

MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA-PIEŃKOWSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-
KRAJEWSKA, MAŁGORZATA SZCZAWIŃSKA, ANTONI GORYL

PROGNOZOWANIE WZROSTU BAKTERII CHOROBOTWÓRCZYCH W PRODUKTACH MIĘSNYCH GOTOWYCH DO SPOŻYCIA

Streszczenie

Celem pracy było opracowanie zbiorczego modelu, czasowo-temperaturowego wzrostu, przeżywalności i inaktywacji wybranych drobnoustrojów chorobotwórczych (*Salmonella enteritidis* i *Listeria monocytogenes*) w modelowych produktach mięsnych, gotowych do spożycia (typu ready-to-eat) oraz porównanie wyników uzyskanych w badaniach z prognozami otrzymanymi z programu komputerowego Pathogen Modeling Program ver.5.1. Badania mikrobiologiczne wykonano klasycznymi metodami płytkowymi. Konstrukcji modelu zbiorczego dokonano z wykorzystaniem metody Gaussa-Newtona, która jest prostszą, numeryczną realizacją nieliniowej metody najmniejszych kwadratów. Stwierdzono, że skonstruowane modele czasowo-temperaturowe wzrostu, przeżywalności i śmierci drobnoustrojów chorobotwórczych potwierdzają tezę, że badania mikrobiologiczne prowadzone w celu uzyskania modeli prognostycznych powinny być przeprowadzane na modelowych produktach żywnościowych, a nie płynnych pożywkach mikrobiologicznych. Odpowiednie modele produktów żywnościowych powinny być zaproponowane dla każdej grupy żywności.

Wstęp

Mikrobiologiczne modele prognostyczne mogą być bardzo przydatne przy opracowywaniu parametrów procesów zapobiegających rozwojowi drobnoustrojów i oszacowaniu ryzyka z nim związanego, tak by można było wcześniej podejmować odpowiednie kroki dla wyeliminowania zagrożenia [2].

Prowadzenie badań z zakresu mikrobiologii prognostycznej jest zarówno kosztowne, jak i pracochłonne. Zważywszy jednak na ogromne koszty wynikające z jednej

Dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, mgr Małgorzata Jałosińska-Pieńkowska, Katedra Techniki i Technologii Gastronomicznej, Wydział Żywienia Człowieka oraz Gospodarstwa Domowego, SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; dr Małgorzata Szczawińska, Katedra Higieny Żywności, Wydział Weterynaryjny, SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; dr Antoni Goryl, Katedra Ekonomii, Akademia Ekonomiczna, ul. Rakowicka 27, 31-510 Kraków.

strony z psucia się żywności, z drugiej zaś z konieczności leczenia zatruc pokarmowych są one nie tylko uzasadnione, ale i opłacalne [5].

W odróżnieniu od drobnoustrojów wskaźnikowych, których wzrost decyduje w znacznym stopniu o zepsuciu produktów żywnościowych, obecność i rozwój drobnoustrojów patogennych determinuje ich bezpieczeństwo. Nie zawsze sama obecność patogenu musi stwarzać ryzyko wystąpienia zatrucia pokarmowego. Konieczne jest osiągnięcie w produkcie żywnościowym liczby mikroorganizmów stanowiących zagrożenie dla zdrowia. Zbyt długi czas przechowywania w nieodpowiedniej (najczęściej zbyt wysokiej) temperaturze decyduje o tym, czy dany drobnoustrój patogenny rozwinię się do niebezpiecznego poziomu, czy też nie. Przy pomocy odpowiednich prognostycznych modeli matematycznych można się o tym przekonać bez konieczności wykonywania skomplikowanych badań.

W zakresie opracowywania mikrobiologicznych modeli prognostycznych, mało jest publikacji dotyczących prognozowania na podstawie badań w rzeczywistych produktach żywnościowych. Większość badań przeprowadzana jest na pojedynczych szczepach bakterii patogennych hodowanych na podłożach mikrobiologicznych, którymi są najczęściej podłoża płynne. Opracowane modele są następnie weryfikowane w odniesieniu do określonych produktów w czasie ich produkcji, przechowywania i dystrybucji. Nie odzwierciedlają one zachowania mikroorganizmów w żywności. Zazwyczaj wzrost przebiega łatwiej, gdyż nie jest niczym ograniczony (ani mikroflorą towarzyszącą ani składnikami żywności), ale może być łatwiej kontrolowany. Współczynnik szybkości wzrostu, a szczególnie długość lag fazy drobnoustrojów są inne w produkcie żywnościowym niż na podłożu mikrobiologicznym, a to wpływa na nieco inne wartości parametrów modelu [7, 12].

Próba innego rozwiązania wyżej wymienionych problemów są przedstawione w niniejszej pracy badania, które zostały podjęte w celu skonstruowania zbiorczego modelu matematycznego rozwoju, przeżywalności i śmierci dwóch bakterii patogennych w modelowym produkcie żywnościowym.

Material i metody

Material oraz schemat produkcji i badań

Materiałem do badań były, wykonane w warunkach laboratoryjnych, modelowe wyroby mięsne w postaci kulek – „meat-ball” (o masie 100 ± 1 g). W skład produktu wchodziło: mięso wołowe bez kości z udźca, bułka tarta (10% masy produktu), mleko o zawartości 2% tłuszczu (100 cm^3 na 1000 g mięsa), cebula (100 g na 1000 g mięsa), sól (1,2% masy produktu). Mięso po zmieleniu i cebula po rozdrobnieniu mieszane były z pozostałymi surowcami i z powstałej masy formowano produkty typu „meat-ball”, które następnie były pieczone w piekarniku do momentu osiągnięcia temperatury

75°C wewnątrz, a po schłodzeniu do temperatury pokojowej (ok. 20°C) pakowane były w torebki foliowe (woreczki do Stomachera: polietylenowe, wytrzymałe, o grubości 0,066 mm, przepuszczalne dla pary wodnej – 8,96 g/m²/24h±0,28, przepuszczalne dla tlenu – 888 cm²/m²/24h).

W celu zbadania wzrostu wybranych drobnoustrojów patogennych (*Listeria monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*), dokonywano skażenia produktów świeżo upieczonych (po schłodzeniu) zawiesiną wyjściową o określonej liczbie wymienionych bakterii. W produkcie (umieszczonym w torebce) wykonywano otwór jałową bagietką, do którego wprowadzano pipetą 1 ml zawiesiny bakteryjnej badanego patogenu (zawierającej 10⁵kom./ml). Czekano do momentu wchłonięcia, a następnie torebki zgrzewano i umieszczano w różnych temperaturach przechowywania w inkubatorach mikrobiologicznych z dochładzaniem: 0°C±1°, 5°C±1°, 10°C±1°, 15°C±1°, 20°C±1° z wyjątkiem temperatury 5°C±1° dla *S. enteritidis* i temperatury 0°C±1° dla *L. monocytogenes*. Produkty przechowywane były w wymienionych temperaturach do 16 dni. Ocenę mikrobiologiczną produktów przeprowadzano co cztery dni (produkt świeży, 4, 8, 12 i 16 dzień przechowywania).

Przeprowadzono 3 cykle produkcyjno-badawcze.

Dodatkowo, w celu wykluczenia obecności *L. monocytogenes* i *S. enteritidis* w produkcie surowym, przeprowadzano oznaczenia mikrobiologiczne wymienionych patogenów w ukształtowanym produkcie, przed pieczeniem. W celu oceny ewentualnego, wtórnego zakażenia produktu oznaczanymi drobnoustrojami patogennymi, produkt upieczony, nie skażony był również sprawdzany na obecność badanych bakterii chorobotwórczych.

Kultury bakteryjne

W badaniach zastosowano szczep *Salmonella enteritidis* 403/97 oraz szczep *Listeria monocytogenes* 378. Oba szczepy pochodziły z kolekcji Państwowego Instytutu Weterynaryjnego z Puław. Wyizolowane były z żywności pochodzenia mięsnego. Szczepy ożywiano i pasażowano na bulionie BHI (Brain Heart Infusion) w temp. 37°C.

Przygotowanie zawiesiny wyjściowej i wykonanie badania

Z bulionu BHI posiewano redukcynicznie oczko czy na płytkę z agarem odżywczym w przypadku *Salmonella enteritidis*, natomiast w przypadku *Listeria monocytogenes* na płytkę z podłożem Columbia, w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, posiewano 1 kolonię na bulion BHI (9 ml). Tak przygotowana 24 godzinna hodowla (w 37°C) była zawiesiną wyjściową. Zawiesinę wyjściową (zarówno *S. enteritidis* jak i *L. monocytogenes*) na bulionie BHI rozcieńczano dwukrotnie (przenosząc po 1 ml do 9 ml płynu do rozcieńczeń). Z drugiego rozcieńczenia (10⁻² zawiesiny wyjściowej) pobierano 5 ml i przenoszono do jałowej kolb-

ki zawierającej 45 ml jałowego płynu do rozcieńczeń. Rozcieńczenie to traktowane było jako rozcieńczenie zerowe, wykorzystywane do skażenia produktów w ilości 1 ml na produkt. Gęstość inoculum wynosiła $1-2 \cdot 10^5$ kom/ml, zarówno dla *L. monocytogenes* jak i *S. enteritidis*. W odpowiednich okresach przechowywania (ewentualnie w przypadku badania produktu świeżego – natychmiast po skażeniu), do torebki Stomachera (w której przechowywany był produkt) dodawano 400 ml płynu do rozcieńczeń. Całość homogenizowano 2 minuty w aparacie Stomacher 400. Następnie przygotowano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń.

Posiewano po 0,5 ml z trzech kolejnych rozcieńczeń, na dwie równoległe płytki z odpowiednim podłożem. Do liczenia wybierano dwa kolejne rozcieńczenia (przy których uzyskiwano wzrost 30–300 kolonii na płytce). Wynik uzyskiwano z czterech płytek (po dwie z każdego rozcieńczenia). Do rozcieńczeń wykorzystywano płyn z peptonem (Merck).

Oznaczenie Salmonella enteritidis i Listeria monocytogenes w produkcji surowym i upieczonym, nie skażonym

Oznaczenia *Salmonella enteritidis* wykonano według normy PN-A-82055-8:1994. Oznaczenia *Listeria monocytogenes* wykonano według normy EN ISO 11290-1.

Oznaczenie Salmonella enteritidis i Listeria monocytogenes w produkcji upieczonym, skażonym

Po przygotowaniu opisanych rozcieńczeń, posiewano powierzchniowo po 0,5 ml materiału, na podłoże BPLS zmodyfikowane (zalecane do izolacji bakterii z rodzaju *Salmonella* spp. z mięsa i produktów mięsnych) (Merck) w kierunku *Salmonella enteritidis* i podłoże Oxford (Oxoid) w kierunku *Listeria monocytogenes*. Inkubowano w 37°C przez 24÷48h.

Konstrukcja zbiorczego modelu czasowo-temperaturowego wzrostu, przeżywalności i śmierci wybranych drobnoustrojów chorobotwórczych w modelowych produktach mięsnych

Do konstrukcji modelu zbiorczego zastosowano metodę Gaussa-Newtona, która jest prostszą, numeryczną realizacją nieliniowej metody najmniejszych kwadratów [11]. W przypadku niezadowalającej aproksymacji, pierwotne modele modyfikowano, aż do osiągnięcia odpowiedniego efektu. Skonstruowane modele są zależnościami stanowiącymi kompromis między jakością aproksymacji (mierzoną sumą kwadratów reszt), a pożądanymi właściwościami stochastycznymi estymatorów parametrów (np. niskie asymptotyczne błędy średnie szacunku, a w efekcie ich statystyczna istotność).

Wyniki doświadczalne wykorzystane do konstrukcji modelu poddano metodzie eliminowania błędów grubych, tj. tych obserwacji, które wykraczały poza 95% przedział ufności. Potrzebne obliczenia były prowadzone w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel.

Szacowanie wzrostu bakterii chorobotwórczych z wykorzystaniem Pathogen Modeling Program v.5.1

Szacowanie wzrostu bakterii chorobotwórczych wykonano wykorzystując program PATHOGEN MODELING PROGRAM (PMP) v.5.1 (USDA ARS NAA, USA).

Przeprowadzono symulację rozwoju mikroflory patogennej, badanej również doświadczalnie w produkcie typu „meat-ball” tj.: *Salmonella spp.* i *Listeria monocytogenes*, w temperaturach zastosowanych w doświadczeniu.

Porównano krzywe wzrostu patogenów otrzymane na podstawie własnych badań mikrobiologicznych z krzywymi otrzymanymi na podstawie symulacji komputerowej.

Omówienie i dyskusja wyników

Wzrost wybranych bakterii patogennych w modelowym produkcie mięsnym

Zarówno w próbkach nie poddanych obróbce cieplnej, jak i upieczonych, nie skażonych badanym patogenem w celach doświadczalnych, nie stwierdzono obecności zarówno *Salmonella spp.* jak i *Listeria spp.*

Tabela 1

Średnie liczby drobnoustrojów chorobotwórczych w produkcie, w zależności od czasu i temperatury przechowywania.

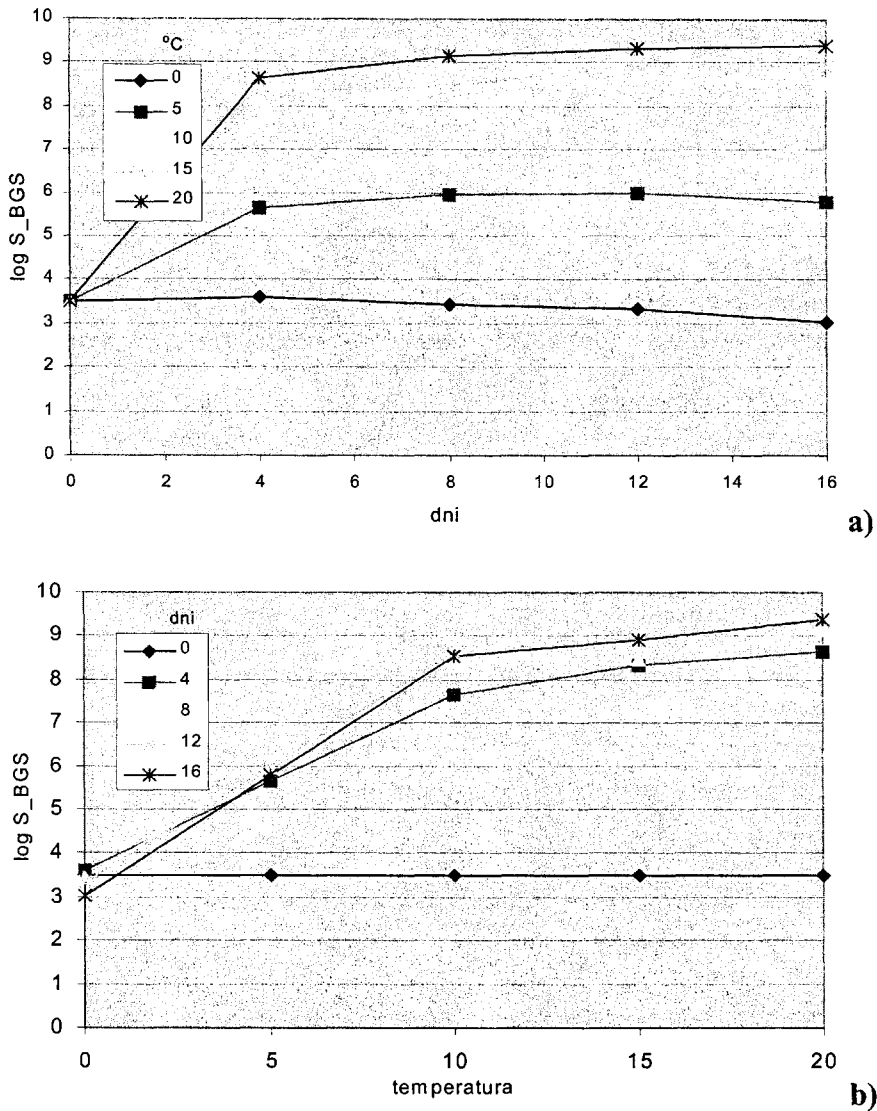
The average count of pathogen bacteria in product, according to time and temperature of storage.

Czas przechowywania (dni) Storage time (days)	<i>Salmonella enteritidis</i> [log(cfu/g)]				<i>Listeria monocytogenes</i> [log(cfu/g)]			
	t.0°C	t.10°C	t.15°C	t.20°C	t.5°C	t.10°C	t.15°C	t.20°C
0	3,50 (0,12)*				3,89 (0,22)			
4	3,61 (0,12)	7,67 (0,49)	8,33 (0,08)	8,64 (0,21)	5,41 (0,22)	8,00 (0,58)	8,87 (0,17)	8,91 (0,24)
8	3,44 (0,13)	8,48 (0,23)	8,48 (0,19)	9,15 (0,34)	7,76 (0,54)	9,15 (0,18)	9,33 (0,14)	9,38 (0,22)
12	3,34 (0,07)	8,63 (0,22)	8,94 (0,14)	9,31 (0,32)	8,65 (0,33)	9,17 (0,30)	9,41 (0,18)	9,40 (0,19)
16	3,03 (0,15)	8,55 (0,37)	8,92 (0,58)	9,40 (0,26)	9,04 (0,21)	9,30 (0,16)	9,52 (0,15)	9,43 (0,10)

*W nawiasie odchylenie standardowe.

*The standard deviation in brackets.

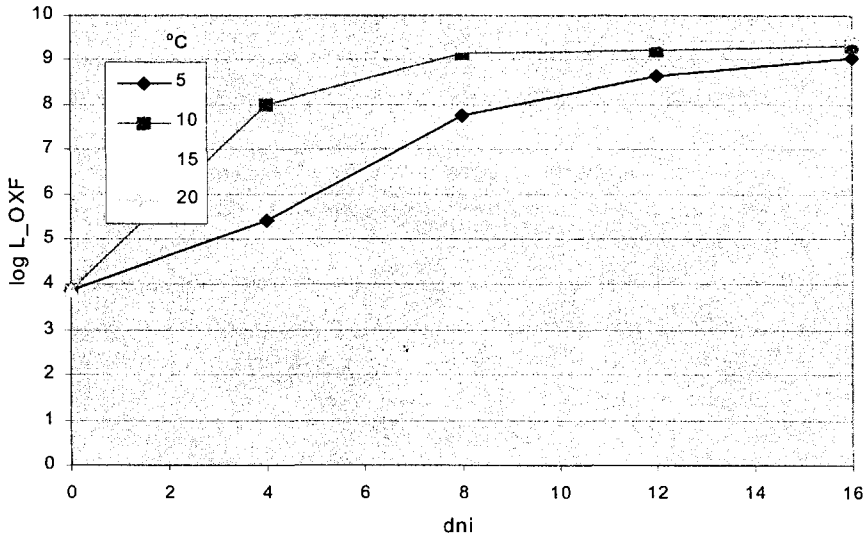
Średnie wartości liczby bakterii patogennych w produktach przechowywanych w poszczególnych temperaturach oraz wartości odchylenia standardowego przedstawiono w tab. 1.



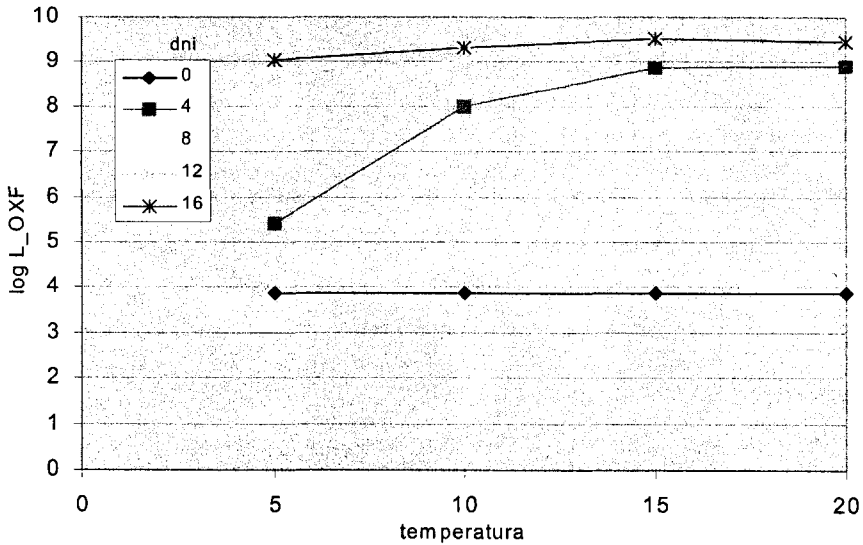
Rys. 1. Wzrost *Salmonella enteritidis* [log cfu/g] w produktach typu „meat-ball”,
 a) w zależności od czasu przy ustalonej temperaturze przechowywania,
 b) w zależności od temperatury przy ustalonym czasie przechowywania.

Fig. 1. The growth of *Salmonella enteritidis* [log cfu/g] in meat-balls
 a) according to time, with state storage temperature,
 b) according to temperature, with state storage time.

Na rys. 1 (a i b) przedstawiono zachowanie *Salmonella enteritidis* w zależności od czasu i temperatury przechowywania (przy ustalonej odpowiednio temperaturze i czasie przechowywania).



a)



b)

Rys. 2. Wzrost *Listeria monocytogenes* [log cfu/g] w produktach typu „meat-ball”:

- a) w zależności od czasu, przy ustalonej temperaturze przechowywania,
- b) w zależności od temperatury, przy ustalonym czasie przechowywania.

Fig. 2. The growth of *Listeria monocytogenes* [log cfu/g] in meat-balls:

- a) according to time, with state storage temperature,
- b) according to temperature, with state storage time.

W temperaturze 0°C nie obserwowano wzrostu *S. enteritidis*, natomiast w pozostałych temperaturach przechowywania obserwowano wzrost tego patogenu, przy czym najbardziej intensywny wzrost widoczny był do 4 dnia przechowywania. Dalszy wzrost był wolniejszy, przy czym największe liczby bakterii oznaczono w produkcie przechowywanym w temperaturze 20°C (rys. 1 a i b).

Charakterystykę wzrostu *Listeria monocytogenes* w poszczególnych temperaturach przechowywania (wartości średnie i odchylenie standardowe) przedstawiono w tab. 1.

Na rys. 2 (a i b) przedstawiono zmiany liczby *L. monocytogenes* w zależności od czasu i temperatury przechowywania (przy ustalonej odpowiednio temperaturze i czasie przechowywania).

Najbardziej intensywny wzrost *L. monocytogenes* w produktach modelowych we wszystkich temperaturach przechowywania obserwowano do 4 dnia, natomiast od 8 dnia był on wolniejszy. Krzywe wzrostu *L. monocytogenes* w temperaturze 15°C i 20°C były bardzo zbliżone (rys. 2 a i b). Przeprowadzone badania potwierdzają m.in. przynależność *L. monocytogenes* do psychrotrofów, gdyż stwierdzono bardzo wyraźny wzrost w temp. 5°C. Uzyskane wyniki potwierdziły też słuszność zaleceń przechowywania produktów żywnościowych w temperaturze poniżej 4°C ze względu na wzrost *Listeria* spp. [15].

Mimo dużych różnic liczby bakterii patogennych w porównaniu z towarzyszącą im mikroflorą na korzyść tego pierwszego (wyniki potwierdzone w badaniach własnych), wzrost wybranych drobnoustrojów chorobotwórczych przebiegał i tak o wiele wolniej niż oszacowany na podstawie programu komputerowego PMP (patrz poniżej). W przypadku większej liczby mikroflory saprofitycznej w stosunku do patogennej mógłby on przebiegać jeszcze wolniej, gdyż konkurencja w stosunku do składników odżywczych produktu żywnościowego, wykorzystywanych w metabolizmie drobnoustrojów byłaby z pewnością jeszcze większa. Można przypuszczać, że w przypadku mniejszej liczby początkowej komórek danej bakterii patogennej i przy odpowiedniej temperaturze przechowywania, pod koniec okresu trwałości liczba bakterii nie powinna wzrosnąć do poziomu stanowiącego zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

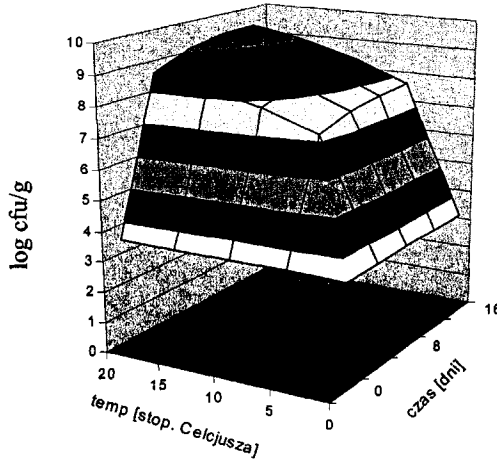
Modele zbiorcze czasowo-temperaturowe (powierzchni odpowiedzi) wzrostu, przeżywalności i inaktywacji drobnoustrojów chorobotwórczych w modelowych produktach mięsnych

Głównym celem pracy było opracowanie modeli zbiorczych wzrostu, przeżywalności i inaktywacji drobnoustrojów patogennych (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*) w modelowym produkcie mięsnym. Dla każdej badanej bakterii sformułowano po 24 modele robocze, będące drogą poszukiwania modelu końcowego. Po przeanalizowaniu wszystkich modeli i dalszych obliczeniach matematycznych i statystycz-

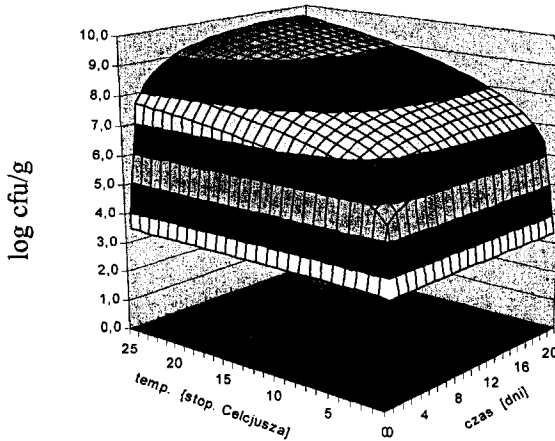
nych służących jak najlepszemu dopasowaniu modelu, sformułowano model zbiorczy (czasowo-temperaturowy) dla każdej bakterii chorobotwórczej. •

Na rys. 3 i 4 przedstawiono końcowe, optymalne modele zbiorcze *S. enteritidis* (rys. 3) i *L. monocytogenes* (rys. 4). W każdym modelu zastosowano estymację powyżej temperatury 20°C i powyżej 16 dnia przechowywania.

a)



b)



Rys.3. Model czasowo-temperaturowy (powierzchni odpowiedzi) wzrostu, przeżywalności i inaktywacji *Salmonella enteritidis* w produktach typu "meat-ball":

a) bez estymacji, w zakresie danych doświadczalnych czasu i temperatury,

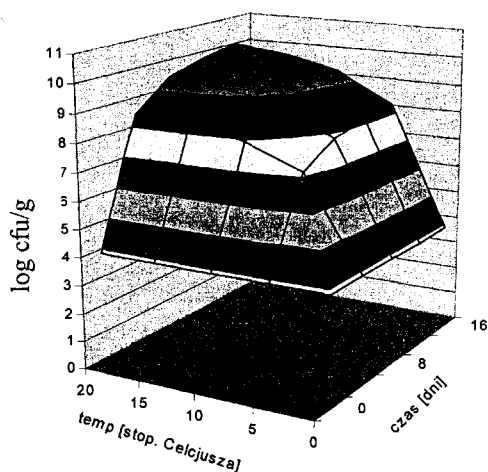
b) z estymacją powyżej zakresu danych doświadczalnych czasu i temperatury.

Fig. 3. The response model of growth, survival and inactivation of *Salmonella enteritidis* in meat-balls:

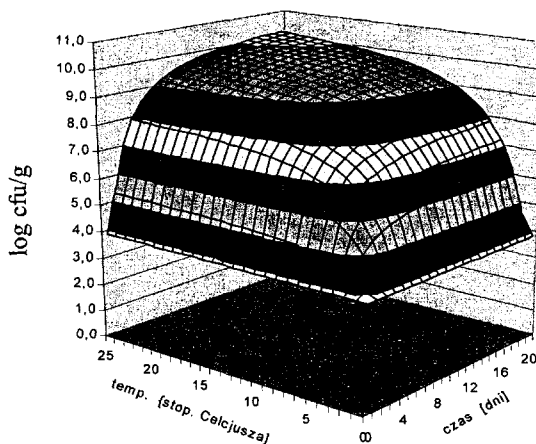
a) without estimation within the range of evaluated time and temperature,

b) with estimation above range of evaluated time and temperature.

a)



b)



Rys. 4. Model czasowo-temperaturowy (powierzchni odpowiedzi) wzrostu, przeżywalności i inaktywacji *Listeria monocytogenes* w produktach typu "meat-ball"

- a) bez estymacji, w zakresie danych doświadczalnych czasu i temperatury,
 b) z estymacją powyżej zakresu danych doświadczalnych czasu i temperatury.

Fig. 4. The response model of growth, survival and inactivation of *Listeria monocytogenes* in meat-balls:

- a) without estimation within the range of evaluated time and temperature,
 b) with estimation above range of evaluated time and temperature.

Przedstawiony model jest najlepszym z punktu widzenia jakości aproksymacji (stopnia dopasowania modelu do danych pomiarowych) oraz właściwości stochastycznych modelu (niezwykle małe asymptotyczne błędy średnie szacunku, dzięki czemu

oceny parametrów statystycznie istotnie różnią się od zera – są istotne). Zmienność zmiennych objaśniających czas i temperaturę prawie w 100% wyjaśnia kształtowanie się zmiennej zależnej (log cfu/g).

$$y = P + L[(x_1 + \varepsilon)^L][(x_2 + \varepsilon)^M](N^{x_1})(O^{x_2}) + u \quad (1)$$

$$R = 1,0000 \quad \Sigma e^2 = 0,0009 \quad \varepsilon = 1,00 \times 10^{-10}$$

gdzie: $L = 2,1181$,

$L = 0,1918$,

$M = 0,2301$,

$N = 0,9897$,

$O = 0,9990$,

$P = 3,4018$,

x_1 – czas przechowywania (dni),

x_2 – temperatura przechowywania ($^{\circ}\text{C}$),

u – składnik losowy,

$0,000 = Se^2$ wariancja resztowa,

$0,008 = Se$ odchylenie standardowe resztowe,

$0,0001 = j^2$ współczynnik zbieżności,

$0,9999 = R^2$ współczynnik determinacji,

$0,9999 = R$ współczynnik korelacji wielorakiej.

Przedstawiony model jest najlepszym z punktu widzenia aproksymacji (stopnia dopasowania do danych pomiarowych), jak i właściwości stochastycznych. Wszystkie oceny parametrów statystycznie istotnie różnią się od zera na poziomie istotności co najmniej 0,006, co znacznie przekracza zwyczajowo przyjmowany poziom istotności 0,05.

$$y = U + \exp[R - S/(x_1 + \varepsilon) - T/(x_2 + \varepsilon)] + u \quad (2)$$

$$R = 0,9724 \quad \Sigma e^2 = 5,0964 \quad \varepsilon = 1,00 \times 10^{-10}$$

gdzie: $R = 2,0109$

$S = 1,5586$

$T = 2,1266$

$U = 3,8599$

x_1 – czas przechowywania (dni)

x_2 – temperatura przechowywania ($^{\circ}\text{C}$)

u – składnik losowy

$0,3640 = Se^2$ wariancja resztowa

$0,6033 = Se$ odchylenie standardowe resztowe

$0,0544 = j^2$ współczynnik zbieżności

$0,9455 = R^2$ współczynnik determinacji

$0,9724 = R$ współczynnik korelacji wielorakiej

W przyszłości należałoby przeprowadzić badania i skonstruować model dla niższej, początkowej liczby komórek bakterii chorobotwórczych (wprowadzanych do produktu), gdyż w przedstawionej pracy inoculum zakażające miało dość wysoką gęstość, stąd wysoka liczba początkowa bakterii w produkcie. Wynikało to z obawy, że przy zbyt małej liczbie wprowadzanych bakterii zostaną one zdominowane przez mikroflorę towarzyszącą.

Oszacowanie możliwości rozwoju mikroflory patogennej z wykorzystaniem „Pathogen Modeling Program”

Do wywołania zatrucia lub zmian niekorzystnych dla zdrowia konieczny jest pewien poziom zanieczyszczenia danymi drobnoustrojami patogennymi, który wynosi w przypadku *Salmonella* spp. poniżej 5 log(cfu/g) i *Listeria* spp. około 4 log(cfu/g) [14].

Do szacowania wykorzystano własne dane doświadczalne dotyczące składu produktu oraz własne wyniki badań mikrobiologicznych, dotyczące drobnoustrojów chorobotwórczych (*L.monocytogenes* i *S. enteritidis*). Przyjęto następujące wartości:

pH	5,8 ,
stężenie NaCl	1,2%,
log liczby początkowej <i>Listeria monocytogenes</i>	3,9 ,
log liczby początkowej <i>Salmonella enteritidis</i>	3,5.

W przypadku *L. monocytogenes* dokonano oszacowania dla temperatur: 5°C, 10°C, 15°C i 20°C, natomiast dla *Salmonella* spp.: 10°C, 15°C i 20°C. Były to temperatury zastosowane w badaniach własnych, a jednocześnie ujęte w programie.

Na podstawie programu oszacowano, po jakim czasie wystąpi taka liczba badanych bakterii patogennych, którą w badaniach własnych stwierdzono w 16 dniu przechowywania. Oszacowano również po jakim czasie liczba badanych bakterii będzie stanowiła zagrożenie dla zdrowia. Zarówno w przypadku badań własnych jak i w wymienionym programie, uzyskano krzywe wzrostu bakterii z wykorzystaniem równania Gompertz'a.

Wyniki oszacowania wraz z czasem generacji i czasem trwania lag fazy przedstawiono w tab. 2.


Zarówno w przypadku *L. Monocytogenes*, jak i *Salmonella* spp. stwierdzono, że taka sama liczba wymienionych bakterii, którą oznaczono w 16 dniu przechowywania w badaniach własnych, jest szacowana znacznie wcześniej przy pomocy Pathogen Modeling Program. Wraz ze wzrostem temperatury przechowywania różnice czasów są coraz większe. Na przykład w przypadku rozwoju *L. monocytogenes*, w temp. 5°C liczba komórek oznaczona w badaniach własnych (w 16 dniu przechowywania) oszacowana została z programu 14 dnia, a w temp. 20°C już w połowie drugiego dnia.


Należy zwrócić szczególną uwagę na stwierdzone duże różnice w szybkości wzrostu wymienionych bakterii patogennych w badaniach własnych, w porównaniu ze

wzrostem oszacowanym na podstawie programu komputerowego Pathogen Modeling Program (tab. 2). Rzeczywisty wzrost drobnoustrojów stwierdzony w badaniach własnych, był o wiele wolniejszy i nie tak bardzo równomierny w porównaniu ze wzrostem oszacowanym na podstawie programu komputerowego (rys. 5-18).


Tabela 2


Oszacowanie wzrostu bakterii patogennych na podstawie „Pathogen Modeling Program”

 liczba końcowa (log cfu/g) osiągnięta w 16 dniu przechowywania w przedstawionych badaniach,

 liczba (log cfu/g) badanego patogenu stanowiąca zagrożenie dla zdrowia.

Estimation of pathogen bacteria growth with Pathogen Modeling Program

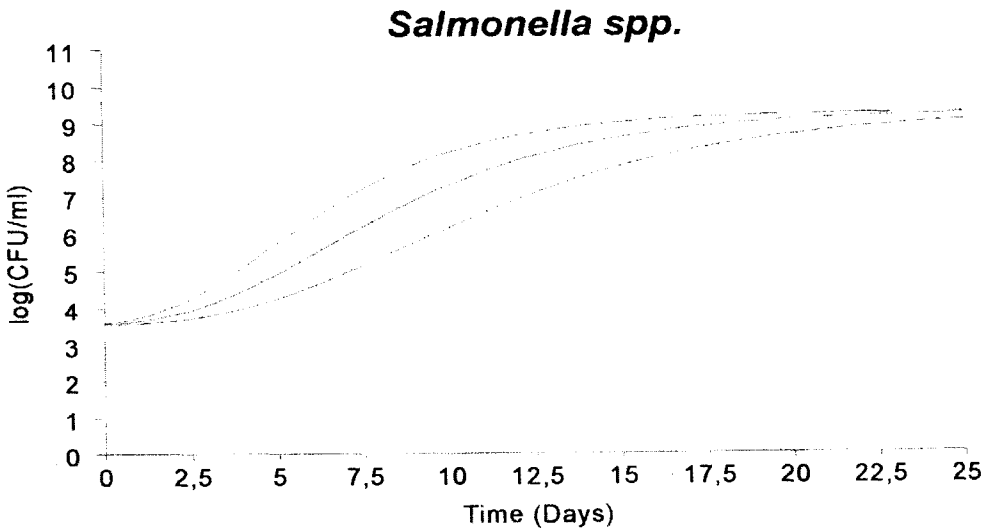
 the total count of bacteria (log cfu/g) obtained in own studies after 16 days of storage,

 the count of pathogen harmful for health.

Rodzaj mikroorganizmu (type of micro-organisms)	Temp. przech. (°C) Storage time (°C)	Liczba początkowa [log(cfu/g)] Initial count [log(cfu/g)]	Liczba końcowa [log(cfu/g)] Final count [log(cfu/g)]	Czas trwania lag fazy (dni) Lag time (days)	Czas generacji (godziny) Generation time (hours)	Czas do osiągnięcia założonego poziomu (dni) Time to reach assumed level (days)
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	3,9	9,0	3,62	14,7	14,00
	10	3,9	9,3	1,61	5,8	6,00
	15	3,9	9,5	0,78	2,7	2,85
	20	3,9	9,4	0,42	1,4	1,47
<i>Salmonella spp.</i>	10	3,5	8,6	2,37	14,0	12,17
	15	3,5	8,9	0,65	3,5	3,27
	20	3,5	9,2	0,26	1,2	1,23

Przedstawione wyniki potwierdzają, że wzrost bakterii na wyselekcjonowanych podłożach mikrobiologicznych różni się od wzrostu tych samych bakterii na podłożu, jakim jest sam produkt żywnościowy. Potwierdzają to także badania Jeppesen'a i Huss'a [6] dotyczące wzrostu *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* w produktach rybnych. Wiele czynników związanych z żywnością, takich jak np. dostępność składników pokarmowych, czynniki antimikrobiologiczne, wpływ mikroflory towarzyszącej nie jest uwzględniany w modelach konstruowanych na podstawie doświadczeń wyko-

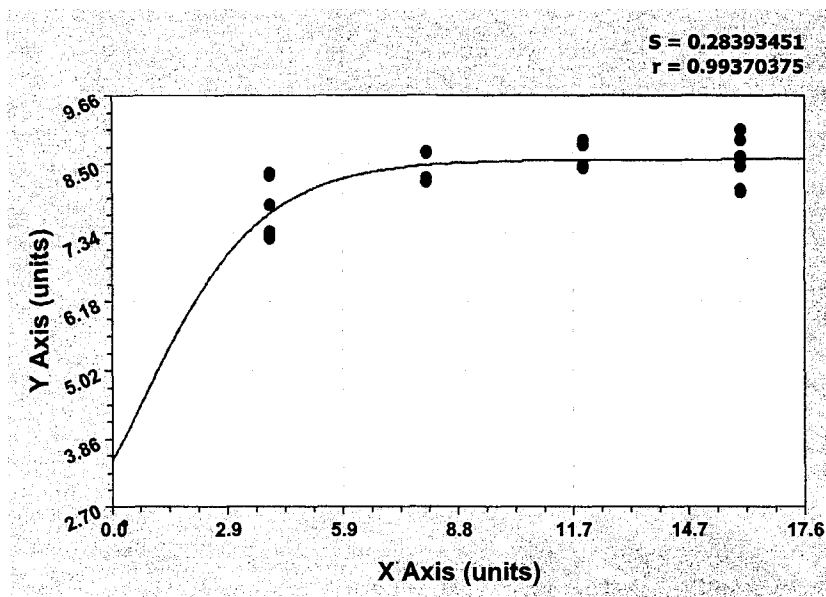
nanych na podłożach mikrobiologicznych. Z tego powodu wielu takich modeli nie można dopasować do wyników badań przeprowadzonych na produkcie żywnościowym. Współczynnik szybkości wzrostu i czas trwania lag fazy różni się znacznie od otrzymanego na podstawie badań na płynnych podłożach mikrobiologicznych, nawet z uwzględnieniem tych samych warunków środowiskowych [7].



Rys. 5. Wzrost *Salmonella spp.* w temperaturze 10°C oszacowany przy pomocy PMP.

Fig. 5. The estimated with PMP growth of *Salmonella spp.* at 10°C.

Avery i wsp. [1] w swoich badaniach porównawczych i przy konstrukcji programu komputerowego wykazali, że wzrost na podłożu mikrobiologicznym zawsze był większy niż w rzeczywistym produkcie żywnościowym. Podobne różnice zaobserwowali także inni autorzy wykorzystujący program komputerowy Pathogen Modeling Program. Szczawiński i wsp. [13] porównywali zachowanie się *L. monocytogenes* w kilku wybranych produktach spożywczych (kefir, jogurt, surowe mleko, termizowany twarożek i peklowana szynka) z wynikami oszacowanymi za pomocą omawianego programu. Zaobserwowano szybszą od przewidywanej w programie inaktywację listerii w przetworach mlecznych (prawdopodobnie spowodowane oddziaływaniem bakterii kwasu mlekowego) i powolniejszy od przewidywanego wzrost w peklowanej szynce.



X - czas przechowywania (dni),

Y - log cfu/g

X - storage time (days)

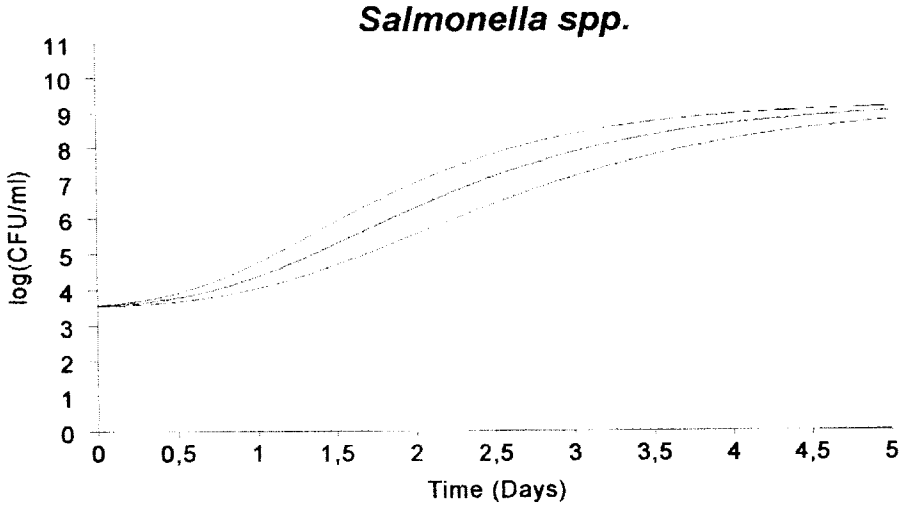
Y - log cfu/g

Rys. 6. Wzrost *Salmonella enteritidis* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 10°C.

Fig. 6. Growth of *Salmonella enteritidis* in meat-balls during storage at 10°C.

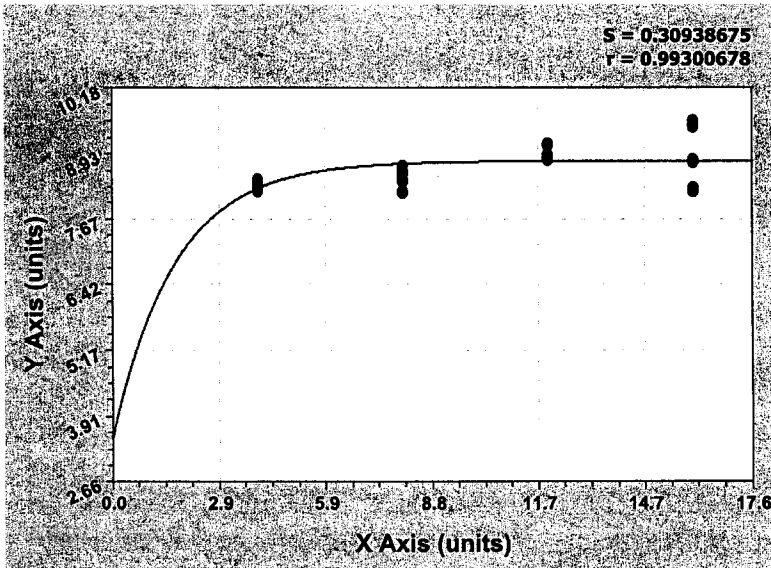
Dalgaard i Jorgensen [3] wykazali, że wzrost *L. monocytogenes* oszacowany na podstawie programu komputerowego PMP był znacznie szybszy, niż zaobserwowany na podstawie badań w produkcie żywnościowym, którym był wędzony łosoś. Predykcja otrzymana przy zastosowaniu Food Micro Model w tym samym opracowaniu, również różniła się od wyników badań mikrobiologicznych prowadzonych na wymienionym produkcie rybnym. W obu przypadkach, na podstawie programu komputerowego otrzymywano wyższe współczynniki szybkości wzrostu i dłuższy czas trwania lag fazy, w porównaniu z wynikami badań przeprowadzonych na produkcie żywnościowym. W omawianym opracowaniu najbardziej zbliżone do badań mikrobiologicznych oszacowanie uzyskano przy zastosowaniu modelu Murphy’ego [8], do którego konstrukcji wykorzystano eksperymenty przeprowadzone na produktach mlecznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że wskazane byłoby stworzenie dla każdej grupy żywności modelowego wyrobu, będącego rzeczywistym produktem i jednocześnie modelowym reprezentantem danej grupy. Z tego powodu należy



Rys. 7. Wzrost *Salmonella* spp. w temperaturze 15°C oszacowany przy pomocy PMP.

Fig. 7. The estimated with PMP growth of *Salmonella* spp. at 15°C.



X - czas przechowywania (dni),

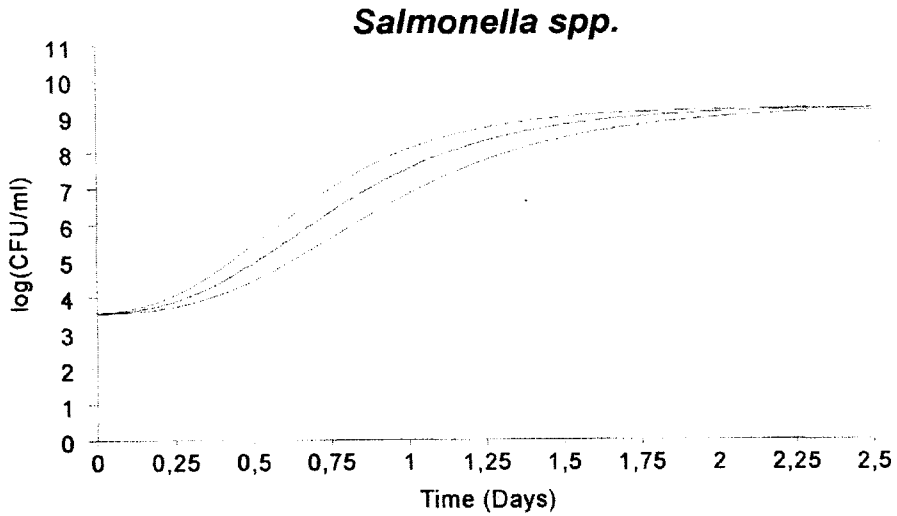
Y - log cfu/g

X - storage time (days)

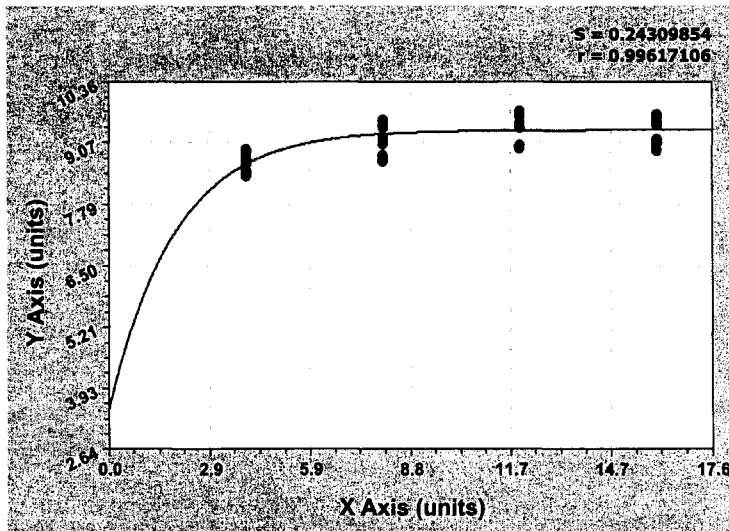
Y - log cfu/g

Rys. 8. Wzrost *Salmonella enteritidis* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 15°C.

Fig. 8. Growth of *Salmonella enteritidis* in meat-balls during storage at 15°C.

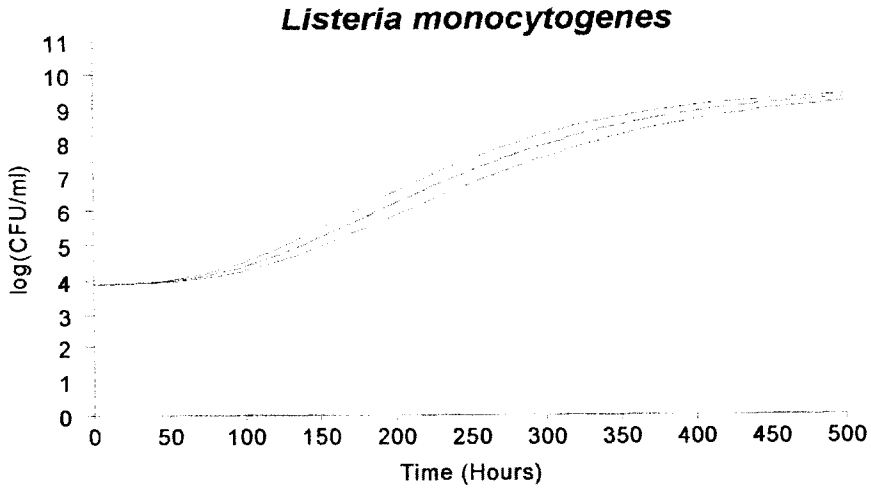


Rys. 9. Wzrost *Salmonella spp.* w temperaturze 20°C oszacowany przy pomocy PMP.
 Fig. 9. The estimated with PMP growth of *Salmonella spp.* at 20°C.



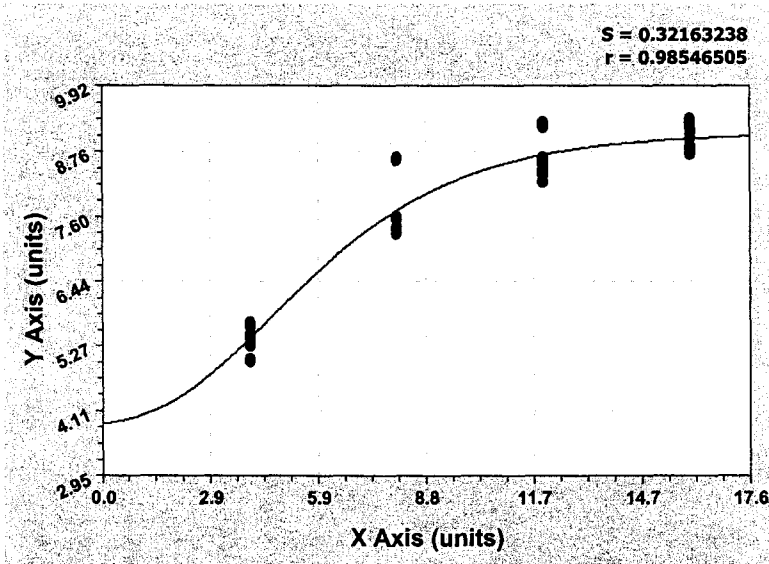
X - czas przechowywania (dni),
 Y - log cfu/g
 X - storage time (days)
 Y - log cfu/g

Rys. 10. Wzrost *Salmonella enteritidis* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 20°C.
 Fig. 10. Growth of *Salmonella enteritidis* in meat-balls during storage at 20°C.



Rys. 11. Wzrost *Listeria spp.* w temperaturze 5°C oszacowany przy pomocy PMP.

Fig. 11. The estimated with PMP growth of *Listeria spp.* at 5°C.



X - czas przechowywania (dni),

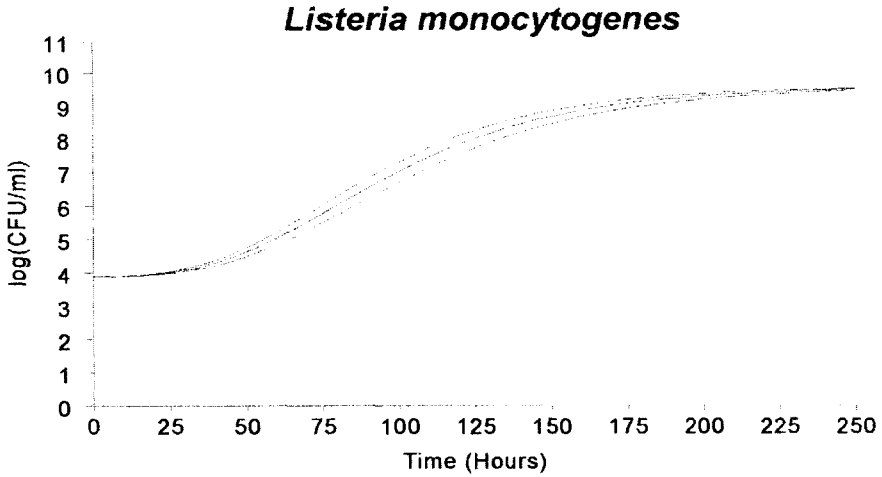
Y - log cfu/g

X - storage time (days)

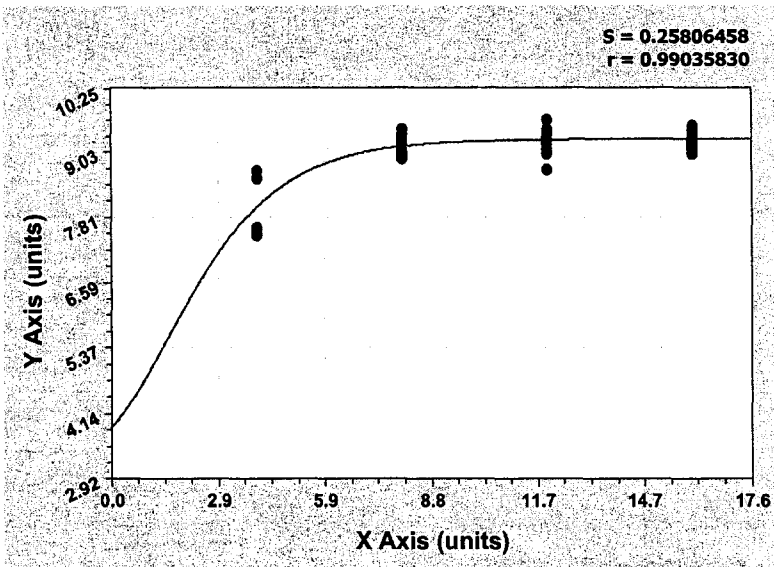
Y - log cfu/g

Rys. 12. Wzrost *Listeria monocytogenes* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 5°C.

Fig. 12. Growth of *Listeria monocytogenes* in meat-balls during storage at 5°C.



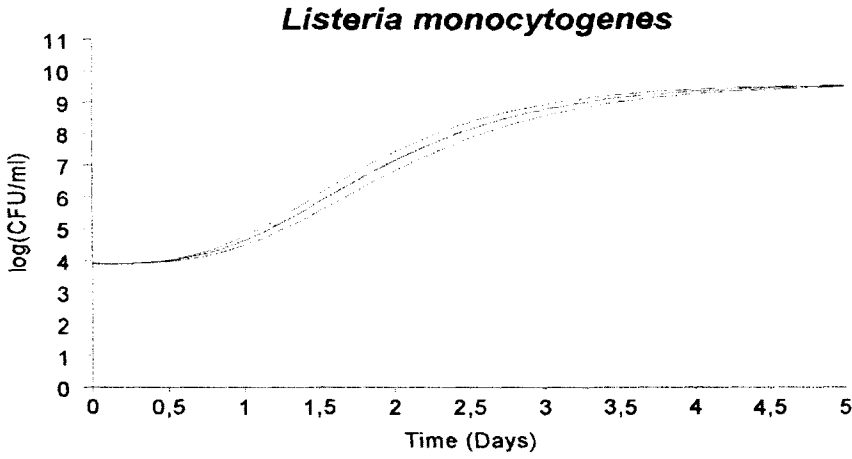
Rys. 13. Wzrost *Listeria spp.* w temperaturze 10°C oszacowany przy pomocy PMP.
 Fig. 13. The estimated with PMP growth of *Listeria spp.* at 10°C.



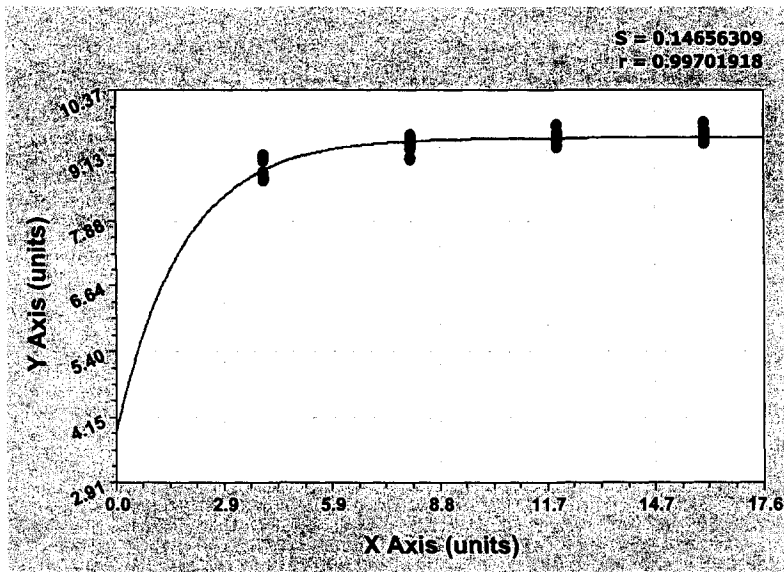
X - czas przechowywania (dni),
 Y - log cfu/g
 X - storage time (days)
 Y - log cfu/g

Rys. 14. Wzrost *Listeria monocytogenes* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 10°C.

Fig. 14. Growth of *Listeria monocytogenes* in meat-balls during storage at 10°C.



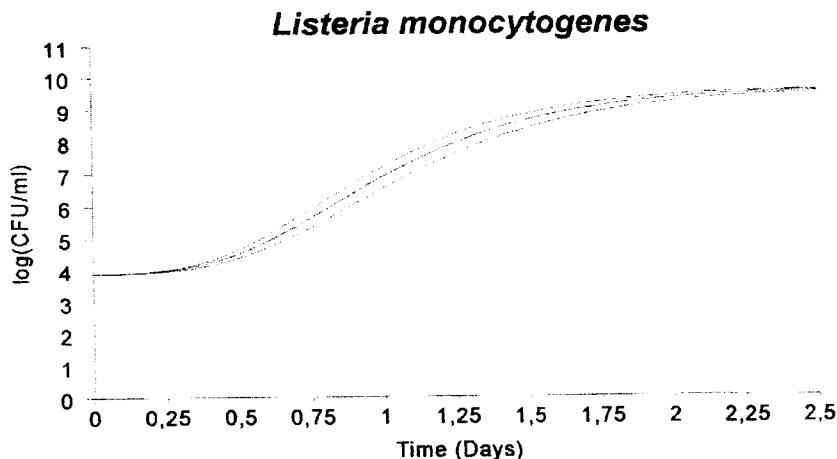
Rys. 15. Wzrost *Listeria spp.* w temperaturze 15°C oszacowany przy pomocy PMP.
 Fig. 15. The estimated with PMP growth of *Listeria spp.* at 15°C.



X - czas przechowywania (dni),
 Y - log cfu/g
 X - storage time (days)
 Y - log cfu/g

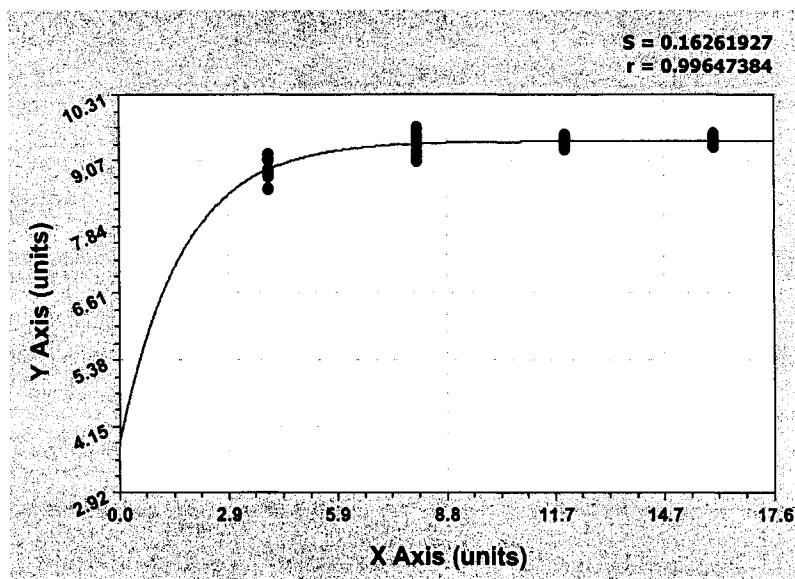
Rys. 16. Wzrost *Listeria monocytogenes* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 15°C.

Fig. 16. Growth of *Listeria monocytogenes* in meat-balls during storage at 15°C.



Rys. 17. Wzrost *Listeria spp.* w temperaturze 20°C oszacowany przy pomocy PMP.

Fig. 17. The estimated with PMP growth of *Listeria spp.* at 20°C.



X - czas przechowywania (dni),

Y - log cfu/g

X - storage time (days)

Y - log cfu/g

Rys. 18. Wzrost *Listeria monocytogenes* w produktach typu „meat-ball” przechowywanych w temperaturze 20°C.

Fig. 18. Growth of *Listeria monocytogenes* in meat-balls during storage at 20°C.

konstruować modele dla różnych typów żywności. W przedstawionych badaniach wybrano produkty z mięsa rozdrobnionego, gdyż są one bardzo popularne na rynku i chętnie kupowane przez konsumentów (hamburgery, zrazy mielone, karma dla zwierząt). Wydaje się, że badany produkt typu „meat-ball” może być uważany za wyrób modelowy dla grupy produktów z mięsa rozdrobnionego, nie peklowanego.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na skonstruowanie modeli czasowo-temperaturowych (powierzchni odpowiedzi) dla wybranych bakterii chorobotwórczych (*Salmonella enteritidis* i *Listeria monocytogenes*).
2. Oszacowany na podstawie Pathogen Modeling Program wzrost bakterii chorobotwórczych (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*) był znacznie szybszy w porównaniu ze wzrostem tych bakterii w modelowych produktach mięsnych.
3. Skonstruowane modele czasowo-temperaturowe wzrostu, przeżywalności i śmierci drobnoustrojów chorobotwórczych potwierdzają tezę, że badania mikrobiologiczne prowadzone w celu uzyskania modeli prognostycznych, powinny być przeprowadzane na modelowych produktach żywnościowych, a nie płynnych pożywkach mikrobiologicznych. Odpowiednie modele produktów żywnościowych powinny być zaproponowane dla każdej grupy żywności.

LITERATURA

- [1] Avery S.M., Hudson J.A., Phillips D.M.: Use of response surface models to predict bacterial growth from time/temperature histories, *Food Control*, **7**, 1996, 121.
- [2] Bourgeois C.M.: Quality and safety assurance, *European Food & Drink Review*, **9**, 1997, 65.
- [3] Dalgaard P., Jorgensen L.V.: Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon, *Int. J. Food Microbiol.*, **40**, 1998, 105.
- [4] EN ISO – 1996/11290-1: Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*.
- [5] Ilnicka-Olejniczak O.: Referat na zebraniu Oddz. Warszawskiego PTTŻ (dane nie publikowane), 1994.
- [6] Jeppesen V.F., Huss H.H.: Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C, *Int. J. Food Microbiol.*, **19**, 1993, 179.
- [7] 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.
- [8] Murphy P.M., Rea M.C., Harrington D.: Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in skim medium and validation studies in a range of dairy products, *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 1996, 557.

- [9] Pathogen Modeling Program: Microbial Food Safety Research Unit., USDA ARS NAA Eastern Regional Research Center, v. 5.1, USA, 1994.
- [10] PN-94/A-82055: Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*.
- [11] Ratkowsky D.A.: Nonlinear regression modelling. A unified practical approach, Marcel Dekker Inc., New York, 1983.
- [12] Roberts T.A.: Combinations of antimicrobials and processing methods, *Food Technol.*, **1**, 1989, 156.
- [13] Szczawiński J., Szczawińska M., Stańczak B.: Przewidywanie zachowania się *Listeria monocytogenes* w żywności na podstawie programu komputerowego Pathogen Modeling Program v.4,0 oraz badań własnych, w: Materiały X Kongresu PTNW, Wrocław, 1996, 527.
- [14] Trojanowska K.: Zatrucia pokarmowe – nowe patogeny w żywności, w: Materiały Konferencji Naukowej: Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produkcji żywności, Warszawa, 1997, 11.
- [15] Walker S.J.: Organisms of emerging significance, in: Microbiological and Environmental Health Issues Relevant to the Food and Catering Industries, Symposium Proceedings, Campden Food and Drink Research Association, Chipping Campden, UK, 1990.

PREDICTION OF PATHOGENIC BACTERIA GROWTH IN READY-TO-EAT MEAT PRODUCT

S u m m a r y

The purpose of this work was to construct the response surface model of growth, survival and inactivation for two food pathogens (*Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*) in model meat products (met-ball) and comparison results of own microbiological evaluations with predicted values, obtained with Pathogen Modeling Program v. 5.1. Gauss-Newton method was used to construct the response surface model of growth, survival and inactivation.

It was concluded, that constructed models of growth, survival and inactivation of pathogen bacteria should be lead with model food product, not with sythetic liquid media. Suitable model products should be developed for each group of food commodities. ❧