

Mikrobiologia prognostyczna – zastosowania praktyczne

JACEK SZCZAWIŃSKI

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Szczawiński J.

Predictive microbiology: Practical applications

Summary

Studies on the effects of environmental factors and technological processes on the behavior of microorganisms in food have been conducted for many years. Mathematical models have come to be used extensively for quantitative interpretation of the results of these studies. The use of modeling in food microbiology has grown to the point of being recognized as a distinct discipline of food microbiology, termed predictive microbiology. In recent years, progress in this field has been impressive, and predictive microbiology is increasingly used by food producers and food inspectors in their routine work. One of the reasons for this development are changes in European food law, particularly the obligatory introduction of HACCP, risk analysis and microbiological criteria for food. Predictive microbiology has been an important supporting tool in food chain risk management.

Keywords: predictive microbiology, HACCP, risk analysis, food chain

Podstawowym celem mikrobiologów i technologów żywności jest uzyskanie bezpiecznych dla zdrowia konsumenta i trwałych produktów spożywczych. Do osiągnięcia tego celu niezbędna jest inaktywacja lub zahamowanie wzrostu i aktywności niepożądanych drobnoustrojów, które mogą powodować zatrucia i zakażenia pokarmowe lub psucie się środków spożywczych. Od dawna prowadzone są zatem badania nad wpływem czynników środowiskowych oraz procesów technologicznych na zachowanie się mikroorganizmów w żywności. W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku intensywność tych badań znacznie wzrosła, jednak brak odpowiednich metod matematycznej interpretacji wyników przeprowadzanych doświadczeń ograniczał realny postęp w mikrobiologii żywności. Momentem przełomowym była Konferencja Towarzystwa Mikrobiologii Przemysłowej (Society for Industrial Microbiology) w Tampie na Florydzie w 1992 r., podczas której mikrobiolodzy, technolodzy, matematycy i statystycy z kilkunastu krajów określili kierunki rozwoju nowej gałęzi mikrobiologii żywności – „predictive microbiology” (6).

Podstawowym założeniem mikrobiologii prognostycznej jest powtarzalność procesów mikrobiologicznych przebiegających w żywności oraz możliwość opisanie ich za pomocą modeli matematycznych, a głównym celem – przewidywanie zachowania się drobnoustrojów w produktach spożywczych, wyrażane w kategoriach ilościowych.

Jest kilka klasyfikacji modeli matematycznych wykorzystywanych w mikrobiologii prognostycznej. Według jednej z nich wyróżnia się:

- modele oparte na prawdopodobieństwie – często stosowane w przypadku bakterii przetrwalnikujących np. *C. botulinum*,

- modele kinetyczne – stosowane zwykle dla bakterii nieprzetrwalnikujących, które stają się niebezpieczne po przekroczeniu pewnej progowej liczby.

Z uwagi na charakter opisywanego zjawiska wyróżnia się modele inaktywacji, wzrostu oraz przeżywalności drobnoustrojów (14).

Inna klasyfikacja dzieli modele matematyczne na pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe.

Modele pierwszorzędowe to wzory matematyczne opisujące krzywe wzrostu lub przeżywalności.

Modele drugorzędowe są równaniami opisującymi zmiany parametrów modeli pierwotnych pod wpływem zmian czynników środowiskowych. Do najczęściej stosowanych należą model Arrheniusa, pierwiastka kwadratowego Ratkowskiego i model Gamma Zwite-ringa (14).

Modele trzeciorzędowe są komputerowymi arkuszami kalkulacyjnymi (systemami) złożonymi z modeli pierwszego i drugiego rzędu. Paradoksalnie te najbardziej skomplikowane modele są często najbardziej przyjazne dla użytkowników, ponieważ zostały opracowane w formie łatwych w obsłudze programów komputerowych służących do symulacji zachowania się

drobnoustrojów w różnych warunkach. Przykładami takich modeli są Food MicroModel opracowany przez Leatherhead Food Research Association, ComBase Predictor i najbardziej popularny Pathogen Modeling Program, który dostępny jest bezpłatnie na stronie internetowej Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA).

Przewidywanie inaktywacji drobnoustrojów pod wpływem czynników fizycznych

Modele matematyczne wykorzystano po raz pierwszy do przewidywania inaktywacji drobnoustrojów podczas obróbki termicznej. Prace w dziedzinie termobakteriologii zapoczątkowane zostały już w 1895 r. przez Russela. Podwaliny teoretyczne technologii produkcji konserw tworzył Bigelow, który w latach 1917-1921 wyznaczył oporność przetrwalników bakteryjnych i był w stanie obliczyć niezbędne parametry sterylizacji, a następnie Ball, Stumbo i wielu innych badaczy, dzięki którym konserwy sterylizowane termicznie uważane są za jeden z najbardziej bezpiecznych produktów (17).

W większości przypadków przy zachowaniu stałej temperatury proces termicznego występuje prostoliniowa zależność pomiędzy czasem ogrzewania i liczbą przeżywających drobnoustrojów, dlatego do podstawowych pojęć z zakresu termobakteriologii należy obliczana z analizy regresji liniowej wartość „D”, która oznacza czas wyrażony w minutach potrzebny w danej temperaturze do dziesięciokrotnej redukcji liczby drobnoustrojów oraz wartość „z”, która charakteryzuje wrażliwość populacji bakteryjnej na wzrost temperatury i określa, o ile stopni Celsjusza należy podnieść (lub obniżyć) temperaturę obróbki cieplnej, aby uzyskać dziesięciokrotne skrócenie (lub wydłużenie) wartości D. Znajomość tych wartości oraz zmian temperatury w produkcji podczas jego ogrzewania pozwalają na przewidywanie konsekwencji mikrobiologicznych obróbki termicznej przy stosowaniu różnych kombinacji czasu i temperatury oraz na obliczanie wartości pasteryzacyjnych (PV) lub sterylizacyjnych (F) niezbędnych do uzyskania zaplanowanego stopnia destrukcji bakterii wegetatywnych lub przetrwalników (17). Pomimo znacznych osiągnięć w zakresie matematycznego modelowania inaktywacji termicznej drobnoustrojów, ciągle poszukuje się nowych rozwiązań, zwłaszcza przy stosowaniu łagodnej obróbki cieplnej w połączeniu z innymi czynnikami, np. modyfikacją pH lub obniżaniem aktywności wody.

Modele matematyczne opracowane przez termobakteriologów są wykorzystywane (bezpośrednio lub po nieznaczących modyfikacjach) do przewidywania skutków stosowania innych procesów fizycznych, tj. napromieniowania żywności oraz wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (7).

Przewidywanie wzrostu drobnoustrojów

Znacznie trudniejsze od przewidywania stopnia inaktywacji okazało się prognozowanie wzrostu drob-

noustrojów w żywności, ponieważ jego dynamika zależy od wielu zmiennych, takich jak: charakter jakościowy i ilościowy początkowej mikroflory produktu, temperatura, pH, aktywność wody, dostępność tlenu, poziom CO₂, stężenie substancji konserwujących, zawartość witamin i aminokwasów egzogennych itp.

Przykładem jednego z pierwszych zastosowanych modeli opartych na prawdopodobieństwie jest zaproponowany przez Hauschilda (4) prosty wzór do obliczania prawdopodobieństwa wykiełkowania pojedynczego przetrwalnika *C. botulinum* oraz namnożenia się potomnych komórek wegetatywnych do poziomu niezbędnego do wytworzenia toksyny botulinowej:

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

gdzie:

P – prawdopodobieństwo wytworzenia toksyny botulinowej,

n – liczba próbek w grupie doświadczalnej,

q – liczba próbek nietoksycznych,

s – liczba przetrwalników *C. botulinum* w 1 próbce.

Wykorzystanie tego równania w badaniach własnych pozwoliło na ocenę wpływu napromieniowania na właściwości przeciwbotulinowe azotynu sodowego w peklowanym mięsie (9, 13). Umożliwia ono również ocenę ryzyka wystąpienia zatruc botulinowych związanego z konsumpcją różnych produktów spożywczych obecnych na rynku (4).

Przykładem jednego z pierwszych zastosowanych modeli kinetycznych jest równanie Gomperta (1, 3, 6), wykorzystywane do przewidywania kinetyki wzrostu populacji bakteryjnej:

$$L_{(t)} = A + C \exp \{-\exp [-B(t - M)]\}$$

gdzie:

L_(t) – log liczby bakterii w czasie t (h) [lg/ml],

A – asymptotyczny lg liczby bakterii przy nieoznaczonym spadku czasu (≈ lg początkowej liczby bakterii) [lg/ml],

C – asymptotyczna wielkość wzrostu przy nieoznaczonym wzroście czasu (ilość lg cykli wzrostu) [lg/ml],

M – czas, przy którym tempo wzrostu jest maksymalne [h],

B – relatywne tempo w czasie M [lg/ml/h].

Zaletą równania Gomperta jest to, że pozwala ono przy pomocy równań pomocniczych na obliczenie takich wskaźników, jak: długość trwania lagfazy, tempo wzrostu bakterii w fazie logarytmicznej, czas jednej generacji oraz maksymalna gęstość populacji, co umożliwia znaczne pogłębienie interpretacji wyników doświadczeń mikrobiologicznych. Model Gomperta okazał się bardzo przydatny w badaniach własnych, których celem było porównanie wzrostu *S. aureus* w nienapromieniowanej i napromieniowanej różnymi dawkami peklowanej szynce wieprzowej (12) oraz porównanie krzywych wzrostu pałeczek *Salmonella* poddanych działaniu ogrzewania mikrofalowego i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego z krzywymi wzrostu bakterii kontrolnych (10, 11).

Do innych modeli najczęściej wykorzystywanych obecnie do oceny wzrostu populacji bakteryjnej w żywności należy model logistyczny, Baranyi i MacKellara.

Do oceny przeżywalności bakterii stosuje się modele: liniowy, nieliniowy potęgowy, nieliniowy eksponencjalny, nieliniowy Fermi, nieliniowy Cole'a, zmodyfikowany Gomperta oraz Baranyi i MacKellara (7).

Rola mikrobiologii prognostycznej w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności

Mikrobiologia prognostyczna rozwija się w ostatnich latach niezwykle dynamicznie. Odgrywa ona nie tylko istotną rolę w interpretacji wyników badań z zakresu mikrobiologii żywności, ale też jest coraz powszechniej wykorzystywana w rutynowej pracy producentów żywności oraz służb inspekcyjnych, w tym Inspekcji Weterynaryjnej.

Jedną z przyczyn tego zjawiska są zmiany w europejskim prawie żywnościowym ukierunkowane na poprawę bezpieczeństwa żywności, a zwłaszcza obligatoryjne wprowadzenie systemu HACCP, analizy ryzyka (Rozporządzeniem WE nr 178/2002) oraz kryteriów mikrobiologicznych dla żywności (Rozporządzenie WE nr 2073/2005 i 1441/2007).

W systemie HACCP możliwość przewidywania reakcji drobnoustrojów na stosowane zabiegi technologiczne i zmiany czynników środowiskowych może być wykorzystana w analizie zagrożeń i określaniu środków kontrolnych, ustalaniu poziomów docelowych i limitów krytycznych oraz przy weryfikacji systemu (7).

Pojęcie analizy ryzyka zostało określone w prawie żywnościowym jako postępowanie składające się z trzech powiązanych ze sobą elementów obejmujących: ocenę ryzyka, zarządzanie ryzykiem i informowanie o ryzyku. Mikrobiologia prognostyczna jest cennym narzędziem w ocenie ryzyka mikrobiologicznego – wspartego naukowo procesu składającego się z czterech etapów: identyfikacji zagrożenia, charakterystyki niebezpieczeństwa, oceny narażenia oraz charakterystyki ryzyka. Mikrobiologia prognostyczna jest szczególnie przydatna w dwóch ostatnich etapach oceny ryzyka, tj. ocenie narażenia oraz charakterystyce ryzyka.

Wielu szczegółowych informacji na temat roli i możliwości wykorzystania mikrobiologii prognostycznej w systemie HACCP, ocenie ryzyka mikrobiologicznego oraz analizie ryzyka dostarcza opracowanie *Modeling Microbial Responses in Food* (7).

Kontrola jakości mikrobiologicznej środków spożywczych znajdujących się w obrocie jest jednym z podstawowych elementów zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Z tego względu szczególnie istotną rolę w europejskim prawie żywnościowym odgrywa rozporządzenie (WE) 2073/2005 (wraz z nowelizacją zawartą w rozporządzeniu (WE) nr 1441/2007 oraz późniejszymi zmianami) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dla produktów spożywczych. Każdy producent środków spożywczych powinien posiadać

dokumentację charakteryzującą produkt uzyskiwany w warunkach zakładu w wyniku określonego procesu produkcyjnego. Powinny zostać wykonane odpowiednie badania dla określenia trwałości produktu. Dla każdego nowego produktu wskazane jest wykonanie badań fizykochemicznych, takich jak: określenie pH, a_w , zawartości soli i środków konserwujących. Dla uzyskania niezbędnych informacji zaleca się wykorzystywanie modeli matematycznych, pozwalających na ocenę wzrostu lub przeżywalności określonych drobnoustrojów chorobotwórczych podczas przechowywania w różnych warunkach. W szczególności dotyczy to żywności gotowej do spożycia, w której możliwy jest wzrost *Listeria monocytogenes* – bakterii stwarzającej znaczne ryzyko dla zdrowia ludzkiego w przypadku osiągnięcia wysokiej liczby. AFSSA (Francuska Agencja Bezpieczeństwa Żywności) oraz Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. *Listeria monocytogenes* opublikowały dokument techniczny zawierający metody badań pozwalające na ocenę intensywności wzrostu listerii w żywności gotowej do spożycia (2). W dokumencie tym rekomenduje się wykorzystanie programu MicroFit v 1.0 opracowanego w Instytucie Badania Żywności (IFR) w Wielkiej Brytanii, który bazuje na modelu wzrostu Baranyi.

Wydaje się, że w najbliższej przyszłości mikrobiologia prognostyczna będzie powszechnie wykorzystywana w zarządzaniu ryzykiem w łańcuchu żywnościowym. Wynika to z faktu, że wiodące organizacje międzynarodowe (ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods, CAC – Codex Alimentarius Commission, ILSI – International Life Science Institute) zalecają wprowadzenie do narodowych programów bezpieczeństwa żywności narzędzi bazujących na idei analizy ryzyka mikrobiologicznego (MRA), które mogłyby powiązać wymagania krajowych programów bezpieczeństwa żywności z ich wpływem na zdrowie publiczne (15, 16). Dyskusja nad tymi narzędziami (kryteriami) zaczęła się już w latach dziewięćdziesiątych. Zostały one wprowadzone po raz pierwszy w praktyce przez WTO (Światowa Organizacja Handlu). Narzędziami tymi są: ALOP, FSO, PC i PO. ALOP (Appropriate Level of Protection) oznacza „odpowiedni poziom ochrony”, czyli poziom przyjęty jako odpowiedni przez dany kraj w obrębie swojego terytorium. FSO (Food Safety Objective) – „cel bezpieczeństwa żywności” to maksymalna częstotliwość i/lub koncentracja czynnika zagrożenia w żywności na etapie jej spożycia. PO (Performance Objective) – „cel wykonawczy” to maksymalna częstotliwość i/lub koncentracja czynnika zagrożenia w żywności na odpowiednim etapie jej produkcji przed etapem jej spożycia. PC (Performance Criterion) – „kryterium wykonawcze” to maksymalna wartość w zakresie częstotliwości i/lub koncentracji czynnika zagrożenia w żywności, która musi być osiągnięta. Punktem wyjścia tej koncepcji ma być odpowiedni poziom ochrony (ALOP), ustalany przez

władze danego kraju i wyrażany jako ogólne cele zdrowia publicznego. W celu praktycznego powiązania ALOP z kontrolą zagrożeń bezpieczeństwa żywności powinny być ustanowione cele bezpieczeństwa żywności (FSO), cele operacyjne (PO) oraz kryteria operacyjne (PC). Przykładem FSO mogą być kryteria bezpieczeństwa żywności określone w Rozporządzeniu 2073/2005 i 1441/2007.

Przykładem PO może być np. występowanie pałeczek *Salmonella* nie częstsze niż w 0,002% surowych tuszek drobiowych. Przykładem PC jest np. wymagania redukcji bakterii enteropatogennych o 5 jednostek logarytmicznych podczas pasteryzacji.

Wymienione narzędzia (FSO, PO, PC) w wymierny sposób umożliwiają producentom praktyczną realizację zadań w zakresie bezpieczeństwa żywności, które zagwarantują osiągnięcie ALOP. Do koncepcji FSO nawiązuje pośrednio norma ISO22000: 2005, która wymaga określenia akceptowalnych poziomów zagrożeń w wyrobach gotowych.

Wydaje się, że omawiane kryteria będą coraz częściej wykorzystywane w praktyce i staną się powszechnie stosowanym, użytecznym narzędziem w kształtowaniu polityki bezpieczeństwa żywności oraz ochrony zdrowia publicznego.

Opisując praktyczne zastosowania mikrobiologii prognostycznej, wypada wspomnieć o działaniach podejmowanych w Polsce w tym zakresie. Obecnie w kilku krajowych ośrodkach naukowych, w tym również w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego SGGW, realizowany jest projekt rozwojowy nr N R12 0097 06/2009 „Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do modelowania bezpieczeństwa żywności”. Kierownikiem i koordynatorem projektu jest prof. dr hab. Stefan Ziajka z UWM w Olsztynie. Cele badań obejmują: opracowanie matematycznych modeli (wzrostu, przeżywalności), opisujących zachowanie się określonych drobnoustrojów chorobotwórczych w wybranych produktach pochodzenia zwierzęcego przechowywanych w różnych temperaturach; przedstawienie wyników w formie komputerowej bazy danych; przygotowanie narzędzi do realizacji programów bezpieczeństwa żywności w oparciu o analizę ryzyka w postaci kryteriów operacyjnych, kryteriów procesu i kryteriów produktu. Do chwili obecnej określono zachowanie się *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Y. enterocolitica* i *E. coli* w 15 wybranych produktach, przechowywanych w 5 różnych temperaturach w zakresie od 0°C do 25°C. Projekt realizowany jest we współpracy z producentami żywności, a zatem jego wyniki mają szansę na szybkie zastosowanie w praktyce.

Piśmiennictwo

1. Baranyi J., Roberts T. A.: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 23, 277-294.
2. Beaufort A., Cornu M., Bergis H., Lardeux A. L., Lombard B.: Technical Guidance Document On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Ali-

ments). EU Community Reference Laboratory for *Listeria Monocytogenes*. Version 2 – November 2008.

3. Gibson A. M., Bratchell N., Roberts T. A.: Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 1988, 6, 155-178.
4. Hauschild A. H. W.: Assessment of botulism hazards from cured meat products. *J. Food Technol.* 1982, 36, 95-104.
5. Kolożyn-Krajewska D.: Higiena produkcji żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2003.
6. López S., Prieto M., Dijkstra J., Ghanoa M. S., France J.: Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 96, 289-300.
7. McKellar R. C., Lu X.: Modeling microbial responses in food. CRC Press 2004.
8. Swarte C., Donker R. A.: Towards an FSO/ALOP based food safety policy. *Food Control* 2005, 16, 825-830.
9. Szczawiński J.: Wpływ peklowania, pasteryzacji i napromieniowania mięsa na wytwarzanie toksyny przez *Clostridium botulinum*. Praca hab. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa 1987.
10. Szczawiński J., Klusek A., Szczawińska M. E.: Growth responses of *Salmonella* Enteritidis subjected to heat or high pressure treatment in a laboratory medium. *High Press Res.* 2009, 29, 141-149.
11. Szczawiński J., Klusek A., Szczawińska M. E.: Parameters of growth curves of *Salmonella* Enteritidis subjected to conventional heat or microwave treatment. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 627-632.
12. Szczawiński J., Szczawińska M.: Evaluation of *Staphylococcus aureus* growth in unirradiated and irradiated cured meats using the Gompertz equation. *SozEp-Hefte.* 1993, 16, 130-134.
13. Szczawiński J., Szczawińska M., Szulc M.: Effect of irradiation on antibotulinal efficacy of nitrite. *J. Food Sci.* 1989, 54, 1313-1317.
14. Tarczyńska A. S., Kowalik J., Łobacz A.: Modelowanie mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności. *Przem. Spoż.* 2012, 66, 35-37.
15. Whiting R. C.: What risk assessments can tell us about setting criteria. *Food Control* 2011, 22, 1525-1528.
16. Wojdat E., Kwiatek K.: Procedura postępowania w ocenie ryzyka mikrobiologicznego w łańcuchu produkcyjnym żywności. *Higiena* 2004, 13, 8-9.
17. Ziemia Z.: Podstawy cieplnego utrwalania żywności. WNT, Warszawa 1980.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Szczawiński, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: jacek_szczawiński@sggw.pl