

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

Department of Food Gastronomy and Food Hygiene, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Submitted in November 2017, accepted in February 2018

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

Prognostowanie w mikrobiologii żywności

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 populacje 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

Key words: risks analysis, food microbiology, predictive models, predictive software

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

* Corresponding author: dr. Elżbieta Rosiak, Department of Food Gastronomy and Food Hygiene, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw; tel. +48 22 5937070; e-mail: elzbieta_rosiak@sggw.pl

1. Introduction

The concept of “predictive microbiology” was used for the first time in the Polish language in 1994 by prof. Ilnicka-Olejniczak [45]. The definition used back then has not its relevance. Predictive microbiology was defined as detailed knowledge about the behaviour of microorganisms in response to specific environmental conditions. The term “predictive” means rational, scientific anticipation of future events. It should be added that predicting future events takes place on the basis of historical data, i.e. in food microbiology, these are the results of scientific experiments carried out under planned, defined conditions. The response of microorganisms is therefore a dependent variable in the function of environmental factors resulting from the composition of the product, the technology used, and the method of packaging. Another definition indicates that predictive microbiology is a subdiscipline of food microbiology, the task of which is to predict the behaviour of microorganisms in food using mathematical models [76].

The properties and usability of the models have been reflected in the European Union’s food law. The Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 with later amendments on microbiological criteria for foodstuffs, contains a provision stipulating that the shelf-life be established using predictive models for indicator bacteria with considerations for the critical factors of microbial growth or survival [86].

2. The idea of predictive microbiology

Food microbiology was initially dominated by microbiological tests on specific products, without any attempt to understand what influences the growth of microorganisms. It was thought that food itself is the main factor conditioning the presence of microorganisms. The concept of predictive microbiology assumes that the presence of microorganisms in food is the result of a combination of various environmental factors, primarily temperature, pH, and water activity [84].

The main idea underlying predictive microbiology is the assumption that the response of microorganisms to environmental factors that determine their growth is reproducible. Therefore, in the repetitive conditions of an environment determined by: the raw material, processing technology, material, and packing atmosphere, the microbial response is predictable and can be described using mathematical models. Such models can be used in a broad scope in relation to food groups, and not only to individual products. It has been proven that predictive models provide results at least 1000 times faster than challenge tests, which are based

on estimating the shelf-life of the product under the same conditions as those prevailing during the distribution or storage of food, based on the number of microorganisms that determine the acceptable level or the level of deterioration [14, 84].

3. Historical background of predictive microbiology

The first predictive models describing the logarithmic-linear dependence of the kinetics of microbial mortality were developed by Bigelow in 1920 and 1921 [5] and Esty and Meyer in 1922. In 1922, Esty and Meyer described thermal inactivation of the endospores of *Clostridium botulinum* type A using a log-linear model, which is still used in the production of canned sterilized food. This model determines the rate of bacterial inactivation at a constant temperature [60].

In the literature the first reference to the concept of predictive microbiology dates back to 1937. It refers to the research conducted by Scott, who considered the knowledge about the rate of growth of selected microorganisms at different temperatures to be important in the research on beef spoilage. Based on his own research, he defined microbiological predictives as knowledge about the growth of some microorganisms at different temperatures on the example of chilled beef. Scott also conducted research on the specific rate of microbial inactivation depending on the availability of water, today referred to as water activity and carbon dioxide levels. Scott’s research without appropriate technology, such as data loggers, computers, and the Internet was doomed to failure. It had to wait for times when these innovations would have been developed and easily accessible.

Thus, the beginning of the 1960s can be considered to be the era of “modern” microbiological prognostics [13, 66]. The research on the process of food spoilage conducted by Australian scientists, Olley and Ratkowsky, led to the formulation of the mathematical dependence of the influence of temperature on the relative rate of food spoilage in 1973. An S-shaped curve was delineated, which was termed the “general spoilage curve” [68]. The shape of the letter “S” corresponds to two phases: the initial acceleration phase (concave fragment) and the final delay phase (convex fragment) [65].

4. The concept of a model and modelling concepts in food microbiology

The model can be defined as: the description of the system, theory or phenomenon. It explains their known or suggested properties and can be used for further

research on these properties. In the common understanding, the model is a smaller replica of a real object. However, in the case of science, engineering, finance, etc., the model is usually a simplified description of the correlation between the observed reactions and the factors responsible for the emergence of these reactions. This description can be expressed in words or quantitatively using one or several mathematical equations. Thus, a mathematical model can simply describe a set of data, or it can be a hypothesis or a series of hypotheses regarding basic relations between independent variables [65].

In predictive microbiology, there is no unambiguous and definitive division of predictive models. It is distinguished that several main concepts of models (empirical vs mechanistic, stochastic vs deterministic, dynamic vs static) within which there are model divisions depending on the type of the microorganism examined or the nature of problems caused by microorganisms (kinetic vs. probabilistic), variables described (primary, secondary and tertiary models) or the influence of environmental factors on microbial populations (growth, survival, inactivation models). Models located on the borderline which combine different approaches, e.g. single cell models combining a stochastic and mechanistic approach implemented in static or dynamic conditions, are encountered in classifications.

4.1. Concept 1: empirical vs mechanistic models

Empirical models called “black box” models describe the observed response of a population of microorganisms to environmental factors. Matching the traditional mathematical relationships to the distribution of empirical data is the only criterion for assessing the model. Polynomial models of the response surface, the Gompertz model, neural networks or the square root model are the best known empirical models. Mechanistic models are based on understanding the basic biochemical and intracellular processes which control the behaviour of cells. Therefore, current microbiological knowledge may be insufficient to develop a complete mechanistic model. Very often, models are created that combine mechanistic features and empirical elements [8, 31, 65, 66].

4.2. Concept 2: static vs dynamic models

Data for the construction of the first predictive models were obtained under static conditions. The real conditions prevailing in food are subject to changes over time, therefore models that take into account this variability, i.e. dynamic models, are needed. There are various factors that can be added as constituents to the basic dynamic model, namely: fluctuations in environmental conditions, variability of the physiological

state of cells, interactions and production of metabolites affecting bacterial growth [10].

The elementary equation describing the dynamic model can be presented as follows:

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = m_i \cdot N_i(t), N_j(t), fact(t), chem(t), phys(t) \cdot N_i(t) \quad (1)$$

where:

$N_i(T)$ represents the number of microbial cells, μ_i (h^{-1}) is a specific coefficient resulting from interactions within, (N_j) and between (N_j) species of microorganisms, $(fact)$ physicochemical conditions of the environment, $(phys)$ physiological state of the cells and $(chem)$ metabolite production.

The rate of growth/inactivation in conditions changing over time will be calculated by the model if respectively $\mu_i > 0$ or $\mu_i < 0$. For each factor included in the model, additional mathematical equations describing its variability over time should be developed [76].

4.3. Concept 3: stochastic vs deterministic models

Deterministic mathematical models describe the behaviour of large populations of microorganisms as a whole without taking into account the response of individual microbial cells to selected environmental factors [55], while the stochastic approach takes into account the effect of variability and uncertainty related to the environmental response of a single cell in the entire population of microorganisms [24].

5. Breakdowns of predictive models

The first division, due to the complexity of dependencies between the variables included in the model, encompasses the division into primary, secondary and tertiary models. Primary models take into account the change in the number of microorganisms over time (growth or inactivation) and the kinetic parameters are determined (lag phase, coefficient of growth rate, time needed to reach the stationary phase, rate of inactivation). On the other hand, secondary models describe the relation of kinetic parameters from the original model to environmental variables (e.g. temperature). Tertiary models are the implementation of both types of models in computer tools and on-line databases [31, 43, 74, 98].

The most commonly used primary models are Gompertz, logistic, Stannard (after reparameterization) and the Schnut and Richards functions [100]. The consequence of research conducted by Zwietering and Gibson, who compared the capabilities of the above-mentioned functions to model data obtained from a batch culture of *Lactobacillus plantarum* and other bacteria

was the statement whereby in most cases the model best describing and adapting to data as well as easy to use was a modified Gompertz model [10, 31, 68, 74, 100].

The modified Gompertz function (after reparameterization) is a commonly used empirical, primary model describing the change in the number of microorganisms over time in a given environment. The additional parameter A represents the lower value of the log asymptote of the number of bacteria ($\log \{N_{(-\infty)}\}$, which in some cases, when the value of parameter A is lower than $N_{(0)}$ gives a better fit of the function and estimation of the initial cell density [67]. On the basis of primary models, kinetic parameters can be obtained to describe microbial populations, such as: generation time, duration of the lag phase, maximum rate of exponential growth, time needed to reach specific population size [16, 68, 95]. Currently, many authors use the Gompertz model (2) to calculate the use-by date of food products [14, 30, 40, 49, 56].

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

where:

t = time [h],

$N_{(t)}$ = population size at time t [\log (cfu / ml)],

A = value of the lower asymptote ($\text{Log } N_{(-\infty)}$) [\log (jtk / ml)],

D = difference between the upper and lower values of the asymptote [e.g. $\text{Log } N_{(\infty)} - \text{Log } N_{(-\infty)}$] [\log (jtk / ml)],

M = time after which the exponential growth rate reaches its maximum [h],

B = is the tangent of the inclination of the growth curve at the time M .

Despite the widespread use, the Gompertz model has weaknesses, including: non-horizontal course and negative value of the phase lag estimation, expression of microbial cell concentration on a logarithmic scale, imprecise expression of the maximum rate of population growth with the inflection point of the curve, which suggests that the maximum growth coefficient may be higher than the estimated, expression of the exponential growth phase by a non-linear function [9, 10, 97, 98].

In secondary models, two ways of describing the relations of kinetic parameters to environmental factors can be distinguished: (1) the influence of several environmental factors is most often described by lower-degree polynomial functions (first degree and second degree, less frequently, third degree functions); (2) environmental factors affecting the microbial population which are individually modelled. Among these models, the square root model, the gamma model, the cardinal parameter model, and the polynomial function are most commonly used (the so-called response surface models) [74, 76].

Tertiary models are called integrated models in prognostic computer programs [31, 98]. The user observes environmental factors such as: a_w , pH, and temperature visualised after being introduced into the mathematical model which allows them to obtain prognostic results, whose calculation is based on primary and secondary models. Primary models determine changes in the number of microorganisms over time, while secondary models indicate how the values calculated according to the primary model change under the influence of one or more environmental factors.

The appearance of powerful computers in the 1980s enabled faster execution of complex mathematical calculations. It was then possible to develop mathematical models using multi-step algorithms, which estimate model parameters. This resulted in the prolific development of this field of food microbiology. Table I presents currently available computer programs which integrate models into a useful tool and visualise the primary data on which the models were built [62]. Although the first versions of prognostic programs for microbiology were independent tools, today the open-source online programs available to everyone and everywhere via the Internet are dominant (Tab. I) [43, 53, 80, 93].

The pioneering role was played by the Pathogen Modelling Program (PMP), designed by two United States Departments of Agriculture (USDA): Agricultural Research Service (ARS) and Eastern Regional Research Center (ERRC), which is responsible for formulating and implementing federal agricultural and food policy. This is the oldest study that is based on predictive models. Since 1990 PMP has been distributed in various forms: from single spreadsheets and commercially available programs to stand-alone free of charge programs available on the Internet. PMP includes a set of models that can be used to predict growth and inactivation, both thermal and non-thermal (pasteurisation and radiation), mainly of pathogenic bacteria in food, e.g. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., Primary models use the Gompertz equation [100]. The user has at their disposal such estimated parameters describing the population as: the duration of the lag phase, generation time, growth or inactivation chart with reference to confidence interval in selected environmental conditions [20, 31, 43, 44]. Currently, the version 7.0 is available for downloading from the website <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550>.

In recent years numerous predictive programs for food microbiology have been developed, whose overview is contained in Tab. I. Programs such as FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Sym'Previus, GroPIN, and Listeria Meat Model have been designed for specific microorganisms in specific matrices. In the development of others (FDA-iRISK, TRiMiCri),

Table I
Review of computer programs for food predictive microbiology

Name	Access / link	Date	Affiliation	Modelling concept	Target group
Baseline	Free internet access www.baselineapp.com	2012	University of Cordoba, Spain	Deterministic	FBOs, R&T, S
ComBase	Free internet access www.combase.cc	2004	Institute of Food research, UK	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
Dairy Products Safety Predictor	Commercial, internet access www.aqr.maisondulait.fr	2012	ACTALIA, France; French Dairy Interbranch Organization, France	Stochastic	FBOs
FDA-iRISK	Free internet access www.irisk.foodrisk.org	2012	Food and Drug Administration, USA	Stochastic	FBOs, R&T, S, G
FILTREX	Free, downloadable www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/ public/logiciels/filtrex/	2013	INRA, National Institute for Agronomy Research, France	Stochastic	R&T, S
FISHMAP	Free, downloadable www.azi.es/dowlands/dowlands/ fishmap/#tab-description	2011	AZTI, Transforming Science into Business, Spain	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	Free, downloadable www.fssp.food.dtu.dk	1999	Technical University of Denmark, Denmark	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
GlnaFit	Free internet access www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php	2003	Catholic University of Leuven, Belgium	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
GroPIN	Free internet access www.aua.gr/psomas/gropin	2013	Agricultural University of Athens, Greece	Deterministic and stochastic	FBOs, R&T, S, G
Listeria Meat Model	Free internet access www.cpmf2.be	2012	Catholic University of Leuven, Belgium	Deterministic	FBOs, G
MicroHibro	Free internet access www.microhibro.com	2011	University of Cordoba, Spain	Stochastic	FBOs, R&T, S, G
MRV, Microbial Responses Viewer	Free internet access www.mrviewer.info/	2008	National Food Research Institute, Japan	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
NIZO Premia	Commercial, without internet access	1995	NIZO Food Research, The Netherlands	Deterministic	FBOs
PMM-Lab	Free internet access www.sourceforge.net/projects/pmmlab/	2012	Federal Institute for Risk Assessment, Denmark	Deterministic	R&T, S, G
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	Free internet access www.dmripredict.dk	2006	Danish Meat Research Institute, Denmark	Deterministic	FBOs, R&T, S, G
Sym'Previous	Commercial, internet access www.symprevious.org	2003	Adria Development, France	Deterministic and stochastic	FBOs, R&T, S, G

FBOs – Food Business Operators, R&T – Researchers and Teachers, S – Students, G – Government.

Source: own study based on Koseki 2009, Huang 2014, Plaza-Rodriguez *et al.*, 2015, Tenenhaus-Aziza 2015 [43, 51, 80, 93].

risk assessment models became the priority. Microbial Responses Viewer [80, 87] focuses on the growth/no growth type of estimation. To generate predictive models the following programs have been developed: GlnaFit, FILTRES, PMM-Lab.

These programs function as independent prognostic tools, however, the creation of ComBase, a program and an online database, was a pioneering achievement thanks to which both previously published and unpublished models are now available on the Internet. ComBase also has restrictions consisting in the fact that the end user is not allowed to enter a new model into

the database without the creator's knowledge and consent. In addition, it is not possible to export the predictive model used for predicting, but only the forecasts obtained online [51]. In 2011 and 2012, new online programs appeared: MicroHibro and Baseline, which allow for building user-defined growth prediction or inactivation models for any microorganism in food. However, as in the case of ComBase, the user is not allowed to export the model obtained in MicroHibro or Baseline to another prognostic tool.

An innovative solution, and the future of predictive microbiology at the same time, is the creation of Food

Safety Model Repositories (FSMR) which are modules that enable one to export predictive models to a standardised data exchange format. What is more, FSMR are an example of a task-based approach that ensures transparency of data processing and facilitates cooperation and quality control among various researchers. PPM-Lab was chosen as a prototype tool for creating example models of growth, inactivation, and *Salmonella* survival in beef for Food Safety Models Repository [80].

Another classification of models takes into consideration growth, survival, and inactivation models. Growth models constitute the most refined group of models. It includes the Arrhenius-type and Bělehrádek-type models discussed below. Among the functions most frequently used to describe the growth of microorganisms we find: the modified logistic model and the modified Gompertz function.

Inactivation and survival models are characterized by the fact that they describe how the number of microorganisms is reduced over time, focusing on the death phase of the population. The models used most frequently to describe thermal or non-thermal inactivation are: the log-linear model (the Bigelow model), the Weibull model, and “shoulder/tail models” [76].

The creators of the logarithmic-linear model were the pioneers of predictives in food microbiology thanks to plotting the logarithm of the number of bacteria on the Y axis and the temperature on the X axis of a semi-log graph. The obtained mathematical equation which describes the data allows one to calculate the D-value (decimal reduction time). The temperature change that enables obtaining the D-value is determined as the value z [31].

The Weibull model is a primary model of the inactivation of vegetative bacteria. This model assumes non-linearity of semi-logarithmic survival curves in the inactivation process by including biological changes in relation to thermal inactivation. In fact, it is a statistical model of distribution of inactivation times. The Weibull model considers two parameters: a (time) and a dimensionless shape parameter b . The logarithm of parameter distribution a depends linearly on temperature; whereas the dependence of the parameter b on time is not well-established. Although the Weibull model is empirical, it can describe physiological effects. $b < 1$ indicates that the cells left after inactivation have an ability to adapt to stress conditions, while $b > 1$ indicates that the cells left after inactivation are damaged after. This variability of parameters determines the greater flexibility of the Weibull model than that of the linear model based on the D-value. The Weibull distribution function (which is closely related to gamma distribution, extreme values distribution, and log-normal distributions) is also widely used in reliability engineering to describe the duration of failure in electronic and mechanical systems,

and it is suitable for the analysis of survival data, namely, time to failure after applying the load [76].

The arm/tail model describes the condition of the population before inactivation, when the growth curve is flat and there are no changes in the number of microorganisms. The inactivation process causes microbes to die, so the curve takes the shape of an “arm”. “Tail” is a fragment of the curve which represents the survival of microorganisms after the use of the inactivation process; it refers to a population with higher resistance, not subject to inactivation described in the log-linear model [76]. Inactivation models allow for evaluating the effectiveness of applying various technological processes in microbial inactivation.

Predictive models can also be divided into kinetic and probabilistic ones. Kinetic models are usually used in the case of pathogens which do not form endospores, especially those that become dangerous only after exceeding a certain threshold of growth, such as bacteria known as specific spoilage organisms (SSO) [14, 30].

Two types of models describing the kinetics of microbial growth under the influence of temperature and other environmental factors are commonly found. The first are based on the Swante Arrhenius equation elaborated in 1889, which determines the influence of temperature on the speed of a chemical reaction, which is derived from the van't Hoff's equation describing the influence of temperature on the thermodynamics of gases. The second group of models is based on the model originally developed by Jan Bělehrádek in 1930. The function expresses the influence of temperature on biological processes and is developed in modern Ratkowsky's models [25, 68, 74].

The model presented by Bělehrádek in 1930 included “biological” zero (temperature at which and below which no microbial growth is possible).

Modern notation of the Bělehrádek model:

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

where: k = constant rate of growth,
 a, d = parameters to be adjusted,
 t_0 = mathematical equivalent α .

The model of Ratkowsky's square root is one of the best-known models of the Bělehrádek type; which for the full temperature range assumes the form:

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

where: T = incubation temperature [°C],
 k = constant rate of growth,
 T_{\min}, T_{\max} = minimum and maximum growth temperature [°C],
 b, c = parameters to be adjusted.

Modifications of the basic formula of the model led to including considerations for the influence of tem-

perature, water activity and pH on the growth of microorganisms [16, 68, 74, 83, 84, 95, 97].

The second group of kinetic models which explain the influence of temperature on the growth rate are Arrhenius models and their modifications. The simplest Arrhenius model used in predictive microbiology assumes the form:

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

where: k = constant rate of growth,
 E_a = activation energy KJ mol^{-1} ,
 T = absolute temperature $[\text{°C}]$,
 R = gas constant: $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$,
 A = parameter to be adjusted.

In its basic form, many authors found the Arrhenius dependence unsuitable for describing the rate of reaction in complex biological systems. Hence, numerous modifications of the basic dependence have been made, with the extension of its applications for low and high temperatures. Davey's linear modification is considered to be one of the best modifications of the Arrhenius equation [2, 3, 68, 83, 85].

The Arrhenius equation with the linear modification by Davey:

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

where: k = growth rate coefficient,
 T = temperature $[\text{°C}]$,
 C_0, C_1, C_2 = parameters to be adjusted.

Another modification of the model in addition to temperature takes into account water activity as a factor affecting the growth of microorganisms: [16, 68, 83, 85, 25–28; 74].

Probability models are usually used for sporulating bacteria, especially *C. botulinum*, in whose case even the smallest growth is dangerous. Most probability-based models are derived from the Hauschild formula used to calculate the probability of a single endospore germination *C. botulinum* and multiplication of progeny vegetative cells, to a level which is necessary for the production of the botulinum toxin.

5.1. Neural networks

Neural networks can be used wherever tasks involving prediction, classification or control appear [37]. Neural networks are a sophisticated modelling technique, capable of mapping complex functions of non-linear character, thanks to which they can be used in microbiological forecasting of food, in which there is often no basis for linear approximation of occurring phenomena and biological processes.

The Artificial Neural Network (ANN) model was inspired by the physical structure and mechanism of the biological system (Najjar et al., 1997). It is defined as a computational statistical model which combines single elements, called neurons or nodes into a network. The network of neurons is organised into layers: the input, hidden and output layers which are capable of performing parallel calculations. In predictive microbiology, they were applied due to their flexibility and the generation of data distinguished by a high degree of accuracy in matching to experimental data, in comparison with other regression techniques, as well as high tolerance to noise data [12, 35, 71]. On the basis of the collected representative data, showing the variability of the dependent variable, the learning algorithm is repeated until satisfactory solutions are obtained. Its purpose is to automatically create the necessary network structure, then as a result of learning unnecessary connections and neurons are removed. On their basis, the network performs all functions related to the operation of the created model [35, 91, 92].

The most popular network architectures include the multilayer perceptron (MLP), which uses the linear postsynaptic potential function – PSP. The operation of the MLP network consists in determining weighted sums of input values, which are an argument of the – usually a non-linear – activation function. The standard function of activation for the MLP network is the logistic function (also often called – due to its shape – sigmoidal) used by default in all layers of the network. The exception is the WNN (Wavelet Neural Network) in which, instead of a sigmoidal function in hidden layers, the non-linear wave transformation function is used [4]. MLP networks can be learnt using a number of algorithms: conjugate gradient algorithm, Quasi-Newton, Levenberg-Marquardt, back-propagation of errors, fast propagation or Delta-bar-Delta algorithm. Networks with this architecture find many applications in predictive food microbiology, both for modelling the assumed dependence of bacterial growth over time as well as for predicting growth parameters such as the lag phase or exponential growth rate and the influence of external biochemical and environmental factors determining growth [6, 36, 40, 47].

Another type of network used in predictive microbiology are generalised regression neural networks – GRNN and Neuron Networks with Radial Base Functions (RBF) [36]. These networks learn very quickly, but are characterised by their tendency to create structures which are of considerable size, which means that their operations during standard exploitation is very slow. While networks with radial basis function (RBF) have linear neurons in their input and output layers and in the hidden layer they have radial neurons. In the neurons of the radial layer, exponential activation

functions (radial basis functions) are used, while in the output layer neurons are equipped with linear activation functions. Networks with radial basis functions learn relatively quickly and have the advantage of never extrapolating the functions over long distances from known data, so they are in a sense the safest ones. However, in general, they are much larger than the MLP networks which solve the same tasks, which is more time-consuming [36].

5.2. A new generation of predictive models

The new generation of models includes molecular and genomic models, transfer models, models of interactions between species, and single cell models.

The development of molecular biology and the data obtained as a result of these analyses furnish new possibilities for a more mechanistic description of microbial behaviour in food. This leads to the creation of more reliable and solid models, which are called molecular models [15]. Systemic biology aims to understand the relationship between the genotype and phenotype. Mathematical models are necessary to describe these relations and are the key tool enabling in-depth understanding of how biological systems actually work [42].

Currently, attention is focused on developing models that take into account pathogen transmission along the food chain (transfer models) or the probability that this pathogen may grow or fail to grow under given environmental circumstances (growth/no growth models). Growth/no growth models can be used effectively if the data on the presence/absence of a pathogen are required. It is also estimated that pathogenic bacteria can survive the inactivation process and transfer between different types of food as well as at the point of contact of work surfaces/air with food [77]. In the research conducted by Pérez-Rodríguez et al. [78] pathogenic bacteria *E. coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* were transferred during cutting, from a contaminated meat-slicer to cold meats subjected to thermal processing (inactivation was described by the log-linear inactivation model and the Weibull model). The exponential functions were also used to describe the growth of pathogens after they were transferred [88].

Another approach focuses on the factors which inhibit mutual growth in a population of different microorganisms. This effect can be included in the secondary model by adding a new factor corresponding to the inhibitory function. Taking into account the impact of competition between species in predictive models is a necessary step to achieve more accurate predictions. The use of bioprotective cultures as food preservatives and the need to learn how endogenous flora influences the growth of pathogens in food, draws the attention of microbiologists to this area. Models that take these

factors into account may have important applications in the food industry [58].

Modelling the variability of population response to environmental factors associated with the lag phase of microorganisms is an important aspect of microbiological risk assessment. Research in this field has shown that sources of variability are associated with the lag phase and not with the maximum growth rate [7]. Among the factors affecting this phase, the availability of nutrients is the most important. The growth of microorganisms in broth medium may not include a lag phase due to its ideal conditions for their development. Other factors, such as the inoculum level or pre-incubation conditions (cell history), affect the length of this phase. Since microbiological contamination of food is usually at a low level, higher variability of this phase is expected, especially when cells are subjected to stress. Carrying out the tests at the level of single cells, allows better evaluation of the variability and also better prediction of bacterial behaviour in real conditions. Modelling at the level of individual cells uses stochastic processes when the variability between individual cells is included in the considerations. The lag phase and subsequent growth before the stationary phase can be modelled using a two-phase linear function [76]. McKellar and Knight [63] developed a model that combines the stage of adaptation (discontinuous stage), as a single cell property and the stage of logistic bacterial growth (continuous stage). The extension of the continuous-discontinuous model included dynamic conditions of lag phase modelling, because in this phase the maximum growth rate may vary depending on the environmental conditions. This type of modelling was also used by Koutsoumanis [53] to assess the maximum concentrations of NaCl which inhibit the growth of individual cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Data on the variability of growth limits of individual bacterial cells presented in this paper highlight the need for a stochastic approach in quantitative microbiology, especially in environments close to the growth limit.

6. The construction of predictive model

The process of creating a mathematical model requires the coordination of work and knowledge in the field of: microbiology, statistics, mathematics, chemistry, process engineering and information technology. It also requires appropriate computer hardware and software.

In the construction of a mathematical model four stages can be distinguished:

- planning;
- data collection and analysis;
- mathematical description;
- validation and storage of data.

6.1. Planning the experiment

Inclusion of the stage of *planning* the experiment allows for formulating an appropriate research problem and carrying out the necessary preliminary research. In addition, the nature of the studied microorganism and the problems it causes in food determine the type of the model. Different types of models are used to predict the likelihood of toxin formation, the likelihood of growth, the duration of the lag phase of pathogenic bacteria without tolerance for the duration of exceeding it, the development of the pathogen to a certain degree of tolerance or growth of saprophytic bacteria. In addition, at this stage, factors that will be included as variables in the model should be planned. Also important is the number of variables, interactions between variables, the quantity of data necessary for each variable [67].

6.2. Collection of data

Data collection is carried out by using direct methods in which individual microorganisms are distinguished and counted (Petri dish method) and indirect methods in which some properties are determined, such as: optical density, dry mass, impedance [67].

The heterogeneity of food products causes difficulties in collecting data for the construction of predictive models, therefore, microbiological substrates are used for analysis, which have a stable composition and which can be easily modified to obtain the required conditions. In some situations, there may exist different methods for determining environmental conditions, e.g. the choice of the acidifying agent or moisture absorber in order to adjust the pH and water activity. In the case of a model which is to be used for a wider group of food products, chemicals with lower inhibitory properties are used, which reduces the likelihood of a situation where microbiological risk is underestimated (when, for example, the predicted growth rate of microorganisms is lower than in reality). However, if the model is intended for a specific product, the selection of factors may be more narrowed.

The selection of the strain, the size of the inoculum, and the conditions of livestock rearing influence the data received and later forecasts. The size of the inoculum must ensure that the expected microbial response is measurable. Livestock rearing conditions should be selected so as to reflect the actual conditions under which potential micro-organism will evolve as accurately as possible.

The time at which samples are taken is an important factor in the planning of the experiment, and it should be close to the period of the most rapid changes as much as possible, e.g. the end of the lag phase in the case of growth models. 10 to 15 measuring points are

required [48] in order to match the sigmoidal function to the empirical points.

6.3. Data analysis

At the stage of *data analysis* the selection of a mathematical s-shaped function describing the growth curve is made. The nonlinear regression technique allows mathematical description of the lines with the best fit to the empirical points, but it requires the use of appropriate computer software. Sigmoid models of one independent variable with four parameters are: Verhulst's equations, logistic function, Stannard's, Richards', Morgan's, Marcer's, Flodin's, Weibull's, Chapman-Richards' equations, and the ones most commonly used to describe the growth of microorganism populations are the modified Gompertz and logistic functions [68, 81].

6.4. Model validation

Model validation is performed in order to check the predictive capabilities of the model in a new situation. The true value of the model ultimately means how well it can predict the behaviour of microorganisms under the influence of new conditions. The model may prove to be inappropriate for many reasons. It may be a natural diversity of microorganisms, systematic errors in analytical laboratory methods or errors in the applied modelling techniques, inadequately describing data. It is estimated that for models constructed using data collected in experiments conducted on laboratory substrates, the relative error in predicting microbial growth is 7–10% for primary models and 20–50% for secondary models. At this stage, there exist a certain degree of acceptance or rejection of the model, so it may be necessary to provide additional data or confirm the existing one, or use other modelling techniques [48].

Validation of the model in food conditions involves a comparison of the values predicted by the model with the observed data: growth, survival and/or inactivation of microorganisms in food. The fastest and cheapest way to perform validation is to use the results from scientific publications for this purpose [39]. However, the number of available data may be very limited and it may be incomplete. These problems can be solved using the "challenge test", specially designed for the validation of the model for a specific product (external validation). In this case, the data is more appropriate, reliable and complete. However, since it consumes both a large amount of time and requires large financial outlays, it is usually used as supplement to the data from scientific publications [39, 48].

There also exists an internal validation method, using the same data that allowed for developing the model, to validate it. It is necessary to divide the data

rationally into subsets and, based on part of the data, develop a forecasting model and then apply this model to the prediction of the remaining data. Another method consists in sequential data omission. The model built on the basis of other data is used to predict the value of the data omitted, and the obtained values are compared with the proper value of the omitted point. The process is repeated for each point and calculates the sum of the squared residuals.

The accuracy of the model's fit to the data and the estimation of the acceptability of the model's prediction, taking into account the error of the method, can be estimated graphically. The chart includes data predicted by the model relative to the data observed or described in the literature. As a result of graphical validation, it is easy to classify the developed false-safe models if the model overestimates growth and false-dangerous if the model underestimates growth. The line of equivalence represents the perfect correspondence between the predicted and the observed values. Points below the equilibrium line on the right side of the chart mean that the model predicts false-danger, while the points that are above the equivalence lines on the left indicate false-safe prediction [76].

To estimate the accuracy of the models, mathematical and statistical indices such as: mean square error – (MSE); coefficient of determination R^2 ; bias factor B_p , accuracy A_f [74, 76].

The application of a non-validated predictive model in practice may terminate with serious consequences for consumer health safety and, consequently, lead to the rejection of the concept of predictive microbiology as unhelpful. Especially in the case of models based on data derived from non-food systems, it is extremely important to achieve the absolute certainty that the model can be used in a food system.

7. Predictive microbiology in risk analysis

There are two approaches to microbiological risk assessment: qualitative and quantitative assessment. Qualitative assessment is a descriptive assessment, based on the analysis of precise information on the probability of disease occurrence (e.g. high or low probability). Qualitative assessments are carried out in the absence of scientific data or resources to carry out a full quantitative assessment [38, 57]. Quantitative microbial risk assessment (QMRA) requires taking into account a significant numerical database to estimate the health consequences associated with microbiological hazards using mathematical modelling. In QMRA, all stages of food production and distribution (“from field to table”) are taken into account, and the result of the analysis is the estimation of the likelihood of disease

contraction after consumption of the investigated food product [32 61].

QMRA consists of four stages: (1) identification of hazards in which potentially pathogenic micro-organisms present in a food product are indicated; (2) hazard characterization, which describes the adverse health effects associated with the consumption of the pathogenic microorganism contained in the food product; (3) an exposure estimate which predicts the estimated frequency of food intake and the probable number of micro-organisms per portion; and (4) risk characterization to estimate the risk of infection associated with the consumption of the food product [19, 22, 32, 61].

Exposure estimation and risk characterization are two out of four QMRA components which require the application of predictive models [76]. It is necessary to choose the appropriate predictive model to calculate the risk of infection or disease in QMRA. Dose-response models play an important role in assessing the risk with QMRA [29, 34]. This type of model determines the mathematical relationship between the intake of a dose of pathogenic microorganisms, carried by food, and the host's reaction based on the probability of infection/disease or death [19].

There are various dose-response models available in the literature, including the exponential model [70], the β -Poisson model [59], the approximate β -Poisson model [79], the binomial β model [11, 41] and the Weibull-Gamma model [21].

Due to the difficulty in obtaining data, constructing a dose-response model is not a simple matter. Ideally, it would be best if the data necessary for model construction came from studies conducted on the entire population, including sensitive subpopulations: children, the elderly, and pregnant women. The database of results should also take into account various initial levels of pathogenic microorganisms [23]. The results of studies conducted with human participation were presented in the work of Teunis et al. [94]. The data used in the assessment of microbiological risk, necessary for constructing dose-response models, comes from various sources. These include: tests conducted on volunteers with their consent, consisting in the consumption of a product contaminated by a known number of microorganisms [33], extrapolation of the results of tests on animals [89, 99] and analysis of the epidemiological research on food-borne diseases [17, 90].

The lack of data on the dose-response relationship for the majority of pathogenic microorganisms shows how difficult it is to apply the right experimental approach in the quantitative microbiological risk assessment. Considering the heterogeneity of populations exposed to pathogenic microorganisms in terms of their age, health, eating and cultural habits as well as geographical conditions, the situation gets even

more complicated. While estimating the exposure, not only the significant regional differences, but also the organism susceptibility/sensitivity should be taken into account [29, 50]. Moreover, in order to fully estimate the likelihood of disease occurrence, it is not only the distribution of microbes in the raw material, changes in the population of pathogenic microorganisms throughout the process of food production, distribution and storage, but also their distribution during food preparation at home that should be taken into account [32]. Problematic situations also arise in the case of a low initial number of pathogenic bacteria. Due to the lack of knowledge on the basic mechanisms underlying body's response to a specific dose of microorganisms, mathematical modelling is often based on assumptions and extrapolations [18–19, 52]. Mathematical solutions which take these “uncertainties” of the dose-response model into account were suggested in the study by Moon et al. [69]. Besides, Buchanan et al. [18], Julien et al. [46] propose new modelling strategies, such as the Key Events Dose-Response Framework (KEDRF), which is an analytical description of the model dose-response relationship based on existing information.

In order to estimate the final risk (e.g. probability of the occurrence of a disease or number of microbial incidence cases in food), the results predicted by the two models: the exposure estimation model and the dose-response model, should be combined. An exemplary model of exposure estimation is presented in the paper by Pujol et al. [82]. The dose (propagation/frequency and concentration) determined on the basis of the exposure estimation model is introduced into the dose-response model. Several methodological approaches to performing this mathematical procedure have been proposed, some of which were covered in detail by Perez-Rodriguez et al. [75, 77].

The quantitative risk assessment can be presented as “point estimate” (deterministic) or “probabilistic” (stochastic), respectively. The most substantial difference between the two approaches lies in the presentation of the source data necessary to carry out the risk assessment. The deterministic approach means that input data for risk assessment are used as single parameter values (mean or minimum value), e.g. in order to estimate the exposure to an average number of pathogenic microorganisms in food consumed by the average consumer [57]. The deterministic method is simpler and faster to implement because it is based on mathematical calculations, but it only provides a specific result without covering exceptional/rare/unusual cases [1].

Rather than individual parameter values, the probabilistic approach takes into account all available data and uses probability distributions, which translates into a more complete risk assessment [57, 72]. The probabilistic method requires taking into account probability dis-

tributions in order to reflect variability or uncertainty of parameters. This method is more difficult, but it allows for obtaining the probability distribution of the risk and clarifies the interpretation of the model results [1].

The probabilistic approach, despite the greater complexity of calculations, has become a more reliable method used in quantitative risk assessment. The risk assessment should provide considerations for the variability and uncertainty of the information used to estimate the exposure. Variability is essentially a property of nature and represents the diversity in a well-characterized population or parameter. Every element during production, processing and sale of food is marked by variability; both the pathogenic microorganism itself and the host's response to pathogenic factors. On the other hand, the uncertainty also results from the lack of knowledge about the phenomenon or parameter and the inability to characterize it. Identifying and characterizing the variability and uncertainty are important factors, as they affect the final result of risk assessment and, consequently, the decisions pertaining to risk management [57].

Today, the technique most frequently used for carrying out the microbiological risk assessment is the Monte Carlo simulation. This methodology uses the stochastic approach, where the key factors in the model are represented by the distribution of data, and the set of output values is generated in the form of multiple iterations. Thus, the input data in the form of a probability distribution, for instance in relation to the incidence and levels of pathogens in the product or to the thermal inactivation, are joined together to generate estimated probability of the occurrence of a disease, which is also presented as distribution. The Monte Carlo simulation can provide a more realistic risk assessment than a strictly deterministic approach. Furthermore, taking into account variability described as frequency distribution allows for obtaining more realistic risk assessment than the one based on one discrete/single value: e.g. average or minimum value [32]. Unfortunately, many previous studies present microbiological data as discrete values (e.g. mean value of log jtk/g), rather than distribution, which limits their application in QMRA [72].

8. Summary

Owing to the interdisciplinary efforts of both microbiologists and scientists involved in the development of the mathematical model, predictive microbiology is increasingly employed by the academic community and the food industry to improve and assure quality and food safety [39, 86]. In the course of the development of this sub-discipline of food microbiology, several concepts of modelling, classification and division of predictive

models have been proposed, as a result of the necessity to organize models and their applications. Today, modern analytical methods (molecular and genomic models) are being used at the stage of data collection in the process of creating a forecasting model, and besides, there is an ongoing search for modern computational tools, whose example is the employment of Neural Networks.

The utility value of predictive models is constituted by, among others, the estimation of use-by dates for food products as well as its usage in microbiological risk assessment. Numerous computer programs as well as databases operating on-line are used for this purpose. The creation of Food Safety Models Repositories, which are modules that enable the export of predictive models to a standardized data exchange format [80], becomes an innovative solution and also the future of predictive microbiology.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

- Akmal 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- Aspidrou Z., Koutsoumanis K.P.: Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation, *Food Microbiol.* **45**, 216–221 (2015)
- Atsamnia D., Hamadache M., Hanani 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)
- 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)
- Baranyi J., da Silva N.S.: The use of predictive models to optimize risk of decisions. *Int. J. Food Microbiol.* **240**, 19–23 (2017)
- Baranyi J., Pin C.: Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 732–736 (1999)
- Baranyi J., Roberts T.A., McClure P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* **10**, 43–59 (1993)
- 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)
- Basheer I.A., Hajmeer M.: Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiological Methods*, Neural Computing in Microbiology, **43**, 3–31 (2000)
- 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)
- 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)
- 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)
- Buchanan R.L.: Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 6–11 (1993)
- 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)
- 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)
- 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)
- Butler F., Xu Y.: Prediction of *Staphylococcus aureus* growth in ham during chilling using Pathogen Modeling Program. *Biosystem Engineering*, **16**, 20–23 (2011)
- 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. F.* **9**, 498–512 (2010)
- Codex Alimentarius Commission. Report of the Thirtieth Session of the Codex Committee on Food Hygiene (CCFH). Ali-norm 99/13 Appendix IV: s. 58–64 1999. http://www.codexalimentarius.net/download/report/112/Al99_13e.pdf (18.09.2017)
- Coleman M.E., Marks H.M.: Qualitative and quantitative risk assessment, *Food Control*, **10**, 289–297 (1999).
- 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)
- Daughtry B.J., Davey K.R., King K.D.: Temperature dependence of growth kinetics of food bacteria. *Food Microbiol.* **14**, 21–30 (1997)
- Davey K.R.: Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 253–257 (1991)
- Davey K.R.: Linear-Arrhenius models for bacterial growth and depth and vitamin denaturations. *J. In. Microbiol.* **12**, 172–179 (1993)
- 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)
- 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 (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 (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. *Pattern 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**, 337–343 (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. Hoofan, 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. *Curr. Opin. Food Sci.* **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. Biodegr.* **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 (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)

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 populacje 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:

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = m_i \cdot N_i(t), N_j(t), fact(t), chem(t), phys(t) \cdot N_i(t) \quad (1)$$

gdzie:

$N_i(t)$ reprezentuje liczbę komórek drobnoustrojów, μ_i (h^{-1}) jest specyficznym współczynnikiem wynikającym z interakcji wewnątrz

(N_j) 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 dopasowującym 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 www.baselineapp.com	2012	University of Cordoba, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S
ComBase	Bezpłatny, dostęp internetowy www.combase.cc	2004	Institut of Food research, UK	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Dairy Products Safety Predictor	Komercyjny, dostęp internetowy www.aqr.maisondulait.fr	2012	ACTALIA, Francja; French Dairy Interbranch Organization, Francja	Stochastyczna	BŻ
FDA-iRISK	Bezpłatny, dostęp internetowy www.irisk.foodrisk.org	2012	Food and Drug Administration, USA	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
FILTREX	Bezpłatny, do pobrania www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/	2013	INRA, National Institute for Agronomy Research, Francja	Stochastyczna	N, S
FISHMAP	Bezpłatny, do pobrania www.azi.es/dowlands/dowlands/fishmap/#tab-description	2011	AZTI, Transforming Science into Business, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	Bezpłatny, do pobrania www.fssp.food.dtu.dk	1999	Technical University of Denmark, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GlnaFit	Bezpłatny, dostęp internetowy www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php	2003	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GroPIN	Bezpłatny, dostęp internetowy www.aua.gr/psomas/gropin	2013	Agricultural University of Athens, Grecja	Deterministyczna i stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
Listeria Meat Model	Komercyjny, dostęp internetowy www.cpmf2.be	2012	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, ORz
MicroHibro	Bezpłatny, dostęp internetowy www.microhibro.com	2011	University of Cordoba, Hiszpania	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
MRV, Microbial Responses Viewer	Bezpłatny, dostęp internetowy www.mrviewer.info/	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 www.sourceforge.net/projects/pmmlab/	2012	Federal Institute for Risk Assessment, Dania	Deterministyczna	N, S, ORz
Microbial Safety in Meat Products	Bezpłatny, dostęp internetowy www.dmripredict.dk	2006	Danish Meat Research Institute, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Sym'Previus	Komercyjny, dostęp internetowy www.symprevius.org	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 opisaną 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. uwzględnił 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 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 uzyskane 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 zrozumie-

nie relacji genotyp-fenotyp. Modele matematyczne są niezbędne do opisanie tych relacji i 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 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 utrwalających 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 bakterijnych 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 inhibujących, 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 są czasochłonne, jak i wymagają dużych nakładów finansowych, z reguły są one wykorzystywane jako uzupełnienie 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 β -Poissona [59], przybliżony model β -Poissona [79], model dwumianowy β [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). Ali-norm 99/13 Appendix IV: s. 58–64 1999. 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 (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 (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. *Curr. Opin. Food Sci.* **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 on 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. Biodegr.* **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 (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)