

MODELLING OF *BACILLUS CEREUS* DISTRIBUTION IN PASTEURIZED MILK AT THE TIME OF CONSUMPTION

Pavel Ačai, Lubomír Valík, Denisa Liptáková, Jana Minarovičová

ABSTRACT

Modelling of *Bacillus cereus* distribution, using data from pasteurized milk produced in Slovakia, at the time of consumption was performed in this study. The Modular Process Risk Model (MPRM) methodology was applied to over all the consecutive steps in the food chain. The main factors involved in the risk of being exposed to unacceptable levels of *B. cereus* (model output) were the initial density of *B. cereus* after milk pasteurization, storage temperatures and times (model input). Monte Carlo simulations were used for probability calculation of *B. cereus* density. By applying the sensitivity analysis influence of the input factors and their threshold values on the final count of *B. cereus* were determined. The results of the general case exposure assessment indicated that almost 14 % of Tetra Top cartons can contain $> 10^4$ cfu/ml of *B. cereus* at the temperature distribution taken into account and time of pasteurized milk consumption.

Keywords: pasteurized milk; *B. cereus*; predictive models; exposure assessment; Monte Carlo simulations.

ÚVOD

Mikrobiologické hodnotenie rizika, ako neoddeliteľná súčasť analýzy rizika, sa začalo výraznejšie presadzovať pri posudzovaní bezpečnosti potravín a ochrany spotrebiteľa od polovice deväťdesiatych rokov minulého storočia. Kľúčovými zložkami hodnotenia rizika sú: (1) identifikácia nebezpečenstva, (2) hodnotenie expozície, (3) charakterizácia nebezpečenstva (hodnotenie dávka-odozva), (4) charakterizácia rizika **ILSI Europe, (2012)**.

Zatiaľ čo kvalitatívne hodnotenie rizika sa zaoberá opisným spracovaním informácií na odhad stupňa (veľkosti) rizika a vplyvu faktorov na riziko, kvantitatívne hodnotenie rizika pracuje s číselnými údajmi **Fazil (2005)**. Vhodné techniky kvantitatívneho hodnotenia rizika sú vo všeobecnosti založené na simuláciách Monte Carlo. Výsledkom sú distribúcie pravdepodobnosti žiadaného výstupu, ktoré poskytujú informácie nielen o najpravdepodobnejších hodnotách výstupnej premennej (stredná hodnota, medián), ale tiež o jej extrémnych hodnotách, vyplývajúce z kombinácií z rozdelenia pravdepodobnosti vstupných parametrov **Lindqvist et al., (2002)**. Hlavným cieľom modelovania mikrobiologických aspektov bezpečnosti potravín je odhad možnej prítomnosti alebo rastu a rozmnožovania sa nežiaduceho mikroorganizmu v potravinách pomocou prediktívnych primárnych a sekundárnych modelov. Tie sú následne použité na zistenie rozdelenia počtu mikroorganizmov v jedle v čase jeho konzumácie, aby bolo potom možné, prostredníctvom modelov dávky a odozvy, zistiť pravdepodobnosť rizika nákazy/ochorenia konzumenta. Najvšeobecnejší prístup si vyžaduje aplikáciu modelov reprezentujúcich rozličné spôsoby a scenáre, ktoré môžu nastať, keď potravinársky produkt putuje od výrobcu/farmára k spotrebiteľovi. Keďže počet takýchto možných spôsobov a scenárov je takmer nekonečný, komplikované modely je potrebné zjednodušiť do tej

miery, aby ešte primerane reprezentovali realitu **Vose (2008)**.

B. cereus patrí k najdôležitejším spórotvorným mikroorganizmom, ak sa berie do úvahy posúdenie kvality a bezpečnosti pasterizovaného mlieka. Je schopný prežiť aj pasterizačný proces a pri vyšších počtoch ($>10^5$ KT/ml) je schopný produkovať enterotoxíny, ktoré môžu spôsobiť otravu, ktorej príznaky zahŕňujú nevoľnosť, hnačky, zvracanie **Granum et al. (1995)**. Optimálna teplota pre rast *B. cereus* je od 28 °C do 35 °C, minimálna teplota je 4 °C a maximálna teplota 55 °C. Interval hodnôt pH vhodných pre rast mikroorganizmu je od 4,9 do 9,3, a je schopný tolerovať koncentráciu solí až 7,5% **Lampel et al. (2012)**. Vo všeobecnosti, už mlieko obsahujúce viac ako 10^4 KTJ *B. cereus*/ml sa nepovažuje za bezpečné pre spotrebiteľa. Ako podklady pre hodnotenie expozície *B. cereus* pri konzumácii pasterizovaného mlieka sa použili údaje o teplotách a časoch jeho skladovania, podmienkach dopravy z dostupných literárnych zdrojov **Notermans et al. (1997)**, **FDA (1999)**, **Pokrievka (2001)**, **Nauta et al. (2003)**, **Valík et al. (2003)**.

MATERIÁL A METÓDY

Cesta pasterizovaného mlieka od výrobcu ku konzumentovi

Na kvantitatívne hodnotenie expozície *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase konzumácie sa aplikoval Modulárny procesný model rizika (MPMR) **Nauta (2005)**, **Nauta et al. (2003)**, **Lindqvist et al. (2002)**, **Mataragas et al. (2010)**, ktorý pozostáva zo štyroch postupných krokov cesty mlieka od výrobcu až po konzumenta: 1. transport mlieka od výrobcu k predajcovi (maloobchod), 2. skladovanie u predajcu, 3. transport mlieka spotrebiteľom z obchodu domov, 4. skladovanie mlieka v domácnosti.

Distribúcia teplôt a časov skladovania/dopravy mlieka

Dátum spotreby pasterizovaného mlieka v jednolitrových obaloch Tetra Top bol deklarovaný do siedmich dní od výroby. Predpokladá sa, že pasterizované mlieko sa dostane pri doprave od výrobcu do obchodu do jedného dňa pri teplote 5 °C za prísne kontrolovaných podmienok. Na získanie distribúcie časov skladovania v obchode sa použilo uniformné rozdelenie **Nauta et al. (2003)** a hustota rozdelenia teplôt skladovania sa vypočítala na základe údajov **FDA (1999)**. Pretože podmienky dopravy mlieka spotrebiteľom z obchodu domov nie sú vo všeobecnosti známe, použili sme analogický prístup na získanie distribúcií teplôt a časov ako v článku **Nauta et al. (2003)**. Hustoty rozdelení časov v chladničkách domácnosti boli prevzaté od **Notermans et al. (1997)** a teplôt **Pokrievka (2001)**.

Matematický model

Cieľom matematického modelovania bolo hodnotenie expozície mikroorganizmov *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby na základe simulácii Monte Carlo.

Na výpočet distribúcie mikroorganizmov bol použitý primárny prediktívny model pre rast *B. cereus* v pasterizovanom mlieku **Zwietering et al. (1996)**, **Notermans et al. (1998)**, **Nauta (2000)** v nasledujúcom tvare:

$$\log(N) = \log(N_0) + kt \quad (1)$$

kde N je koncentrácia mikroorganizmov (KTJ/ml) v čase t , N_0 je začiatková koncentrácia mikroorganizmov (KTJ/ml), k je rastová rýchlosť (log KTJ/h), t je čas skladovania (h). Najskôr sa na odhad rastovej rýchlosti a dĺžky lag fázy, λ , z experimentálnych rastových čiar **Valík et al. (2003)**, použila **Baranyiho a Robertsova rovnica (1994)**. V druhom kroku sa prostredníctvom sekundárnych modelov získala závislosť dĺžky lag fázy od teploty z modifikovanej Arrheniovej rovnice **Davey (1989)**

$$\lambda = a_T + \frac{b_T}{T} \quad (2)$$

kde λ je dĺžka lag fázy (h), $a_T = -45,667$ h a $b_T = 1035,3$ h°C sú parametrami rovnice **Valík et al. (2003)** a T je teplota (°C), a z odmocninového modelu **Ratkowského Ratkowsky et al. (1982)** vzťah na výpočet rastovej rýchlosti od teploty

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) + q \quad (3)$$

kde parameter $b = 0,026$ °C⁻¹h^{-0,5} je smernica a $q = -0,1032$ h^{-0,5} (°C⁻¹h^{-0,5}) úsek na osi y **Valík et al. (2003)**, $T_{min} = 4$ °C **Blackburn a McClure (2009)** je teoretická minimálna teplota, pri ktorej je *B. cereus* schopný rásť.

Vložením rovnice (3) do rovnice (1) pre uvažované fázy cesty pasterizovaného mlieka od výrobcu až po konzumenta dostaneme:

$$\log(N_i) = \log(N_{0,i}) + [b^2(T - T_{min})^2 + 2bq(T - T_{min}) + q^2]t_i \quad (4)$$

Zavedením substitúcie

$$c_i = [b^2(T - T_{min})^2 + 2bq(T - T_{min}) + q^2]t_i \quad (5)$$

kde $N_{0,i}$ je začiatkový počet mikroorganizmov (KTJ/ml), c_i rastový parameter (KTJ/ml), t_i je reálny čas rastu *B. cereus* (d) v danej etape cesty mlieka od výrobcu po konzumenta, označenej príslušným indexom $i = 1, 2, 3, 4$, môže byť rovnica (4) prepísaná do zjednodušenej formy:

$$\log(N_i) = \log(N_{0,i}) + c_i \quad (6)$$

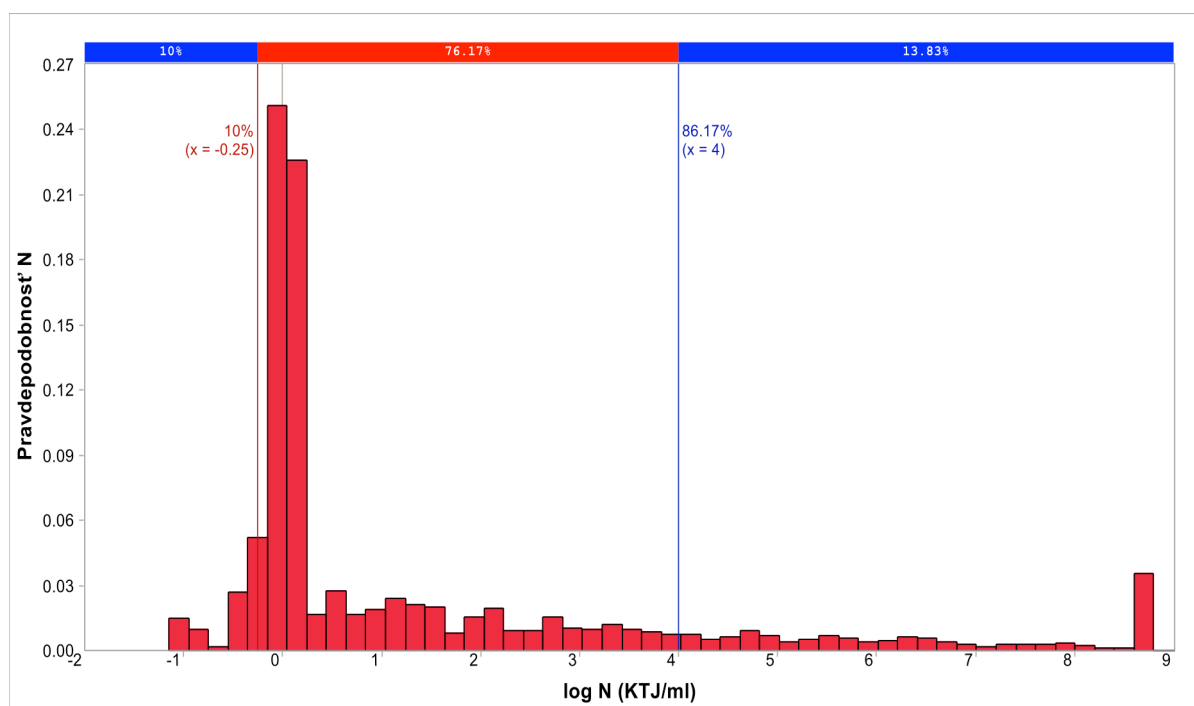
Na zistenie rozdelenia pravdepodobnosti *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase spotreby (výstup modelu) sa použil Model Risk software **www.vosesoftware.com**. Jeho súčasťou je aj citlivostná analýza, umožňujúca posúdiť nielen vplyv vstupných faktorov modelu na výstup v podobe Spearmanových korelačných koeficientov, ale aj ich hraničné číselné hodnoty (threshold values), ktorých zvýšenie spôsobí výraznejší nelineárny nárast počtu *B. cereus*.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rozdelenie pravdepodobnosti *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase spotreby (log $N_4 = \log N$), pomocou rovníc (1-6), je znázornený na Obr. 1.

Výsledky modelovania naznačili, že pri distribúcii teplôt, ktoré sa použili pri hodnotení expozície, by asi 14 % z objemu pasterizovaného mlieka obsahovalo viac ako 10⁴ KTJ/ml *B. cereus* v čase konzumácie mlieka spotrebiteľom.

Použitie približnej (crude) citlivostnej analýzy (Tornado chart) **www.vosesoftware.com** v simulačných výpočtoch nám umožnilo zistiť, ktorý zo vstupných faktorov, či počiatková koncentrácia mikroorganizmu, teplota alebo doba skladovania, vyjadrených prostredníctvom hustoty rozdelenia pravdepodobnosti, má najväčší vplyv na neurčitosť rozdelenia pravdepodobnosti *B. cereus* v čase konzumácie pasterizovaného mlieka. Hodnoty Spearmanových korelačných koeficientov pre čas skladovania v domácnosti (0,467), teploty skladovania v obchode (0,413), začiatkový počet *B. cereus* po pasterizácii (0,336) a teploty skladovania mlieka v chladničkách domácností (0,201), poukázali, že práve tieto majú najvýznamnejší vplyv na simulačný výstup. Hodnoty zvyšných vstupujúcich faktorov (čas skladovania v obchode, doprava od výrobcu do obchodu a z obchodu do domácnosti) boli menšie ako 0,1, a preto ich nebolo nutné vziať do úvahy pri následnej identifikácii medzných hodnôt (threshold values) vstupujúcich faktorov **Mataragas et al. (2010)**, ktorých zvýšenie malo spôsobiť výraznejší, nelineárny nárast počtu *B. cereus*. Z pokročilejšej citlivostnej analýzy (Spider chart) **www.vosesoftware.com** vyplynulo, že hraničné hodnoty uvažovaných vstupných parametrov sú: čas skladovania v chladničkách domácností 6 dní (čas dopravy od výrobcu do obchodu nie je započítaný), teplota skladovania v obchode 6,8 °C, počiatkový počet *B. cereus* po pasterizácii 1 KTJ/ml, teplota uchovávaní mlieka v chladničkách domácností 7,8 °C.



Obrázok 1 Rozdelenie pravdepodobnosti *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby.

Napriek tomu, že vyššie počty *B. cereus* môžu spôsobiť ochorenie, neexistujúci vzťah dávka-odozva pre jeho toxíny, nám neumožnila riziko charakterizovať, teda odhadnúť jeho pravdepodobnosť. O to viac je v súčasnosti potrebné verifikovať maximálne akceptovateľné počty *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby. Je to spoločná zodpovednosť výrobcu, predajcu aj spotrebiteľa, a to najmä v letných mesiacoch.

Predložený článok demonštruje možnosť modelovania expozície *B. cereus* v pasterizovanom mlieku pri jeho ceste od výrobcu cez obchod k spotrebiteľovi, prepojením prediktívnych mikrobiálnych modelov a dostupných údajov o teplotách a časoch skladovania. Aj keď kvôli niektorým predpokladom a neurčitostiam týkajúcich sa vstupujúcich faktorov použitých pri odhade počtu *B. cereus* v pasterizovanom mlieku môžu byť určité výhrady k predloženému matematickému modelu, je užitočným nástrojom pre kvantitatívne hodnotenie expozície *B. cereus* a rozhodnutia zainteresovaných, najmä výrobcu a obchodu.

LITERATÚRA

Anonymous: 1999 U. S. Food Temperature Evaluation Design and Summary Pages. Audits International/FDA, p.13.

Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 23. p. 277-294, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

Blackburn, C. W., McClure, P. J. 2009. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*, 2 nd. Edition, CRC Press. p. 844-888. ISBN: 143980768X

Davey, K. R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during growth phase. *J. Appl. Bacteriol.* vol. 67, p. 483-488. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02519.x> PMID:2592289

Fazil, A. M. 2005. A primer on risk assessment modelling: focus on seafood products. *FAO Fisheries Technical Paper*, 462:56.

Granum, P. E., Thomas, J. M., Alouf, J. E. 1995. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 28, no. 2, p. 129-144. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(95)00052-6)

ILSI (International Life Science Institute) 2012. *Tools for microbiological risk assessment*. ILSI Europe a.i.s.b.l. ISBN 9789078637349. Retrieved from the web: <http://orbit.dtu.dk/files/43551223/MRA%20Tools.pdf>

Lampel, K. A., Al-Khaldi, S., Cahill, S. M., 2012. *Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*, 2 nd. Edition., Silver Spring: Food and Drug Administration (FDA). Retrieved from the web: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>

Lindquist, R., Sylvén, S., Vågsholm, I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 78, no. 1-2, p. 155-170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00237-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00237-4)

Nauta, M. J. 2000 Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 57, no. 1-2, p. 9-18. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00225-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00225-7)

Nauta, M. J., Litman, S., Barker, G. S., Carlin, F. 2003. A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 83, no. 2, p. 205-218. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00374-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00374-4)

Nauta, M. J. 2005. Microbial risk assessment models for portioning and mixing during food handling. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 100, no. 1-3, p. 311-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.027> PMID:15854714

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Gipfel, M., Peeters Weem, P. 1997. A risk assessment study

of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.*, vol. 14, no. 2, p. 143-151.

Notermans, S., Nauta, M. J., Jansen, J., Jouve, J. L., Mead, G. C. 1998. A risk assessment approach to evaluating food safety based on product surveillance. *Food Control*, vol. 9, no. 4, p. 217-223. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00086-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00086-8)

Mataragas, M., Zwietering, M. H., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H. 2010. Quantitative microbial risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers - Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 141, p. S170-S179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.005> PMID:20116877

Pokrievka, M. 2001. Distribution of temperatures in domestic refrigerators. Bratislava: FCHPT STU.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. and Ball A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.*, vol. 149, p. 1-5. PMID:7054139

Valík, E., Görner, F. and Lauková, D. 2003. Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf-life of pasteurized milk. *Czech J. Food Sci.*, vol. 21, no. 6, p. 195-202.

Vose, D. 2008. *Risk Analysis: A Quantitative Guide*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-51284-5

Risk analysis modeling for Excel. Retrieved from the web: <http://www.vosesoftware.com/>

Zwietering, M. H., Notermans, S. and de Wit, J. 1996. The application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 30, no. 2, p. 55-70. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00991-9](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00991-9)

Acknowledgments:

The work was supported by the National Contact Point for Scientific and Technical Cooperation with EFSA, Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic and by the project APVV-0590-10.

Contact address:

Pavel Ačai, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Chemical and Environmental Engineering, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: pavel.acai@stuba.sk.

Ľubomír Valík, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Microbiology and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: lubomir.valik@stuba.sk.

Denisa Liptáková, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Microbiology and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: denisa.laukova@stuba.sk.

Jana Minarovičová, Institute of Food Research, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava Slovakia, E-mail: minarovicova@vup.sk.