

Prediktif Mikrobiyoloji ve Gıda Endüstrisinde Önemi¹

Erhan Keyvan², Haydar Özdemir³

Özet

Prediktif mikrobiyoloji (PM), mikroorganizmaların üreme ve üreme yetenekleri üzerine değişik çevresel faktörlerin etkisi sonucu oluşabilecek değişiklikleri matematiksel yöntemlerle saptamaya yarayan bilimsel bir oluşumdur. Prediktif gıda mikrobiyolojisi (PGM), gıda mikrobiyolojisinin çok disiplinli bir bölümünü oluşturmakta olup, mikrobiyoloji, matematik ve istatistik gibi alanlarında uzman araştırmacıların ortak çalışmasını gerektiren bir alandır. Günümüzde prediktif mikrobiyoloji ile ilgili çalışmaların çoğu, gıda patojenlerinin üreme ve inaktivasyonlarına yönelik olmakla birlikte, HACCP, risk değerlendirmesi, ürün geliştirme ve eğitim amaçlı olarak kullanılabilir. Bu derleme, prediktif mikrobiyolojinin önemi ve gıda endüstrisinde kullanımı konularında bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Gıda orijinli patojen ve bozulmadan sorumlu mikroorganizmalara ilişkin kaygılar, uzun yıllardan beri insanlığın önemli sorunlarından biri olmuştur. Mikrobiyoloji alanında yapılan çalışmalar ile çoğu patojenin gıda kaynaklı zararları açıkça ortaya konulmasına rağmen, gıda güvenliği uygulamalarının yetersizliği nedeniyle oluşan sağlık sorunları hala güncelliğini korumaktadır.

Gıda güvenliği alanında kullanımı yeni olan prediktif mikrobiyolojinin gelişimi ile birlikte gıdaların, üretiminden tüketim aşamasına kadar olan süreçte bozulma etkenleri ve patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan risklerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır.

Prediktif mikrobiyoloji uygulamalarıyla, gıdalarda üretim, paketlenme, muhafaza ve dağıtım aşamalarında, çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan mikroorganizma davranışlarıyla ilgili detaylı bilgiler elde edilebilmektedir. Bu bilgiler önceden güvenilirliği test edilmiş modelleme yöntemleri kullanılarak değerlendirilir.

¹ Bu derleme, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Haydar Özdemir danışmanlığında Doktora Eğitimi yapan, Erhan Keyvan tarafından hazırlanan seminerden özetlenmiştir.

² Araş. Gör., ³ Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. 06110-Dışkapı/Ankara. Yazışmadan sorumlu yazarın E-posta adresi: hozdemir@veterinary.ankara.edu.tr

Eğer mikroorganizmaların farklı koşullar altındaki davranışları anlaşılabilirse gıdalarda oluşacak tehlikelere karşı önlemler de alınabilir. Geleneksel gıda analiz yöntemlerinin uzun zaman alması ve yüksek maliyeti düşünüldüğünde, prediktif mikrobiyolojinin geleneksel yöntemlerin yerine, matematiksel modeller kullanılarak mikroorganizma davranışlarının doğru ve çok yönlü bir şekilde tahmin edilebilmesi amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir (1).

Prediktif Mikrobiyolojinin Tarihi

Prediktif mikrobiyoloji (PM) deneysel bir bilim olarak başlamıştır. Esty ve Meyer'in (2), *Clostridium botulinum* tip A sporlarının doğrusal logaritmik (log) model ile termal inaktivasyonunu tanımlamasıyla ortaya çıkmıştır. Bu yöntem günümüzde düşük asitli konserve gıdalara termal işlem uygulanırken gerekli olan, ısı-zaman parametrelerinin tahmininde de kullanılmaktadır. Doğrusal log modeli ile belirli ısı-zaman aralığındaki spesifik ölüm oranı belirlenir. Sade bir ifade ile "belirli bir zaman diliminde inaktive olan mikroorganizma popülasyonunun yüzde olarak gösterilmesi"dir. Basit ve anlaşılması kolay olmasından dolayı diğer fen bilimleri alanlarında da kullanım alanı bulmuştur (3).

Prediktif mikrobiyolojinin diğer bir uygulamasını ise Scott (4), karkasın kastan ete dönüşümü sırasında olası mikrobiyel bozulmayı ve patojen mikroorganizma oluşumunun ne düzeyde olacağını tahmin ederek gerçekleştirmiştir. Ancak, takip eden otuz yılda pratik teknoloji uygulamalarının yetersizliği PM alanında duraklama dönemini getirmiş, 1960 sonrasında ise; ısı-zaman kombinasyonlarının, dağıtım ve muhafaza aşamalarında kullanılmasıyla, PM yeniden ivme kazanmıştır (5).

Scott PM'nin temelini, "Farklı sıcaklık derecelerindeki mikroorganizmaların üreme oranlarının bilinmesi, dondurulmuş bir sığır etinin bozulmasının nedenlerinin anlaşılması açısından yararlı bir bilgidir. Bu bilgiyle beraber muhafaza şartlarının etkisiyle oluşan muhtemel mikrobiyel bozulma oranının tahmini de yapılabilir. Aynı zamanda, etin işlenmesi ve satışı aşamasında olan muhtemel mikroorganizma popülasyonundaki değişim de açıklanabilir." şeklinde ifade etmiştir (6).

"Prediktif Mikrobiyoloji" terimini bu alandaki ilk derlemeleri ile Robert ve Jarvis (7) adlı bilim adamları kullanmıştır. Bundan sonra PM, üzerinde yoğun çalışmalar yapılan bir bilim dalı olmuştur. Bu alan ile ilgili çok sayıda makale, kitap yayımlanmış ve bilimsel etkinlikler düzenlenmiştir. PM, gelişen teknoloji ile birlikte istatistiksel olarak evrim geçirmiş ve ulaşımı oldukça kolay bilgisayar yazılımları ile gıda güvenliği için vazgeçilmez yöntemlerden biri haline gelmiştir. PM alanında çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir ve gelecekte de adından sıkça söz ettirecek bilimsel bir disiplin olmaya adaydır.

Prediktif Mikrobiyolojinin Tanımı ve Özellikleri

Prediktif mikrobiyoloji, mikroorganizmaların üreme ve üreme kabiliyetlerinde çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan değişimin tahminini yapmaya yarayan bilimsel bir oluşum olarak tanımlanır. Sayısal bir bilim alanı olan PM; üretim, dağıtım ve muhafaza

aşamalarının, gıdaların mikrobiyel güvenlik ve kalitesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesine olanak sağlar (8).

Prediktif gıda mikrobiyolojisi (PGM), gıda mikrobiyolojisinin çok disiplinli bir bölümünü oluşturur. Matematiksel modeller kullanılarak farklı çevresel etkenlere karşı mikroorganizma yanıtları tahmin edilir. PM; mikrobiyoloji, matematik, istatistik alanlarında uzman araştırmacıların ortak çalışmasını gerektiren bir yapıdadır (9).

Gıdaların üretim, muhafaza ve dağıtım aşamaları mikroorganizma kontaminasyonuna ve bu mikroorganizmaların çoğalmalarına olanak sağlar. Gıdaların raf ömürleri ya muhafaza aşamalarındaki deneyimlere dayanarak ya da çeşitli testlerle belirlenirken, bu yöntemler maliyeti de artırmaktadır. PM matematiksel eşitlikleri kullanarak, üretim ve muhafaza aşamalarında mikroorganizmaların üreme ve inaktivasyonlarını belirleyerek maliyetleri düşürücü tedbirler yaratabilmektedir (10).

PM, gıdalara uygulanan çeşitli işlemler sonucunda ve değişik çevresel şartlarda oluşan mikroorganizma yanıtlarının, gıdaların kalite ve mikrobiyel güvenliği üzerindeki etkisinin belirlenmesidir. Burada, gıdadaki mikroorganizma davranışları ile ilgili bilginin toplanması, matematiksel olarak biçimlendirilmesi ve çözümlenmesi söz konusudur (6).

Geleneksel yöntemlerle yapılan mikrobiyolojik analizler pahalı, zaman alan ve el becerisi gerektiren çalışmalardır. Elde edilen test sonuçları kümülatif olmadığı için ürün profili ya da ürüne uygulanan ısı-zaman profili değiştiğinde, analizlerin tekrarı gerekmekte ve eski sonuçların bir önemi kalmamaktadır. Bu nedenle, gıda ortamındaki mikroorganizma gelişimini anlayabilmek için bu ilişkiyi matematiksel olarak ifade edip kümülatif bir bilgi birikimine dönüştürmek esastır. İşte prediktif mikrobiyolojinin uzun vadede temel hedefi budur (11).

PM, gıdalarda bozulma etkenleri ve patojen mikroorganizmaların populasyon dinamiklerinin modelleme ile tanımlanmasında kullanılabilir. Bu kullanım mikroorganizmaların çevresel faktörlere karşı gösterdiği doğal ve tekrarlanabilir cevaplarından kaynaklanmaktadır. Deneysel testler kullanarak sıcaklık, a_w ve pH-değeri gibi farklı parametrelerin etkisi altında belirlenen üreme oranı ile mikroorganizma proliferasyonu tahmin edilebilir. Sonuçta elde edilen bilgiler gıda güvenliği ve raf ömrünün değerlendirilmesine olanak sağlayan matematiksel bir model ile birleştirilir (12).

PM; HACCP, risk değerlendirmesi, ürün geliştirme ve eğitimsel amaçlar gibi alanlar içerisinde yararlı bir model olarak kabul edilmektedir. Araştırmaların çoğu gıda patojenlerinin üreme ve inaktivasyonlarının prediktif modellenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. PM, bir gıda ürününün raf ömrünü kısaltıp, bozulmaya yol açan mikroorganizmaların üremesinin tahmini içinde kullanılabilir. Bu amaçla gıdalarda bozulmaya yol açan spesifik mikroorganizmalar seçilir ve test amacıyla kullanılır. Örnek olarak; ısı işlemleri görmüş et ürünlerinde *Lactobacillus curvatus*, modifiye atmosferle paketlenmiş gıdalarda *Listeria monocytogenes* varlığı gibi örnekler verilebilir (13).

Son dönemlerde mikroorganizmaların büyüme karakterlerini belirleyen matematiksel modellere ilgi artmıştır. Bu modeller, bazı gıdalarda mikroorganizmaların zamanla olan üreme ilişkisini ve davranışlarını tahmin etmek için kullanılabilir (14).

Kısaca özetlemek gerekirse; PM, mikroorganizmaların büyüme kinetiklerinin, gıda muhafazasında kullanılan fiziksel ve kimyasal faktörlere (pH-değeri, a_w -değeri, sıcaklık, kimyasal koruyucular) bağlı olarak matematiksel modellerle ifadesini ve bu faktörlerin mikroorganizmaların büyüme kinetiği üzerindeki bireysel etkilerinin, istatistiksel olarak belirlenmesini içerir. Bu modeller üretim ve dağıtım aşamalarındaki risklerin tespitini ve buna bağlı olarak üretim, dağıtım ve soğuk zincirin optimizasyonunu sağlar (11).

Prediktif Mikrobiyoloji ve HACCP

Gıdaların mikrobiyel kontaminasyonunun minimize edilmesi, gıda endüstrisinde kalite ve güvenlik açısından büyük önem arz etmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerin kontrolü için anahtar yaklaşım, mikroorganizmaların büyümelerine etki eden faktörlerin anlaşılmasıdır. Mikroorganizmaların gıdalarda bulunması ve üremesi çok sayıda iç ve dış faktörün etkisi altında gerçekleşmektedir. Bu koşullara örnek olarak; sıcaklık, pH-değeri, sodyum nitrit, tuz ve paketlenmiş gıdalardaki gazların konsantrasyonu gösterilebilir. Mikroorganizmaların üremeleri üzerine etkili çeşitli koşulların anlaşılması, hayatta kalmalarının değerlendirilmesi ve varoluş risklerinin en aza indirilmesi açısından gereklidir. Prediktif mikrobiyoloji mikrobiyel üreme, raf ömrü ve güvenli gıda ürünleri üzerindeki işlemsel etkilerin değerlendirilmesi için önemli bir kolaylık sağlar. Prediktif mikrobiyoloji, HACCP konseptinin bir tamamlayıcısı olarak düşünülebilir (Tablo 1) (8).

Tablo 1: Prediktif Mikrobiyoloji ve HACCP (8).

HACCP	Prediktif Mikrobiyoloji
1. Potansiyel tehlikeler belirlenip, farklı işleme ve operasyon aşamalarında ki şiddeti değerlendirilir.	1. Mikroorganizmalar ile ilgili potansiyel tehlikeleri belirler.
2. Kritik Kontrol Noktaları (KKN) belirlenir ve buralarda kontrol ölçümü yapılır.	2. Mikroorganizmaların çevresel şartlarını geliştirerek muhtemel kontaminasyonların daha iyi belirlenmesini sağlar.
3. Gerek duyulduğunda, özel metotlar kullanarak kontrol sağlanabilir.	3. Önceden tahmin edilen bilgiler ile kontrol bilgileri karşılaştırılarak kontrol sağlanabilir.
4. Uygulamalar izlenir ve uygun olmayan koşullar belirlenir.	4. Ulaşılan bilgiler vasıtasıyla mikrobiyel üreme izlenebilir.

Prediktif Mikrobiyolojide Modelleme

Modelleme teknikleri, mikroorganizma populasyonlarının büyüme stratejilerinin tanımlanmasını sağlar. PM'de bir modellemenin amacı, insan sağlığını tehdit eden muhtemel mikroorganizma seviyesi ve bu tehditin ne zaman oluşabileceğinin tahminidir (15).

Prediktif mikrobiyolojide matematiksel modeller kullanılarak farklı çevresel şartlarda bulunan mikroorganizmaların büyüme, hayatta kalma ve inaktivasyonları tahmin edilir. Matematiksel modeller pH-değeri ve a_w -değeri gibi çeşitli koşullar altında bulunan mikroorganizmalardan elde edilen bilgilerin matematiksel eşitliklere yerleştirilmesiyle oluşturulur. Mikroorganizma sayıları gıdanın üretiminde ve işlenmesindeki her aşamada gıdanın işleme teknolojisine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Prediktif mikrobiyoloji kullanılarak ürünün tüketim anındaki son kontaminasyon düzeyine etki eden muhafaza koşulları, ürün içeriği ve gıda işleme koşulları sonucu oluşabilecek etkiler araştırılabilir. Bu amaçla, mikrobiyel gıda güvenliği için birçok model geliştirilmiştir (16).

Prediktif modeller sıcaklık, pH-değeri, a_w -değeri, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gibi koşullar ve çeşitli katkıları (NaCl, asetik asit, laktik asit, HCl, sodyum laktat vb.) katılması durumunda mikroorganizmaların bu durumlardaki tepkilerinin tanımlanmasına olanak sağlayan araçlardır. Özellikle optimum depolama koşullarının belirlenmesi, kalite ve mikrobiyel güvenliğin sağlanması gibi çeşitli aşamalarda kullanılabilir (10).

Prediktif modeller mikroorganizmaların üremesi için gerekli temel faktörlerden pH-değeri, a_w -değeri ve sıcaklık için kullanılır. Ancak, nitrit, organik asit ve atmosferin de model mikroorganizmaların üreme karakteristikleri üzerine önemli etkisi vardır (13).

Modelleme Aşamaları

Prediktif mikrobiyolojide modelleme; planlama, veri toplama, veri analizi, matematiksel tanımlama ve doğrulama aşamalarından oluşur (Tablo 2).

Tablo 2: Modelleme Aşamaları (14).

Modelleme Aşamaları
1. Planlama
2. Veri toplama ve veri analizi
3. Matematiksel tanımlama
4. Doğrulama

Planlama

Kaynakları ve zamanı en akılcı şekilde kullanabilmek için her deneyin açık bir amacı olmalı ve deney bu amaç etrafında şekillendirilmelidir. Deneyi oluşturan aşamaları açıklamak için öncelikle deneyin amacının tanımlanması gerekir. Bütün bağımsız

değişkenlerin belirlenmesi ve hangi faktörlerin daha önemli olduğunun tespiti yapılmalıdır. Bu faktörlerin hangi aralıklarda çalışması gerektiği de bilinmelidir (8).

Prediktif modeller, model oluşturulurken kullanılan verilerin elde edildiği aralıklarda geçerlidir, bu aralıkların dışında modelin kullanılması sağlıklı sonuçlar vermez (17).

Tuz konsantrasyonunun mikroorganizma gelişimi üzerine etkisi incelenmek istenirse ve tuz konsantrasyonu % 0.5 - % 2.5 arasında seçilirse, bu aralığın eşit parçalara bölünerek incelenmesi gerekir, yani % 0.5, % 1.0, % 1.5 gibi. Ancak, % 1.0 ile % 1.5 seviyesinde daha yoğun üreme olduğu biliniyorsa çalışmalarda bu değişim dikkate alınarak planlama yapılmalıdır (11).

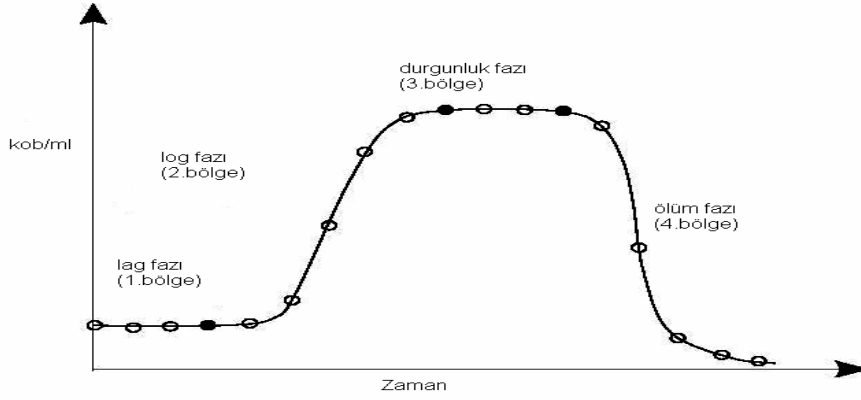
Veri Toplama ve Veri Analizi

Oluşturulan modelin güvenilir ve etkin kullanılabilmesi amacıyla her bağımsız değişken için 10-15 deney noktası oluşturulması gerekir (18). Büyüme eğrisinin bilinmesi, risk değerlendirmesinde ve gıda güvenliğinin sağlanmasında önemlidir. Bakteriyel büyüme eğrisi, iç ve dış koşullardan etkilenen mikroorganizmaların miktarı ile zaman arasındaki ilişkiye bakarak gıdalarda üreme ve hayatta kalma yetenekleri hakkında bilgi verir (19). Tipik bir bakteri büyüme eğrisi başlıca dört bölümden oluşur (Şekil 1) (8).

Gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmaların özellikle lag fazının veya log fazının kinetiğinin modellendirilmesidir. Gıdadaki mikroorganizma popülasyonunun lag fazında kalması sağlanabilirse, gıdanın raf ömrü uzatılabilir. Eğer mikroorganizma büyüme fazına geçiyorsa, bu durumda da büyüme hızı gıdanın raf ömrünü belirler. Bu nedenle PM çalışmalarının amaçlarından biri, lag fazı süresini maksimize etmek veya büyüme hızını minimize edebilecek faktörlerin kombinasyonlarını belirlemektir (11).

Basit olasılık modellerinde, yalnızca ortamda mikrobiyel büyüme olduğunu veya toksin oluşumunun gerçekleştiğini belirlemek yeterlidir. Ancak, kinetik modellemede hücre sayısındaki artış hızının ölçülebilmesi gerekir. Popülasyon büyüme hızı doğrudan ölçülemediği için, hücre sayısının zamana bağlı olarak artışı ölçülüp büyüme hızı belirlenir. Mikroorganizmaların sayımı için birçok yöntem vardır. Bunlar doğrudan ölçüm yöntemleri (mikroskopi, petri sayımı) ve dolaylı ölçüm yöntemleridir (empedans, kondektans, optik dansite, DNA) (8). PM çalışmalarında çoğunlukla klasik petri sayımı yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem çok hassas olması, hücre sayımını mümkün kılması, kültür ortamında ve gıdalarda kullanılabilmesi nedeniyle avantajlıdır (11). Mikroorganizmaların genel büyüme eğrisi Şekil 1'de gösterilmiştir.

Lag fazı (latent faz, adaptasyon fazı) : Mikroorganizmalar bulunduğu ortama uyum sağlamak için kendi içerisinde fiziksel ve biyokimyasal düzenlemeler yapar. Logaritmik üreme fazı : Mikroorganizmaların bulunduğu ortamın şartlarına göre en yüksek hızda çoğaldığı fazdır. Durgunluk fazı : Bu fazda üreme oranı ve ölüm oranı eşittir, metabolitlerin artması sonucu üreme oranı düşer. Ölüm fazı : Ortamdaki bileşenlerin tükenmesi ve durgunluk fazının uzamasına bağlı olarak hücrelerde ölümler başlar (21).



Şekil 1: Mikroorganizmaların Genel Büyüme Eğrisi.

Doğrulama

Doğrulama modellemenin son aşamasıdır. Bir modelin gerçekten kullanılabilir olup olmadığı mikrobiyel gelişmeyi ne kadar iyi tahmin edebildiğine bağlıdır. Prediktif mikrobiyolojide doğrulama; modelin gıda ortamındaki mikroorganizma gelişimini, gıda üretimi, dağıtımı ve depolanması aşamasında ne kadar iyi tahmin ettiği ölçülerek yapılır. Bunun için gerçek koşullarda elde edilen veriler ile modelin hesapladığı değerler karşılaştırılır. Bu değerler birbirine ne kadar yakınsa model o kadar başarılı kabul edilir (8).

Birincil, İkincil ve Üçüncül Modeller

Prediktif gıda mikrobiyolojisinde modeller matematiksel ifadelerdir ve gıda kaynaklı bir mikroorganizmanın üremesi, hayatta kalması, inaktivasyonunu tanımlar. PGM alanında farklı birkaç model sınıflandırılması yapılmıştır (22). PGM için karışıklıkları ortadan kaldırmak amacıyla bir sınıflandırma sistemi önerilmiştir. Bu sınıflandırma birincil, ikincil ve üçüncül olmak üzere üç seviyede açıklanmıştır (23).

Birincil Modeller

Birincil modeller, belirli çevresel ve kültürel koşullarda, bakteri sayısının zaman ile değişimini tanımlarlar (24). Toplam bakteri sayısı, toksin formasyonu, metabolik ürünleri ve eğer mümkünse kaydedilen bakteriyel büyüme eğrisi gibi bilgiler, birincil bir model kullanarak sağlanabilir. Bu bilgiler bize bakterilerin jenerasyon zamanı, lag fazı evresi, ekspanensiyel büyüme oranı ve maksimum populasyon yoğunluğu hakkında bilgi verir. Mikroorganizmaların büyüme eğrilerinin belirlenmesinde Gompertz veya Baranyi modeli gibi sigmoid fonksiyonların kullanımı daha yaygındır. Bu sigmoid fonksiyonların kullanılmasının nedeni mikroorganizma büyüme eğrisi gibi dört faza sahip olmalarıdır (9).

İkincil Modeller

İkincil modeller ise kültürel veya çevresel koşullarda (pH-değeri, a_w -değeri, E_h , sıcaklık) birincil modellerde oluşan bir ya da daha fazla parametre cevabının

(jenerasyon süresi gibi) tanımlanmasını sağlar. Örneğin, Salmonella Typhimurium'un sığır etindeki 15 ve 40°C arasında olan üreme özelliği incelendiğinde, bu aralıktaki birçok sıcaklıkta üreyebildiği görülür. Birincil modeller kullanarak her sıcaklık derecesindeki jenerasyon süresi hesaplanır. Elde edilen bilgiler ikincil bir modelle birleştirilir. Böylece matematiksel bir eşitlikle sıcaklığın etkisi tanımlanmış olur. Sonuçta hangi sıcaklık derecesinde jenerasyon süresinin sonlanacağı belirlenmiş olur (23-27).

Tablo 3: Modellerin Sınıflandırılması (9).

Birincil Modeller	İkincil Modeller	Üçüncül Modeller
Gompertz Fonksiyonu	Belehrádek Model (Karekök Model)	USDA (United States Department of Agriculture) Pathogen
Modifiye Gompertz	Ratkowsky Model (Karekök Model)	Modelling Program
Logistic Model	Arrhenius Model	Food MicroModel™
Baranyi Model	Modifiye Arrhenius Model (Davey ya da Schoolfield)	Pseudomonas Predictor
First-order Monod Model	Olasılık Modelleri	Expert Systems
Modifiye Monod Model	Z-değeri	
Termal İnaktivasyon için D-değeri	Polynomial veya Response	
Uç fazlı Doğrusal Model	Williams-Landel Ferry Model	

Büyüme oranı ve sıcaklık arasındaki ilişkiyi 1930 yılında tanımlayan Belehrádek, modelinin tanıtılmasından bu yana çok sayıda ikincil model geliştirilmiştir (1).

Basit Olasılık Modelleri

Basit olasılık modelleri, gıdalarda mikrobiyel risklerin belirlenmesinde ilk başvuru olan araçlardır. Ancak, elde edilen bilgiler oldukça sınırlıdır. Temel olasılık hesaplarına dayandıkları için doğruluk dereceleri oldukça düşüktür. Mikroorganizmaların gelişme ve metabolik ürünlerin üretim hızı hakkında bilgi vermezler. Bu nedenle kullanımları da sınırlıdır (8).

Ratkowsky Tipi veya Karekök Modeli

Karekök modeli temel olarak büyüme oranının karekökü ile sıcaklık arasındaki ilişkiyi tanımlayan Belehrádek Modeline (28) dayanır. Bu model vasıtasıyla bir değişken sabit tutulup diğer değişken hakkında fikir yürütülmesi sağlanır. Bu ilişki aşağıdaki eşitlikle açıklanabilir (29).

$$k^{1/2} = b(T - T_{\min})$$

k : büyüme oranı, T : deneysel sıcaklık,
 T_{\min} : kuramsal minimum hücre büyüme sıcaklığı, b : regresyon katsayısıdır.

Regresyon, iki ya da daha çok değişken arasındaki doğrusal ilişkinin fonksiyonel şeklini göstermekle kalmaz, değişkenlerden birinin değeri bilindiğinde diğeri hakkında tahmin yapılmasını sağlar (30). Büyüme oranı üzerine farklı parametrelerin etkisinin gösterilmesi amacıyla, modele pH-değeri ve a_w - değeri etkisi de uygulanabilir (1).

Regresyon Modelleri

Bu modele değinmeden önce mikroorganizmaların büyüme kinetik parametreleri hakkında bilgi sahibi olmamız gerekir. Bu parametreler lag fazı süresi, maksimum büyüme oranı ve jenerasyon süresi olarak sıralanabilir.

Lag fazı süresi: Mikroorganizmaların bulunduğu çevresel şartlara uyum sağlaması için gerekli süreyi ifade eder.

Jenerasyon süresi: Ekspansiyon fazda mikroorganizma popülasyonunun iki katına çıkma süresini ifade eder.

Maksimum popülasyon yoğunluğu: Mikroorganizma yoğunluğunun büyüme eğrisinde en fazla olduğu noktadaki miktarını gösterir (20).

Regresyon eşitlikleri, mikroorganizma büyüme kinetik parametrelerinin ortam koşullarına bağlı değişimini ifade eder.

$$y = a + b_1x_1$$

y: bağımlı değişken, x: bağımsız değişken, a: sabit, b: regresyon katsayısı.

Bu tür regresyon modelleri pek çok gıda kaynaklı patojen bakterinin büyüme kinetiklerinin modellendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Deneysel koşullarda elde edilen büyüme eğrileri vasıtasıyla bakterilerin zamana bağlı değişimleri belirlenir, regresyon eşitlikleri vasıtasıyla da modellemeleri yapılabilir (11).

Üçüncül Modeller

Üçüncül modeller, birincil ve ikincil modellerdeki uygulamalar ve kullanımı kolay bir bilgisayar yazılımı ile oluşturulur. Ayrıca bu model sıcaklık, pH-değeri ve a_w -değeri gibi fonksiyonlarla da birleştirilebilir. Uygun bir veri tabanı oluşturularak, farklı koşullarda olan bazı mikroorganizma türleri üzerindeki faktörlerin etkisi de karşılaştırılabilir. Üçüncül modeller kullanarak PM, gıda endüstrisinde kolay ulaşılabilen ve oldukça etkili bir araç olarak kullanılabilir (9).

İngiltere Tarım, Gıda ve Balıkçılık Bakanlığı 1988 yılında mikrobiyel patojenlerin üreme ve ölümlerine ilişkin araştırmacılarla ortaklaşa yapılan çalışmalar sonucu toplanan bilgileri bilgisayar ortamına uygun olarak aktarmıştır. Toplanan bu bilgiler ilk modelleme programı olan Food MicroModel™'in temelini teşkil etmiştir. Ayrıca 2003 yılında İngiltere Gıda Standardı Ajansı "Growth Predictor" adlı programı geliştirmiştir. Programa ücretsiz olarak ulaşılabilir (www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor) (3).

İngiltere'deki bu gelişmelere paralel olarak ABD'nde de, Pathogen Modelling Programme (PMP: <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>) adlı program kullanıma sunulmuştur.

Prediktif yazılım paketleri, matematiksel modeller ve mikrobiyolojik bilginin sentezlenmesi ile dört adımda oluşturulabilir:

1. Farklı format ve kültürler kullanarak araştırmacılar tarafından mikrobiyolojik bilgiler elde edilir.
2. Bu bilgiler ışığında alanında uzman kişiler tarafından bir bilgi havuzu oluşturulur.
3. Elde edilen bilgilerin insanlar tarafından ulaşılabilir ve kullanışlı olabilmesi için internet ortamına uygun bir şekilde bilgiler ana sunucuya kaydedilir.
4. Prediktif yazılımları oluşturmak için, matematiksel modeller kullanarak belli koşullar altındaki mikroorganizma davranışları kaydedilir. Yine, matematiksel eşitlikler vasıtasıyla ihtiyaç duyulan tahminlerin yapılması sağlanır (30).

Prediktif Mikrobiyolojinin Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Prediktif mikrobiyolojinin gıda endüstrisindeki kullanım alanlarını aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz:

1. Et ürünlerinde üretimin değişik aşamalarında (kesim, parçalama, soğutma, paketlenme, dağıtım v.b.) hijyenik koşulların kontrolünde,
2. Et ve süt ürünlerinde raf ömrünün tespiti ile ilgili çalışmalarda,
3. Fermantasyon için gerekli starter kültürlerin kontrolünde,
4. Hedef mikroorganizmaların üremesi için gerekli çevresel şartların tespitinde,
5. Ürünler üzerine uygulanan çeşitli işlemlerin optimizasyonunda,
6. Değişik gıdaların üretiminde kullanılan katkı maddelerinin, mikroorganizma davranışları üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde (20).

HACCP

HACCP programının gıda endüstrisinde kullanımıyla birlikte, gıda güvenliğini etkileyen çoğu değişkenin sayısal olarak ifade edilmesi ihtiyacı doğmuştur (31). PGM, bu değişkenlerin mikroorganizmaların üreme ve inaktivasyonu üzerine etkilerini sayısal olarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır. PGM ve HACCP, gıda güvenliği için gelişme gösterme aşamasındadır ve prediktif modeller HACCP sisteminin gelişimi için de kullanılabilir. Modeller tehlike analizleri, kritik kontrol noktalarının tespiti ve gerekli önlemlerin alınması için yardımcı olabilmektedir (32).

Risk Değerlendirmesi

Risk değerlendirme, gıda güvenliği alanında ortaya çıkan yeni bir disiplindir. Analitik bir araçtır ve halk yararı gözeterek öncelikli politikaların belirlenmesini sağlar (33, 34). Gıdaların üretim, depolama, dağıtım ve bu aşamalarda oluşan patojen mikroorganizmaların infeksiyon dozu ile gıda tüketim miktarına bağlı hastalık oluşturma riskinin belirlenmesi önemlidir (35). PGM yardımı ile patojen mikroorganizma düzeyi ve hastalık oluşturma potansiyelinin tahmini yapılabilmektedir (9).

Gıdalarda Raf Ömrü Çalışmaları

Prediktif modeller kullanılarak, mikroorganizma davranışları ve gıdalara uygulanan işlemler sonucu oluşan değişkenlerin birlikte değerlendirilmesiyle ürünlerin raf ömrü hakkında tahminler yapılabilir (36). Raf ömrünün belirlenmesi karışık bir süreçtir ve kötü depolama koşullarında bu sürece etki ettiği düşünüldüğünde tahmin yapmak oldukça güçtür (37). Risk değerlendirmesi ve HACCP'in raf ömrü çalışmalarında ürüne her aşamada uygulandığı düşünülerek tahminler yapılmalıdır. Kullanılan çığ materyal, ürün formülasyonu, hijyenik şartlar, depolama ve dağıtım koşulları hakkında kesin bilgiler elde edilmesiyle doğru bir tahmin yapılabilir. Tüm bu şartların sağlanması oldukça zor olmakla beraber yüksek maliyet oluştururlar. Ancak, modellerin gelişimiyle birlikte bu maliyetli ve zaman alan süreç kolaylaşmıştır (38).

Ürün Araştırma ve Geliştirme Çalışmaları

Ürün yapısının değişimi ve uygulanan işlemlerin zararlı mikroorganizma popülasyonu üzerine önemli etkisi vardır ve fırsatçı patojen mikroorganizma sayısının artmasına neden olabilir. PGM ile üründe oluşan değişimler hızlı bir şekilde değerlendirilir. Modeller vasıtasıyla üretici, ürünlerin kullanımı, üzerinde yeniden çalışılması veya uygun analiz yöntemlerinin hangisi olduğuna dair kararlar verebilir (39, 40, 41).

Gıda endüstrisindeki potansiyel uygulamaları nedeniyle PM son yıllarda üzerinde önemle durulan konulardandır. PM modelleri;

1. Yeni geliştirilmiş gıda ürünlerinin mikrobiyel dayanıklılıklarının belirlenmesine,
2. Yeni veya değişik kombinasyonlardaki gıda katkı maddelerinin tek başına ya da ortak etkileşimlerinin araştırılmasına,
3. Gıdaların raf ömrünün ve gıda güvenliğinin tahminine,
4. Kaynakların daha verimli kullanılması amacıyla mikroorganizma gelişimi açısından kritik koşulların belirlenmesine,
5. Isı etkisine maruz kalmış gıdaların sağlık açısından oluşturduğu potansiyel riskin belirlenmesine,
6. HACCP programlarının oluşturulmasına olanak sağlar (42, 43).

Prediktif Mikrobiyolojide Modelleme Çalışmaları

Karekök modeli kullanarak sıcaklığın 5-50 °C ve a_w -değerinin 0.936-0.995 olduğu değişken parametrelerin, *Vibrio parahaemolyticus*'un dört farklı suşunun büyüme oranına etkisini araştırılan çalışmada, büyüme oranına sıcaklığın etkisini min. 8.3 °C, maks. 45.3 °C ve opt. 37-39 °C olarak gözlemlenmiştir. Araştırmacılar a_w -değerinin büyüme oranı üzerindeki etkilerinin ise, $a_w = 0.936-0.995$ aralığında etkenin üreyebildiği, opt. $a_w = 0.995$, $a_{wmax} = 0.997-0.999$ olarak tahmin edilmiştir. Araştırmacılar deneysel olarak yaptıkları bu çalışma sonucunda, elde ettikleri matematiksel verileri grafik formuna dönüştürmüşlerdir (44).

McClure ve ark. (45), NaCl (5.0-115.0 g/l), pH (4.0-7.2), sıcaklık (1-35°C) ve NaNO₂'in (0-200 mg/l) *Listeria monocytogenes* üzerine etkisini incelemiştir. *L.*

monocytogenes'in üreme limitlerinin en iyi şekilde tahmininin yapılabilmesi için uç derecede parametreler seçilmiştir. Çoğu gıda örneğini teşkil etmesi için 267 farklı koşulda inceleme yapılmıştır (Tablo 4). Elde edilen bilgiler ışığında öncelikle bakteriyel büyüme eğrisi Program 2 adlı modelleme programı ile bulunmuştur. Baranyi ve ark. (22)'nin modeli ile birleştirilip her üreme derecesi için üreme oranı, lag fazı evresi ve maksimum populasyon yoğunluğu bulunup, elde edilen matematiksel verileri kullanarak grafik formuna dönüştürmüşlerdir (45).

Tablo 4: Parametrelerin Gösterilmesi (45).

Depolama sıcaklığı (°C)	1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35
pH	4.5, 4.9, 5.3, 6.0, 6.3, 6.7, 7.4
NaCl (g/l)	5, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 115
NO ₂ (mg/l)	0, 50, 100, 200

George ve ark. (46), farklı sıcaklık (1-20°C) ve pH-değeri (4.5-7.2) ile farklı konsantrasyondaki asetik asit (0-10000 mg/l) ve laktik asitin (0-20000 mg/l) *Listeria monocytogenes*'in üremesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, asetik asit grubunda sıcaklık 4-20°C, pH-değeri 4.5-7.0, asetik asit miktarı ise 0-10000 mg/l olarak seçilmiştir. Laktik asit grubunda ise sıcaklık 1-20°C, pH-değeri 4.3-7.2, laktik asit miktarı ise 0-20000 mg/l olarak alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda asetik asidin laktik asitten daha fazla inhibitör etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (46). Aynı şekilde araştırmacılar çalışmada elde ettikleri sayısal değerleri kullanarak grafik formuna dönüştürmüşlerdir. Araştırmacılar oluşturdukları grafik modelinde olduğu gibi, aynı pH-değerinde asetik asidin laktik asitten daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu, laktik asit konsantrasyonunun 2500 mg/l, pH-değerinin 5.0 ve sıcaklık derecesinin 20°C olduğu koşullarda ise *Listeria monocytogenes*'in jenerasyon süresinin 2.3 saat olduğunu bildirmişlerdir. Aynı sıcaklık derecesi, pH-değeri ve 2500 mg/l asetik asit konsantrasyonunda ise jenerasyon süresi 5.4 saat bulunmuştur. Araştırmacılar (46) çalışmadan elde edilen bulgulara bağlı olarak, asetik asitin laktik asitten daha fazla inhibisyon etkisine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonuç ve Öneriler

Son yıllarda prediktif mikrobiyolojinin gıda endüstrisindeki önemi artarak gelişme göstermektedir. Dünyanın dört bir tarafında bulunan araştırmacılar, bilginin toplanması ve bu bilginin başarılı şekilde modellendirilmesi için yoğun çalışmalar yapmaktadırlar. Ancak yapılan bu çalışmalara rağmen prediktif gıda mikrobiyolojisi çalışmalarının tamamıyla kabul gördüğü söylenemez.

Bilimsel otoriteler tarafından prediktif mikrobiyolojinin tam olarak sınıflandırılmadığı düşünülmektedir. Çoğunlukla kabul edilen sınıflandırma şekli ise birincil, ikincil ve üçüncül modeller şeklinde yapılan sınıflandırmalardır. Aynı şekilde, istatistiksel bilginin modelleme aşamalarında yoğun olarak kullanılması nedeniyle çalışmalara gereken ilgi gösterilmemektedir. Bu nedenle, önceden de belirtildiği gibi prediktif gıda mikrobiyolojisi alanında uzman gıda, mikrobiyoloji, matematik ve istatistikçilerin ortak çalışmalarını gerektiren bir disiplindir. Daha kullanışlı ve kesin sonuçlar veren modeller üzerinde çalışmalar ise devam etmektedir. PM'nin Sayısal Mikrobiyel Risk

Değerlendirmesi alanında kullanımı endüstriyel gıda güvenliği, ekonomi ve halk sağlığı açısından da büyük bir adımdır.

PGM'nin güvenilirliğini artırmak için gıda mikrobiyolojisinde kullanılan laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Ancak bu şekilde doğruluğu yüksek tahminler yapılabilir ve bu şekilde gıda güvenliği sağlanabilir. Ancak bunlara rağmen, 21. yüzyılda PM'nin gıda mikrobiyolojisi alanında kullanımı ve öneminin artarak devam edeceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. LI, H., XIE, G., EDMONDSON, A.S. (2008). Review of secondary mathematical models of predictive microbiology. *Journal of Food Products Marketing*. 14: 57-74.
2. ESTY, J.R., MEYER, K.F. (1922). The heat resistance of the spore of *Bacillus botulinus* and allied anaerobes, XI. *J. Infect. Dis.* 31: 650-663. Alınmıştır: BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (2004). Predictive Microbiology- Quantitative Microbial Ecology. *Culture-March 2004*.
3. BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (2004). Predictive Microbiology- Quantitative Microbial Ecology. *Culture-March 2004*.
4. SCOTT, W. J. (1937). The growth of microorganisms on ox muscle. II. The influence of temperature. *Journal of the Council of Scientific and Industrial Research, Australia*, 10: 338–350. Alınmıştır: McMEEKIN, T.A. (2007). Predictive Microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Sci.* 77: 17-27.
5. McMEEKIN, T.A. (2007). Predictive Microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Sci.* 77: 17-27.
6. McMEEKIN, T.A., OLLEY, J., RATKOWSKY, D.A., ROSS, T. (2002). Predictive Microbiology: Towards the interface and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 395-407.
7. ROBERTS, T. A., JARVIS, B. (1983). Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In T. A. Roberts & F. A. Skinner (Eds.), *Food microbiol. Advances and prospects* (pp. 89–95). New York: Academic Press.
8. McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. (1993). Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press Ltd. England.
9. McDONALD, K., SUN, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 1-27.
10. BOZKURT, H., ERKMEN, O. (2001). Predictive modelling of *Yersinia enterocolitica* inactivation in Turkish Feta cheese during storage. *Journal of Food Engineering.* 47: 81-87.
11. ÖLMEZ, H.K. (1999). Prediktif Mikrobiyoloji. *Gıda Dergisi.* 46-48.
12. MILES, W.D., ROSS, T., OLLEY, J., McMEEKIN, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 133-142.
13. DEVLIEGHERE, F., VAN BELLE, B., DEBEVERE J. (1999). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: A predictive model. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 57-70.
14. FARBER, J.M., CAI, Y., ROSS W.H. (1996). Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 133-144.

15. SOBOLEVA, T.K., PLEASANTS, G., ROUX, G. (2000). Predictive microbiology and food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 57: 183-192.
16. WALLS, I., VIRGINIA, N.S. (1997) Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 97-102.
17. WALKER, S.J., JONES, J.E. (1993). Protocols for data generation for predictive microbiology. *J. Indust. Microbiol.* 12: 273-276.
18. McMEEKIN, T.A., ROSS, T. (1996). Modelling Applications. *J. Food. Prot.* 37.
19. ANON. (2009a). Overview of Predictive Microbiology. Erişim Adresi: <http://pmp.arserrc.gov/PMPHome/Overview.aspx> Erişim Tarihi: 03.04.2009.
20. ANON. (2007). Predictive Microbiology Information Portal. Erişim Adresi: <http://portal.arserrc.gov> Erişim Tarihi: 08.04.2009.
21. VAN IMPE, J.F., POSCHET, F., Geeraerd, A.H. and Vereecken, K.M. (2005). Towards a novel class of predictive microbial growth models. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 97-105.
22. BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (1992). A terminology for models in predictive microbiology – A reply to K.R. Davey. *Food Microbiol.* 9: 355.
23. WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.* 10: 175-177.
24. WHITING, R.C. (1995). Microbial modelling in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 467-494.
25. DICKSON, J.S., SIRAGUSA, G.R., WRAY, Jr. J.E. (1992). Predicting the growth of *Salmonella typhimurium* on beef by using the temperature function integration technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3482-3487.
26. WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L., (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurised liquid eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 111-125.
27. GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extend of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 479-490.
28. BELEHRADEK, J., (1930). Temperature coefficients in biology. *Biol. Rev. Biol. Proc. Camb. Phil. Soc.* 5: 30-60. Alınmıştır: McDONALD, K., SUN, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: A review . *Int. J. Food Microbiol.* 52: 1-27.
29. RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., McMEEKIN T.A., BALL, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 71: 452-459.
30. ANON. (2009b). Regresyon. Erişim Adresi: <http://tr.wikipedia.org/Regresyon> Erişim Tarihi: 13.04.2009.
31. BUCHANAN, R.L., WHITING, R.C. (1996). Risk assesment and predictive microbiology. *J. Food Prot.* 59: 31-36.
32. ELLIOT, P.H. (1996). Predictive Microbiology and HACCP. *J. Food Prot.* 59: 48-53.
33. BUCHANAN, R.L. (1995). The role of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiol.* 12: 421-424.
34. FOEGEDING, P.M. (1997). Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 87-95.
35. MILLER, A.J., WHITING, R.R., SMITH, J.L. (1997). Use of risk assessment to reduce Listeriosis incidence. *Food Technol.* 51: 100-103.

36. BANKS, J.G. (1994). Process control and quality assurance through the application of HACCP and predictive microbiology. In: Minimal Processing of Foods and Process Optimisation. An Interface, CRC Press, Boca Raton.
37. WILLIAMS, T. (1992). The Principles Involved in the Determination of Product Shelf-Life, Leatherhead Food Research Association. UK.
38. NEUMEYER, K., ROSS, T., McMEEKIN, T.A. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth spoilage *Pseudomonads*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 55-63.
39. BLANKENSHIP, L.C., CRAVEN, S.E., LEFFLER, R.G., CUSTER, C. (1988). Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chilli during cooling. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1104-1108.
40. BUCHANAN, R.L., STAHL, H.G., WHITING, R.C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 844-851.
41. ROBERTS, T.A. (1990). Predictive Modelling of Microbial Growth. *Food Technol. Int. Europe*, pp. 231-235.
42. ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M., Van'T Riet, K., (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1875-1881.
43. SKINNER, G.E., LARKIN, J.W., RHODEHAMEL, E.J. (1994). Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Safety*.14: 175-217.
44. MILES, W.D., ROSS, T., OLLEY, J., McMEEKIN, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 133-142.
45. McCLURE, P.J., BEAUMONT, A.L., SUTHERLAND J.P., ROBERTS, T.A. (1997). Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 221-232.
46. GEORGE, S.M., RICHARDSON, L.C.C., PECK, M.W. (1996). Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 73-90.