

Danuta Kołożyn-Krajewska

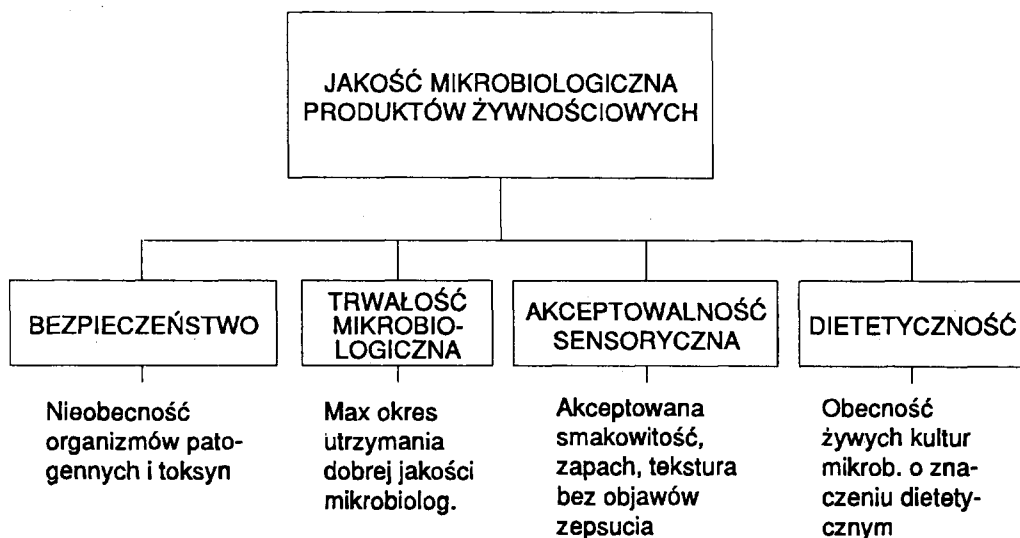
## GWARANTOWANA JAKOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA ŻYWNOŚCI A METODY PREDYKTYWNE

"Nie ma żadnej pewności, jeśli nie można zastosować którejś z nauki opierającej się na naukach matematycznych"

*Leonardo da Vinci*  
(1452-1519)

Pojęcie jakości żywności jest dobrze znane i łatwo rozpoznawalne za pomocą różnych metod, ale nadal brak jest jednoznacznej definicji tego terminu. Według normy ISO 8402 "Jakość to ogół cech i właściwości wyrobu lub usługi, decydujących o zdolności wyrobu lub usługi do zaspokojenia stwierdzonych lub przewidywanych potrzeb" [1]. Obok tego typu definicji nominalnych, istnieją także definicje realne - charakteryzujące pojęcie przez wyliczanie jego istotnych cech [2] np. definicja Szczuckiego: "Jakość artykułów spożywczych - jest to stopień zdrowotności, atrakcyjności sensorycznej i dyspozycyjności ..." [3].

Wychodząc z podobnego założenia proponuję następujące zestawienie istotnych cech składowych jakości mikrobiologicznej żywności (rys. 1.):



Dr inż Danuta Kołożyn-Krajewska, Wydział Żywnienia Człowieka oraz Gospodarstwa Domowego, SGGW, Warszawa

Dla jakości mikrobiologicznej przyjmuję następującą realną definicję:

**Jakość mikrobiologiczna świeżych lub utrwalonych produktów żywnościowych to stopień ich bezpieczeństwa, trwałości mikrobiologicznej, akceptowalności sensorycznej i dietetyczności.**

Według ISO 8402 pojęcie zapewnienia jakości (ang. quality assurance - QA) można zdefiniować jako "wszystkie planowe i systematyczne działania, niezbędne do stworzenia odpowiedniego stopnia zaufania co do tego, że wyrób lub usługa spełni ustalone wymagania jakościowe ... . Skuteczność zapewnienia jakości wymaga zarówno systematycznej oceny czynników wpływających na trafność projektu lub specyfikacji wymagań w odniesieniu do zamierzonych zastosowań jak i weryfikacji i auditów produkcji, instalowania i operacji kontrolnych. Stworzenie odpowiedniego stopnia zaufania może wymagać udokumentowania" [1]. W tym ujęciu przyjmuję, że **żywność gwarantowanej jakości to produkty żywnościowe, dla których w całym procesie pozyskiwania, przetwórstwa i dystrybucji zastosowano systemy gwarantujące spełnienie ustalonych wymagań jakościowych.**

Z powyższych rozważań wynika, że dla uzyskania żywności gwarantowanej jakości, niezbędna jest znajomość wymagań, które są różne dla poszczególnych produktów żywnościowych. Wymagania mikrobiologiczne związane są bezpośrednio z koniecznością zapewnienia wymienionych cech, charakteryzujących jakość mikrobiologiczną produktów tj.: bezpieczeństwa, trwałości, akceptowalności sensorycznej i dietetyczności. Ze względów zdrowotnych, z powodu możliwości wystąpienia zatruc i zakażeń pokarmowych, bezpieczeństwo ma znaczenie podstawowe.

## 1. Oszacowanie Bezpieczeństwa Mikrobiologicznego

Zależy ono od rodzaju i ilości mikroorganizmów lub ilości produkowanych przez drobnoustroje toksyn, obecnych w spożywanej żywności. Ryzyko zachorowania związane jest poza tym z podatnością organizmu na tego typu czynniki. Tak więc przy tworzeniu wymagań mikrobiologicznych należy z jednej strony posługiwać się wiedzą mikrobiologiczną związaną z możliwością występowania potencjalnie niebezpiecznych mikroorganizmów w danym produkcie żywnościowym, a z drugiej - wiedzą medyczną określającą ilość mikroorganizmów i toksyn, które mogą wywołać zakażenie lub zatrucie. Formalne oszacowanie ryzyka związanego z mikrobiologicznym (lub innym) skażeniem żywności, może być dokonane na drodze czterostopniowej analizy [4]:

- 1) Identyfikacja zagrożenia - wskazanie na czynnik, który może mieć działanie niepomyślne dla zdrowia człowieka.
- 2) Oszacowanie zagrożenia - zbadanie ilościowe i jakościowe natury niesprzyjającego oddziaływania.
- 3) Oszacowanie ryzyka (narażenia) - jakościowe i ilościowe zbadanie stopnia narażenia się na czynniki, które mogą wystąpić.
- 4) Charakterystyka ryzyka - zebranie wyników ww. analiz dla ilościowego oszacowania prawdopodobieństwa wystąpienia niepomyślnego oddziaływania, w danej populacji.

Tego rodzaju sformalizowana procedura oszacowania zagrożenia nie znalazła w zasadzie zastosowania w mikrobiologii żywności, chociaż czynione są pewne próby jej zalecenia np. przez Amerykański Narodowy Komitet Doradczy ds. Żywnościowych Kryteriów Mikrobiologicznych (NACMCF). Dwa pierwsze punkty (identyfikacja zagrożeń i ich oszacanie) stanowią też część systemu HACCP [4].

### 1.1. Identyfikacja zagrożeń mikrobiologicznych

Mikroorganizmy są powszechnie obecne w środowisku życia człowieka, w jego pożywieniu, w nim samym. Nazwa drobnoustroje obejmuje następujące, nierównorzędne zresztą pod względem systematycznym, grupy organizmów: wirusy, bakterie i organizmy bakteriopodobne, grzyby (zazwyczaj z wyłączeniem grzybów kapeluszowych), glony jednokomórkowe i kolonijne (z wyłączeniem glonów plechowych), pierwotniaki. Poza tym tradycyjnym podziałem można zastosować nieco inny, wyróżniający trzy zasadnicze grupy - nadkrólestwa: *Virales* czyli wirusy, *Prokaryota* (bakterie i organizmy bakteriopodobne), *Eukaryota*. Wszystkie formy należące do dwóch pierwszych nadkrólestw należą do drobnoustrojów. Spośród *Eukaryota* zaliczamy tylko pierwotniaki (*Protozoa*), niektóre glony i grzyby oraz śluzowce i *Acrasiae* [5].

#### **Bakterie patogenne**

Badania mikrobiologiczne i kliniczne doprowadziły do dość dobrego poznania rodzajów i możliwości występowania w żywności mikroorganizmów patogennych, mogących powodować zatrucia i zakażenia pokarmowe. Jednakże nasza wiedza nie jest kompletna, gdyż w większości przypadków zatruc pokarmowych, zarówno źródło żywności jak i mikroorganizmy powodujące zatrucie pozostają nie zidentyfikowane. W wielu krajach rozpoczęto obecnie szeroko zakrojoną akcję (badania Sentinel), mającą na celu dokładne zbadanie wszystkich przypadków zachorowań pokarmowych, a w szczególności określenie źródeł zakażenia i drobnoustrojów, które były jego przyczyną [4].

Bakteryjne zatrucia pokarmowe dzieli się na intoksykacje, których przyczyną jest działanie toksyny, i zatrucia typu zakaźnego, do którego wywołania konieczna jest obecność żywych bakterii. Znanych jest wiele grup bakterii powodujących zatrucia pokarmowe [6]. Wśród nich największe zagrożenie zdrowotne stanowi *Clostridium botulinum*, G<sup>+</sup>, bezwzględnie beztlenowa pałeczka. Wprawdzie botulizm występuje dosyć rzadko, ale ma szczególne znaczenie ze względu na ciężki przebieg choroby. Rozróżnia się 7 typów oznaczonych literami od A do G, przy czym w stosunku do człowieka mają znaczenie typy: A, B, E, F, G. Toksyny botulinowe należą do najsilniejszych trucizn, działających na system nerwowy człowieka. Tworzenie toksyny następuje wyłącznie w przechowywanej żywności, tylko w warunkach beztlenowych. Toksyny są odporne na działanie kwasów, więc nie ulegają rozkładowi przez kwas solny soku żołądkowego. Nie są natomiast ciepłooporne; ulegają zniszczeniu podczas ogrzewania w temperaturze 80<sup>0</sup>C przez 10 min. Źródłem botulizmu są najczęściej konserwy i żywność pakowana próżniowo lub w atmosferze modyfikowanej, o pH powyżej 4,5. Produkty zakażone toksyną botulinową nie zawsze wykazują sensoryczne objawy zepsucia, co może być niebezpieczne dla konsumentów. Szczepy nie-proteolityczne *Cl. botulinum* mogą rosnąć do temperatury 3,3<sup>0</sup>C, co oznacza że mają szansę rozwoju i produkcji toksyn w czasie długiego, chłodniczego przechowywania żywności [6, 7].

Mniej niebezpieczne zatrucia mogą być powodowane przez enterotoksynę gronkowcową. Czynnikiem etiologicznym są chorobotwórcze szczepy *Staphylococcus aureus*. Do wytworzenia enterotoksyny jest konieczne osiągnięcie przez populację co najmniej 10<sup>6</sup>/1 g produktu żywnościowego. Enterotoksyny tworzą się zarówno w żywności zawierającej przewagę węglowodanów, jak i białek pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego. Duże niebezpieczeństwo stwarzają lody, kremy i inne produkty cukiernicze, zwłaszcza przygotowywane z surowego mleka. Źródłem zatrucia mogą być też przetwory mięsne i

konserwy, zwłaszcza w zalewie olejowej, gdzie gronkowce wykazują wyjątkowo dużą ciepłooporność [6].

Duże zagrożenie zdrowotne może stanowić rodzaj *Salmonella* - G<sup>-</sup>, tlenowe lub względnie beztlenowe, nie przetrwalnikujące pałeczki. Mogą rosnąć w szerokim zakresie temperatur (7 - 48<sup>0</sup>C) i pH 4 - 8. Rozpowszechniły się one w ostatnich dziesiątkach lat wskutek rozwoju międzynarodowego handlu żywnością i paszami. Obecnie znanych jest 2200 typów serologicznych i wciąż odkrywane są nowe. Z produktów, które są przyczyną zatrucia tym drobnoustrojem należy wymienić: potrawy mięsne, drobiowe, mleczne i z dodatkiem jaj [6].

Także *Shigella*, *Bacillus subtilis* i *Clostridium perfringens* mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia. W ostatnich latach wzrasta liczba doniesień nt. zatrucia pokarmowych wywoływanych przez *Escherichia coli* - bakterię wchodzącą w skład mikroflory przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt i uważaną za nieszkodliwą, a wręcz pożyteczną. Istnieją jednak szczepy chorobotwórcze, które mogą wywoływać zaburzenia jelitowe (enteritis) oraz infekcje o różnym przebiegu u ludzi i zwierząt.

Dopiero od niespełna 20 lat znane są zachorowania powodowane przez gatunek *Campylobacter jejuni*, bakterię G<sup>-</sup>, nie przetrwalnikującą, mikroaerofil. Obecnie kamylobakteriozy występują i są rozpoznawane w wielu krajach na świecie, przewyższając nawet salmonellozy. Do szczególnie często zanieczyszczonych tą bakterią produktów należą: mięso drobiowe i mleko nie pasteryzowane [6].

Niezaprzeczalne zagrożenie stanowią organizmy psychrotrofowe, takie jak *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* i *Aeromonas hydrophila*. Dotychczas zidentyfikowano 7 gatunków *Listeria* i wyróżniono co najmniej 16 serotypów tego gatunku. Jest to bakteria G<sup>+</sup>, nie przetrwalnikująca o szerokim zakresie temperatury wzrostu (0,5 - 45<sup>0</sup>C). W niskich temperaturach może wzrastać do niebezpiecznych ilości, gdyż uzyskuje sprzyjające warunki, dzięki ograniczeniu wzrostu drobnoustrojów mezofilnych. Na gatunek ten zwraca się szczególną uwagę ze względu na udokumentowane przypadki pojedynczych i grupowych, groźnych infekcji ludzi oraz wywoływanie chorób (listeriozy), kończących się dużą śmiertelnością. Do produktów szczególnie często zanieczyszczonych *L. monocytogenes* należą sery miękkie, "maziowe" i dojrzewające z udziałem pleśni, a następnie surowe mięso, drób, surowe i pasteryzowane mleko, nie myte owoce i warzywa [6, 7].

*Yersinia enterocolitica* (i inne z rodzaju *Yersinia*) to bakteria G<sup>-</sup>, względnie beztlenowa, psychrotroficzna, mogąca wzrastać w zakresie temperatur od -2<sup>0</sup>C do 45<sup>0</sup>C i pH 4,6 - 9,0. Jako patogen odżywnościowy, powodujący chorobę zwaną yersiniozą, została rozpoznana dopiero w połowie lat siedemdziesiątych. Głównym źródłem zakażenia jest woda, następnie produkty zawierające mleko oraz mięso surowe i gotowane, ryby, owoce morza, surowe warzywa [6].

### Grzyby i ich toksyny

Rozwój grzybów w żywności może być przyczyną jej zepsucia lub pogorszenia cech sensorycznych (pleśnienie pieczywa czy warzyw, fermentacja soków owocowych itd.). Może jednak także stanowić poważne zagrożenie zdrowotne. Bardzo duża ilość pleśni ma zdolności produkowania substancji toksycznych zwanych mykotoksynami. Niektóre z nich wykazują właściwości mutageniczne (zwiększające częstość mutacji) i kancerogenne, inne są toksyczne w stosunku do specyficznych organów. Do najlepiej poznanych mykotoksyn należy aflatoksyna. Historia jej poznania sięga roku 1960, kiedy to w Anglii padło ponad 100 000 indyków po zjedzeniu paszy z orzeszków ziemnych, sprowadzanej z Afryki i Ameryki Południowej. Z trującej paszy wyizolowano *Aspergillus flavus* i toksynę wytworzoną przez

pleśń, którą nazwano aflatoksyną. Później stwierdzono, że także *A. parasiticus* produkuje aflatoksynę. Związki te wykrywano na świeżej wołowinie, szynce i bekonie, mleku, piwie, kakao, rodzynekach, mleku sojowym, kiełbasach dojrzewających, serze, soku jabłkowym itp. Dwoma ważnymi czynnikami wpływającymi na produkcję toksyn są temperatura (opt. 24 - 28°C) i aktywność wody. Stwierdzono, że aflatoksyny mają właściwości nowotworowe. Normy amerykańskie przewidują do 20 ppb dla żywności i paszy z wyłączeniem mleka dla którego maksymalna ilość może wynosić tylko 0,5 ppb [8, 9].

Innymi mykotoksynami spotykanymi dość często w żywności są: ochratoxyny, patuliny, kwas penicylinowy i inne. W większości są one termostabilne, tak więc nie są rozkładane podczas gotowania.

### **Wirusy**

Wiedza na temat obecności wirusów w żywności jest znacznie mniejsza niż o bakteriach czy grzybach, głównie ze względu na trudności związane z ich izolowaniem, hodowlą i oznaczaniem w produktach żywnościowych. Wiadomo jednak, że podobnie jak bakterie jelitowe także wirusy tego pochodzenia stanowią potencjalne zagrożenie, jako skażenie żywności. Są to np.: Picornawirusy, Reowirusy, Parwovirusy, Adenowirusy. Najpopularniejszym źródłem wirusów, powodujących zatrucia pokarmowe są skorupiaki, zakażane wirusami za pośrednictwem wody w której żyją. Wirusy mogą przetrwać w zakażonej żywności przez kilka - kilkanaście dni i nie są wrażliwe na rozwój bakterii powodujących jej zepsucie. Istnieje wiele udokumentowanych infekcji wirusowych spowodowanych spożyciem sałatek, kanapek, ostryg i innych produktów [8].

Dosyć rozległa wiedza, jaką obecnie dysponujemy, nt. wzrostu, przeżywalności i śmierci chorobotwórczych mikroorganizmów pochodzących z żywności, może być zastosowana do identyfikacji potencjalnego zagrożenia mikrobiologicznego w poszczególnych produktach żywnościowych. Celowi temu służy prognozowanie mikrobiologiczne, które zostanie szerzej omówione w dalszej części referatu.

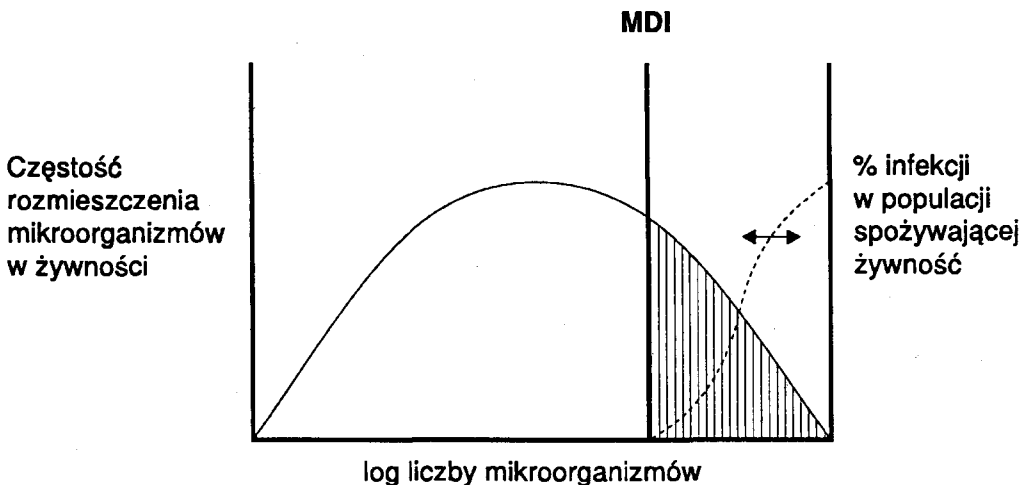
### **1. 2. Oszacowanie zagrożenia**

Aby oszacowanie zagrożenia było efektywne, musi być zarówno ilościowe jak i obiektywne. W ciągu ostatnich lat, mikrobiolodzy żywności dokonali istotnego postępu w dziedzinie ilościowego i obiektywnego szacowania zagrożenia mikrobiologicznego związanego z żywnością oraz określania strategii jego kontroli. Taka właśnie procedura szacowania zagrożenia, została zastosowana przy opracowywaniu systemu HACCP [4, 10, 11]. Podobną, chociaż mniej wykorzystywaną procedurę (LISA - longitudinally integrated safety assurance, szeregowo zintegrowane szacowanie bezpieczeństwa) zaproponował Mossel [4].

Głównym problemem prawidłowego oszacowania zagrożenia jest uzyskanie ilościowej informacji o możliwości wystąpienia zatrucia poprzez żywność zakażoną różną ilością mikroflory patogennej, tj. czy wystąpi infekcja, a jeśli tak to jaki będzie jej przebieg? Nasza obecna wiedza na temat wpływu koncentracji mikroorganizmów w żywności na zainicjowanie choroby, jest jeszcze nie pełna. Lepsze poznanie działania różnych czynników na proces zainicjowania infekcji, umożliwi skonstruowanie odpowiednich modeli dla głównych patogenów żywnościowych. Tego typu model, określający chorobotwórcze dawki mikroorganizmów, został już opracowany dla drobnoustrojów patogennych w wodzie pitnej, a ostatnio rozszerzony do określenia ryzyka zdrowotnego związanego z zakażeniem wirusowym mięczaków (Beta-Distribution Probability Model of Haas) [4].

### 1.3 Oszacowanie stopnia ryzyka

Polega ono na wyznaczeniu prawdopodobieństwa konsumpcji takiej ilości mikroorganizmów, która może wywołać infekcję lub chorobę. Głównym problemem jest tutaj rozmieszczenie mikroorganizmów w żywności. Zwykle jest ono heterogenne i zmieniające się w całym łańcuchu żywnościowym w rezultacie wzrostu lub śmierci mikroorganizmów, podczas przechowywania i przygotowania do spożycia. Niektórzy badacze uważają, że rozmieszczenie organizmów w żywności jest losowe, ale inni przyjmują rozkład normalny [4]. Biorąc pod uwagę heterogeniczne rozmieszczenie drobnoustrojów w żywności i różnorodność reakcji indywidualnych organizmów na infekcję, nie jest zaskoczeniem, że nie wszyscy zachorują, mimo narażenia na chorobotwórczą dawkę mikroorganizmów (rys. 2.).



Rys. 2. Oszacowanie ryzyka zagrożenia mikrobiologicznego

MDI - minimalna dawka infekcyjna

— - częstotliwość rozmieszczenia mikroorganizmów

----- % infekcji (strzałkami zaznaczono granice przedziału ufności odzwierciedlające wrażliwość populacji)

### 1.4 Charakterystyka ryzyka

Wynika ona z oszacowania zagrożenia i narażenia się (ryzyka), a ogólnie wyrażana jest jako rozkład prawdopodobieństwa wystąpienia oszacowanego zagrożenia. Należy wziąć pod uwagę, że osiągnięcie absolutnego bezpieczeństwa jest niemożliwe i w związku z tym musi być określone dopuszczalne ryzyko choroby w populacji narażonej na niebezpieczeństwo mikrobiologiczne. W idealnych warunkach powinno to być opracowane przez zespół składający się z pracowników przemysłu, konsumentów i odpowiedzialnych autorytetów z

dziedziny ochrony zdrowia, którzy braliby pod uwagę aspekty socjalno-ekonomiczne i inne. Dla wspomnianego już modelu opracowanego dla wody i skorupiaków, Agencja Środowiska Stanów Zjednoczonych, zaproponowała aby poziom dopuszczalnego ryzyka spowodowanego konsumpcją wody wynosił: jedna infekcja na  $10^4$  osób na rok. Z kolei Mossel i Drion [4] zaproponowali zastosowanie średniej częstotliwości infekcji dla patogenów jako jedna infekcja w całej populacji podczas 100 lat. Różnice te wskazują na pragmatyczne podejście Agencji i bardziej idealistyczną wizję naukowców. W każdym przypadku należy jednak dostosowywać poziom dopuszczalnego ryzyka do powagi zagrożenia, jakie niesie ze sobą obecność danego patogenu. Na przykład poziom bezpieczeństwa dla *Clostridium botulinum* musi być znacznie wyższy niż dla mniej groźnych mikroorganizmów (np. *Clostridium perfringens*). Dlatego też akceptowany poziom narażenia się na obecność *Clostridium botulinum* w żywności apertyzowanej musi być poniżej 1 puszki na  $10^{12}$  opakowań, gdy dla innych, nie powodujących zagrożenia życia lub odpowiedzialnych za zepsucie organizmów, dopuszczalny jest poziom poniżej jednej puszki na  $10^4$ .

Tak więc w celu określenia dopuszczalnego ryzyka, przemysł musi wziąć pod uwagę - dane epidemiologiczne dotyczące zachorowań (dawka i powaga choroby); - wybraną populację konsumentów; - prawdopodobieństwo wystąpienia niekontrolowanego ryzyka zagrożenia zdrowia. Na podstawie takiej analizy, definiowany jest poziom zabezpieczenia koniecznego do zastosowania przy poszczególnych operacjach technologicznych. Istotnym jest jednak aby redukując ryzyko narażenia się na jedno niebezpieczeństwo, nie spowodować jednocześnie wzrostu ryzyka innego czynnika. Zawsze więc istnieje potrzeba wyważenia ryzyka różnych czynników i podjęcia pragmatycznej decyzji, zgodnie z zasadą że jeśli nie będziemy jeść, zagłodzimy się na śmierć, lecz gdy będziemy jeść, także możemy umrzeć.

Formalne oszacowanie ryzyka związanego z drobnoustrojami patogennymi, będzie zawsze nastęrczało dużo trudności, ze względu na nie przewidywalne i specyficzne czynniki, które muszą być brane pod uwagę dla oszacowania niebezpieczeństwa i narażenia się. Podejmuje się jednak działania, których celem jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności między innymi różnorodne systemy zapewnienia jakości. Jak już wspomniano, jednym z narzędzi, które może być stosowane w systemach służących zagwarantowaniu jakości, są matematyczne modele mikrobiologiczne pozwalające na określenie przewidywanego zachowania mikroorganizmów, (jakościowego i ilościowego). Dziedzina ta została nazwana "predictive microbiology"; poniżej omówiono jej ogólne zasady.

## 2. MIKROBIOLOGIA PROGNOSTYCZNA

Mikrobiologia prognostyczna ("predictive microbiology") to przewidywanie, przepowiadanie czy prognozowanie w mikrobiologii. W ciągu ostatnich 5 - 8 lat mikrobiologia prognostyczna była jedną z najintensywniej rozwijających się sub-dyscyplin w ramach mikrobiologii żywności. Zainteresowanie tą dziedziną ma zasięg ogólnoswiatowy [12, 13, 14, 15, 16].

Jedno z podstawowych założeń nowoczesnej mikrobiologii żywności stanowi fakt, że wzrost mikroorganizmów jest funkcją żywności jako środowiska. Gatunki bardziej przystosowane do życia w takim środowisku jakim jest żywność będą dominujące. W każdym środowisku można określić skończoną ilość czynników wpływających na fizjologiczne reakcje mikroorganizmów. Teoretycznie, możliwe jest uzyskanie specyficznych informacji, dotyczących charakterystyk wzrostu poszczególnych mikroorganizmów w każdym produkcie żywnościowym, jako

odpowieź na określone warunki środowiska. Jednakże ogromna ilość produktów żywnościowych spożywanych na świecie i wysoki poziom zmienności biologicznej, w zasadzie uniemożliwia realizację tych teoretycznych założeń. Na szczęście w większości produktów żywnościowych występuje limitowana ilość czynników determinujących wzrost mikroorganizmów. Jeśli zostanie określona reakcja mikroorganizmów na te czynniki, możliwe będzie określenie ich zachowania w żywności. Założenie to leży u podstaw mikrobiologii prognostycznej. Na podstawie zebranych w kontrolowanych warunkach danych, formułowane są zależności matematyczne, określające wpływ i interakcje poszczególnych zmiennych. Obliczone modele matematyczne mogą być następnie wykorzystane do przewidywania zachowania mikroorganizmów w szeregu produktów żywnościowych, tylko na podstawie pomiaru parametrów fizycznych [13, 14].

Mikrobiologia żywności była zawsze dziedziną w której stosowano modelowanie matematyczne, chociaż często mikrobiolodzy żywności nie zdawali sobie w pełni sprawy z faktu, że techniki które rutynowo wykorzystują, są formą mikrobiologii prognostycznej. Przykładem może być obliczanie oporności termicznej i czasów procesu, wymagające zastosowania liniowego modelu matematycznego opisującego inaktywację bakterii.

Można wymienić wiele przyczyn ponownego zainteresowania modelowaniem matematycznym dla opisu zależności mikrobiologicznych w żywności, a wśród nich:

- powszechną dostępność mikrokomputerów,
- preferencje konsumentów dla świeżych, mniej przetworzonych produktów żywnościowych. Spowodowało to opracowanie nowych systemów utrwalania kombinowanego, polegających na zastosowaniu szeregu czynników. W związku z tym istnieje konieczność ilościowego określenia efektów każdego czynnika dla zapewnienia ogólnej jakości mikrobiologicznej żywności. Także stosowanie HACCP wymagającego określenia limitów krytycznych dla poszczególnych etapów obróbki żywności, stwarza potrzebę opracowania efektywnych modeli,
- ogromna ilość różnorodnych produktów żywnościowych obecnych w handlu międzynarodowym. Poprzez systematyczne określanie wpływu ilościowego kluczowych czynników oddziałujących na zachowanie mikroorganizmów, możliwe jest stworzenie efektywnych modeli, przydatnych dla różnych produktów [12].

Pierwotne modele prognostyczne tworzone były oddzielnie dla wzrostu i oddzielnie dla inaktywacji drobnoustrojów. Modele dotyczące wzrostu mikroorganizmów są ogólnie lepiej opracowane niż modele inaktywacji, z wyjątkiem modeli inaktywacji termicznej. Obecnie coraz częściej dostrzegana jest potrzeba konstruowania modeli obejmujących wzrost, przeżywalność i śmierć mikroorganizmów.

## 2.1 Modelowanie wzrostu bakterii

Różnorodne modele, opracowane dla opisu 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 dla 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 [13].



Drobnoustroje rozwijają się w środowisku zgodnie z krzywą wzrostu, w której po fazie przystosowawczej, następuje faza wzrostu wykładniczego, a następnie faza wzrostu stacjonarnego i ostatnia - faza zamierania. Reakcje populacji bakteryjnej określa się dla potrzeb mikrobiologii prognostycznej jako zmianę: w czasie trwania lag fazy, okresu generacji, zmianę czasu potrzebną do osiągnięcia określonej 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. Jest to warunkiem koniecznym do utworzenia modeli drugorzędowych kinetyki wzrostu mikroorganizmów. Szczególnie istotne było wykorzystanie różnorodnych zależności sigmoidalnych, takich jak krzywe logistyczne i Gompertz'a. Zależności te były pierwotnie wykorzystywane do opisu innych procesów biologicznych. Dopiero w końcu lat 80. zwrócono uwagę mikrobiologów żywności na możliwość ich zastosowania do wyrażenia wzrostu mikroorganizmów. Zmieniło to radykalnie drogę analizy ilościowej kinetyki wzrostu [12].

Wzór Gompertz'a jest czteroparametrową funkcją opisującą asymetryczną krzywą sigmoidalną [15, 16]:

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

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 wzoru mogą zostać matematycznie przyrównane do charakterystyk kultur mikrobiologicznych znanych mikrobiologom, tj. do wykładniczej szybkości wzrostu, czasu generacji, czasu trwania lag fazy i maksymalnej gęstości populacji. W związku z tym wzór Gompertz'a może być przekształcony używając parametrów szybkości wzrostu i czasu trwania lag fazy [12].

### **Modelowanie wpływu warunków środowiskowych i kultur bakteryjnych na wzrost bakterii**

Wzrost mikroorganizmów w systemie żywnościowym zależy od szeregu zmiennych. Na kinetykę wzrostu mikroorganizmów mają między innymi wpływ: temperatura, pH, kwasowość, aktywność wody, wilgotność, izotermi absorpcji i desorpcji, dostępność tlenu, poziom dwutlenku węgla, potencjał redox, zawartość i dostępność składników odżywczych, obecność substancji antymikrobiologicznych. Tradycyjne technologie utrwalania oddziałują zwykle na jeden z tych parametrów, tak aby zapobiegać rozwojowi drobnoustrojów chorobotwórczych. W związku z rozwojem produkcji żywności świeżej jak najmniej przetworzonej, opracowano systemy zabezpieczenia żywności jedynie poprzez schładzanie i odpowiednie opakowanie, stwarzające wielostopniowe bariery oddziałujące na różne czynniki, odpowiedzialne za rozwój mikroorganizmów. Utrwalanie to polega na sumarycznym działaniu wielu czynników, z których każdy oddzielnie nie jest w pełni skuteczny. Stosowana jest duża ilość kombinacji

różnych czynników, które dopiero wtedy są skuteczne. Dla kosztownego opracowywania i produkcji tego typu wyrobów, jest prawie niezbędnym dostępność i stosowanie dobrego modelu, łączącego wpływ stosowanych zmiennych [12].

### Modele oparte na prawdopodobieństwie

Większość tych modeli opartych jest na założeniach Hauschild'a [12], który oszacował prawdopodobieństwo rozwoju i produkcji toksyn przez pojedynczy przetrwalnik *Cl. botulinum*. Założenie to bierze pod uwagę silny wpływ, jaki na kiełkowanie przetrwalników bakterii wywierają warunki kultury bakteryjnej. Wykazano np., że prawie wszystkie przetrwalniki *Cl. botulinum* wykiełkowały w środowisku bez NaCl, o pH 7,0, podczas gdy tylko 1 spośród 100 000 wykiełkował w obecności 2% NaCl i pH 5,5 [12, 13]. W wielu doświadczeniach badano wpływ i interakcje szeregu zmiennych na prawdopodobieństwo kiełkowania i wzrostu *Clostridium botulinum* [12]. Do modelowania indywidualnego udziału zmiennych, wykorzystano różnorodne formy analizy regresji, dostarczające wielu wzorów matematycznych, które mogą służyć do przewidywania zachowań bakterii w żywności [12]. Przykładowe wzory zamieszczono we wcześniejszej publikacji autorki [14].

### Modele kinetyczne

Następną grupą modeli są te, które matematycznie opisują wpływ warunków kultury bakteryjnej i środowiska, na kinetykę wzrostu mikroorganizmów, szczególnie okres trwania lag fazy i czas generacji. Modelowanie może być prowadzone bezpośrednio lub z wykorzystaniem funkcji matematycznych takich jak wzór Gompertza'a.

Stwierdzono, że wprawdzie potencjalny wzrost patogenów w żywności zależy od interakcji wielu zmiennych, ale w przypadku szeregu produktów wiodące znaczenie ma pojedynczy czynnik. Na przykład takim pojedynczym determinantem wzrostu mikroorganizmów w żywności zhomogenizowanej, takiej jak płynne mleko, jest temperatura przechowywania. Nic więc dziwnego, że większość badań nad modelowaniem, dotyczyła właśnie tej zmiennej [15, 16].

Modelowanie wpływu temperatury przy wykorzystaniu prostego wzoru Arrheniusa jest odpowiednie tylko dla zakresu temperatury wzrostu organizmów. Innymi rozpatrywanymi wzorami są: nie-liniowy wzór Arrheniusa-Schoolfielda, liniowy wzór Arrheniusa-Davey'a i modele "pierwiastka kwadratowego" [12, 13]. Te ostatnie modele były badane bardzo często, szczególnie dla żywności chłodzonej.

W przypadku gdy w celu zapobieżenia wzrostowi mikroorganizmów, musi być wzięta pod uwagę większa ilość czynników, typ opracowywanych modeli zależy od ilości i wzajemnej zależności zmiennych. Dla bardziej skomplikowanych układów zależności większej ilości parametrów, stosowana jest technika "powierzchni odpowiedzi". Zaproponowane dla wielu mikroorganizmów wzory "powierzchni odpowiedzi" opisują wpływ i interakcje zmiennych eksperymentalnych [14].

## 2.2 Matematyczne modelowanie inaktywacji mikroorganizmów w żywności

Proces termicznej 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 na jednorodną zawiesinę komórkową drobnoustrojów jednakowo

ciepłoopornych, następuje ich obumieranie w dużym zakresie według prawideł reakcji pierwszego rzędu:

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

w których:  $N$  = ilość komórek przeżywających ogrzewanie w czasie  $t$ ,  
 $k$  = współczynnik proporcjonalności,  
 $-dN/dt$  = szybkość inaktywacji.

Po dalszych przekształceniach otrzymywana jest zależność:

$$t = \frac{2.303}{k} \log \frac{N_0}{N}$$

w których:  $N_0$  = początkowa ilość komórek,  
 $N$  = stężenie komórek po czasie ogrzewania  $t$ .

Powyższe zależności używane są przy wyznaczaniu oporności cieplnej komórek bakterii, niezależnie od stosowanych metod pomiarowych, pod warunkiem, że krzywe przeżywalności mają przebieg liniowy. W przypadku nie liniowego przebiegu tych krzywych może być zastosowany wzór Alderton'a i Snell'a [17]:

$$(\lg N_0 - \lg N)^a = kt + c$$

gdzie:  $N_0$  = początkowa ilość mikroorganizmów,  
 $N$  = ilość organizmów przeżywających w czasie  $t$ ,  
 $k$  = stała szybkości śmierci,  
 $c$  = stała.

Reinchart i Mohácsi-Farkas [18] sformułowali zależności matematyczne określające wpływ kilku czynników: temperatury, aktywności wody, pH i potencjału redox na inaktywację siedmiu gatunków drobnoustrojów chorobotwórczych. Stopień cieplnej destrukcji ( $k$ ) może być opisany przykładowo następującymi wzorami:

$$[1] \lg k = a_1 + b_1pH + b_2Eh + b_3a_w + b_4T$$

$$[2] \lg k = a_4 + b_1pH + b_2Eh + b_7 \lg a_w + b_4T$$

Obok stosunkowo dużej ilości opracowań dotyczących modeli termicznej inaktywacji mikroorganizmów, istnieją, choć w zdecydowanej mniejszości, dane związane z inaktywacją nie termiczną. Dotyczą one np. wpływu pH, aktywności wody czy obecności środków antymikrobiologicznych [12].

### 2.3 Modelowanie wzrostu, przeżywalności i śmierci mikroorganizmów

Przedstawione powyżej rodzaje modelowania nie obejmują całości zjawisk. Zdarza się bowiem, że na przykład mikroorganizmy zaczynają się rozwijać po krótkiej lag fazie. W innych przypadkach mogą zginąć lub przechodzą przedłużony okres równowagi, ewentualnie powodujący wzrost, ale tylko po początkowym spadku. W takim przypadku zaprezentowane powyżej rodzaje modeli, nie przedstawiają prawdziwej populacji. W mikrobiologii żywności

duże znaczenie będą miały modele zbiorcze, które zawierają trzy rodzaje dynamiki populacji (tj. wzrost, przeżywalność i śmierć).

Prace nad tego typu modelami zostały podjęte m.in. w Wielkiej Brytanii i są sponsorowane przez Ministerstwo Rolnictwa, Rybołówstwa i Żywności [19, 20]. Prowadzone są badania nad konstrukcją modeli matematycznych dla bakterii patogennych: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* i *Yersinia enterocolitica*.

Przykład tego typu prac stanowi opracowanie Jones'a i wsp. [19], dla *Listeria monocytogenes*. Danymi wyjściowymi do opracowania wzorów był cykl życia mikroorganizmów, który może być podzielony na dwie fazy: 'I' - organizmów niedojrzałych, nie zdolnych do podziału i '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,

$\mu_I$  - funkcja szybkości śmierci komórek niedojrzałych,

$\alpha$  - szybkość podziału komórek,

$C(t)$  - ilość komórek dojrzałych w czasie  $t$ ,

$I(t)$  - ilość komórek niedojrzałych w czasie  $t$ .

Prowadzone przez wiele ośrodków w Wielkiej Brytanii prace doprowadziły do skonstruowania modeli, które posłużyłyby 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, stężenia soli, pH, aktywności wody, zawartości kwasu mlekowego,  $CO_2$ , zawartości azotynu sodu lub innych konserwantów. Zastosowanie tych technik jest dla mikrobiologów szansą, pozwalającą im na szybkie określenie reakcji mikroorganizmów na zmieniające się warunki w żywności. Możliwe jest przewidywanie np. bezpiecznego okresu przydatności do spożycia, poprzez określenie gatunków drobnoustrojów, które zostaną zainaktywowane, przetrwają lub będą się rozwijać w znanych warunkach [10]. W ten sposób mikrobiologia prognostyczna staje się bardzo istotnym narzędziem w systemach kształtowania określonej, gwarantowanej jakości produktów żywnościowych (np. HACCP, TQM, ISO 9000), w czasie procesu ich pozyskiwania, wytwarzania, przechowywania i dystrybucji, zastępując końcową kontrolę wyrobów gotowych. ■

## Literatura

1. Norma PN-EN 28402 (ISO 8402), 1993.
2. Gołębiowski T., Sikora T., Towaroznawstwo żywności, AE Kraków 1991.
3. Szczucki C., Gospod. Mięsna 1970, 1.
4. Baird-Parker A.C., Food Control 1995, 6, 1.
5. Kunicki-Goldfinger W.J.H., Życie bakterii, Wyd. Nauki. PWN Warszawa 1994.
6. Kołożyn-Krajewska D., Chrostowska-Gońda B., Przem. Spoż. 1993, 47, 12.
7. Kołożyn-Krajewska D., Przem. Spoż. 1993, 47, 9.
8. Jay J.M., Modern Food Microbiology VNR New York 1986
9. Rhodes M.E., Food Mycology G.K. Hall & Co., Boston 1979.
10. Materiały szkoleniowe Leatherhead Food RA: HACCP 1995.
11. Kołożyn-Krajewska D., Szkoła letnia "Food Product Development" Błażejewko k/Poznania 1994.
12. Buchanan R.L., Trends Food Sci. Technol. 1993, 4, 1.
13. Buchanan R.L., Food Safety Assessment Amer. Chem. Soc., Washington DC 1993.
14. Kołożyn-Krajewska D., Przem. Spoż. 1994, 48, 11.
15. Buchanan R.L., J. Food Safety 1991, 11.
16. Buchanan R.L., Cygnarowicz M.L., Food Microbiol. 1990, 7.
17. Alderton J., Snell N., Appl. Microbiol., 1970, 19.
18. Reichart O., Mohacsi-Farkas O., Intern. J. Food Microbiol. 1994, 24.
19. Jones J.E. i wsp., Intern. J. Sci Microbiol. 1994, 23.
20. Walker S.J., Jones J.E., J. Ind. Microbiol. 1993, 12.