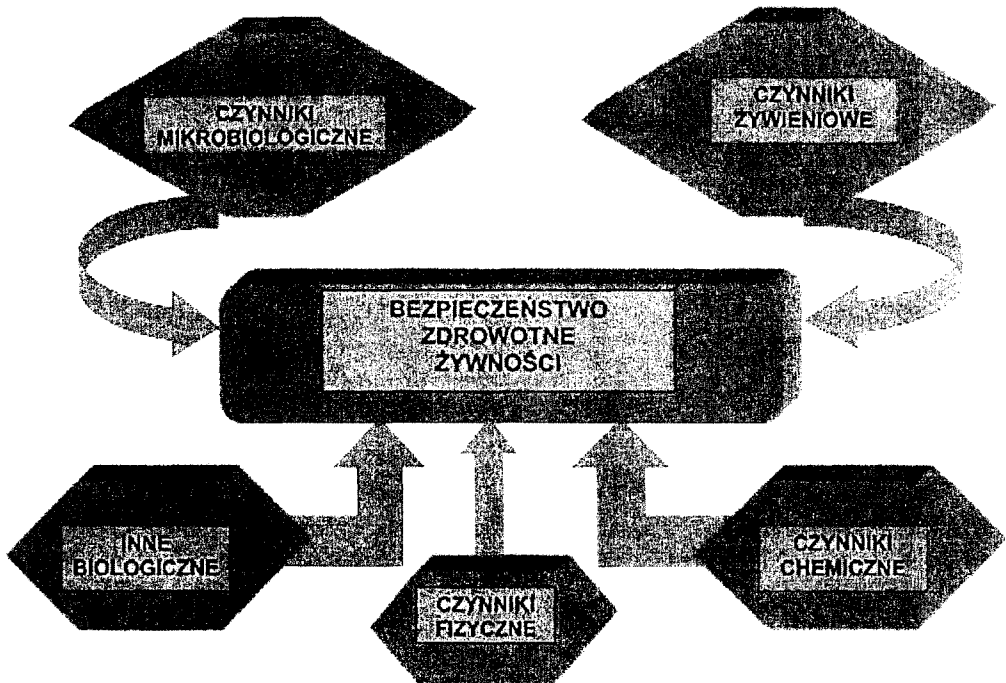
Box i Draper, 1987

### Wprowadzenie

Bezpieczeństwo zdrowotne żywności zależy od wielu czynników biologicznych (w tym mikrobiologicznych), chemicznych, fizycznych i żywieniowych (Rys. 1). Metale toksyczne, pozostałości pestycydów, azotany i inne zanieczyszczenia chemiczne, a także fizyczne są traktowane jako potencjalne zagrożenie zdrowia, ale istnieje całkowita zgodność, że główne, najważniejsze zagrożenia to przede wszystkim nie zbilansowane żywienie oraz skażenia mikrobiologiczne [5].

Wzrost drobnoustrojów w produkcji żywnościowym uwarunkowany jest składnikami odżywczymi potrzebnymi do ich rozwoju i panującymi w żywności warunkami. Na wzrost mikroorganizmów w żywności, a tym samym na trwałość, wpływa wiele czynników (Rys. 2) wewnętrznych ( $a_w$ , pH, potencjał redox i in.), zewnętrznych (temperatura przechowywania, atmosfera gazów, wilgotność względna i in.) czy produkcyjnych (suszenie, dodatek substancji konserwujących i in.) [39].

Wiedza jaką obecnie dysponujemy, dotycząca wzrostu, przeżywalności i śmierci mikroorganizmów chorobotwórczych i saprofitycznych pochodzących z żywności, może być zastosowana do identyfikacji potencjalnego zagrożenia mikrobiologicznego, w poszczególnych produktach żywnościowych. Celowi temu służy mikrobiologia prognostyczna („predictive microbiology”) czyli przewidywanie czy prognozowanie w mikrobiologii. Nazwa polska - mikrobiologia prognostyczna - zaproponowana została przez prof. Ilnicką-Olejniczak w 1994 r. [21].

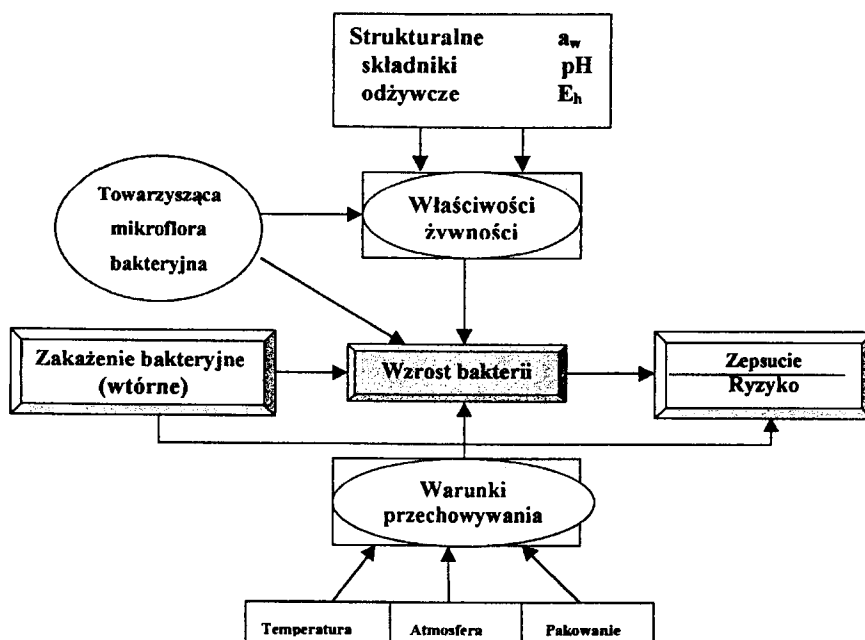


Rys. 1. Czynniki bezpieczeństwa zdrowotnego żywności.

Fig. 1. Factors of food safety.

Mikrobiologia prognostyczna żywności jest oparta na założeniu, że reakcja populacji mikroorganizmów na czynniki środowiskowe jest powtarzalna i że przez określenie tych czynników, jest możliwe, na podstawie dokonanych w przeszłości badań, określenie potencjalnego rozwoju lub inaktywacji mikroorganizmów. W każdym środowisku znaleźć można skończoną liczbę czynników wpływających na fizjologiczne reakcje mikroorganizmów. Teoretycznie, ogromna liczba czynników wpływających na wzrost bakterii w żywności może być określona, tak że możliwe jest uzyskanie specyficznych informacji, dotyczących charakterystyk wzrostu poszczególnych mikroorganizmów w każdym produkcie żywnościowym. Jeśli zostanie określona reakcja mikro-

organizmów na te czynniki, możliwe będzie przewidywanie ich zachowania w żywności. Modele włączają takie czynniki, jak: temperatura, pH, aktywność wody ( $a_w$ ), zawartość azotynu sodu czy kwasów organicznych oraz skład atmosfery (tlenowa, modyfikowana czy próżniowa). Na podstawie zebranych w kontrolowanych warunkach danych, formułowane są zależności matematyczne, określające wpływ i interakcje poszczególnych zmiennych [10, 35].



Rys. 2. Wpływ różnych czynników na wzrost mikroorganizmów w żywności. Źródło: [39].

Fig. 2. Effect of various factors on microbial growth in food.

Pozwala to na wyjaśnienie wielu zachowań mikroorganizmów w żywności, a przez monitorowanie wymienionych parametrów istnieje możliwość określenia jakości produktu i jego stanu sanitarnego. Zrozumienie zachowania się populacji drobnoustrojów podczas procesu produkcyjnego i magazynowania, dzięki wykorzystaniu odpowiednich zależności matematycznych pomiędzy wzrostem drobnoustrojów, a warunkami zewnętrznymi, umożliwi precyzyjne określenie ich przeżywalności i wzrostu [11, 22, 26, 29, 35].

Zastosowanie modelowania matematycznego w mikrobiologii żywności nie jest nowe. Przykładem może być obliczanie oporności cieplnej mikroorganizmów i czasów procesów cieplnego utrwalania żywności (pasteryzacja, sterylizacja). Prace w dziedzi-

nie termobakteriologii zostały zapoczątkowane już w 1895 roku przez Russela, który wyizolował z konserwowanego groszku bakterie powodujące psucie się konserw i zaproponował przedłużenie czasu sterylizacji. Teoretyczne podwaliny produkcji konserw tworzył Bigelow, który w latach 1917 – 1921 wyznaczył oporność cieplną przetrawników i obliczył niezbędne parametry sterylizacji. Dalsze prace w tej dziedzinie były prowadzone przez Esty'ego, Meyer'a, Ball'a i znacznie później Stumbo i doprowadziły do dobrego poznania procesów cieplnego wyjaławiania, tak że konserwy wytwarzane przemysłowo stały się produktem o najmniejszym chyba prawdopodobieństwie wystąpienia zatrucia bakteryjnego [36]. Modele cieplnej inaktywacji mikroorganizmów były prekursorami mikrobiologii prognostycznej.

Modelowanie matematyczne było i jest także szeroko stosowane w przemyśle fermentacyjnym [11, 18].

Ponowne zainteresowanie prognozowaniem w mikrobiologii, w ostatnich latach spowodowane było między innymi coraz większym zainteresowaniem żywnością chłodzoną, jak najmniej przetworzoną i precyzyjnym wyznaczaniem jej okresu trwałości, rozwojem kombinowanych metod utrwalania żywności czy rozwojem komputeryzacji, ale przyczyną najważniejszą, była potrzeba zapewnienia odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego w produkcji żywności. Obecnie jest to najintensywniej rozwijająca się subdyscyplina mikrobiologii żywności. Kierunek rozwoju tej nowej dziedziny mikrobiologii, ustalony został po raz pierwszy na konferencji zorganizowanej pod auspicjami Towarzystwa Mikrobiologii Przemysłowej (Society for Industrial Microbiology), 12-15 kwietnia 1992 roku w Tampie na Florydzie. Zgromadziła ona mikrobiologów, technologów żywności, matematyków i statystyków z 15 krajów.

### **Zasady mikrobiologii prognostycznej**

Zazwyczaj modelowanie opiera się na technikach regresji liniowej i nieliniowej i dane dotyczące wzrostu oraz parametry modelu dopasowywane są do równania przy użyciu różnych algorytmów [32]. Wszystkie modele muszą być upraszczane, gdyż reprezentują skomplikowany i rozbudowany kompleks biochemicznych procesów zachodzących podczas wzrostu komórki i nie są w stanie przewidzieć wszystkich interakcji, jakie zachodzą pomiędzy komórką mikroorganizmu, a czynnikami środowiska w produkcie [24]. Muszą być one uproszczone do rozsądnej liczby wyjściowych parametrów. Parametry te muszą być łatwo mierzalne podczas wzrostu (np. temperatura czy pH) albo znane przed rozpoczęciem doświadczenia (np. poziom NaCl, zawartość białek czy tłuszczu). Model musi być jednocześnie na tyle złożony aby dokładnie przewidywać i na tyle prosty, aby być użytecznym, co sprawia, że żaden model nie jest najlepszy w przypadku różnych sytuacji [7, 43].

W 1983 roku na sympozjum Society for Applied Bacteriology komisja złożona z trzydziestu ekspertów z dziedziny mikrobiologii żywności stwierdziła, że oszacowanie przydatności do spożycia produktów spożywczych przy zastosowaniu komputerowych programów wzrostu bakterii ma 80% szansę wykorzystania na szeroką skalę do 1993 roku, czego jednak nie osiągnięto. Od tego czasu w pracach związanych z opracowywaniem modeli prognostycznych bierze udział wielu naukowców. Większość funduszy była wykorzystywana na prowadzenie badań głównie w USA i Wielkiej Brytanii, a także w Australii i innych krajach Europy.

Modele prognostyczne mogą być ogólnie podzielone na :

- modele wzrostu mikroorganizmów,
- modele inaktywacji,
- modele zbiorcze.

### Modele wzrostu drobnoustrojów

Drobnoustroje rozwijają się w środowisku zgodnie z krzywą wzrostu, w której po fazie przygotowawczej, następuje faza wzrostu logarytmicznego, a następnie faza wzrostu stacjonarnego i ostatnia – faza zamierania. Reakcje populacji bakteryjnej określa się dla potrzeb mikrobiologii prognostycznej jako zmianę czasu trwania lag fazy, czasu generacji, czasu potrzebnego do osiągnięcia danej gęstości lub jako współczynnik szybkości właściwej wzrostu. W ostatnich latach powstało wiele modeli pierwotnych do opisu krzywych wzrostu mikroorganizmów, zarówno w systemach modelowych, jak i w żywności. Modele te pozwoliły na obiektywne wyrażenie krzywych wzrostu w postaci wzorów matematycznych. Szczególnie istotne było wykorzystanie różnorodnych zależności sigmoidalnych, takich jak krzywe logistyczne i Gompertz'a [11]. Równanie Gompertz'a jest najczęściej używanym modelem pierwszorzędowym dla opisu wzrostu mikrobiologicznego [1].

Wzór Gompertz'a jest czteroparametrową funkcją opisującą asymetryczną krzywą sigmoidalną [9]:

$$L_t = A + Ce^{-e^{-B(t-M)}}$$

gdzie:

- $L_t$  – log liczby bakterii w czasie  $t$  (w godz.) [ $\log(\text{cfu/ml})$ ],
- $A$  – asymptotyczny log liczby bakterii przy nieoznaczonym spadku czasu (w przybliżeniu odpowiada log początkowej ilości bakterii) [ $\log(\text{cfu/ml})$ ],
- $C$  – asymptotyczna wielkość wzrostu, która następuje przy nieoznaczonym wzroście czasu (ilość log cykli wzrostu) [ $\log(\text{cfu/ml})$ ],
- $M$  – czas, w którym absolutna szybkość wzrostu jest maksymalna [h],
- $B$  – relatywna szybkość wzrostu w czasie  $M$  [ $\{\log(\text{cfu/ml})\}/h$ ].

Cztery parametry tego wzrostu mogą zostać matematycznie przyrównane do charakterystyk kultur mikrobiologicznych znanych mikrobiologom:

Wykładnicza szybkość wzrostu:

$$\mu = BC/e \{ \log(\text{cfu/ml}) \} / h$$

Czas generacji:

$$GT = (\log 2)e/BC \text{ [h]}$$

Czas trwania lag fazy:

$$\lambda = M - (1/B) \text{ [h]}$$

Maksymalna gęstość populacji:

$$MPD = A + C \text{ [log(cfu/ml)]}$$

W związku z tym, wzór Gompertz'a może być przekształcony używając parametrów szybkości wzrostu i czasu trwania lag fazy, gdzie właśnie czas trwania lag fazy jest niezmiernie ważny dla całego cyklu życiowego komórki, gdyż jest to proces przemian adaptacyjnych komórki bakteryjnej przystosowującej się do nowych warunków środowiska [4, 16, 45]. Wzór Gompertz'a może być stosowany we współpracy z odpowiednim, przystosowanym do krzywych, oprogramowaniem (Food MicroModel czy Pathogen Modeling Program) [25].

Sprawą znacznie trudniejszą jest prognozowanie wzrostu drobnoustrojów w rzeczywistym produkcie żywnościowym, ponieważ jego dynamika zależy od wielu zmiennych, takich jak: charakter jakościowy i ilościowy początkowej mikroflory produktu, temperatura, pH, aktywność wody, dostępność tlenu, poziom CO<sub>2</sub>, stężenie substancji konserwujących, zawartość witamin i aminokwasów egzogennych [38]. Dodatkowo, na kinetykę wzrostu mikroorganizmów mają wpływ: kwasowość, wilgotność, dostępność składników odżywczych, obecność substancji antymikrobiologicznych [9, 25].

Różnorodne modele, opracowane dla opisu wzrostu bakterii pochodzących z żywności, mogą być sklasyfikowane w dwóch głównych grupach: modele oparte na prawdopodobieństwie i modele kinetyczne. Wybór metody zależy od typu branej pod uwagę bakterii i wpływu jej wzrostu na bezpieczeństwo produktu. Modele oparte na prawdopodobieństwie są zwykle stosowane w przypadku bakterii przetrwalnikujących, szczególnie *Clostridium botulinum*, w przypadku których nawet najmniejszy wzrost jest niebezpieczny. Modele kinetyczne opracowywano częściej dla nie przetrwalnikujących patogenów, szczególnie tych które stają się niebezpieczne dopiero po przekroczeniu pewnego progu wzrostu [10].

Modele kinetyczne są zależnościami czasowo-temperaturowymi. Przy konstrukcji tego typu modeli stosuje się zwykle dwa rodzaje postępowania:

- badanie szybkości wzrostu mikroorganizmów co jest następnie wykorzystywane do prognozowania opartego na wykładniczym wzroście populacji,
- dopasowywanie funkcji sigmoidalnych do obserwowanej krzywej wzrostu populacji i modelowanie wpływu czynników środowiska na wartość parametrów tej krzywej.

W obu przypadkach konstrukcja modeli jest dokonywana przez określenie wzrostu pewnej liczby mikroorganizmów, przy poszczególnych poziomach kombinacji czynników, tak aby uzyskać informacje dotyczące czasu generacji, długości lag fazy, szybkości wzrostu i maksymalnej gęstości populacji.

Wśród modeli kinetycznych wyróżnia się cztery główne rodzaje: modele Bełehrádek'a lub modele „pierwiastka kwadratowego”, modele Arrhenius'a, modele Davey'ego (zmodyfikowane modele Arrhenius'a), modele wielomianowe lub „powierzchni odpowiedzi”.

Przykładem modelu opartego na wzorze Bełehrádek'a jest zależność Ratkowsky'ego określająca wpływ temperatury na wzrost mikroorganizmów [10, 11]:

$$(k)^{0,5} = b(T - T_{\min})$$

gdzie:

- k – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,
- b – współczynnik estymowany (nachylenie linii regresji),
- T – temperatura inkubacji [K],
- $T_{\min}$  – zanotowana minimalna temperatura wzrostu [K].

Podstawą modeli Arrhenius'a stosowanych w prognostycznej mikrobiologii żywności jest klasyczny wzór Arrhenius'a:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT$$

gdzie (w przypadku zastosowania do wzrostu mikroorganizmów):

- k – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,
- A – parametr do określenia,
- R – stała gazowa ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),
- T – temperatura inkubacji [K],
- $E_a$  – energia aktywacji.

Modelowanie wpływu temperatury przy wykorzystaniu prostego wzoru Arrhenius'a jest odpowiednie tylko w zakresie temperatury wzrostu organizmów. Modyfikacje tego wzoru związane były z rozszerzeniem zastosowania dla niskich i wysokich

temperatur. Powstało wiele modeli opartych na wzorze Arrhenius'a, z których najbardziej znanymi są: nie-liniowy wzór Arrheniusa-Schoolfielda i liniowy wzór Arrheniusa-Davey'a [10, 11].

Davey [13] zmodyfikował typowy wzór Arrhenius'a do modelowania wpływu temperatury i aktywności wody na wzrost mikroorganizmów:

$$\ln(k) = C_0 + C_1/T + C_2/T^2 + C_3 a_w + C_4 a_w^2$$

gdzie:

$k$  – współczynnik szybkości wzrostu mikroorganizmów,

$T$  – temperatura inkubacji [K],

$a_w$  – aktywność wody,

$C_0, C_1, C_2, C_3$  i  $C_4$  – współczynniki do wyznaczenia.

Ten sam wzór może być także zastosowany do modelowania łącznego wpływu temperatury i pH [14].

W przypadku bardziej skomplikowanych zależności większej liczby parametrów, stosowane są wzory wielomianowe ("powierzchni odpowiedzi") opisujące wpływ i interakcje zmiennych eksperymentalnych [10]. W modelach tego typu wykorzystywane są także znane funkcje matematyczne np. logistyczna i Gompertz'a [35].

Modele prawdopodobieństwa wzrostu mikroorganizmów oparte są w większości na założeniach Hauschild'a [20], który oszacował prawdopodobieństwo, że pojedynczy przetrwalnik *Clostridium botulinum* rozwinie się i będzie produkował toksyny w żywności. Założenie to bierze pod uwagę silny wpływ, jaki na kiełkowanie przetrwalników bakterii wywierają warunki kultury bakteryjnej.

$$P = (\ln n/q)/s$$

gdzie:

$P$  – prawdopodobieństwo wytworzenia toksyny botulinowej,

$n$  – liczba próbek w grupie doświadczalnej,

$q$  – liczba próbek nietoksycznych,

$s$  – liczba przetrwalników *Clostridium botulinum* w 1 próbce.

Na podstawie obliczonego prawdopodobieństwa  $P$  można obliczyć wartość  $\log 1/P$ , odpowiadającą logarytmowi liczby przetrwalników niezbędnych do wytworzenia w produkcie toksyny botulinowej.

W wielu doświadczeniach badano wpływ i interakcje szeregu zmiennych na prawdopodobieństwo kiełkowania i wzrostu *Clostridium botulinum* [17, 28, 42]. Do modelowania indywidualnego udziału zmiennych, wykorzystano różnorodne formy



analizy regresji, dostarczające szeregu wzorów matematycznych, które mogą służyć do przewidywania zachowań bakterii w żywności.

Przykładowym modelem opisującym zależność wpływu temperatury, wielkości inoculum i stężenia solanki w gotowanym mięsie indyka jest model sformułowany przez Geonigeorgisa i wsp. [10]:

$$\log LP = 0.625 + 6.71 (1/T) + 0.0005 (IT) - 0.033(T) + 0.102(B) - 0.102 (I)$$

gdzie:

LP – czas lag fazy do toksynogenezy [dni],

T – temperatura [K],

I – wielkość inoculum [ $\text{cm}^3$ ],

B – stężenie solanki [%].

Inny model został sporządzony dla czasu i relatywnej szybkości kiełkowania [44]:

$$P_t = P_{\max} / (1 + e)^{k(\tau - t)}$$

gdzie:

$P_t$  – prawdopodobieństwo wzrostu w czasie t,

T – czas [dni],

$P_{\max}$  – maksymalne prawdopodobieństwo po całkowitym czasie przechowywania,

k – stała szybkość [ $\text{dni}^{-1}$ ],

$\tau$  – czas do punktu środkowego funkcji –  $P_{\max}/2$  [dni].

### Modele inaktywacji drobnoustrojów

Proces cieplnej inaktywacji drobnoustrojów został dość dobrze poznany i opisany, także w postaci modeli matematycznych. Niszczenie populacji komórek pod wpływem wysokiej temperatury jest procesem uzależnionym od czasu ogrzewania. W czasie działania stałej, letalnej temperatury następuje ich obumieranie, w dużym zakresie według prawideł reakcji pierwszego rzędu, zaproponowanej już w 1908 roku przez Chick'a [33]:

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

gdzie:

N – liczba komórek przeżywiających ogrzewanie w czasie t,

k – współczynnik proporcjonalności,

-dN/dt – szybkość inaktywacji.

Oznacza to, że w jednakowych jednostkach czasu inaktywacji ulega ta sama część pozostałych przy życiu komórek. Nazywane jest to zwykle logarytmicznym porząd-

kiem obumierania [37]. Na tych założeniach oparte są modele cieplnej inaktywacji mikroorganizmów [26].

Ze względu na wzrost produkcji żywności pasteryzowanej, potrzebne są badania w celu zrozumienia biochemii tego procesu i stworzenia odpowiednich modeli destrukcji cieplnej mikroorganizmów, w tym szczególnie patogenów [46].

Obok stosunkowo dużej liczby opracowań dotyczących modeli cieplnej inaktywacji mikroorganizmów, istnieją, choć w zdecydowanej mniejszości, modele związane z inaktywacją nietermiczną. Dotyczą one np. wpływu pH, aktywności wody czy obecności środków antymikrobiologicznych [10], np. model inaktywacji *Listeria monocytogenes* w środowisku o  $\text{pH} \leq 5,3$  nastawionym za pomocą HCl:

$$t_{4-D} = m(\text{pH} - \text{pH}_0)$$

gdzie:

- $t_{4-D}$  – czas osiągnięcia „4-D” ( $10^4$ ) inaktywacji,
- $m$  – nachylenie linii regresji,
- $\text{pH}_0$  – pH natychmiastowej inaktywacji otrzymane przez ekstrapolację linii regresji dla  $t = 0$ .

W cytowanej pracy otrzymano wartości:  $m = 197,3$  i  $\text{pH}_0 = 2,67$ .

### Modele zbiorcze i programy komputerowe

Przedstawione powyżej rodzaje modelowania nie obejmują całości zjawisk. Zdaje się bowiem, że na przykład mikroorganizmy zaczynają się rozwijać po krótkiej lag fazie. W innych przypadkach mogą zginąć lub przechodzą przedłużony okres przygotowawczy, ewentualnie powodujący wzrost, ale po początkowym spadku liczby komórek. W takim przypadku zaprezentowane powyżej rodzaje modeli, nie przedstawiają prawdziwej populacji. W mikrobiologii żywności duże znaczenie mają modele zbiorcze, zawierające trzy rodzaje dynamiki populacji (tj wzrost, przeżywalność i śmierć drobnoustrojów).

Przykładem takiego modelu jest model Jones'a i wsp., [23] dla *Yersinia enterocolitica*. Danymi wyjściowymi do opracowania tego ostatniego modelu był cykl życia mikroorganizmów, który może być podzielony na dwie fazy:

- I – organizmów niedojrzałych, nie zdolnych do podziału,
- C – komórek dojrzałych.

Szybkość zmian całkowitej populacji mikroorganizmów została przedstawiona w postaci wzoru:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\mu_c C(t) - \mu_I I(t) + c(t)\alpha$$

gdzie:

- $N(t)$  – całkowita populacja drobnoustrojów w czasie  $t$ ,
- $\mu_c$  – funkcja szybkości śmierci komórek dojrzałych,
- $\mu_1$  – funkcja szybkości śmierci komórek niedojrzałych,
- $\alpha$  – szybkość podziału komórek,
- $C(t)$  – liczba komórek dojrzałych w czasie  $t$ ,
- $I(t)$  – liczba komórek niedojrzałych w czasie  $t$ .

Natomiast Griffiths i Phillips [19] przewidywali okres trwałości mleka pasteryzowanego w różnych, stałych temperaturach przechowywania przy zastosowaniu równania pierwiastka kwadratowego.

Szeroko zakrojone prace nad tego typu modelami zostały podjęte m.in. w Wielkiej Brytanii [23, 41]. Przeprowadzono badania nad konstrukcją modeli matematycznych dla bakterii patogennych: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* i *Yersinia enterocolitica*. Prowadzone przez wiele ośrodków w Wielkiej Brytanii prace doprowadziły do skonstruowania modeli, które posłużyły do napisania programu komputerowego "Food Micro Model". Pozwala on na natychmiastowe określenie stanu mikrobiologicznego (w zakresie powyżej wymienionych gatunków drobnoustrojów chorobotwórczych) produktów w zależności od środowiska i warunków przechowywania. Rozważanymi parametrami są: temperatura przechowywania, stężenie soli, pH, aktywność wody, zawartość kwasu mlekowego,  $\text{CO}_2$ , zawartość azotynu sodu lub innych konserwantów.

Innym znanym modelem jest „Pathogen Modeling Program”, skonstruowany w USA. Zawiera on modele wzrostu 8 bakterii patogennych, modele czasu trwania lag fazy (*Clostridium botulinum*) oraz modele inaktywacji i przeżywalności podczas przechowywania (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., i *Staphylococcus aureus*).

Oba komputerowe modele umożliwiają przewidywanie np. bezpiecznego okresu przydatności do spożycia, przez określenie gatunków bakterii, które zostaną zainaktywowane, przetrwają lub będą się rozwijać w znanych warunkach.

Natomiast w 1998 roku zespół Wijtzes'a [44] stworzył system decyzyjny wspierający projektowanie produkcji żywności (Food Design Support System - FDSS). Pozwala on na symulację produkcji żywności, przy czym brane są pod uwagę różne parametry (pH, temperatura,  $a_w$ , skład atmosfery), mikroorganizmy, procesy (z kilkoma „wbudowanymi” operacjami jednostkowymi np. mieszaniem czy obróbką cieplną) oraz łańcuchy dystrybucji.

## Prognozowanie okresu przydatności do spożycia

Modele prognostyczne można wykorzystać do obliczania czasu przydatności do spożycia różnych produktów, zarówno nowych jak i o zmodyfikowanej technologii oraz tradycyjnych, gwarantując im lepsze i bezpieczniejsze wykorzystanie. Powszechnym problemem jest na przykład właściwe oszacowanie czasu przydatności do spożycia żywności, która często jest przechowywana w sklepie przez dłuższy czas i określenie odpowiednich warunków przechowywania, gwarantujących jej bezpieczeństwo zdrowotne [31].

Pierwsze modele przechowalnicze dotyczyły kontroli psucia się ryb. Badania były przeprowadzone w stacji badawczej Torry w Wielkiej Brytani i zakończyły się opublikowaniem w roku 1964 modelu, określającego wpływ działania temperatury na szybkość psucia się ryb. Badania te były następnie kontynuowane przez Olle'a w CSIRO i Nixona z Nowozelandzkiej Komisji Przetwórstwa Rybnego w 1973 roku, którzy wykazali podobieństwo zależności wielu procesów psucia (włączając wzrost bakterii) od temperatury. To z kolei pozwoliło Daudowi i wsp. w 1978 roku skonstruować model zepsucia kurczaków [35].

W celu umożliwienia przewidywania okresu trwałości, należy skonstruować lub zastosować istniejący model wzrostu, jak na przykład wymieniony już wcześniej model Gompertz'a, Arrheniusa czy pierwiastka kwadratowego, w zależności od tego, jakie parametry wzrostu brane są pod uwagę (czas trwania lag fazy, współczynnik szybkości wzrostu czy czas generacji). Następnie trzeba dopasować model do własnych danych, najczęściej zebranych przy zastosowaniu tradycyjnych metod mikrobiologicznych np. metody posiewu płytkowego, mierzenia gęstości populacji itp. Są to tzw. „challenge test” czyli szacowanie okresu trwałości produktu w tych samych warunkach, jakie panują podczas dystrybucji czy przechowywania, na podstawie liczby mikroorganizmów wyznaczających poziom akceptowalny lub zepsucia. Jeśli następują jakiegokolwiek zmiany w procesie technologicznym produktu, testy są powtarzane. Poza tym są one dosyć drogie i zajmują dużo czasu. Nie dają też szczegółowej informacji na temat wpływu kontrolowanych parametrów na wzrost mikroorganizmów. Jak do tej pory jednak, modele prognostyczne nie zastąpiły całkowicie „challenge test”, lecz są stosowane równolegle [2, 12, 41].

Model musi uwzględniać mierzone środowiskowe wskaźniki wzrostu (pH, temperaturę,  $a_w$  itp.), są to tzw. zmienne modelu. Przez ekstrapolacje można prognozować wzrost w warunkach, które nie były pierwotnie badane [34]. Praktycznie, najczęściej używane są modele z jedną lub dwiema zmiennymi, chociaż stosuje się też modele wieloparametrowe, nazywane modelami powierzchni odpowiedzi.

Modelując okres trwałości, bierze się głównie pod uwagę wzrost mikroorganizmów oraz zmiany sensoryczne np. uwzględniając technikę analizy ryzyka Weibull'a

(metoda graficzna, nazywana również procedurą maksymalnego prawdopodobieństwa), natomiast, jak do tej pory, w modelowaniu nie uwzględnia się chemicznej degradacji składników odżywczych np. oksydacji lipidów [6].

Przy prognozowaniu okresu trwałości napotyka się na wiele problemów. Jednym z nich jest początkowy poziom zakażenia produktu. Od niego zależy bowiem w dużym stopniu okres przydatności do spożycia, a najczęściej nie jest on kontrolowany w rutynowych badaniach. Przy prognozowaniu bierze się więc pod uwagę maksymalny, początkowy poziom zanieczyszczenia badanego produktu, który może być dalej wykorzystany w analizie ryzyka i przy wyznaczaniu krytycznych punktów kontrolnych w systemie HACCP [27]. Następnym problemem jest końcowa liczba mikroorganizmów, która wyznacza koniec okresu przydatności do spożycia. W przypadku wielu produktów jest to zakażenie na poziomie  $10^6$ – $10^7$  kom./g, spowodowane najczęściej wzrostem mikroflory saprofitycznej.

Jednakże, w wielu produktach liczba mikroorganizmów nie może być wskaźnikiem zepsucia. W takich przypadkach, psucie się produktu spowodowane wzrostem mikroorganizmów może być lepiej oszacowane przy zastosowaniu innych indykatorów, na przykład zmian jakości sensorycznej. Jeśli w produkcji istnieje prawdopodobieństwo obecności patogenu produkującego toksyny, za koniec okresu trwałości przyjmuje się czas krótszy niż czas potrzebny do wyprodukowania toksyny [3].

Zazwyczaj okres trwałości wyznaczony przy użyciu metod mikrobiologii prognostycznej jest nieco krótszy, niż rzeczywisty. Jest to właśnie ten margines bezpieczeństwa, który uwzględniają wszystkie modele prognostyczne.

Modele matematyczne mogą być także zastosowane w celu przewidywania wpływu różnych kombinacji czasowo-temperaturowych, jakie zachodzą podczas produkcji, przechowywania i dystrybucji, na czas trwania okresu przydatności do spożycia [30].

### **Wady modeli prognostycznych**

Głównym zastrzeżeniem zgłaszanym do modeli prognostycznych jest fakt uwzględniania zbyt małej liczby czynników decydujących o rozwoju, przeżywalności lub inaktywacji mikroorganizmów. Z drugiej strony należy jednak ograniczać liczbę determinantów, gdyż uwzględnienie zbyt dużej ich liczby bardzo skomplikowałoby, a może wręcz uniemożliwiło modelowanie. Należy unikać sytuacji gdy modele staną się za skomplikowane i co za tym idzie trudne do wykorzystania.

Drugim poważnym zastrzeżeniem w stosunku do mikrobiologii prognostycznej jest zastosowanie pożywek mikrobiologicznych (najczęściej płynnych) w celu uzyskania danych do konstrukcji modelu oraz stosowanie czystych kultur mikroorganizmów, co oznacza brak mikroflory konkurencyjnej. Opracowane w ten sposób modele są następnie „dopasowywane” do danych na podstawie których zostały skonstruowane. W

związku z tym zdarza się, że brak jest zadowalającej walidacji do wyników innych badań szczególnie konkretnych produktów żywnościowych.

Zastrzeżenia budzi także fakt, że modele tworzone są głównie w przypadku mikroflory patogennej, a tylko niewielka ich liczba dotyczy zepsucia produktów. Wiąże się z tym także brak modeli dla grup drobnoustrojów np. ogólnej liczby drożdży i pleśni, ogólnej liczby psychrotrofów itp.

### **Możliwości zastosowania i przyszłość mikrobiologii prognostycznej**

Wśród możliwości zastosowania mikrobiologicznych modeli prognostycznych wymienić należy:

- przewidywanie okresu przydatności do spożycia,
- prognozowanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów przy zmianie składu lub technologii produkcji,
- obiektywną ocenę konsekwencji ewentualnych niezgodności w procesie produkcyjnym i przechowywaniu żywności,
- bazę dla tworzenia przewodników, norm, kryteriów,
- wyznaczanie limitów krytycznych parametrów w krytycznych punktach kontrolnych w systemie HACCP,
- narzędzie edukacyjne dla pracowników przemysłu i handlu.

Mówiąc o przyszłości mikrobiologii prognostycznej należy zwrócić uwagę na konieczność współpracy międzynarodowej, która, przez porównanie i zestawienie wyników, umożliwi uzyskanie bardziej wszechstronnych i lepiej dopasowanych modeli. Umożliwi to także powstanie zunifikowanego systemu modeli, możliwych do wykorzystania w międzynarodowym handlu i legislacji.

Przewiduje się powstawanie modeli zbiorczych do prognozowania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji drobnoustrojów patogennych w celu zapobiegania zatruciom i zakażeniom pokarmowym, a także konstruowanie modeli „zepsucia” produktów żywnościowych. W tym drugim przypadku istnieje konieczność połączenia i określenia zależności między wzrostem mikroorganizmów i ich aktywnością a wpływem drobnoustrojów na zmiany sensoryczne produktów.

Mikrobiologia prognostyczna staje się samodzielną dyscypliną naukową wyrosłą z mikrobiologii żywności, o własnych prawach i jeszcze nie do końca przewidzianej przyszłości. Przyszły rozwój modelowania prognostycznego będzie zależał od innych nauk i dyscyplin, głównie matematyki, statystyki, programowania komputerowego, inżynierii stosowanej, fizjologii mikroorganizmów, a także od stosowanych oprogramowań i zastosowania systemów eksperckich.

Przewiduje się wzrost możliwości zastosowania modeli prognostycznych przez przemysł spożywczy. Mikrobiologia prognostyczna może stać się bardzo istotnym

narzędziem w projektowaniu nowych wyrobów, pozwalając na oszacowanie potencjalnych zagrożeń i zaproponowanie metod utrwalenia, a także określenie możliwości i warunków przechowywania. Prognozowanie mikrobiologiczne umożliwi efektywne zaplanowanie procesu technologicznego w celu uzyskania produktu bezpiecznego pod względem mikrobiologicznym. Modele matematyczne znajdują także zastosowanie w systemach zapewnienia jakości (głównie bezpieczeństwa) w „biznesie” żywnościowym (np. HACCP, GMP, GHP), na wszystkich etapach procesu wytwarzania, od momentu produkcji surowców, przez ich przetwarzanie, do momentu dystrybucji i konsumpcji gotowych wyrobów.

## LITERATURA

- [1] Aggelis G., Samelis J., Metaxopoulos J.: A novel modelling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat product stored at 3<sup>0</sup>C and 12<sup>0</sup>C in air. *Int. J. of Food Microbiol.*, **43**, 1998, 39.
- [2] Baird-Parker A.C., Kilsby D.C.: Principles of predictive food microbiology. *J. App. Bact., (Symp. Supl.)*, **43**, 1987.
- [3] Baker D.A., Genigeorgis C.: Predicting the safe storage of fresh fish under atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modelling length of the lag phase of growth. *J. Food Prot.*, **53**, 1990, 131.
- [4] Baranyi J., Roberts T.A.: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *Int. Food Microbiol.*, **23**, 1994, 277.
- [5] Baryłko-Pikielna N.: Bezpieczeństwo i wartość odżywcza żywności: opinie konsumentów a opinie przedstawicieli nauki. *Przem. Spoż.*, **49**, 4, 1995, 111.
- [6] Bin Fu, Labuza T.P.: Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, **4**, 3, 1993, 125.
- [7] Box M.J.: Bias in nonlinear estimation. *J. Roy. Statist. Soci., B*, **33**, 1971.
- [8] Box M.J., Draper K.: Empirical model building and response surfaces. Wiley, UK 1987.
- [9] Buchanan R.L.: Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *J. Food Safety*, **11**, 1991, 123.
- [10] Buchanan R.L.: Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 1, 1993, 6.
- [11] Buchanan R.L.: Food Safety Assessment Amer. Chem. Soc., Washington DC, 1993, 250.
- [12] Cole M.B.: Databases in modern food microbiology. *Trends in Food Sci. and Technol.*, **2**, 11, 1991, 293, 14 ref.
- [13] Davey K.R.: Applicability of the Davey linear Arrhenius predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 1991, 253.
- [14] Davey K.R.: Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *Int. J. Food Microb.*, **23**, 1994, 295.
- [15] Davey K.R., Daughtry B.J.: Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phase of bacterial growth: temperature, salt concentration and pH. *Food Res. Intern.*, **28**, 3, 1995, 233
- [16] Garthright W.E.: Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiol.*, **8**, 1991, 239.

- [17] Genigeorgis C.A., Carnicu M., Dutulescu D., Farrer T.B.: Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4° to 30°C. *J. Food Prot.*, **54**, 1991, 662.
- [18] Goldblith S.A., Joslyn M.A., Nickerson J.T.R.: An introduction to the thermal processing of foods, AVI Publishing Co., Westport, Conn, **1**, 1961, 1128.
- [19] Griffiths M.W., Phillips J.D.: Prediction of the shelf-life of pasteurized milk at different storage temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 1988, 269.
- [20] Hauschild A.H.W.: Assessment of botulism hazards from cured meat products. *J. Food Techn.*, **36**, 12, 1982, 95.
- [21] Ilnicka-Olejniczak O.: Referat na zebraniu Oddz. Warszawskiego PTTŻ (dane nie publikowane), 1994.
- [22] Ilnicka-Olejniczak O., Hornecka D.: Prognozowanie w mikrobiologii żywności; w: *Food Product Development. Opracowywanie nowych produktów żywnościowych*. Wyd. AR Poznań, 1995, 149-168.
- [23] Jones D., Walker S.J., Sutherland J.P., Peck M.W., Little C.L.: Mathematical modelling of the growth, survival and death of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 1994, 433.
- [24] Knochel S., Gould G.: Preservation microbiology and safety: Quo vadis? *Trends in Foods and Technology*, 1995, 6, 127.
- [25] Kołożyn-Krajewska D.: Ogólne zasady prognozowania w mikrobiologii żywności. Cz. I. Matematyczne modelowanie wzrostu mikroorganizmów w żywności. *Przem. Spoż.*, **48**, 11, 1994, 362.
- [26] Kołożyn-Krajewska D.: Ogólne zasady prognozowania w mikrobiologii żywności. Cz. II. Matematyczne modelowanie inaktywacji mikroorganizmów w żywności. *Przem. Spoż.*, **49**, 11, 1995, 434.
- [27] Labuza T.P., Bin Fu, Taoukis P.S.: Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods. *J. Food Prot.*, **55**, 1992, 741.
- [28] Maas M.: Development and use of probability models: the industry perspective. *J. Indust. Microbiol.*, **12**, 1993, 162.
- [29] McClure P.J., Blackburn C.W., Cole M.B., Curtis P.S., Jones J.E., Legan J.D., Ogden I.D., PECK M.W., Roberts T.A., Sutherland J.P., Walker S.J.: Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 1994, 265.
- [30] Muermans M.L.T., Stekelenburg F.K., Zwietering M.H., Huis In't Veld J.H.J.: Modelling of the microbiological quality of meat. *Food Control*, **4**, 1993, 216.
- [31] Nicolai B.M., van Impe J.F., Martens T., de Baerdemaeker J.: Experimental validation of a dynamic model for microbial growth and inactivation under time varying temperature conditions. (in prep.), 1995.
- [32] Ratkowsky D.A.: Principles of nonlinear regression modeling. *J. Ind. Microbiol.*, **12**, 1993, 195.
- [33] Reichart O., Mohacsi-Farkas O.: Mathematical modelling of the combined effect of water activity, pH and redox potential on the heat destruction. *Intern. J. Food Microbiol.*, **24**, 1994, 103.
- [34] Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology: application of a square root model. *Food Aust.*, **43**, 1991, 202.
- [35] Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 3-4, 1994, 241.
- [36] Sikorski Z.E.: *Technologia żywności pochodzenia morskiego*. WNT Warszawa 1980.
- [37] Stumbo C.R.: "Thermobacteriology in food processing", Acad.Press, 1973.
- [38] Szczawiński J.: Prognozowanie w mikrobiologii żywności, w: *Materiały Konferencji Naukowej: Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produkcji żywności*, PTTŻ Warszawa, 1997, 94.
- [39] Untermann F.: Hygiene in meat production and processing. *Fleischwirtschaft*, **69**, 1989, 6.



- [40] Walker S.J., Jones J.E.: Protocols for data generation for predictive modeling. *J. Ind. Microbiol.*, **12**, 1993, 273.
- [41] Walker S.J., Jones J.E.: Microbiology modelling and safety assessment. In: *Food Technology International Europe*. (red. Turner A.), Sterling Publications Limited, London, 1994, 25-29.
- [42] Whiting R.C., Call J.E.: Time of growth model for proteolytic *Clostridium botulinum*. *Food Microbiol.*, **10**, 1993, 295.
- [43] Whiting R.C., Buchanan R.L.: Predictive Modeling, in: *Food Microbiology, fundamentals and frontiers*, Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville, T.J. (ed.), ASM Press, Washington D.C., 1997, 728.
- [44] Wijtzes T., Van't Riet K., Huis In't Veld J.H.J., Zwietering M.H.: A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. *Int. J. Food Microbiol.*, **42**, 1998, 79.
- [45] Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van't Riet K.: Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1990, 1875.

## ASSUMPTIONS, PRINCIPLES AND FUTURE OF PREDICTIVE FOOD MICROBIOLOGY

### Summary

Main principles of mathematical modelling in food microbiology were presented in the paper. Examples of predictive models of growth, inactivation and survival of microorganisms were discussed. Attitude towards microbiological model limitations and realistic possibilities of their practical application was

discussed. 