

MODELE WZROSTU *LISTERIA MONOCYTOGENES* W ŻYWNOŚCI GOTOWEJ DO SPOŻYCIA

Anna Szosland-Fałtyn, Joanna Królasik, Milena Krępska, Elżbieta Polak

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,

Oddział Chłodnictwa i Jakości Żywności w Łodzi,

al. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź,

e-mail: anna.szosland@och-ibprs.pl

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie matematycznych modeli wzrostu *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia, z uwzględnieniem różnych warunków dystrybucji, przechowywania i użytkowania, przy uwzględnieniu takich czynników jak: początkowy poziom kontaminacji komórkami *Listeria monocytogenes*, czas oraz temperatura przechowywania produktów. Do badań zaklasyfikowano produkty, w których najczęściej wykrywano obecność tego patogenu. Były to: flaki oraz fasolka po bretońsku. Modelowanie wzrostu *Listeria monocytogenes* prowadzone było przez 7 dni, w trzech zakresach temperatur: 2-6°C, 9-11°C i 12-16°C oraz przy dwóch poziomach kontaminacji: 10^4 jtk/g produktu i 10^2 jtk/g.

Przeprowadzone badania wykazały, że w czasie 7 dni przechowywania badanych produktów intensywnie wzrasta liczba *Listeria monocytogenes* zarówno w niskiej temperaturze przechowywania (2-6°C) jak i wyższych. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych skonstruowano nieliniowe modele pierwszego stopnia, opisujące zmiany przeżywalności bakterii w czasie oraz modele drugiego stopnia, opisujące zmiany przeżywalności bakterii w funkcji czasu i temperatury. Współczynnik determinacji r^2 w modelach pierwszego stopnia wynosił od 0,95 do 0,99 zaś w modelach drugiego stopnia od 0,77 do 0,82, co wskazuje na bardzo dobre dopasowanie modeli. Wysokie wartości statystyki F we wszystkich modelach potwierdziły, że parametry zostały precyzyjnie dobrane.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, mikrobiologia prognostyczna, bezpieczeństwo żywności

GROWTH MODELS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN READY-TO-EAT FOOD

Summary

The aim of the study was to construct mathematical predictive models of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food, by taking into account different conditions of distribution, storage and use, including the initial contamination levels of *Listeria monocytogenes* cells, time and storage temperatures of products. The study classified the products in which the most frequently detected the presence of this pathogene. These were: tripe and baked beans. Modeling of *Listeria monocytogenes* growth was conducted for 7 days at three temperatures ranges: 2-6°C, 9-11°C i 12-16°C and two levels of contamination 10^4 and 10^2 cfu/g of product.

The study showed that within 7 days of tested products storage the number of *Listeria monocytogenes* extensively rises both at the low storage temperatures (2-6°C) and higher. On the basis of experimental data nonlinear, primary models, describing the evolution of bacterial population with time and secondary models describing evolution of bacterial population with time and temperature were constructed. The determination coefficient r^2 in the primary models was from 0,95 to 0,99 while in the secondary models from 0,77 to 0,82, suggesting a very good model fitting. High values of F statistics in all models confirmed that the parameters are precisely matched.

Key words: *Listeria monocytogenes*, predictive microbiology, safety of food

WSTĘP

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku powstała nowa subdyscyplina mikrobiologii żywności – mikrobiologia prognostyczna, która sprzyja zapewnianiu jakości i bezpieczeństwu żywności. Łączy w sobie elementy mikrobiologii, statystyki, matematyki, umożliwiając poznanie reakcji drobnoustrojów na określone warunki środowiskowe panujące w żywności. Jej podstawowym założeniem jest, powtarzalność reakcji drobnoustrojów na czynniki zewnętrzne panujące w środowisku (temperaturę, pH aktywność wody, obecność konserwantów, skład chemiczny itd.). Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych wyznaczane są funkcje - modele opisujące rozwój mikroorganizmów w określonych warunkach [Rosiak i in. 2005, Trzaskowska i in. 2007]. Najczęściej do modelowania stosuje się techniki regresji liniowej i nieliniowej. Większość modeli jest jednak uproszczeniem

relacji rzeczywistych i nie jest w stanie odzwierciedlić wszystkich interakcji zachodzących w układzie komórka - środowisko [Zielińska i in. 2008].

Listeria monocytogenes jest drobnoustrojem powszechnie występującym w przyrodzie, rosnącym w warunkach tlenowych i beztlenowych w szerokim zakresie temperatur (1-45°C). Ze względu na swoją chorobotwórczość już niewielka liczba tych drobnoustrojów, tj. 10^2 jtk/g produktu może spowodować listeriozę, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością czy kobiet w ciąży [Augustin i in. 2000, Osek 2008, Rebagliati i in. 2009].

Przepisy Komisji Unii Europejskiej w sprawie kryteriów mikrobiologicznych, dotyczących produktów spożywczych, kładą szczególny nacisk na badania obecności *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia. Parametr ten stanowi jedno z kryteriów bezpieczeństwa żywności, a dopuszczalny poziom tych bakterii nie może przekroczyć 100 jtk/g, w czasie całego okresu przydatności do spożycia. Ponadto, obowiązujące rozporządzenie w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych zaleca przeprowadzanie dodatkowych badań, ze szczególnym uwzględnieniem wyrobów gotowych do spożycia, w których możliwy jest wzrost *Listeria monocytogenes* i które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego ze względu na obecność tego patogenu. Obejmują one między innymi „badania oceniające rozwój lub przeżywalność mikroorganizmów, których dotyczy badanie, które mogą być obecne w produkcie w ciągu okresu przydatności do spożycia w racjonalnie dających się przewidzieć warunkach dystrybucji, przechowywania i użytkowania” [Rozporządzenie Komisji WE 1441/2007].

Biorąc pod uwagę te zalecenia, dotyczące badań przeżywalności i rozwoju *Listeria monocytogenes* w wyrobach gotowych do spożycia oraz wychodząc naprzeciw potrzebom producentów żywności, dla których tego typu badania są zbyt czasochłonne i kosztowne, Pracownia Mikrobiologii Oddziału Chłodnictwa i Jakości Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego podjęła badania w tym zakresie. Celem ich było prognozowanie mikrobiologiczne, umożliwiające przewidywanie rozwoju i przeżywalności *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia z uwzględnieniem różnych zakresów temperatury, podczas dystrybucji, przechowywania i użytkowania. Efektem przeprowadzonych badań jest możliwość wykorzystania przez producentów żywności opracowanych modeli do przewidywania terminów przydatności do spożycia produktów, jak również do określania limitów krytycznych obecności *Listeria monocytogenes* w krytycznych punktach kontrolnych, w systemie HACCP, w zakładach wytwarzających badane produkty.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Jako materiał badawczy wybrano próbki żywności gotowej do spożycia: flaki i fasolkę po bretońsku, zakupione w sklepie detalicznym, w których najczęściej wykrywano obecność *Listeria monocytogenes*. Materiał biologiczny stanowił szczep *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 pochodzący z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych zakupiony w postaci liofilizowanej zawiesiny drobnoustrojów firmy Meccenti.

Określenie liczby *Listeria monocytogenes*

Produkty kontaminowano szczepem *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i porcjowano w ilości 150 g do sterylnych woreczków. Założono dwa poziomy kontaminacji: wyższy 10^4 jtk/g produktu (sugerując się danymi literaturowymi) i niższy 10^2 jtk/g (uwzględniając przepisy unijne, w których liczba patogenu nie może przekroczyć 100 jtk/g produktu). Zakażone próbki żywności przechowywano przez 7 dni w trzech zakresach temperatur: niższym: 2-6°C, gdy produkt jest prawidłowo dystrybuowany i magazynowany oraz wyższych: 9-11°C i 12-16°C, gdy produkt znajduje się poza ciągiem chłodniczym, jest nieprawidłowo transportowany i przetrzymywany w sklepie lub u konsumenta. W produktach przed kontaminacją badano obecność oraz liczbę *Listeria monocytogenes*, natomiast bezpośrednio po kontaminacji oraz po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dniach przechowywania, badano liczbę *Listeria monocytogenes*. Obecność *Listeria monocytogenes* oznaczano zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1:1999+A1:2005 zaś liczbę *Listeria monocytogenes* zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-2:2000/A1:2005 + Ap1:2006 + Ap2:2007. Eksperymenty powtarzane były dwukrotnie.

Analiza statystyczna danych

Wyniki badań analizowano, stosując następujące statystyki: odchylenie standardowe, test istotności różnic - analizę wariancji ANOVA, model logistyczny, model powierzchni odpowiedzi logistyczny.

Po przeanalizowaniu danych literaturowych, do konstruowania mikrobiologicznych modeli prognostycznych zastosowano, powszechnie wykorzystywany przez naukowców do opisywania sigmoidalnych krzywych wzrostu drobnoustrojów, model logistyczny [Fujikawa i in. 2004, Mullan 2009, Rosiak i Kołożyn-Krajewska 2005, Trząskowska i in. 2007, Zwietering i in. 1990]. Za wyborem tego modelu przemawiał wysoki współczynnik determinacji r^2 (informujący o dopasowaniu modelu regresji do danych empirycznych).

Do opisu wzrostu bakterii wybrano funkcje: logistyczną (pierwszorzędowy model nieliniowy - model pierwszego stopnia) oraz powierzchnię odpowiedzi logistyczną (model drugorzędowy - model drugiego stopnia). Przyjęto poziom istotności $p=0,05$. Są to modele

matematyczne, które opisywane są równaniami matematycznymi zawierającymi parametry matematyczne do oszacowania (a,b,c itd.). Oszacowania tych parametrów dokonuje się z użyciem procedur iteracyjnych, wyznaczając najmniejszą wartość sumy kwadratów różnicy błędu pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi, przy pomocy metody najmniejszych kwadratów. Obliczeń dokonano w programie TableCurve2D (jedna zmienna niezależna) oraz TableCurve 3D (dwie zmienne niezależne) firmy SYSTAT Software Inc. Oba programy w wersjach testowych.

WYNIKI I DISKUSJA

We wszystkich badanych próbkach produktów przechowywanych w warunkach chłodniczych, obserwowano wzrost liczby *Listeria monocytogenes*. Najbardziej dynamiczny wzrost bakterii odnotowano w odniesieniu do próbek produktów przechowywanych w zakresie temperatur 12-16°C (tabela 1). W próbkach flaków inkubowanych w temperaturze 12-16°C liczba *Listeria monocytogenes* już po 4 dniach przechowywania kształtowała się na poziomie $9,97 \pm 0,14 \log \text{ jtk/g}$ oraz $9,90 \pm 0,18 \log \text{ jtk/g}$, przy wyjściowym poziomie kontaminacji odpowiednio $4,32 \pm 0,21 \log \text{ jtk/g}$ i $2,81 \pm 0,13 \log \text{ jtk/g}$. Ze względu na wysokie skażenie mikrobiologiczne tych próbek, nie prowadzono już dalszych oznaczeń. W temperaturze 2-6°C, po 7 dniach przechowywania próbek flaków liczba *Listeria monocytogenes* wynosiła $6,93 \pm 0,13 \log \text{ jtk/g}$ i $5,20 \pm 0,15 \log \text{ jtk/g}$ przy wyjściowym poziomie kontaminacji odpowiednio $4,32 \pm 0,21 \log \text{ jtk/g}$ i $2,81 \pm 0,13 \log \text{ jtk/g}$. Zbliżone wyniki odnotowano w odniesieniu do próbek fasolki po bretońsku. W próbkach fasolki przechowywanej w temperaturze 12-16°C poziom bakterii już po 4 dniach przechowywania kształtował się od $9,93 \pm 0,25 \log \text{ jtk/g}$ do $9,99 \pm 0,26 \log \text{ jtk}$ (przy początkowym poziomie zakażenia odpowiednio $2,84 \pm 0,15 \log \text{ jtk/g}$ i $4,89 \pm 0,12 \log \text{ jtk/g}$). W temperaturze 2-6°C po 7 dniach przechowywania próbek fasolki po bretońsku liczba *Listeria monocytogenes* wynosiła $7,00 \pm 0,12 \log \text{ jtk/g}$ i $5,11 \pm 0,21 \log \text{ jtk/g}$ przy wyjściowym poziomie kontaminacji odpowiednio $4,89 \pm 0,12 \log \text{ jtk/g}$ i $2,84 \pm 0,15 \log \text{ jtk/g}$.

Tabela 1. Wpływ czasu na wzrost bakterii *Listeria monocytogenes* w badanych produktach
Effect of time on the bacterial growth of Listeria monocytogenes in examined products

Produkt	Zakres temperatur [°C]	Liczba bakterii <i>Listeria monocytogenes</i> ± odchylenie standardowe log jtk/g							
		0 dzień	1 dzień	2 dzień	3 dzień	4 dzień	5 dzień	6 dzień	7 dzień
Flaki 1	2 - 6	4,32 ± 0,21	4,66 ± 0,12	4,92 ± 0,10	5,00 ± 0,07	5,77 ± 0,27	5,99 ± 0,21	6,18 ± 0,07	6,93 ± 0,13
Flaki 2		2,81 ± 0,13	2,85 ± 0,06	2,95 ± 0,07	3,28 ± 0,24	3,89 ± 0,23	4,30 ± 0,13	4,90 ± 0,11	5,20 ± 0,15
Fasolka1		4,89 ± 0,12	5,00 ± 0,21	5,08 ± 0,18	5,61 ± 0,22	5,80 ± 0,08	6,00 ± 0,29	6,63 ± 0,15	7,00 ± 0,12
Fasolka 2		2,84 ± 0,15	2,92 ± 0,28	2,98 ± 0,22	3,41 ± 0,07	3,93 ± 0,21	4,51 ± 0,19	4,85 ± 0,12	5,11 ± 0,21
Flaki 1	9 - 11	4,32 ± 0,21	4,86 ± 0,13	5,15 ± 0,11	5,95 ± 0,19	7,00 ± 0,12	8,84 ± 0,17	9,54 ± 0,14	nb
Flaki 2		2,81 ± 0,13	2,95 ± 0,12	3,70 ± 0,09	5,51 ± 0,14	6,60 ± 0,12	8,30 ± 0,14	8,95 ± 0,12	nb
Fasolka1		4,89 ± 0,12	4,93 ± 0,17	5,49 ± 0,12	6,04 ± 0,09	7,20 ± 0,11	8,77 ± 0,15	9,61 ± 0,13	nb
Fasolka 2		2,84 ± 0,15	3,08 ± 0,19	4,45 ± 0,15	5,61 ± 0,07	6,73 ± 0,15	7,90 ± 0,12	8,73 ± 0,15	nb
Flaki 1	12 - 16	4,32 ± 0,21	6,43 ± 0,14	6,95 ± 0,14	7,88 ± 0,14	9,97 ± 0,14	nb	nb	nb
Flaki 2		2,81 ± 0,13	4,60 ± 0,14	6,70 ± 0,01	7,46 ± 0,19	9,90 ± 0,18	nb	nb	nb
Fasolka1		4,89 ± 0,12	6,52 ± 0,21	7,26 ± 0,04	8,36 ± 0,17	9,99 ± 0,26	nb	nb	nb
Fasolka 2		2,84 ± 0,15	4,92 ± 0,22	6,93 ± 0,07	7,96 ± 0,13	9,93 ± 0,25	nb	nb	nb

* nb- nie badano

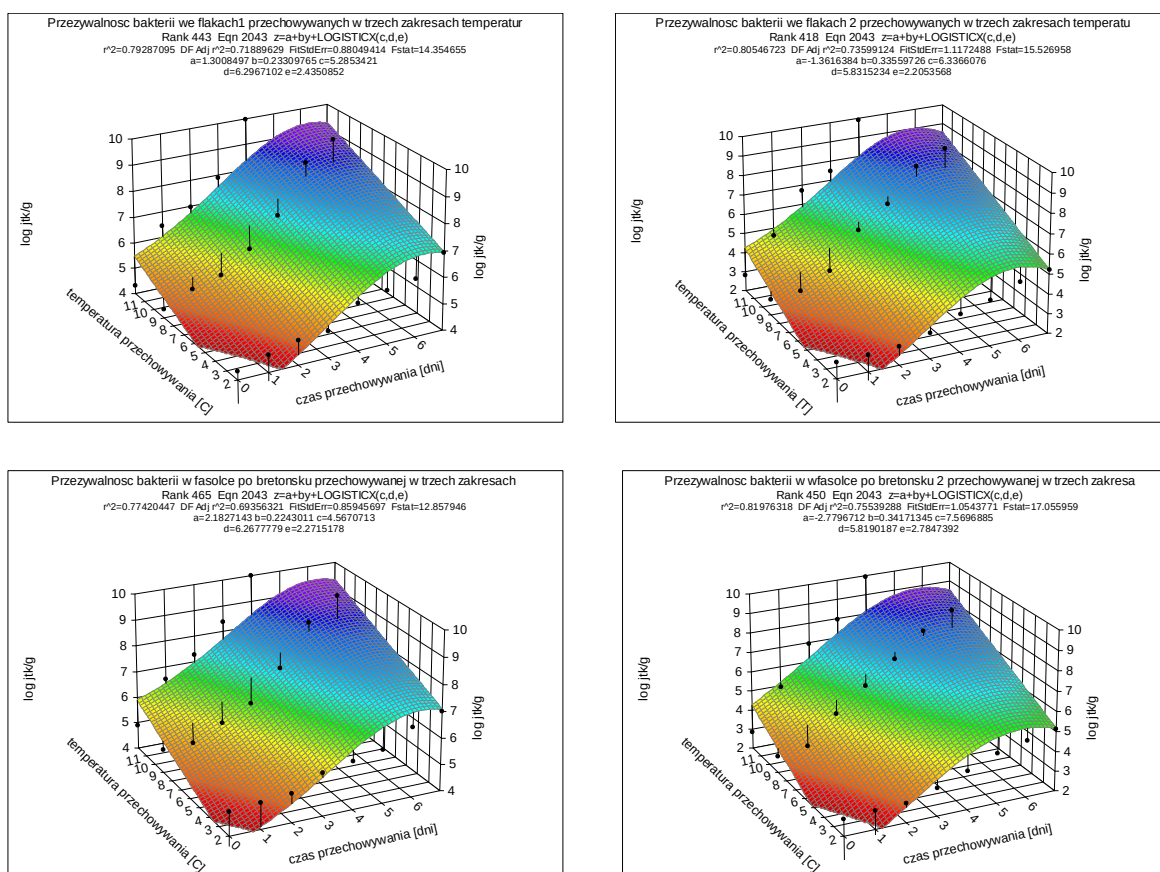
Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych (tabela 1) w pierwszym etapie opracowywania wyników skonstruowano nieliniowe modele pierwszego stopnia opisujące zmiany przeżywalności bakterii w czasie. Kierując się współczynnikiem determinacji (r^2), wybrano powszechnie stosowany model logistyczny, który we wszystkich przypadkach wynosił $r^2 > 0,95$, sugerując bardzo dobre dopasowanie modeli. Wysokie wartości statystyki F we wszystkich modelach oznaczały, że oceny parametrów asymptotycznie istotnie różniły się od zera i świadczyły o tym, że parametry zostały precyzyjnie dopasowane aby mieć do nich zaufanie (tabela 2) [Trząskowska i in. 2007, Zielińska i in. 2008].

Tabela 2. Wartości parametrów i statystyki opisowe modelu logistycznego wzrostu *Listeria monocytogenes*

Parameter values and descriptive statistics of logistic growth model for Listeria monocytogenes

Temperatura [°C]	Produkt	Parametry modelu				r^2	Adjustowany r^2	Dopasowanie błędu standardowego	Wartość F
		a	b	c	d				
2-6	Flaki 1	2,30	22,06	30,20	8,13	0,97	0,94	0,19	51,28
	Flaki 2	8,10	-1,40	0,99	0,06	0,99	0,99	0,85	289,43
	Fasolka 1	4,37	4,06	11,55	3,34	0,98	0,96	0,13	83,53
	Fasolka 2	2,65	2,44	6,82	1,62	0,99	0,99	0,09	254,02
9-11	Flaki 1	116,50	31,75	6,71	-	0,98	0,95	0,38	83,21
	Flaki 2	2,07	6,87	6,00	1,57	0,99	0,98	0,29	146,85
	Fasolka 1	4,74	4,88	6,11	1,22	0,99	0,99	0,10	775,40
	Fasolka 2	1,12	7,74	6,66	2,31	0,99	0,99	0,23	206,88
12-16	Flaki 1	-13,16	120,86	46,69	14,48	0,95	0,82	0,88	6,98
	Flaki 2	11,04	5,62	2,26	-	0,97	0,90	0,61	38,27
	Fasolka 1	-12,40	77,22	38,92	14,16	0,99	0,94	0,47	22,20
	Fasolka 2	10,12	4,75	2,01	-	0,98	0,93	0,52	53,60

W kolejnym etapie opracowywania wyników skonstruowano modele drugiego stopnia, opisujące zmiany przeżywalności bakterii w funkcji czasu i temperatury. Wybrano logistyczny model powierzchni odpowiedzi z pięcioma parametrami (od a do e). W modelach prezentowanych na wykresie 1 na osi z przedstawiono logarytm dziesiętny jednostek tworzących kolonie na g produktu, na osi x czas przechowywania badanych produktów w dniach, a na osi y temperaturę przechowywania w °C. Jednocześnie na rysunku 1 podano parametry modeli oraz statystyki opisowe. Współczynnik determinacji r^2 w modelach wynosił od 0,77 dla modelu wyznaczonego w fasolce po bretońsku 1, do 0,82 dla fasolki po bretońsku 2, sugerując dobre dopasowanie modeli niezależnie od rodzaju produktu. Wysokie wartości statystyki F we wszystkich modelach potwierdziły, że parametry zostały precyzyjnie dopasowane (rysunek 1) [Trząskowska i in. 2007, Zielińska i in. 2008].



Rysunek 1. Modele logistyczne powierzchni odpowiedzi zmian liczby bakterii *Listeria monocytogenes* w badanych produktach przechowywanych w trzech zakresach temperatur

The logistic response surface models of the change in Listeria monocytogenes bacteria count in examined products, stored at three temperature ranges

Na podstawie modeli drugiego stopnia (rysunek 1) oszacowano, we wszystkich produktach, liczbę bakterii *Listeria monocytogenes* w poszczególnych dniach przechowywania produktów i porównano oszacowane dane z danymi eksperymentalnymi (tabela 3).

Tabela 3. Porównanie oszacowanej liczby bakterii *Listeria monocytogenes* obliczonej na podstawie modelu logistycznego powierzchni odpowiedzi do uzyskanych danych eksperymentalnych
Comparison of the estimated Listeria monocytogenes bacteria count, calculated on the basis of the logistic response surface models with the experimental data

Temperatura [°C]	Produkt	Liczba bakterii <i>Listeria monocytogenes</i> [log jtk/g]															
		0 dzień		1 dzień		2 dzień		3 dzień		4 dzień		5 dzień		6 dzień		7 dzień	
		O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E
2-6	Flaki 1	3,14	4,32	3,70	4,66	4,40	4,92	5,22	5,00	6,03	5,77	6,69	5,99	7,03	6,18	6,94	6,93
	Flaki 2	0,88	2,81	1,60	2,85	2,53	2,95	3,61	3,28	4,67	3,89	5,43	4,30	5,64	4,90	5,22	5,20
	Fasolka 1	3,65	4,89	4,12	5,00	4,73	5,08	5,46	5,61	6,23	5,80	6,86	6,00	7,18	6,63	7,08	7,00
	Fasolka 2	0,87	2,84	1,78	2,92	2,79	2,98	3,82	3,41	4,72	3,93	5,31	4,51	5,47	4,85	5,14	5,11
9-11	Flaki 1	5,48	4,32	5,37	4,86	6,02	5,15	6,88	5,95	7,70	7,00	8,40	8,84	8,70	9,54	8,61	nb
	Flaki 2	3,28	2,81	4,00	2,95	4,93	3,70	6,01	5,51	7,07	6,60	7,82	8,30	8,03	8,95	7,61	nb
	Fasolka 1	5,26	4,89	5,72	4,93	6,33	5,49	7,06	6,04	7,83	7,20	8,46	8,77	8,80	9,61	8,68	nb
	Fasolka 2	3,31	2,84	4,22	3,08	5,23	4,45	6,26	5,61	7,16	6,73	7,75	7,90	7,91	8,73	7,58	nb
12-16	Flaki 1	4,76	4,32	6,03	6,43	6,74	6,95	7,55	7,88	8,36	9,97	9,03	nb	9,36	nb	9,27	nb
	Flaki 2	4,24	2,81	4,96	4,60	5,89	6,70	6,97	7,46	8,02	9,90	8,78	nb	8,99	nb	8,58	nb
	Fasolka 1	5,90	4,89	6,36	6,52	6,97	7,26	7,71	8,36	8,47	9,99	9,10	nb	9,44	nb	9,32	nb
	Fasolka 2	4,29	2,84	5,19	4,92	6,21	6,93	7,24	7,96	8,14	9,93	8,73	nb	8,88	nb	8,56	nb

Objaśnienia: O- dane oszacowane, E- dane eksperymentalne, nb- nie badano

Ponadto przeprowadzono prognozę wzrostu *Listeria monocytogenes* w dwóch hipotetycznych temperaturach 20°C i 25°C po 7 dniach przechowywania (tabela 4).

Tabela 4. Prognoza liczby bakterii *Listeria monocytogenes* obliczona na podstawie modelu logistycznego powierzchni odpowiedzi
Prediction of the Listeria monocytogenes bacteria count, calculated on the basis of the logistic response surface models

Produkt	Liczba bakterii <i>Listeria monocytogenes</i> po 7 dniach przechowywania [log jtk/g]	
	20 °C	25 °C
Flaki 1	11,18	12,32
Flaki 2	11,32	12,96
Fasolka po bretońsku 1	11,16	12,25
Fasolka po bretońsku 2	11,35	13,02

WNIOSKI

1. Badane wyroby garmazeryjne spełniały wymogi Rozporządzenia Komisji WE 1441/2007 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych pod względem obecności patogenu *Listeria monocytogenes*. Uzyskane wyniki wskazują, że przeżywalność bakterii *Listeria monocytogenes* uzależniona jest od rodzaju produktu, mikroflory towarzyszącej, temperatury przechowywania oraz wyjściowego poziomu kontaminacji drobnoustrojami patogennymi.
2. Skonstruowane modele prognostyczne: logistyczny oraz powierzchni odpowiedzi logistyczny w bardzo dobry sposób opisują wzrost i przeżywalność bakterii *Listeria monocytogenes* w badanych produktach co daje możliwość wykorzystania ich przez producentów żywności do przewidywania terminów przydatności do spożycia produktów, jak również do określania limitów krytycznych *Listeria monocytogenes* w krytycznych punktach kontrolnych, w systemie HACCP, w zakładach wytwarzających badane produkty.
3. Ze względu na prognozowany w badanych produktach w modelu drugorzędowym dynamiczny wzrost bakterii *Listeria monocytogenes*, w żadnym z krytycznych punktów kontrolnych systemu HACCP, w zakładach wytwarzających te produkty, nie powinno stwierdzać się obecności tego patogenu.

PIŚMIENNICTWO

1. Augustin J. C., Brouillaud-Delattre A., Rosso L., Carlier V. (2000): Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 66(4), 1706-1710.
2. Fujikawa H., Kai A., Morozumi S. (2004). A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. Food Microbiol., 21, 501-509.
3. Kagkli D. M., Iliopoulos V., Stergiou V., Lazaridou A., Nychas J.-G. (2009): Differential *Listeria monocytogenes* strain survival and growth in Katiki, a traditional Greek soft cheese, at different storage temperatures. Appl. Environ. Microbiol., 75(11), 3621-3626.
4. Mullan, W.M.A. (2009). Modelling the probability of *Listeria monocytogenes* growing in cheese. Dairy Sci. Food Technol. <http://www.dairyscience.info/food-model/178-listeria-model.html>.
5. Norma PN-EN ISO 11290-1:1999+A1:2005 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* Metoda wykrywania obecności.
6. Norma PN-EN ISO 11290-2:2000/A1:2005 + Ap1:2006 + Ap1:2007 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* Metoda oznaczania liczby.
7. Pinon A., Zwietering M., Perrier M., Membre J.-M., Lepore B., Mettler E., Thuault D., Coroller L., Sthal V., Vialette M. (2004): Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl. Environ. Microbiol., 70(2), 1081-1087.
8. Osek J. (2008): Występowanie chorób odzwierzęcych i ich czynników etiologicznych w 2006 r. w świetle raportu Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności. Życie Wet., 83(3), 192-201.
9. Rebagliati V., Philipi R., Rossi M., Troncoso A. (2009): Prevention of foodborne listeriosis. Indian J. Pathol. Microbiol., 52(2), 145-149.
10. Rosiak E., Kołożyn-Krajewska D. (2005): Modele wzrostu bakterii *Pseudomonas* w produktach gotowych do spożycia. Żywność. Nauka. Technol. Jakość, 3 (44), 192-2005.
11. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.

12. Trząskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A. (2007): Prognozowanie wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym soku marchwiowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 6 (55), 138-148.
13. Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A. (2008). Modele przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5 (60), 126-134.
14. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1875–1881.