

Elżbieta Rosiak\*, Katarzyna Kajak-Siemaszko, Monika Trzaskowska,  
Danuta Kołożyn-Krajewska

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2017 r., zaakceptowano w lutym 2018 r.

**Streszczenie:** Pojęcie „mikrobiologia prognostyczna” po raz pierwszy w języku polskim zostało użyte w 1994 roku przez prof. Ilnicką-Olejniczak. Natomiast początki prognozowania w mikrobiologii sięgają roku 1920 kiedy to Bigelow opracował zależność logarytmiczno-liniową kinetyki śmierci mikroorganizmów. Mikrobiologia prognostyczna jest subdyscypliną mikrobiologii żywności, której zadaniem jest przewidywanie zachowań mikroorganizmów w żywności z wykorzystaniem modeli matematycznych. Model prognostyczny w przypadku mikrobiologii jest z reguły uproszczonym opisem korelacji pomiędzy zaobserwowanymi reakcjami oraz czynnikami odpowiedzialnymi za pojawienie się tych reakcji. Wyróżnia się kilka głównych koncepcji modeli (empiryczne vs mechanistyczne; stochastyczne vs deterministyczne; dynamiczne vs statyczne) w ramach których istnieją podziały modeli w zależności od rodzaju badanego drobnoustroju czy natury problemów powodowanych przez drobnoustroje (kinetyczne vs probabilistyczne), opisywanych zmiennych (modele pierwszo-, drugo i trzeciorzędowe) czy oddziaływania czynników środowiskowych na populację drobnoustrojów (modele wzrostu, przeżywalności, inaktywacji). Do nowej generacji modeli zalicza się modele molekularne i genomowe, modele transferu, ANN, modele interakcji między gatunkami oraz modele pojedynczej komórki.

Proces powstawania matematycznego modelu wymaga koordynacji pracy i wiedzy z zakresu: mikrobiologii, statystyki, matematyki, chemii, inżynierii procesowej oraz informatyki. Wymaga również odpowiedniego sprzętu i oprogramowania komputerowego. Wyróżnia się cztery etapy postępowania przy konstrukcji modelu matematycznego: planowanie; zbieranie i analiza danych; opis matematyczny; walidacja i przechowywanie danych.

W ostatnich latach opracowano liczne programy do prognozowania w mikrobiologii FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Sym'Previus, GroPIN, Listeria Meat FDA-iRISK, TRiMiCri, Microbial Responses, GlnaFiT, FILTRET, PMM-Lab. Natomiast baza danych ComBase, jest osiągnięciem pionierskim jako narzędzie działające on-line. Niektóre programy spełniają wymagania do tworzenia Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności (FSMR – Food Safety Model Repositories).

1. Wprowadzenie. 2. Idea mikrobiologii prognostycznej. 3. Rys historyczny mikrobiologii prognostycznej. 4. Pojęcie modelu i koncepcje modelowania w mikrobiologii żywności. 4.1. Koncepcja 1: modele empiryczne vs mechanistyczne. 4.2. Koncepcja 2: modele statyczne vs dynamiczne. 4.3. Koncepcja 3: modele stochastyczne vs deterministyczne. 5. Podziały modeli prognostycznych. 5.1. Sieci neuronowe. 5.2. Nowa generacja modeli prognostycznych. 6. Konstrukcja modelu prognostycznego. 6.1. Planowanie doświadczenia. 6.2. Zbieranie danych. 6.3. Analiza danych. 6.4. Walidacja modelu. 7. Prognozowanie mikrobiologiczne w analizie ryzyka. 8. Podsumowanie

### Predictive microbiology of food

**Abstract:** The beginnings of predictive microbiology date back to 1920 when Bigelow developed a logarithmic-linear dependence of kinetics on the death of microorganisms. Predictive microbiology is a sub-discipline of food microbiology, whose task is to predict the behavior of microorganisms in food using mathematical models. The predictive model for microbiology is usually a simplified description of the correlation between the observed reactions and the factors responsible for the occurrence of these reactions. There are several main conceptual models (empirical vs. mechanistic, stochastic vs. deterministic, dynamic vs. static), in which there are model divisions depending on the type of examined microorganism or the nature of the problems caused by microbes (kinetic vs. probabilistic), described variables (first, secondary and tertiary) or the influence of environmental factors on microbial populations (growth, survival, inactivation). The new generations of models include molecular and genomic models, transfer models, Artificial Neural Network, interactions between species, and single cell models.

The process of creating a mathematical model requires coordination of work and the knowledge of: microbiology, statistics, mathematics, chemistry, process engineering and computer and web science. It also requires appropriate hardware and software. There are four stages in the construction of a mathematical model: planning; data collection and analysis; mathematical description; validation and storage of data.

In recent years, numerous computer software programs have been developed: FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Symbiosis, GroPIN, Listeria Meat FDA-iRISK, TRiMiCri, Microbial Responses, GlnaFiT, FILTRET, PMM-Lab. ComBase database, on the other hand, is a pioneering achievement as an on-line tool. Some programs meet the requirements for creating Food Safety Model Repositories (FSMR).

1. Introduction. 2. The idea of predictive microbiology. 3. Historical background of predictive microbiology. 4. The concept of a model and modeling concepts in food microbiology. 4.1. Concept 1: empirical vs. mechanistic models. 4.2. Concept 2: static vs. dynamic models. 4.3. Concept 3: stochastic vs. deterministic models. 5. Breakdowns of prognostic models. 5.1. Neural networks. 5.2. A new generation of predictive models. 6. The construction of the predictive model. 6.1. Planning the experiment. 6.2. Collection of data. 6.3. Data analysis. 6.4. Model validation. 7. Predictive microbiology in risk analysis. 8. Summary

---

**Słowa kluczowe:** analiza ryzyka, mikrobiologia żywności, modele prognostyczne, programy prognostyczne

**Keywords:** risks analysis, food microbiology, predictive models, predictive software

---

\* Autor korespondencyjny: Elżbieta Rosiak, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 22 593 70 70; e-mail: elzbieta\_rosiak@sggw.pl

## 1. Wprowadzenie

Pojęcie „mikrobiologia prognostyczna” po raz pierwszy w języku polskim zostało użyte w 1994 roku przez prof. Ilnicką-Olejniczak [45]. Definicja wówczas użyta nie straciła na aktualności. Mikrobiologia prognostyczna była definiowana jako szczegółowa wiedza o zachowaniu się mikroorganizmów w odpowiedzi na określone warunki środowiska. Termin „prognozowanie” oznacza racjonalne, naukowe przewidywanie przyszłych zdarzeń. Należy dodać, że przewidywanie przyszłych zdarzeń odbywa się na podstawie danych historycznych, czyli w mikrobiologii żywności są to wyniki doświadczeń naukowych prowadzonych w zaplanowanych, określonych warunkach. Odpowiedź mikroorganizmów jest zatem zmienną zależną w funkcji czynników środowiska wynikających ze składu produktu, użytej technologii, sposobu pakowania. Inna definicja wskazuje, że mikrobiologia prognostyczna jest subdyscypliną mikrobiologii żywności, której zadaniem jest przewidywanie zachowań mikroorganizmów w żywności z wykorzystaniem modeli matematycznych [76].

Właściwości i użyteczność modeli znalazły odzwierciedlenie w prawie żywnościowym Unii Europejskiej. W Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. z późniejszymi zmianami w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych jest zapis nakazujący aby ustalać termin przydatności do spożycia wykorzystując modele prognostyczne dla bakterii wskaźnikowych uwzględniając krytyczne czynniki wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów [86].

## 2. Idea mikrobiologii prognostycznej

Mikrobiologia żywności początkowo była zdominowana badaniami mikrobiologicznymi dotyczącymi konkretnych produktów, bez próby zrozumienia, co wpływa na wzrost mikroorganizmów. Uważano, że żywność sama w sobie jest głównym czynnikiem, warunkującym obecność drobnoustrojów. Koncepcja mikrobiologii prognostycznej zakłada, że obecność mikroorganizmów w żywności jest wynikiem kombinacji różnych czynników środowiska, przede wszystkim: temperatury, pH i aktywności wody [84].

Ideą mikrobiologii prognostycznej jest założenie, że odpowiedź mikroorganizmów na czynniki środowiska, które determinują ich wzrost jest powtarzalna. Zatem, w powtarzalnych warunkach środowiska zdefiniowanych: surowcem, technologią przetwarzania, materiałem i atmosferą pakowania odpowiedź drobnoustrojów jest przewidywalna i daje się opisać przy

użyciu modeli matematycznych. Modele takie mogą być stosowane w szerokim zakresie w odniesieniu do grup żywności, a nie tylko do pojedynczych produktów. Zostało dowiedzione, iż modele prognostyczne dostarczają wyników co najmniej 1000 razy szybciej niż challenge tests, polegające na szacowaniu okresu trwałości produktu w tych samych warunkach, jakie panują podczas dystrybucji czy przechowywania żywności, na podstawie liczby mikroorganizmów wyznaczających poziom akceptowalny lub poziom zepsucia [14, 84].

## 3. Rys historyczny mikrobiologii prognostycznej

Pierwsze modele prognostyczne opisujące zależność logarytmiczno-liniową kinetyki śmierci mikroorganizmów zostały opracowane przez Bigelowa w 1920 i 1921 roku [5] oraz Esty i Meyera w 1922 roku. W roku 1922 Esty i Meyer opisali inaktywację termiczną przetrwalników *Clostridium botulinum* typu A z wykorzystaniem modelu logarytmiczno-liniowego, który wciąż jest stosowany w produkcji żywności sterylizowanej w puszkach. Model ten określa tempo inaktywacji bakterii przy stałej temperaturze [60].

Pierwsza wzmianka w literaturze dotycząca koncepcji mikrobiologii prognostycznej pochodzi z 1937 roku. Dotyczy badań prowadzonych przez Scott'a, który wiedzę o tempie wzrostu wybranych mikroorganizmów w różnych temperaturach uważał za istotną w badaniach dotyczących zepsucia wołowiny. W oparciu o swoje badania zdefiniował prognozowanie mikrobiologiczne jako wiedzę o wzroście niektórych mikroorganizmów w różnych temperaturach na przykładzie chłodzonego mięsa wołowego. Scott prowadził również badania dotyczące specyficznego tempa inaktywacji drobnoustrojów zależnego od dostępności wody, dziś określanego jako aktywność wody oraz od poziomu dwutlenku węgla. Badania Scott'a bez odpowiedniej technologii takiej jak: rejestratory danych, komputery i internet były skazane na porażkę. Musiały czekać na czasy kiedy te innowacje zostaną opracowane i łatwo dostępne.

Zatem za erę „nowoczesnego” prognozowania mikrobiologicznego można uznać początek lat 60. XX wieku [66, 13]. Badania nad procesem psucia się żywności prowadzone przez australijskich naukowców, Olley'a i Ratkowsky'ego, doprowadziły do sformułowania w 1973 roku matematycznej zależności wpływu temperatury na relatywne tempo psucia się żywności. Wykreślono S-kształtną krzywą, którą nazwano „krzywą zepsucia” (general spoilage curve) [68]. Kształt litery „S” odpowiada dwóm fazom: początkowej fazie przyspieszenia (fragment wklęsły) oraz końcowej fazie opóźnienia (fragment wypukły) [65].

#### 4. Pojęcie modelu i koncepcje modelowania w mikrobiologii żywności

Model może być zdefiniowany jako: opis systemu, teorii lub zjawiska. Wyjaśnia ich znane lub sugerowane właściwości i może być wykorzystywany do dalszych badań nad tymi właściwościami. W powszechnym rozumieniu model jest mniejszą repliką prawdziwego obiektu. Jednak w przypadku nauki, inżynierii, finansów itp., model jest z reguły uproszczonym opisem korelacji pomiędzy zaobserwowanymi reakcjami oraz czynnikami odpowiedzialnymi za pojawienie się tych reakcji. Opis ten może być wyrażony za pomocą słów lub ilościowo za pomocą jednego lub kilku równań matematycznych. Zatem model matematyczny może po prostu opisywać zbiór danych, bądź też może stanowić hipotezę lub serię hipotez, dotyczących podstawowych relacji pomiędzy niezależnymi zmiennymi [65].

W mikrobiologii prognostycznej nie istnieje jednoznaczny i ostateczny podział modeli prognostycznych. Wyróżnia się kilka głównych koncepcji modeli (empiryczne vs mechanistyczne; stochastyczne vs deterministyczne; dynamiczne vs statyczne) w ramach których istnieją podziały modeli w zależności od rodzaju badanego drobnoustroju czy natury problemów powodowanych przez drobnoustroje (kinetyczne vs probabilistyczne), opisywanych zmiennych (modele pierwszo-, drugo i trzeciorzędowe) czy oddziaływania czynników środowiskowych na populacje drobnoustrojów (modele wzrostu, przeżywalności, inaktywacji). W klasyfikacji spotyka się modele, znajdujące się na pograniczu, które łączą różne podejścia, np. modele pojedynczych komórek łączą podejście stochastyczne i mechanistyczne realizowane w warunkach statycznych lub dynamicznych.

##### 4.1. Koncepcja 1: modele empiryczne vs mechanistyczne

Modele empiryczne zwane inaczej modelami „black box” opisują obserwowaną odpowiedź populacji mikroorganizmów na czynniki środowiskowe. Dopasowanie tradycyjnych zależności matematycznych do przebiegu danych empirycznych jest jedynym kryterium oceny modelu. Modele wielomianowe powierzchni odpowiedzi, model Gompertza, sieci neuronowe czy model pierwiastka kwadratowego to najlepiej poznane modele empiryczne. Modele mechanistyczne opierają się na zrozumieniu podstawowych procesów biochemicznych i wewnątrzkomórkowych, które kontrolują zachowanie komórek. Dlatego aktualna wiedza mikrobiologiczna może być niewystarczająca, do opracowania kompletnego modelu mechanistycznego. Bardzo często powstają modele łączące cechy mechanistyczne i elementy empiryczne [8, 31, 65, 66].

##### 4.2. Koncepcja 2: modele statyczne vs dynamiczne

Dane do konstruowania pierwszych modeli prognostycznych uzyskiwano w warunkach statycznych. Rzeczywiste warunki panujące w żywności podlegają zmianom w czasie, zatem potrzebne są modele uwzględniające tę zmienność, czyli modele dynamiczne. Istnieją różne czynniki, które można dodawać jako elementy składowe do podstawowego modelu dynamicznego, mianowicie: wahania warunków środowiskowych, zmienność stanu fizjologicznego komórek, interakcje i produkcję metabolitów mających wpływ na wzrost bakterii [10].

Równanie elementarne opisujące model dynamiczny można przedstawić następująco:

$$\begin{aligned} dN_i(t)/dt = & \\ = m_i \cdot N_i(t), N_j(t), fact(t), chem(t), phys(t) \cdot N_i(t) & \end{aligned} \quad (1)$$

gdzie:

$N_i(t)$  reprezentuje liczbę komórek drobnoustrojów,  $\mu_i$  ( $h^{-1}$ ) jest specyficznym współczynnikiem wynikającym z interakcji wewnątrzkomórkowych i między ( $N_j$ ) gatunkami drobnoustrojów, ( $fact$ ) fizykochemiczne uwarunkowania środowiskowe, ( $phys$ ) fizjologiczny stan komórek oraz ( $chem$ ) wytwarzanie metabolitów.

Współczynnik szybkości wzrostu/inaktywacji w zmieniających się w czasie warunkach zostanie obliczony przez model, jeśli odpowiednio  $\mu_i > 0$  lub  $\mu_i < 0$ . Dla każdego czynnika uwzględnionego w modelu należy opracować dodatkowe równania matematyczne opisujące jego zmienność w czasie [76].

##### 4.3. Koncepcja 3: modele stochastyczne vs deterministyczne

Deterministyczne modele matematyczne opisują zachowanie dużych populacji drobnoustrojów jako całości bez uwzględnienia odpowiedzi poszczególnych komórek drobnoustrojów na wybrane czynniki środowiskowe [55] natomiast podejście stochastyczne uwzględnia wpływ zmienności i niepewności związanych z odpowiedzią, na warunki środowiskowe, pojedynczej komórki w całej populacji mikroorganizmów [24].

#### 5. Podział modeli prognostycznych

Pierwszy podział ze względu na złożoność zależności pomiędzy zmiennymi uwzględnionymi w modelu obejmuje podział na modele pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe. W modelach pierwszorzędowych bierze się pod uwagę zmianę liczby mikroorganizmów w czasie (wzrost lub inaktywacja) oraz wyznacza się parametry kinetyczne (lag faza, współczynnik szybkości wzrostu,

czas do osiągnięcia fazy stacjonarnej, tempo inaktywacji). Natomiast modele drugorzędowe opisują relację parametrów kinetycznych pochodzących z modelu pierwotnego do zmiennych środowiskowych (np. temperatura). Modele trzeciorzędowe to implementacja obu typów modeli w narzędziach komputerowych oraz bazach danych on-line [31, 43, 74, 98].

Najpowszechniej wykorzystywane modele pierwszorzędowe to funkcja Gompertza, logistyczna, Standarda (po reparametryzacji) oraz funkcja Schnuta'a i Richardsa [100]. Konsekwencją badań prowadzonych przez Zwieteringa i Gibsona, którzy porównali możliwości ww. funkcji do modelowania danych otrzymanych z hodowli okresowej *Lactobacillus plantarum* oraz innych bakterii było stwierdzenie że w większości przypadków modelem najlepiej opisującym i dopasującym się do danych jak również łatwym w zastosowaniu był zmodyfikowany model Gompertza [10, 31, 68, 74, 100].

Zmodyfikowana funkcja Gompertza (po reparametryzacji) jest powszechnie używanym empirycznym, pierwszorzędowym modelem opisującym zmianę liczby mikroorganizmów w czasie, w określonym środowisku. Dodatkowy parametr A reprezentuje dolną wartość asymptoty log liczby bakterii ( $\log \{N_{(-\infty)}\}$ ), co w niektórych przypadkach, kiedy wartość parametru A jest mniejsza niż  $N_{(0)}$  daje lepsze dopasowanie funkcji i oszacowanie początkowej gęstości komórek [67]. Na podstawie modeli pierwszorzędowych można uzyskać parametry kinetyczne służące do opisu populacji drobnoustrojów takie jak: czas generacji, czas trwania lag fazy, maksymalna szybkość wzrostu wykładniczego, czas do osiągnięcia specyficznej liczebności populacji [16, 68, 95]. Obecnie wielu autorów wykorzystuje model Gompertza (2) do obliczania terminu przydatności do spożycia produktów żywnościowych [14, 30, 40, 49, 56].

$$\text{Log } N_{(t)} = A + D \exp\{-\exp[-B(t-M)]\} \quad (2)$$

gdzie:

t = czas [h],

$N_{(t)}$  = liczebność populacji w czasie t [ $\log$  (jtk/ml)],

A = wartość dolnej asymptoty (np.  $\text{Log } N_{(-\infty)}$ ) [ $\log$  (jtk/ml)],

D = różnica pomiędzy górną i dolną wartością asymptoty [np.  $\text{Log } N_{(\infty)} - \text{Log } N_{(-\infty)}$ ] [ $\log$  (jtk/ml)],

M = czas po którym wykładnicza szybkość wzrostu jest maksymalna [h],

B = oznacza tangens kąta nachylenia krzywej wzrostu w czasie M.

Mimo powszechnego wykorzystania model Gompertza ma słabe strony, do których zalicza się m.in.: nie horyzontalny przebieg i szacowanie ujemnej wartości lag fazy, wyrażanie koncentracji komórek drobnoustrojów w skali logarytmicznej, nieprecyzyjne wyrażanie maksymalnego tempa wzrostu populacji punktem

przebiegu krzywej co sugeruje, że maksymalny współczynnik wzrostu może być wyższy niż oszacowany, wyrażenie wykładniczej fazy wzrostu funkcją nieliniową [9, 10, 97, 98].

W modelach drugorzędowych można wyróżnić dwa sposoby opisywania relacji parametrów kinetycznych do czynników środowiskowych: (1) wpływ kilku czynników środowiskowych jest opisany jednocześnie najczęściej przez funkcje wielomianowe niższego rzędu (pierwszego i drugiego rzędu; rzadziej trzeciego rzędu); (2) czynniki środowiskowe wpływające na populację drobnoustrojów są indywidualnie modelowane. Wśród tych modeli najczęściej wykorzystuje się model pierwiastka kwadratowego, model gamma, model parametrów kardynalnych oraz funkcję wielomianową (tzw. powierzchnie odpowiedzi) [74, 76].

Modele trzeciorzędowe nazywane są modelami zintegrowanymi w prognostycznych programach komputerowych [31, 98]. Wizualizują użytkownikowi czynniki środowiskowe takie jak:  $a_w$ , pH, temperatura, wprowadzone do matematycznego modelu i pozwalają na uzyskanie wyników prognozowania obliczonych na podstawie pierwszo i drugorzędowych modeli. Modele pierwszorzędowe określają zmiany liczby mikroorganizmów w czasie, natomiast modele drugorzędowe wskazują jak wartości wyliczone przez model pierwszorzędowy zmieniają się pod wpływem jednego lub kilku z czynników środowiskowych.

Pojawienie się w latach 80. XX wieku wydajnych komputerów umożliwiło szybsze wykonanie skomplikowanych obliczeń matematycznych. Dzięki temu możliwe było opracowanie modeli matematycznych z wykorzystaniem wieloetapowych algorytmów szacujących parametry modelu. Zaowocowało to lawinowym rozwojem tej dziedziny mikrobiologii żywności. W tabeli I przedstawiono dostępne obecnie programy komputerowe, które integrują modele w użyteczne dla użytkownika narzędzie i wizualizuje dane pierwotne, na których modele zostały zbudowane [62]. Chociaż pierwsze wersje programów do prognozowania w mikrobiologii były samodzielnymi narzędziami, obecnie dominują wersje programów on-line dostępne dla wszystkich i wszędzie przez Internet (tab. I) [43, 53, 80, 93].

Pionierskim programem był Pathogen Modeling Program (PMP), opracowany przez dwa Departamenty Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA): Agricultural Research Service (ARS) i Eastern Regional Research Center (ERRC), który jest odpowiedzialny za tworzenie i realizację polityki rolnej i żywnościowej rządu federalnego. Jest to najstarsze opracowanie wykorzystujące jako podstawę modele prognostyczne. Od 1990 roku PMP był rozpowszechniany w różnych formach: od pojedynczych arkuszy kalkulacyjnych, programów dostępnych komercyjnie, do samodzielnich programów dostępnych w Internecie nieodpłatnie. PMP obej-

muje pakiet modeli, które mogą być wykorzystane do przewidywania wzrostu i inaktywacji termicznej i nietermicznej (pasteryzacja i radiacja) przede wszystkim bakterii patogennych w żywności np. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., Modele pierwszorzędowe wykorzystują równanie Gompertz'a [100]. Użytkownik dysponuje oszacowanymi parametrami opisującymi populację: czasem trwania lag fazy, czasem generacji, wykresem wzrostu lub inaktywacji z uwzględnieniem przedziału ufności w wybranych warunkach środowiska [20, 31, 43, 44]. Obecnie dostępna jest wersja 7.0 do ściągnię-

cia ze strony <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550>.

W ostatnich latach opracowano liczne programy do prognozowania w mikrobiologii żywności których przegląd zawiera Tab. I. Programy takie jak FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Sym'Previus, GroPIN, Listeria Meat Model opracowano z myślą o konkretnych mikroorganizmach w konkretnych matrycach. W opracowaniu innych (FDA-iRISK, TRiMiCri) priorytetem były modele wykorzystywane w ocenie ryzyka. Oszacowanie typu wzrost/brak wzrostu to przedmiot uwagi programu Microbial Responses Viewer [80, 87].

Table I  
Przegląd programów komputerowych do prognozowania w mikrobiologii żywności

Nazwa	Dostępność/link	Data opracowania	Affiliacja	Koncepcja modelowania	Grupa odbiorców
Baseline	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.baselineapp.com">www.baselineapp.com</a>	2012	University of Cordoba, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S
ComBase	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.combase.cc">www.combase.cc</a>	2004	Institut of Food research, UK	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Dairy Products Safety Predictor	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.aqr.maisondulait.fr">www.aqr.maisondulait.fr</a>	2012	ACTALIA, Francja; French Dairy Interbranch Organization, Francja	Stochastyczna	BŻ
FDA-iRISK	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.irisk.foodrisk.org">www.irisk.foodrisk.org</a>	2012	Food and Drug Administration, USA	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
FILTREX	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/">www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/</a>	2013	INRA, National Institute for Agronomy Research, Francja	Stochastyczna	N, S
FISHMAP	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.azi.es/dowlands/dowlands/fishmap/#tab-description">www.azi.es/dowlands/dowlands/fishmap/#tab-description</a>	2011	AZTI, Transforming Science into Business, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.fssp.food.dtu.dk">www.fssp.food.dtu.dk</a>	1999	Technical University of Denmark, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GlnaFit	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php">www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php</a>	2003	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GroPIN	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.aua.gr/psomas/gropin">www.aua.gr/psomas/gropin</a>	2013	Agricultural University of Athens, Grecja	Deterministyczna i stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
Listeria Meat Model	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.cpmf2.be">www.cpmf2.be</a>	2012	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, ORz
MicroHibro	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.microhibro.com">www.microhibro.com</a>	2011	University of Cordoba, Hiszpania	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
MRV, Microbial Responses Viewer	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.mrviewer.info/">www.mrviewer.info/</a>	2008	National Food Research Institute, Japonia	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
NIZO Premia	Komercyjny, brak dostępu internetowego	1995	NIZO Food Research, The Netherlands	Deterministyczna	BŻ
PMM-Lab	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.sourceforge.net/projects/pmmlab/">www.sourceforge.net/projects/pmmlab/</a>	2012	Federal Institute for Risk Assessment, Dania	Deterministyczna	N, S, ORz
Microbial Safety in Meat Products	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.dmrpredict.dk">www.dmrpredict.dk</a>	2006	Danish Meat Research Institute, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Sym'Previus	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.symprevius.org">www.symprevius.org</a>	2003	Adria Development, Francja	Deterministyczna i stochastyczna	BŻ, N, S, ORz

Do generowania modeli prognostycznych opracowano programy: GlnaFiT, FILTREX, PMM-Lab.

Wymienione programy funkcjonują jako samodzielne narzędzia do prognozowania, jednak pojawienie się ComBase, jako programu i bazy danych działających on-line było osiągnięciem pionierskim dzięki któremu publikowane i niepublikowane modele są dostępne w sieci Internet. ComBase ma także ograniczenia polegające na tym, że ostateczny użytkownik nie może samodzielnie wprowadzić nowego modelu do bazy bez wiedzy i zgody twórcy. Ponadto nie można wyeksportować wykorzystanego do prognozowania modelu, a jedynie prognozy uzyskane on-line [51]. W latach 2011–2012 pojawiły się nowe programy dostępne on-line: MicroHibro i Basaline, które umożliwiają zbudowanie modeli zdefiniowanych przez użytkownika do prognozowania wzrostu lub inaktywacji dowolnego drobnoustroju w żywności. Jednak podobnie jak w ComBase użytkownik nie ma możliwości wyeksportowania uzyskanego w MicroHibro i Basaline modelu do innego narzędzia prognostycznego.

Nowatorskim rozwiązaniem i zarazem przyszłością mikrobiologii prognostycznej staje się tworzenie Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności (FSMR – Food Safety Model Repositories) czyli modułów, które umożliwiają eksport modeli prognostycznych do wystandaryzowanego formatu wymiany danych. Ponadto FSMR są przykładem podejścia opartego na przepływie zadań co zapewnia przejrzystość przetwarzania danych oraz ułatwia współpracę i kontrolę jakości wśród różnych naukowców. Program PPM-Lab został wybrany jako prototypowe narzędzie do tworzenia przykładowych modeli wzrostu, inaktywacji i przeżywalności *Salmonella* w mięsie wołowym dla Repozytorium Modeli Bezpieczeństwa Żywności [80].

Inny podział modeli uwzględnia modele wzrostu, przeżywalności i inaktywacji. Modele wzrostu stanowią najlepiej dopracowaną grupę modeli. Należą do nich m.in. omówione poniżej modele typu Arrheniusa i typu Bělehrádk'a. Wśród najczęściej stosowanych funkcji opisujących wzrost mikroorganizmów znajdują się zmodyfikowany model logistyczny i zmodyfikowana funkcja Gompertza.

Modele inaktywacji i przeżywalności charakteryzują się tym, że opisują redukcję liczby drobnoustrojów w czasie, koncentrując się na fazie śmierci populacji. Do opisu inaktywacji termicznej lub nietermicznej najczęściej stosuje się model log-liniowy (model Bigelow'a), model Weibull'a i modele „ramienia/ogona” (shoulder/tail model) [76].

Twórcy modelu logarytmiczno-liniowego byli pionierami prognozowania mikrobiologicznego żywności dzięki temu, że na wykresie półlogarytmicznym na osi Y umieścili logarytm liczby bakterii a na osi X temperaturę. Uzyskane równanie matematyczne opisujące

dane pozwala obliczyć wartość D (czas dziesięciokrotnej redukcji). Zmiana temperatury pozwalająca uzyskać wartość D jest określana jako wartość z [31].

Model Weibull'a jest pierwszorzędowym modelem inaktywacji bakterii wegetatywnych. Model ten zakłada nieliniowość krzywych przeżycia półlogarytmicznego w procesie inaktywacji poprzez uwzględnienie zmian biologicznych w odniesieniu do inaktywacji termicznej i jest w zasadzie statystycznym modelem rozkładu czasów inaktywacji. Model Weibull'a uwzględnia dwa parametry: a (czas) i bezwymiarowy parametr kształtu – b. Logarytm rozkładu parametru a zależy liniowo od temperatury; natomiast zależność parametru b od czasu nie jest dobrze ustalona. Chociaż model Weibull'a ma charakter empiryczny, może opisywać efekty fizjologiczne.  $b < 1$  wskazuje, że pozostałe po inaktywacji komórki mają zdolność adaptacji do warunków stresowych, podczas gdy  $b > 1$  wskazuje, że pozostałe po inaktywacji komórki są uszkodzone. Ta zmienność parametrów decyduje o większej elastyczności modelu Weibull'a niż modelu liniowego bazującego na wartości D. Funkcja dystrybucji Weibull'a (która jest blisko związana z rozkładem gamma, rozkładem wartości ekstremalnych i rozkładami log-normalnymi) jest również szeroko stosowana w inżynierii niezawodności, w celu opisu czasu awarii w systemach elektronicznych i mechanicznych oraz jest odpowiednia do analizy danych o przetrwaniu, tj. czasu do usterki po zastosowaniu obciążenia [76].

Model ramienia/ogona opisuje stan populacji przed inaktywacją, kiedy krzywa wzrostu jest płaska i nie zachodzą zmiany liczby mikroorganizmów. Proces inaktywacji powoduje zamieranie drobnoustrojów, zatem krzywa przyjmuje kształt „ramienia”. „Ogon” to fragment krzywej, który reprezentuje przeżycie drobnoustrojów po zastosowaniu procesu inaktywacji; dotyczy populacji wykazującej większą oporność, nie podlegających inaktywacji opisanej modelem log-liniowym [76]. Modele inaktywacji pozwalają ocenić efektywność stosowania różnych procesów technologicznych na inaktywację mikroorganizmów.

Modele prognostyczne mogą być także podzielone na kinetyczne i probabilistyczne. Modele kinetyczne stosowane są zwykle w przypadku nieprzetrwalnikujących patogenów, zwłaszcza tych, które stają się niebezpieczne dopiero po przekroczeniu pewnego progu wzrostu jak np. bakterie określane jako specyficzne organizmy psujące (SSO – Specific Spoilage Organism) [14, 30].

Powszechnie spotykane są dwa typy modeli opisujących kinetykę wzrostu mikroorganizmów pod wpływem temperatury i innych czynników środowiska. Pierwsze oparte są na równaniu Swante Arrheniusa opracowanym w 1889 roku, określającym wpływ temperatury na szybkość reakcji chemicznej, które wywodzi się z równania van't Hoff'a opisującego wpływ temperatury na termodynamikę gazów. Druga grupa modeli bazuje

na modelu pierwotnie opracowanym przez Jana Bělehrádka w 1930 roku. Funkcja wyraża wpływ temperatury na procesy biologiczne i jest rozwijana we współczesnych modelach Ratkowsky'ego [25, 68, 74].

Model zaprezentowany przez Bělehrádka w 1930 r. uwzględniał zero „biologiczne” (temperatura w której i poniżej której żaden wzrost drobnoustrojów nie jest możliwy).

Współczesny zapis modelu Bělehrádka:

$$k = a(t - t_0)^d \quad (3)$$

gdzie:  $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $a, d$  = parametry do dopasowania,  
 $t_0$  = matematyczny ekwiwalent  $a$ .

Do najbardziej znanych modeli typu Bělehrádka należy model pierwiastka kwadratowego Ratkowsky'ego; który dla pełnego zakresu temperatur ma postać:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp [c(T - T_{\max})]\} \quad (4)$$

gdzie:  $T$  = temperatura inkubacji [°C],  
 $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $T_{\min}, T_{\max}$  = minimalna i maksymalna temperatura wzrostu [°C],  
 $b, c$  = parametry do dopasowania.

Modyfikacje podstawowej formuły modelu doprowadziły do uwzględnienia wpływu temperatury, aktywności wody i pH na wzrost mikroorganizmów [16, 68, 74, 83, 84, 95, 97].

Druga grupa modeli kinetycznych wyjaśniająca wpływ temperatury na szybkość wzrostu to modele Arrhenius'a i jego modyfikacje. Najprostszy model typu Arrhenius'a stosowany w mikrobiologii prognostycznej ma postać:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

gdzie:  $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $E_a$  = energia aktywacji  $\text{KJ mol}^{-1}$ ,  
 $T$  = temperatura bezwzględna [C],  
 $R$  = stała gazowa:  $8,314 \text{ J K}^{-1} - \text{mol}^{-1}$ ,  
 $A$  = parametr do dopasowania.

W podstawowej postaci, wielu autorów uznało zależność Arrhenius'a jako nieodpowiednią do opisu szybkości reakcji w złożonych systemach biologicznych. Dlatego powstały liczne modyfikacje, podstawowej zależności z rozszerzeniem zastosowania dla niskich i wysokich temperatur. Za jedną z najlepszych modyfikacji wzoru Arrhenius'a uznaje się liniową modyfikację Davey'a [2, 3, 68, 83, 85].

Wzór Arrhenius'a z liniową modyfikacją Davey'a:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} \quad (6)$$

gdzie:  $k$  = współczynnik szybkości wzrostu,  
 $T$  = temperatura [°C],  
 $C_0, C_1, C_2$  = parametry do dopasowania.

Kolejna modyfikacja modelu oprócz temperatury uwzględnia aktywność wody jako czynnik wpływający na wzrost mikroorganizmów: [16, 68, 83, 85, 25, 26–28, 74].

Modele oparte na prawdopodobieństwie stosowane są zwykle w przypadku bakterii przetrwalnikujących, zwłaszcza *C. botulinum*, w przypadku których nawet najmniejszy wzrost jest niebezpieczny. Większość modeli opartych na prawdopodobieństwie wywodzi się z wzoru Hauschilda, służącego do obliczania prawdopodobieństwa wykiełkowania pojedynczego przetrwalnika *C. botulinum* i namnażania się potomnych komórek wegetatywnych, do poziomu, który jest niezbędny do wytworzenia toksyny botulinowej.

## 5.1. Sieci neuronowe

Sieci neuronowe mogą być stosowane wszędzie tam, gdzie pojawiają się zadania związane z predykcją, klasyfikacją czy sterowaniem [37]. Sieci neuronowe są wyrafinowaną techniką modelowania, zdolną do odwzorowywania złożonych funkcji, mających charakter nieliniowy, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w prognozowaniu mikrobiologicznym żywności, w której często nie ma podstaw do aproksymacji liniowej występujących zjawisk i procesów biologicznych.

Model sztucznej sieci neuronowej (ANN – Artificial Neural Network) został zainspirowany fizyczną strukturą i mechanizmem działania układu biologicznego (Najjar i wsp., 1997). Definiowany jest jako obliczeniowy model statystyczny, łączący ze sobą pojedyncze elementy, nazwane neuronami lub węzłami w sieć. Sieć neuronów zorganizowana jest w warstwy: wejściową, ukrytą oraz wyjściową, które są w stanie dokonać równoległych obliczeń. W mikrobiologii prognostycznej znalazły zastosowanie dzięki swojej elastyczności i generowaniu danych charakteryzujących się wysokim stopniem dokładności w dopasowywaniu do danych eksperymentalnych, w porównaniu z innymi technikami regresji, a także dużej tolerancji na dane nieprecyzyjne (noise data) [12, 35, 71]. Na podstawie zgromadzonych reprezentatywnych danych, pokazujących zmienność zmiennej zależnej, uruchamiany jest algorytm uczenia powtarzany do momentu uzyskania satysfakcjonujących rozwiązań. Jego celem jest automatyczne wytworzenie potrzebnej struktury sieci, następnie w wyniku uczenia zbędne połączenia i neurony są usuwane. W oparciu o nie sieć realizuje wszystkie funkcje związane z eksploatacją utworzonego modelu [35, 91, 92].

Do najpopularniejszych architektur sieciowych należy perceptron wielowarstwowy (MLP – Multilayer Perceptron), który wykorzystuje liniową funkcję potencjału postsynaptycznego – PSP (Postsynaptic Potential function). Działanie sieci MLP polega na wyznaczeniu

ważonych sum wartości wejściowych, które są argumentem, zwykle nieliniowej, funkcji aktywacji. Standardową funkcją aktywacji dla sieci MLP jest funkcja logistyczna (nazywana również często, ze względu na kształt, sigmoidalną) stosowana domyślnie we wszystkich warstwach sieci. Wyjątek stanowią sieci WNN (Wavelet Neural Network) w których zamiast funkcji sigmoidalnej w warstwach ukrytych wykorzystywana jest funkcja nieliniowej transformacji falowej [4]. Sieci MLP mogą być uczone za pomocą wielu algorytmów: algorytmu gradientów sprzężonych, Quasi-Newtona, Levenberga-Marquardta, wstecznej propagacji błędów (back-propagation), szybkiej propagacji lub algorytmu Delta-bar-Delta. Sieci o tej architekturze znajdują liczne zastosowania w mikrobiologii prognostycznej żywności, zarówno do modelowania założonych zależności wzrostu bakterii w czasie jak również prognozowania parametrów wzrostu takich jak lag faza czy wykładnicze tempo wzrostu oraz wpływu zewnętrznych biochemicznych i środowiskowych czynników warunkujących wzrost [6, 36, 40, 47].

Innym rodzajem sieci wykorzystywanym w mikrobiologii prognostycznej są sieci realizujące regresję uogólnioną – GRNN (Generalized Regression Neural Network) oraz Sieci Neuronowe o Radialnych Funkcjach Bazowych (RBF) [36]. Sieci te uczą się w bardzo krótkim czasie, ale charakteryzują się tendencją do tworzenia struktur o dużych rozmiarach, co powoduje, że ich działanie podczas normalnej eksploatacji jest bardzo powolne. Natomiast sieci o radialnych funkcjach bazowych (RBF) mają w warstwie wejściowej i wyjściowej neurony liniowe, natomiast w warstwie ukrytej neurony radialne. W neuronach warstwy radialnej stosowane są wykładnicze funkcje aktywacji (radialne funkcje bazowe), zaś w warstwie wyjściowej neurony wyposażone są w liniowe funkcje aktywacji. Sieci o radialnych funkcjach bazowych uczą się stosunkowo szybko i mają tę zaletę, że nigdy nie dokonują ekstrapolacji funkcji na zbyt duże odległości od znanych danych, są więc w pewnym sensie najbezpieczniejsze. Jednakże z reguły są one znacznie większe niż rozwiązujące te same zadania sieci MLP, co jest bardziej czasochłonne [36].

## 5.2. Nowa generacja modeli prognostycznych

Do nowej generacji modeli zalicza się modele molekularne i genomowe, modele transferu, modele interakcji między gatunkami oraz modele pojedynczej komórki.

Rozwój biologii molekularnej i uzyskanie w wyniku tych analiz dane dają nowe możliwości bardziej mechanistycznego opisu zachowania drobnoustrojów w żywności. Prowadzi to do powstania bardziej niezawodnych i solidnych modeli, które nazywa się modelami molekularnymi [15]. Biologia systemowa ma na celu zrozu-

mienie relacji genotyp-fenotyp. Model matematyczne są niezbędne do opisanie tych relacji stanowią kluczowe narzędzie, które umożliwia dogłębne zrozumienie, jak w rzeczywistości działają systemy biologiczne [42].

Obecnie uwaga skupia się na opracowywaniu modeli uwzględniających przenoszenie patogenu wzdłuż łańcucha żywnościowego (modele transferu) lub prawdopodobieństwo, że ten patogen może rosnąć lub nie rosnąć w zadanych warunkach środowiskowych (modele wzrostu/brak wzrostu). Modele wzrostu/brak wzrostu mogą być skutecznie stosowane, jeśli wymagane są dane dotyczące obecności/nieobecności patogenu. Szacuje się również przeżycie przez bakterie patogenne procesu inaktywacji i transfer między różnymi rodzajami żywności oraz na styku powierzchni roboczych/powietrza z żywnością [77]. W badaniach Pérez-Rodríguez i wsp. [78] bakterie patogenne *E. coli* O157:H7 i *Staphylococcus aureus* przenoszone były podczas krojenia, z zanieczyszczonej krajalnicy, do wędliny poddanej obróbce cieplnej (inaktywację opisano modelem inaktywacji logarytmiczno-liniowym i modelem Weibull'a). Do opisu wzrostu patogenów po transferze wykorzystano także funkcje wykładnicze [88].

Inne podejście skupia się na czynnikach hamujących wzajemny wzrost w populacji różnych mikroorganizmów. Efekt ten może być włączony do modelu drugorzędowego przez dodanie nowego czynnika, odpowiadającego funkcji hamującej. Uwzględnienie wpływu konkurencji między gatunkami w modelach predykcyjnych jest krokiem niezbędnym do osiągnięcia dokładniejszych przewidywań. Zastosowanie kultur bioochronnych jako środków konserwujących żywność i potrzeba poznania, w jaki sposób endogenna flora wpływa na wzrost patogenów w żywności, zwraca uwagę mikrobiologów na ten obszar. Modele uwzględniające te czynniki mogą mieć ważne zastosowania w przemyśle spożywczym [58].

Modelowanie zmienności odpowiedzi populacji na czynniki środowiskowe związane z lag fazą mikroorganizmów stanowi istotny aspekt oceny ryzyka mikrobiologicznego. Badania w tej dziedzinie wykazały, że źródła zmienności są związane właśnie z lag fazą, a nie z maksymalną szybkością wzrostu [7]. Wśród czynników wpływających na tę fazę, istotna jest dostępność składników odżywczych. Wzrost drobnoustrojów w pożywce bulionowej może nie obejmować lag fazy, ze względu na idealne warunki rozwoju. Inne czynniki, takie jak poziom inokulum lub warunki przed inkubacją (historia komórek) wpływają na długość tej fazy. Ponieważ zanieczyszczenie mikrobiologiczne żywności zwykle jest na niskim poziomie, spodziewana jest większa zmienność tej fazy, zwłaszcza gdy komórki są poddane stresowi. Przeprowadzenie badań na poziomie pojedynczych komórek, pozwala lepiej ocenić



zmiennosc i przewidywac zachowania bakterii w realnych warunkach. Modelowanie na poziomie pojedynczych komorek wykorzystuje procesy stochastyczne, gdy uwzględnia się zmienność między poszczególnymi komórkami. Lag faza i późniejszy wzrost przed fazą stacjonarną mogą być modelowane przy użyciu dwufazowej funkcji liniowej [76]. McKellar i Knight [63] opracowali model, który łączy etap adaptacji (nieciągły), jako właściwość pojedynczej komórki oraz etap logistycznego wzrostu bakterii (ciągły). Rozszerzenie modelu do ciągłego-nieciągłego-ciągłego obejmowało dynamiczne uwarunkowania modelowania lag fazy, ponieważ w tej fazie maksymalna szybkość wzrostu może zmieniać się w zależności od warunków środowiskowych. Ten rodzaj modelowania wykorzystał również Koutsoumanis [53] do oceny maksymalnych stężeń NaCl hamujących wzrost indywidualnych komórek *Salmonella enterica* serowar Enteritidis. Dane o zmienności granic wzrostu pojedynczych komórek bakteryjnych prezentowane w tej pracy podkreślają potrzebę podejścia stochastycznego w mikrobiologii ilościowej, zwłaszcza w środowiskach bliskich granicy wzrostu.

## 6. Konstrukcja modelu prognostycznego

Proces powstawania matematycznego modelu wymaga koordynacji pracy i wiedzy z zakresu: mikrobiologii, statystyki, matematyki, chemii, inżynierii procesowej oraz informatyki. Wymaga również odpowiedniego sprzętu i oprogramowania komputerowego.

Wyróżnia się cztery etapy postępowania przy konstrukcji modelu matematycznego:

1. planowanie;
2. zbieranie i analiza danych;
3. opis matematyczny;
4. walidacja i przechowywanie danych.

### 6.1. Planowanie doświadczenia

Uwzględnienie etapu *planowania* doświadczenia umożliwia postawienie właściwego problemu badawczego oraz wykonanie niezbędnych badań wstępnych. Ponadto natura badanego mikroorganizmu i problemy wywołane przez niego w żywności określają rodzaj modelu. Różne typy modeli są stosowane do przewidywania prawdopodobieństwa wytworzenia toksyn, prawdopodobieństwa wzrostu, czasu trwania lag fazy bakterii patogennych bez tolerancji czasu jej przekroczenia, rozwoju patogenu do pewnej granicy tolerancji czy rozwoju bakterii saprofitycznych. Ponadto na tym etapie należy zaplanować czynniki, które w modelu będą uwzględnione jako zmienne. Ważna jest liczba zmiennych, interakcje pomiędzy zmiennymi, liczba niezbędnych danych dla każdej zmiennej [67].

### 6.2. Zbieranie danych

Zbieranie danych odbywa się za pomocą metod bezpośrednich, w których indywidualne mikroorganizmy są wyróżniane i liczone (metoda płytkowa) oraz metod pośrednich, w których oznaczane są niektóre właściwości takie jak: gęstość optyczna, sucha masa, impedancja [67].

Heterogenność produktów żywnościowych powoduje trudności w zbieraniu danych do konstrukcji modeli prognostycznych, dlatego do analiz stosowane są podłoża mikrobiologiczne, które mają stabilny skład i które mogą być łatwo modyfikowane w celu otrzymania wymaganych warunków. W niektórych sytuacjach mogą istnieć różne metody określania warunków środowiska, np. wybór środka zakwaszającego, czy substancji pochłaniającej wilgoć w celu dostosowania wartości pH oraz aktywności wody. W przypadku modelu, który ma być używany do szerszej grupy produktów spożywczych, stosowane są środki chemiczne o mniejszych właściwościach inhibitujących, co zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia sytuacji, gdzie ryzyko mikrobiologiczne jest niedoszacowane (gdy np. przewidziane tempo wzrostu mikroorganizmów jest niższe niż w rzeczywistości). W przypadku jednak gdy model jest przeznaczony dla konkretnego produktu, wybór czynników może być bardziej zawężony.

Wybór szczepu, wielkość inokulum oraz warunki prowadzenia hodowli wpływają na otrzymywane dane oraz późniejsze prognozy. Wielkość inokulum musi zapewnić, że oczekiwana odpowiedź drobnoustrojów będzie mierzalna. Warunki hodowli powinny być tak dobrane, aby jak najdokładniej odzwierciedlać rzeczywiste warunki, w jakich potencjalny drobnoustrój będzie się rozwijać.

Czas w jakim pobierane są próbki jest ważnym czynnikiem w planowaniu doświadczenia i na tyle, na ile to tylko możliwe, powinien być zbliżony do okresu najbardziej gwałtownych zmian, np. koniec lag fazy w przypadku modeli wzrostu. W celu dopasowania funkcji sigmoidalnej do punktów empirycznych wymagane jest od 10 do 15 punktów pomiarowych [48].

### 6.3. Analiza danych

Na etapie *analizy danych* dokonywany jest wybór matematycznej funkcji s-kształtnej opisującej krzywą wzrostu. Technika regresji nieliniowej pozwala na matematyczne opisanie linii najlepszego dopasowania do punktów empirycznych, ale wymaga to zastosowania odpowiedniego oprogramowania komputerowego. Sigmoidalnymi modelami jednej zmiennej niezależnej z czterema parametrami są równania: Verhulst'a, funkcja logistyczna, funkcja Stannard'a, Richards'a, Morgana, Marcer'a, Flodin'a, Weibull'a, Chapman'a-Richards'a,

a najczęściej stosowanymi do opisu wzrostu populacji mikroorganizmów są zmodyfikowana funkcja Gompertza oraz logistyczna [68, 81].

#### 6.4. Walidacja modelu

Walidacja modelu wykonywana jest w celu sprawdzenia możliwości predykcyjnych modelu w nowej sytuacji. Prawdziwa wartość modelu ostatecznie oznacza jak dobrze może on przewidzieć zachowanie mikroorganizmów pod wpływem nowych warunków. Model może okazać się niewłaściwy z wielu powodów. Może to być naturalna różnorodność mikroorganizmów, błędy systematyczne analitycznych metod laboratoryjnych lub błędy w stosowanych technikach modelowania, nieadekwatnie opisujących dane. Szacuje się, że dla modeli konstruowanych przy użyciu danych zebranych w doświadczeniu prowadzonym na podłożach laboratoryjnych błąd względny w prognozowaniu wzrostu mikroorganizmów wynosi 7–10% w przypadku modeli pierwszorzędowych i 20–50% w przypadku modeli drugorzędowych. Na tym etapie istnieje pewien stopień akceptacji lub odrzucenia modelu, w związku z czym może się pojawiać potrzeba dostarczenia dodatkowych lub potwierdzenia istniejących danych, bądź też zastosowania innych technik modelowania [48].

Walidacja modelu w warunkach żywności obejmuje porównanie wartości prognozowanych przez model z danymi obserwowanymi: wzrostu, przeżywalności i/lub inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Najszybszym i najtańszym sposobem walidacji jest wykorzystanie w tym celu wyników z publikacji naukowych [39]. Jednakże liczba dostępnych danych może być bardzo ograniczona oraz mogą być one niekompletne. Problemy te mogą być rozwiązane przy użyciu „challenge test”, specjalnie zaprojektowanych na potrzeby walidacji modelu w przypadku konkretnego produktu (walidacja zewnętrzna). W tym przypadku dane są bardziej odpowiednie, wiarygodne i kompletne. Ponieważ jednak pochłanianie jest zarówno dużą ilością czasu, jak i wymagają duże nakłady finansowych, z reguły są one wykorzystywane jako uzupełnienia danych pochodzących z publikacji naukowych [39, 48].

Istnieje także metoda walidacji wewnętrznej, wykorzystująca te same dane które pozwoliły na opracowanie modelu, do jego walidacji. Należy podzielić dane racjonalnie na podzbiory i w oparciu o część danych opracować model prognostyczny, a następnie zastosować ten model do predykcji pozostałych danych. Inna metoda polega na sekwencyjnym opuszczaniu danych. Model zbudowany na podstawie pozostałych danych stosowany jest do przewidywania wartości opuszczonych danych, a otrzymane wartości porównuje się z właściwą wartością opuszczonego punktu. Proces powtarza się w przypadku każdego punktu i oblicza sumę kwadratów reszt.

Dokładność dopasowania modelu do danych i oszacowanie akceptowalności predykcji modelu z uwzględnieniem błędu metody może być oszacowana metodą graficzną. Na wykresie umieszczane są dane przewidywane przez model względem danych obserwowanych lub opisanych w literaturze. W wyniku walidacji graficznej można łatwo sklasyfikować opracowane modele na fałszywie-bezpieczne jeśli model przeszacowuje wzrost i fałszywie-niebezpieczne, jeśli model niedoszacowuje wzrostu. Linia równoważności reprezentuje doskonałą zgodność pomiędzy wartościami prognozowanymi a obserwowanymi. Punkty znajdujące się poniżej linii równoważności z prawej strony wykresu oznaczają że model prognozuje fałszywie-niebezpiecznie, natomiast punkty układające się powyżej linii równoważności, po lewej stronie oznaczają predykcję fałszywie-bezpieczną [76].

Do szacowania dokładności modeli wykorzystuje się także wskaźniki matematyczno-statystyczne takie jak: średni błąd kwadratowy – Mean Squere Error (MSE); współczynnik determinacji  $R^2$ ; bias faktor  $B_f$ , accuracy  $A_f$  [74, 76].

Zastosowanie w praktyce modelu prognostycznego nie poddanego walidacji może zakończyć się poważnymi konsekwencjami dotyczącymi bezpieczeństwa zdrowotnego konsumenta i w konsekwencji prowadzić do odrzucania koncepcji mikrobiologii prognostycznej jako nieprzydatnej. Szczególnie w przypadku modeli powstałych w oparciu o dane nie pochodzące z systemów żywnościowych, uzyskanie bezwzględnej pewności, że model może być zastosowany w układzie żywności jest sprawą niezwykle ważną.

#### 7. Prognozowanie mikrobiologiczne w analizie ryzyka

Wyróżnia się dwa podejścia do oceny ryzyka mikrobiologicznego: ocenę jakościową i ocenę ilościową. Ocena jakościowa to ocena opisowa, oparta na analizie sprecyzowanych informacji dotyczących prawdopodobieństwa wystąpienia choroby (np. prawdopodobieństwo wysokie lub niskie). Oceny jakościowe są przeprowadzane w przypadku braku naukowych danych lub zasobów do przeprowadzenia pełnej oceny ilościowej [38, 57]. Ilościowa ocena ryzyka mikrobiologicznego (QMRA – Quantitative Microbial Risk Assessment) wymaga uwzględnienia znacznej bazy danych liczbowych do szacowania konsekwencji zdrowotnych związanych z zagrożeniem mikrobiologicznym za pomocą modelowania matematycznego. W QMRA bierze się pod uwagę wszystkie etapy produkcji i dystrybucji żywności (‘od pola do stołu’), a wynikiem analizy jest oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia choroby po spożyciu badanego produktu spożywczego [32, 61].

QMRA składa się z czterech etapów: (1) identyfikacji zagrożeń, w której wskazuje się mikroorganizmy potencjalnie patogenne obecne w produkcie żywnościowym; (2) charakterystyki zagrożeń, która opisuje niekorzystne skutki zdrowotne związane z konsumpcją mikroorganizmu patogenego zawartego w produkcie żywnościowym; (3) oszacowania narażenia, które przewiduje szacunkową częstotliwość spożycia żywności oraz prawdopodobną liczbę mikroorganizmów w porcji; oraz (4) charakterystyki ryzyka w celu oszacowania ryzyka wystąpienia zakażeń związanych ze spożyciem produktu żywnościowego [19, 22, 32, 61].

Oszacowanie narażenia i charakterystyka ryzyka to dwie spośród czterech składowych QMRA, które wymagają zastosowanie modeli prognostycznych [76]. Do obliczenia ryzyka infekcji lub choroby w QMRA, konieczny jest wybór odpowiedniego modelu prognostycznego. Istotną rolę w charakterystyce ryzyka QMRA odgrywają modele typu dawka-odpowiedź (dose-response models) [29, 34]. Ten typ modelu określa matematyczną zależność między spożyciem dawki mikroorganizmów patogenych, przenoszonych przez żywność, a reakcją gospodarza polegającą na prawdopodobieństwie wystąpienia infekcji / choroby lub śmierci [19].

W literaturze dostępne są różne modele typu dawka-odpowiedź, w tym model wykładniczy [70], model  $\beta$ -Poissona [59], przybliżony model  $\beta$ -Poissona [79], model dwumianowy  $\beta$  [11, 41] oraz model Weibull-Gamma [21].

Ze względu na trudności w pozyskiwaniu danych skonstruowanie modelu dawka-odpowiedź nie jest sprawą prostą. Najlepiej byłoby, gdyby dane niezbędne do konstrukcji modelu pochodziły z badań prowadzonych wśród całej populacji, z uwzględnieniem wrażliwych subpopulacji: dzieci, osób starszych, kobiet w ciąży. Baza wyników powinna uwzględniać także różne początkowe poziomy drobnoustrojów patogenych [23]. Wyniki badań przeprowadzonych z udziałem ludzi przedstawiono w pracy Teunis i wsp. [94]. Dane wykorzystywane w ocenie ryzyka mikrobiologicznego niezbędne do konstrukcji modeli dawka-odpowiedź, pochodzą z różnych źródeł. Zalicza się do nich m.in.: testy przeprowadzane za zgodą wolontariuszy polegające na spożyciu produktu zanieczyszczonego znaną liczbą drobnoustrojów [33], ekstrapolację wyników badań prowadzonych na zwierzętach [89, 99] oraz analizy wyników badań epidemiologicznych dotyczących chorób przenoszonych przez żywność [17, 90].

Brak danych dotyczących zależności dawka-odpowiedź, w przypadku większości drobnoustrojów chorobotwórczych pokazuje, jak trudno jest zastosować właściwe podejście eksperymentalne w ilościowej ocenie ryzyka mikrobiologicznego. Biorąc pod uwagę niejednorodność populacji narażonych na mikroorga-

nizmy patogenne pod względem wieku, stanu zdrowia, nawyków żywieniowych i kulturowych oraz warunków geograficznych sytuacja komplikuje się jeszcze bardziej. W oszacowaniu narażenia należy wziąć pod uwagę nie tylko znaczne różnice regionalne lecz także podatności/wrażliwość organizmu [29, 50]. Ponadto w celu pełnego oszacowania prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, należy wziąć pod uwagę nie tylko rozkład drobnoustrojów w surowcu, zmiany w populacji mikroorganizmów chorobotwórczych podczas produkcji, dystrybucji i przechowywania, ale również podczas przygotowywania żywności w domu [32]. Problematyczne stają się także sytuacje w przypadku niskiej początkowej liczby bakterii patogenych. Ze względu na brak wiedzy na temat podstawowych mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi organizmu na określoną dawkę mikroorganizmów, modelowanie matematyczne opiera się na wielu założeniach i ekstrapolacjach [18–19, 52]. Rozwiązania matematyczne uwzględniające te „niepewności” w modelu dawka-odpowiedź zaproponował w swojej pracy Moon i wsp. [69]. Z kolei Buchanan i wsp. [18], Julien i wsp. [46] proponują nowe strategie modelowania, takie jak Kluczowe Ramy Reakcji na Dawkę (KEDRF – the Key Events Dose-Response Framework), które jest analitycznym opisem wzorcowych relacji dawka-odpowiedź na podstawie istniejących informacji.

W celu oszacowania końcowego ryzyka (np. prawdopodobieństwa zachorowania lub liczby przypadków występowania drobnoustrojów w żywności), należy połączyć wyniki prognozowane przez dwa modele: model oszacowania narażenia i model dawka-odpowiedź. Przykładowy model szacowania narażenia przedstawiono w pracy Pujol i wsp. [82]. Dawka (rozpowszechnienie/częstość i koncentracja) wyznaczona na podstawie modelu oszacowania narażenia wprowadzana jest do modelu dawka-odpowiedź. Zaproponowano kilka podejść metodologicznych do przeprowadzenia tej procedury matematycznej, z których niektóre zostały szczegółowo omówione przez Perez-Rodriguez i wsp. [75, 77].

Ilościową ocenę ryzyka można przedstawić odpowiednio jako „oszacowanie punktowe” (deterministyczne) lub „probabilistyczne” (stochastyczne). Podstawową różnicą między tymi dwoma podejściami jest przedstawienie danych źródłowych niezbędnych do przeprowadzenia oceny ryzyka. Podejście deterministyczne oznacza, że dane wejściowe do oceny ryzyka są wykorzystywane jako pojedyncze wartości parametrów (wartość średnia lub minimalna) np. w celu oszacowania narażenia na średnią liczbę mikroorganizmów patogenych, obecnych w żywności spożywanej przez przeciętnego konsumenta [57]. Metoda deterministyczna jest prostsza i szybsza do wdrożenia, ponieważ bazuje na obliczeniach matematycznych, ale dostarcza jedynie

konkretnego wyniku bez informacji o wyjątkowych/rzadkich/niecodziennych przypadkach [1].

Podejście probabilistyczne, w przeciwieństwie do pojedynczych wartości parametrów, uwzględnia wszystkie dostępne dane i wykorzystuje rozkłady prawdopodobieństwa, co przekłada się na pełniejszą charakterystykę ryzyka wystąpienia choroby [57, 72]. Metoda probabilistyczna wymaga uwzględnienia rozkładów prawdopodobieństwa w celu odzwierciedlenia zmienności lub niepewności parametrów. Metoda ta jest trudniejsza, ale prowadzi do otrzymania rozkładu prawdopodobieństwa ryzyka i doprecyzowuje interpretację wyników modelu [1].

Podejście probabilistyczne, pomimo większej złożoności obliczeń, stało się bardziej wiarygodną metodą stosowaną w ilościowej ocenie ryzyka. Charakterystyka ryzyka powinna uwzględniać zmienność i niepewność informacji wykorzystywanych w celu oszacowania narażenia. Zmienność jest zasadniczo właściwością natury i reprezentuje różnorodność dobrze scharakteryzowanej populacji lub parametru. Każdy element podczas produkcji, w przetwórstwie i sprzedaży żywności charakteryzuje się zmiennością; zarówno sam mikroorganizm chorobotwórczy, jak i reakcja organizmu gospodarza na czynniki chorobotwórcze. Z drugiej strony niepewność wynika także z braku wiedzy na temat zjawiska lub parametru i niezdolności do jej scharakteryzowania. Rozpoznawanie i charakteryzowanie zmienności i niepewności są ważne, ponieważ wpływają one na końcowy wynik oceny ryzyka, a w konsekwencji na podejmowane decyzje dotyczące zarządzania ryzykiem [57].

Najczęściej stosowaną techniką przeprowadzenia oceny ryzyka mikrobiologicznego jest obecnie symulacja Monte Carlo. Metodologia ta wykorzystuje podejście stochastyczne, gdzie kluczowe czynniki w modelu są reprezentowane przez rozkład danych, a zestaw wartości wyjściowych jest generowany w formie wielokrotnych iteracji. Zatem dane wejściowe w postaci rozkładu prawdopodobieństwa na przykład w odniesieniu do częstości występowania i poziomów patogenu w produkcji lub do inaktywacji termicznej, łączą się w celu wygenerowania szacowanego prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, które jest również prezentowane jako rozkład. Symulacja Monte Carlo może zapewnić bardziej realistyczne oszacowanie ryzyka niż podejście ściśle deterministyczne. Ponadto, biorąc pod uwagę zmienność opisaną jako rozkład częstotliwości, otrzymuje się bardziej realistyczną ocenę zagrożenia niż powstała w oparciu o jedną wartość dyskretną/pojedynczą: np. wartość średnią lub minimalną [32]. Niestety, wiele opublikowanych dotąd badań przedstawia dane mikrobiologiczne jako wartości dyskretne (np. wartość średnia log jtk/g), a nie rozkład, co ogranicza ich wykorzystanie w QMRA [72].

## 8. Podsumowanie

Mikrobiologia prognostyczna dzięki interdyscyplinarnym wysiłkom zarówno mikrobiologów jak i naukowców uczestniczących w opracowywaniu matematycznego modelu jest coraz częściej wykorzystywana przez środowiska akademickie oraz przemysł spożywczy do poprawy i zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności [39, 86]. W trakcie rozwoju tej subdyscypliny mikrobiologii żywności powstało kilka koncepcji modelowania, klasyfikacji i podziałów modeli prognostycznych ze względu na konieczność uporządkowania modeli oraz ich zastosowań. W procesie tworzenia modelu prognostycznego na etapie zbierania danych wykorzystywane są obecnie nowoczesne metody analityczne (modele molekularne i genomowe) jak również wciąż poszukuje się nowoczesnych narzędzi obliczeniowych czego przykładem jest wykorzystanie Sieci Neuronowych.

Wartość użytkowa modeli prognostycznych to m.in. szacowanie terminów przydatności do spożycia produktów żywnościowych jak również wykorzystanie w ocenie ryzyka mikrobiologicznego. Służą temu liczne programy komputerowe jak również bazy danych działające on-line. Nowatorskim rozwiązaniem i zarazem przyszłością mikrobiologii prognostycznej staje się tworzenie Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności czyli modułów, które umożliwiają eksport modeli prognostycznych do wystandaryzowanego formatu wymiany danych [80].

## Piśmiennictwo

1. Akmel D.C., Tapé T. i wsp.: Quantitative assessment of the microbiological risk associated with the consumption of attieke in Côte d'Ivoire. *Food Control*, **81**, 65–73 (2017)
2. Alber S.A., Schaffner D.W.: Evaluation of data transformations used with square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *App. Environ. Microbiol.* **58**, 3337–3342 (1992)
3. Alber S.A., Schaffner D.W.: New modified square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate as a function of temperature. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 206–210 (1993)
4. Amina M., Panagou E.Z., Kodogiannis V.S., Nychas G.-J.E.: Wavelet neural networks for modeling high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in UHT whole milk. *Chemom. Intell. Lab. Syst. Discipline.* **103**, 170–183 (2010)
5. Aspidou Z., Koutsoumanis K.P.: Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation, *Food Microbiol.* **45**, 216–221 (2015)
6. Atsamnia D., Hamadache M., Hanini S., Benkortbi O., Oukrif D.: Prediction of the antibacterial activity of garlic extract on *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* by determining the diameter of the inhibition zones using artificial neural networks. *LWT – Food Science and Technology*, **82**, 287–295 (2017)
7. Augustin J.-Ch., Carlier V.: Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.* **56**, 53–70 (2000)

8. Baranyi J., da Silva N.S.: The use of predictive models to optimize risk of decisions. *Int. J. Food Microbiol.* **240**, 19–23 (2017)
9. Baranyi J., Pin C.: Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 732–736 (1999)
10. Baranyi J., Roberts T.A., McClure P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* **10**, 43–59 (1993)
11. Barker-Reid F., Harper G.A., Hamilton A.J.: Affluent effluent: growing vegetables with wastewater in Melbourne, Australia – a wealthy but bone-dry city. *Irrigat. Drain Syst.* **24**, 79–94 (2010)
12. Basheer I.A., Hajmeer M.: Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiological Methods*, Neural Computing in Microbiology, **43**, 3–31 (2000)
13. Bowman J., McMeekin T., McQuestion O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M.: The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 2–9 (2008)
14. Brucker S., Albrecht A., Petersen B., Kreyenschmidt J.: A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food Control*, **29**, 451–460 (2013)
15. Brul S., Mensonides F.I.C., Hellingwerf K.J., Teixeira de Mattos J.M.: Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods, **128**, 16–21 (2008)
16. Buchanan R.L.: Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 6–11 (1993)
17. Buchanan R.L., Damert W.G., Whiting R.C., Van Schothorst M.: An approach for using epidemiologic and microbial food survey data to develop a 'purposefully conservative' estimate of the dose-response relationship between *Listeria monocytogenes* levels and the incidence of foodborne listeriosis. *J. Food Prot.* **60**, 918–922 (1997)
18. Buchanan R.L., Havelaar A.H., Smith M.A., Whiting R.C., Julien E.: The key events dose-response framework: its potential for application to foodborne pathogenic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 718–728 (2009)
19. Buchanan R.L., Smith J.L., Long W.: Microbial risk assessment: Dose-response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 159–172 (2000)
20. Butler F., Xu Y.: Prediction of *Staphylococcus aureus* growth in ham during chilling using Pathogen Modeling Program. *Biosystem Engineering*, **16**, 20–23 (2011)
21. Carrasco E., Perez-Rodriguez F., Valero A., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G.: Risk assessment and management of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce salads. *Compr. Rev. Food Sci.* **9**, 498–512 (2010)
22. Codex Alimentarius Commission. Report of the Thirtieth Session of the Codex Committee on Food Hygiene (CCFH). Alinorm 99/13 Appendix IV: s. 58–64 1999. [http://www.codexalimentarius.net/download/report/112/Al99\\_13e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/112/Al99_13e.pdf) (18.09.2017)
23. Coleman M.E., Marks H.M.: Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control*, **10**, 289–297(1999).
24. Couvert O., Augustin J-Ch. i wsp. Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 236–242 (2010)
25. Daughtry B.J., Davey K.R., King K.D.: Temperature dependence of growth kinetics of food bacteria. *Food Microbiol.* **14**, 21–30 (1997)
26. Davey K.R.: Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. App. Bacteriol.*, **70**, 253–257 (1991)
27. Davey K.R.: Linear-Arrhenius models for bacterial growth and depth and vitamin denaturations. *J. In. Microbiol.* **12**, 172–179 (1993)
28. Davey K.R.: Modeling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 295–303 (1994)
29. De Keuckelaere A., Jacxsens L., Amoah P., Medema G., McClure P., Jaykus L.-A., Uyttendaele M.: Zero risk does not exist: lessons learned from microbial risk assessment related to use of water and safety of fresh produce. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **14**, 387–410 (2015)
30. Dermesonluoglu E., Fileri K., Orfanoudaki A., Tsevdou M., Modeling the microbial spoilage and quality decay of pre-packed dandelion leaves as function of temperature. *J. Food Eng.* **184**, 21–30 (2016)
31. Devlieghere F., Francois K., Vermeulen A., Debevere J.: Predictive microbiology (w) Predictive modeling and risk assessment. Integrating safety and environmental knowledge into food studies towards European sustainable development, red. R. Costa, K. Kristbergsson, Springer, Boston, 2009, s. 29–53
32. Dominguez S., Schaffner D.W.: Microbiological quantitative risk assessment (w) Safety of meat and processed meat, red. F. Toldrá, Springer, New York, 2009, s. 591–614
33. FAO/WHO. Microbiological Risk Assessment Series 2: Risk Assessments of Salmonella in Eggs and Broiler Chickens. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Geneva, Rome, 2002, [www.fao.org/3/a-y4392e.pdf](http://www.fao.org/3/a-y4392e.pdf) (11.09.2017)
34. FAO/WHO. Microbiological risk assessment series 3: Hazard characterization for pathogens in food and water. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Geneva, Roma, 2003, [whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562374.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562374.pdf) (11.09.2017)
35. Fernández J.C., Hervás C., Martínez-Estudillo F.J., Gutiérrez P.A.: Memetic Pareto Evolutionary Artificial Neural Networks to determine growth/no-growth in predictive microbiology. *Appl. Soft Comput.* **11**, 534–550 (2011)
36. Fernández-Navarro F., Hervás-Martínez C., Cruz-Ramírez M., Gutiérrez P.A., Valero A.: Evolutionary q-Gaussian Radial Basis Function Neural Network to determine the microbial growth/no growth interface of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Soft Comput.* **11**, 3012–3020 (2011)
37. Ferrari A., Lombardi S., Signoroni A.: Bacterial colony counting with convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging. *Patter Recognit.* **61**, 629–640 (2017)
38. Giaccone V., Ferri, M.: Microbiological quantitative risk assessment and food safety: an update. *Vet. Res. Commun.* **29**, 101–106 (2005)
39. Guiller L.: Predictive microbiology models and operational readiness. *Procedia Food Sci.* **7**, 133–136 (2016)
40. Gunvig A., Hansen F., Borggaard C.: A mathematical modeling for predicting growth/no-growth of psychrotrophic *C. botulinum* in meat products with five variables. *Food Control*, **29**, 309–317 (2013)
41. Hamilton A.J., Stagnitti F., Premier R., Boland A.M., Hale G.: Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Mikrob.* **72**, 3284–3290 (2006)
42. Heinemann, M., Sauer U.: Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 337–43 (2010)
43. Huang L.: IPMP 2013 – A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 100–107 (2014).
44. Huang L., Juneja V. K., Yan X.: Thermal inactivation of foodborne pathogens in the USA pathogen modeling program. *J. Therm. Anal. and Colorim.* **106**, 191–198 (2011)
45. Ilnicka-Olejniczak O., Hornecka D.: Prognozowanie w mikrobiologii żywności (w) Food Product Development. Opracowanie nowych produktów żywnościowych. Wydawnictwo AR, Poznań, 1995, s. 149–168

46. Julien E., Boobis A.R., Olin S.S.: The key events dose-response framework: a cross disciplinary mode-of-action based approach to examining dose-response and thresholds. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 682–689 (2009)
47. Keeratipibul S., Phewpan A., Lursinsap Ch.: Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 130–138 (2011)
48. Kilcast D., Subramanian P.: The stability and shelf-life of food. Woodhead Publishing, Cambridge, 2000
49. Kim H.W., Lee K., Kim S. H., Rhee M.S.: Predictive modeling of bacterial growth in ready-to-use salted napa cabbage (*Brassica pekinensis*) at different storage temperatures. *Food Microbiol.* **70**, 129–136 (2018)
50. Klapwijk P.M., Jouve J.-L., Stringer M.F.: Microbiological risk assessment in Europe: the next decade. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 223–230 (2000)
51. Koseki S.: Microbial responses viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 75–82 (2009)
52. Koseki S.: Risk assessment of microbial and chemical contamination in fresh produce (w) Global Safety of Fresh Produce red. J. Hoorfan, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2014, s. 153–171
53. Koutsoumanis, K.: A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods, **128**, 116–121 (2008)
54. Koutsoumanis K. P., Lianou A.: Stochasticity in Colonial Growth Dynamics of Individual Bacterial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2294–2301 (2013)
55. Koutsoumanis K. P., Lianou A., Gougoul M.: Latest developments of foodborne pathogens modeling. *Current Opinion in Food Science*, **8**, 89–98 (2016)
56. Krishnan K. R., Babuskin S., Babu P. A. S., Sivarajan M., Sukumar M.: Evaluation and predictive modeling the effect of spice extracts an raw chicken meat stored at different temperatures. *J. Food Eng.* **166**, 29–37 (2015)
57. Lammerding, A.M., Fazil, A.: Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 147–157 (2000)
58. Larsen P., Yuki H., Gilbert J.: Modeling microbial communities: Current, developing, and future technologies for predicting microbial community interaction. *J. Biotechnol.* **160**, 17–24 (2012)
59. Lim K.Y., Jiang S.C.: Reevaluation of health risk benchmark for sustainable water practice through risk analysis of rooftop-harvested rainwater. *Water Res.* **47**, 7273–7286 (2013)
60. Mafart P.: Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* **100**, 239–251 (2005)
61. Magnússon S.H., Verhagen H.: State of the art in benefit – risk analysis: Food microbiology. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 33–39 (2012)
62. McKellar C., Xuewen L.: Modeling microbial responses in food. CRC Press, USA, 2004
63. McKellar, R. C., Knight K.: A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **54** (3), 171–80 (2000)
64. McMeekin T.A.: Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science*, **77**, 17–27 (2007)
65. McMeekin T. A., Bowman J., McQuestin O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M.: The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 2–9 (2008)
66. McMeekin T.A., Olley J., Ratkowsky D.A., Ross T.: Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **73**, 395–407 (2002)
67. McMeekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A.: Predictive microbiology, theory and application, RST LTD, England, 1993
68. McMeekin T. A., Ross T.: Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *J. Food Microbiol.* **1**, 133–153 (2002)
69. Moon H., Kim S., Chen J., George N., Kodell R.: Model uncertainty and model averaging in the estimation of infectious dose for microbial pathogens. *Risk Anal.* **33**, 220–231 (2013).
70. Mota A., Mena K.D., Soto-Beltran M., Tarwater P.M., Chaidez C.: Risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water irrigating fresh produce in Mexico. *J. Food Protect.* **72**, 2184–2188 (2009)
71. Najjar Y.M., Basheer I.A., Hajmeer H.N.: Computational neural networks for predictive microbiology: I. Methodology. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 27–49 (1997)
72. Nauta M.J.: Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *Int. J. Food Microbiol.* **73**, 297–304 (2002)
73. Nauta, M. van der Fels-Klerx I., Havelaar A.: A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. *Risk Anal.* **25**, 85–98 (2005)
74. O'Mahony C., Seman D. L.: Modeling the microbial shelf life of Foods and Beverages (w) The Stability and Shelf Life of Food, red. Persis Subramaniam, Woodhead Publishing Series in Food Science, Cambridge, 2016, s. 253–289
75. Pérez-Rodríguez F., Campos D., Ryser E.T., Buchholz A.L., Posada-Izquierdo G.D., Marks B.P., Zurera G., Todd E.C.D.: A mathematical risk model for *Escherichia coli* O157:H7 cross contamination of lettuce during processing. *Food Microbiol.* **28**, 694–701 (2011)
76. Pérez-Rodríguez F., Valero A.: Application of Predictive Models in Quantitative Risk Assessment and Risk Management (w) Predictive Microbiology in Foods (red.) F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, Springer, Berlin, 2013, s. 87–97
77. Pérez-Rodríguez F., Valero A., Carrasco E., García R.M., Zurera G.: Understanding and modeling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 131–44 (2008)
78. Pérez-Rodríguez F., van Asselt E.D., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G., Zwietering M.H.: Extracting additional risk managers information from a risk assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats. *J. Food Prot.* **70**, 1137–1152 (2007)
79. Petterson S.R, Ashbolt N.J., Sharma A.: Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water Environ. Res.* **73**, 667–672 (2001)
80. Plaza-Rodríguez C., Thoens C., Falenski A., Weiser A.A., Appel B., Kaesbohrer A., Filter M.: A strategy to establish Food safety Model Repositories. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 81–90 (2015)
81. Pruitt K.M., Kamau D.N.: Mathematical model of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 221–231 (1993)
82. Pujol L., Albert I., Magras C., Johnson N., B., Membre J.-M., Probabilistic exposure assessment model to estimate aseptic-UHT product failure rate. *Int. J. Food Microbiol.* **192**, 124–141 (2015)
83. Ratkowsky D.A.: Principles of nonlinear regression modeling, *J. Ind. Microbiol.*, **12**, 195–199 (1993)
84. Roberts T. A.: Microbial Growth and Survival: Developments in Predictive Modelling. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **36**, 297–309 (1995)
85. Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 241–264 (1994)

86. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U. L 338 z 22.12.2005
87. Seliworstow T., Uyttendaele M., De Zutter L., Nauta M.: Application of TRiMiCri for the evaluation of risk based microbiological criteria for *Campylobacter* on broiler meat. *Microb. Risk Anal.* **2-3**, 78–82 (2016)
88. Sheen S., Hwang Ch.-A.: Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Food Microbiol.* **27**, 37–43 (2010)
89. Smith M.A., Takeuchi K., Anderson G., Ware G.O., McClure H.M., Raybourne R.B., Mytle N., Doyle M. P.: Dose response for *Listeria monocytogenes* induced stillbirths in nonhuman primates. *Infect. Immun.* **76**, 726–731 (2008)
90. Strachan N.J.C., Doyle M.P., Kasuga F., Rotariu O., Ogden I.D.: Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 35–47 (2005)
91. Tadeusiewicz R.: Elementarne wprowadzenie do techniki sieci neuronowych z przykładowymi programami, Akademicka Oficyna Wydawnicza PLJ, Warszawa, 1998
92. Tadeusiewicz R.: Sieci Neuronowe, Akademicka Oficyna Wydawnicza RM, Warszawa, 1993
93. Tenenhaus-Aziza F., Ellouze M.: Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair, *Food Microbiol.* **45**, 290–299 (2015)
94. Teunis, P.F.M., Van der Heijden, O.G., Van der Giessen, J.W.B., Havelaar, A.H.: The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens, Report number 284550002. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands 1996, [http://www.rivm.nl/en/Documents\\_and\\_publications/Scientific/Reports/1996/april/The\\_dose\\_response\\_relation\\_in\\_human\\_volunteers\\_for\\_gastro\\_intestinal\\_pathogens](http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/1996/april/The_dose_response_relation_in_human_volunteers_for_gastro_intestinal_pathogens) (4.09.2017)
95. van Gerwen S., Zwietering M.H.: Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.* **61**, 1541–1549 (1998)
96. van Ginneken M., Oron G.: Risk assessment of consuming agricultural products irrigated with reclaimed wastewater: an exposure model. *Water Resour. Res.* **36**, 2691–2699 (2000)
97. Whiting R.C.: Microbial modeling in food. *Critical Reviews in Food Scie. and Nutrit.* **35**, 467–494 (1995)
98. Whiting, R. C., Buchanan R. L.: A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, **10**, 175–177 (1993)
99. Williams D., Irvin E.A., Chmielewski R.A., Frank J.F., Smith M.A.: Dose response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. *J. Food Prot.* **70**, 1122–1128 (2007)
100. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Rient K.: Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875–1881 (1990)