

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Качество и безопасност на храните и
ветеринарно законодателство“

Михаил Владимиров Миланов

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРОК НА ГОДНОСТ НА ХРАНИТЕ ЧРЕЗ
ПРОГНОЗНА МИКРОБИОЛОГИЯ И *LISTERIA*
*MONOCYTOGENES***

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната и научна
степен „Доктор“

Научна специалност "Ветеринарно-санитарна експертиза"

Научен ръководител: Проф. д-р Тодор Стоянчев

Стара Загора

2022 г.

Дисертационният труд е написан на 162 страници и е илюстриран с 23 фигури, 15 таблици и 8 формули. Библиографската справка включва 198 източника. Номерацията на включените в автореферата фигури, таблици и раздели не съответства на тези в дисертацията.

Изказвам своята най – дълбока признателност към научния си ръководител проф. Тодор Стоянчев за компетентното ръководство, неocenимата помощ и изключителното търпение във всеки етап от реализирането на дисертационния труд.

Огромна благодарност дължа и на проф. Христо Даскалов за безценните съвети и помощ, в т.ч при провеждане на микробиологичните изследвания, структурирането и актуалността на научните публикации свързани с дисертационния труд.

Сърдечно благодаря на д-р Гергана Матева и на колегите от Национален център по безопасност на храни (НЦБХ) за изключителната възможност за съвместна работа при подготовката и провеждането на експериментите и последващи научни публикации.

Изключително благодарен съм и на целия колектив на катедра „Качество и безопасност на храните и ветеринарно законодателство“ за полезните съвети, разбиране, търпение и безрезервна подкрепа.

Михаил Миланов

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2022 г. от часа във Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора, на заседание на Специализираното научно жури.

Материалите по защитата са на разположение на интернет страницата на Тракийски университет (www.uni-sz.bg) и в Научен отдел на Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД	стр.5
2. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	стр.7
2.1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	стр.7
2.2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	стр.7
3. РЕЗУЛТАТИ	стр.24
3.1. Експериментално контаминиран сурово сушен месен продукт - филе „Елена“	стр.24
3.2. Експериментално контаминиран малотраен варено-пушен продукт „Биренка“	стр.26
3.3. Експериментално контаминиран малотраен варено-пушен продукт – „Свинско контрафиле/пражка шунка“	стр.30
3.4. Експериментално контаминирано печено свинско месо (<i>m. longissimus dorsi</i>)	стр.34
3.5. Прогнозна микробиология чрез първично и вторично моделиране	стр.37
4. ИЗВОДИ	стр.43
5. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА	стр.44
6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	стр.45
7. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	стр.46
8. SUMMARY	стр.47

Използвани съкращения

μ_{max} – максимален темп на растеж

AFNOR - Association Française de Normalisation (French Standardization Association)

ALOA – Agar Listeria according to Ottaviani & Agosti

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists

ATCC – American Type Culture Collection

BPLS – Brilliant Green Phenol red lactose sucrose agar

BPW – Buffered Peptone Water

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EIA – Enzyme immunoassay

EURL – European Union Reference Laboratories

FBO – Food Business operator (производител)

ISO – International Organization for Standardization

MAE – Mean Absolute Error (средна абсолютна грешка)

MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser/Desorption – Time of Flight (масова спектрометрия)

MAP – Modified Atmosphere Package (опаковка с модифицирана атмосфера)

MAPE – Mean Absolute Percent Error (средна абсолютна процентна грешка)

MHT – Multi Hurdle Technology

MKTTn – Muller – Kauffmann Tetrathionate Novobiocin

MSE – Mean Squared Error (средна квадратна грешка)

MSRV – Modified semi-solid Rappaport – Vassiliadis agar

MST – средна стойност от квадрати

NCTC – North Central Texas College

pH – potential of hydrogen (водороден потенциал)

R^2 – correlation coefficient (корелационен коефициент)

RMSE – Root Mean Squared Error (корен – квадратен на средна квадратна грешка)

RTE – Ready – to – eat (готови за консумация)

RV – Rappaport Vassiliadis broth

SC – Sulfite – cycloserine agar

XLD – Xylose Lysine Deoxycholate

a_w – water activity (водна активност)

1. УВОД

Срокът на годност на хранителните продукти бива повлиян от микробиологични, химични и сензорни промени, а методите за неговото определяне зависят от законодателни изисквания. Той следва да бъде определен базирайки се на научни принципи, които взимат предвид фактори на продукта като рецепта, производство, условия на разпространение и съхранение. Определеният срок на годност е специфичен за продукта и условията на съхранение и не може да се прилага при други продукти и/или условия на съхранение. Определяйки правилният за продукта срок на годност може да бъде ключов фактор за търговския му успех и следва да бъде извършен в ранните етапи от разработката на нови продукти.

Изследванията за срока на годност се опитват да отговорят на въпросите на бизнеса за време, в което продукта може да запази качествените си параметри. Това важи както за неговото производство, така и за последващото съхранение. Такива изследвания най-често отчитат само растежа на микроорганизмите, които естествено се намират в тестваната партида продукти. Изследванията за срок на годност не биха могли да определят растежния потенциал на патогенни бактерии, защото е малко вероятно тези бактерии да се намират в продукта по време на изследването.

Провеждането на тестове с изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests) се прилага с цел да проследи дали състава на продукта и температурата на съхранение могат да контролират растежа на патогенните бактерии (или микроорганизми предизвикващи развала) за периода на срока му на годност. Обръща се внимание на това дали те са налични в съставките използвани в производството му или вторично са контаминирали хранителния продукт по време на неговото съхранение. За периода на провеждане на тези тестове хранителния продукт умишлено се контаминира с рисковипатогенни микроорганизми. Техният растеж се изследва при контролирани лабораторни условия.

Предимството на тези методи е, че дават отговор на въпроса „какво би станало ако“, което не е характерно при

стандартните изследвания за срок на годност. Типичният контаминант при хладилно съхранение на готови за консумация месни продукти е *Listeria monocytogenes*. Въпреки това, за този патоген по храните няма традиционни изследвания свързани със срока на годност с оглед безопасността на продукта при вторична контаминация след термична обработка.

Прогнозната микробиология използва компютърни симулации, за да прогнозира вероятния растеж както за гнилоствни микроорганизми, така и при патогени на храните. Намира приложение при различни продуктови рецепти или условия на съхранение. Математико-статистическите модели дават възможност за бързо и ефикасно решение при разработката на нови продукти или при анализиране на възникнали неблагоприятни ситуации в условията на съхранение. Могат да бъдат получени данни за продължителността на лаг фазата, темпа на растеж, времето необходимо за достигане на определена бактериална концентрация и ефекта на различни видове съхранение на продукта. В допълнение, множество модели могат да се използват при прогнозиране ефекта на оптимални и субоптимални температури на съхранение, промени в рН и водната активност (a_w), и др.

Прогнозните модели представляват много бърз, ефективен и достъпен начин за определяне потенциала за растеж на микроорганизмите при специфични условия на средата.

2. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

2.1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Съвременните условия за интердисциплинарност и интернационализация на научните изследвания ни дадоха основание да си поставим за **ЦЕЛ** на настоящата разработка:

Проучване на модели за прогнозиране срока на годност на месни продукти чрез изкуствено контаминиране с *L. monocytogenes* и софтуерно моделиране чрез бактериалният метаболизъм.

За постигане на поставената цел са разработени следните **ЗАДАЧИ**:

1. Проследяване на микробната кинетика след изкуствено лабораторно контаминиране с *L. monocytogenes* на малотрайни и трайни месни продукти от търговски обекти.

2. Проучване на кинетиката на *L. monocytogenes* в печено свинско месо без странична микрофлора.

3. Проучване дали темповете на растеж на *L. monocytogenes* се повлияват от наличието на други патогенни микроорганизми (при добавяне на щамове *Salmonella* към инокулиращата смес) в сравнение със самостоятелното им контаминиране

4. Софтуерно преизчисление на резултатите от микробния растеж на *L. monocytogenes* при различни температури и различни месни продукти за създаване на прогнозен модел с дефинирана точност.

5. Създаване на експериментален модел за инхибиране на *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* в срока на годност на традиционен сурово сушен продукт „Панагюрска луканка“ при заместване на нитратите с млечнокисели микроорганизми.

2.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За да бъде постиганата целта, заложена в дисертационния труд извършихме 4 основни експеримента, с по 2 повторения. Експериментите са съобразени с изискванията на Техническия документ на Европейската референтна лаборатория за *L. monocytogenes* (EURL for Lm) и ISO 20976-1:2019(E) за провеждане на изследвания за срок на годност на готови за

консумация храни с *L.monocytogenes*. Тези документи предоставят препоръки за провеждането на тестове с изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests), изследващи както растежния потенциал на бактериите, така и максималния темп на растеж.

2.2.1. Описание на пробите и експериментален дизайн

За целите на дисертационното проучване избрахме представители от различни групи месни, готови за консумация продукти: сурово-сушени трайни продукти, малотрайни варено-пушени, както и печено месо.

При провеждане на експериментите формирахме 4 групи готови за консумация месни продукти. Всяка една от тях е представена от 1 продукт: сурово-сушен траен месен продукт „филе Елена“, малотраен варено-пушен продукт „Биренка“, малотраен варено-пушен продукт „Свинско контрафиле/пражка шунка“ и термично-обработен месен продукт „Печено свинско каре“. Всички проби закупихме от магазини за хранителни стоки, като в зависимост от начина на предлагане на продукта са от три типа: предварително нарязани на слайсове, ненарязани опаковани в защитна вакуумна опаковка и сурово месо. Пробите транспортирахме до лабораторията в хладилни условия чрез хладилна чанта и съхранявани при $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ в хладилник за период до 24 часа.

Експерименталният дизайн на проведените от нас опити за целия период на дисертацията са представени в таблица 1.

При провеждането на нашите опити с първия от изследваните от нас продукти използвахме общо 330 слайса малотраен варено-пушен продукт „Биренка“. Представители са на различни партии. Продуктът се предлага цял във вакуумна опаковка с няколко биренки в нея. Поради тази причина бе необходимо вакуумната опаковка да бъде отворена непосредствено преди започване на опитите и всяка биренка да бъде извадена от изкуствената опаковка и нарязана на слайсове с дебелина 3 мм със стерилен нож.

Месни продукти	Опит 1 – брой слайсове		Опит 2 – брой слайсове		Опит 3 – брой слайсове		Общо слайсове
	Контаминирани с <i>L. monocytogenes</i>	Контролни проби	Контаминирани с <i>L. monocytogenes</i>	Контролни проби	Контаминирани с <i>L. monocytogenes</i>	Контролни проби	
Малотраен варено – пушен продукт Биренка	54	54	51	51	60	60	330
Малотраен варено – пушен продукт Свинско филе	37	37	27	27	27	27	182
Термично – обработен месен продукт „Печен свински котлет“	21	21	21	21	-	-	84
Сурово сушен траен месен продукт „Филе Елена“	15+5	15	45	45	45	45	215
							811

Таблица 1. Експериментален дизайн на изследваните четири вида месни продукти, съхранени при три температури

С пробите проведохме 3 опита, като температурите на съхранение след бактериална контаминация при всички опити са еднакви: 6°C, 10°C и 25°C. Избраните температури попадат в оптималния (6°C) и субоптимален (10°C и 25°C) температурен диапазон за съхранение и транспорт на месни продукти.

Използваните щамове *L. monocytogenes* са три на брой и при трите опита. Продължителността на 1-ви и 2-ри опит е 10 дни, а за опит 3 е 8 дни. Първите два опита проведохме със смес от 3 щама *L. monocytogenes*. При първият опит, използваните от нас слайсове са 108, разделени на 6 групи по 6 проби (1 проба = 3 слайса). За всяка от трите температури са организирани тестова (6 проби) и контролна група (6 проби). Вторият опит проведохме върху 102 слайса в 4 групи по 18 слайса и 2 групи по 15 слайса. Третият опит извършихме със същата смес от щамове *L. monocytogenes*, като в допълнение прибавихме към сместа и щамове *Salmonella enterica* (Цел 3 на настоящата разработка). За целите на третия опит приготвихме 120 слайса. При всички температури, слайсовете биренка бяха инокулирани със следното: инокулиране със смес от щамове *L. monocytogenes* (15 слайса); инокулиране със смес от щамове *S. enterica* (15 слайса); инокулиране с комбинация от щамове *L. monocytogenes* и *S. enterica* (15 слайса) и контролна група със стерилен физиологичен разтвор – 15 слайса.

Проведохме три опита със вторият от изследваните от нас продукти: 74 слайса свинско контрафиле и 108 слайса пражка шунка. Температурите на съхранение са сходни с другия малотраен варено-пушен продукт „Биренка“ - 6°C, 10°C и 25°C. При извършените повторения използвахме различни партии филе. Сходно с предходният продукт (биренка), и двата месни продукта закупихме опаковани във вакуумна опаковка. Непосредствено преди провеждането на експеримента ги разопаковахме, извадихме от вакуумната опаковка и нарязвахме на слайсове със стерилен нож. Използваните щамове са 3 на брой при трите опита, като при трети опит експериментално са добавени и изследвани смес от щамове на *S. enterica* (Цел 3 на настоящата разработка). Продължителността на първите два опита е 10 дни, а за трети опит - 8 дни. При всяка температура, контаминирането е извършено следвайки следната схема:

контаминиране със смес от щамове на *L. monocytogenes* (6 слайса); контаминиране с комбинация от *L. monocytogenes* и *S. enterica* щамове (6 слайса; само за трети опит) и контаминиране със стерилен физиологичен разтвор (6 слайса).

За провеждане на изследването с „филе Елена“ закупихме общо 215 слайса от търговската мрежа в предварително нарязан вид. Със закупените проби проведохме три опита с различни щамове и температури на съхранение (6°C, 10°C и 25°C). Различни партии филе Елена са използвани в отделните повторения. Размерът на всеки слайс е ~ 7.0-8.1 см (Д) x 3.0-3.5см (Ш). Диаметърът на слайсовете е ~ 1-2 мм. Проведохме първият опит чрез контаминиране на 15 слайса с 0.1 ml от един щам *L. monocytogenes* при температура на съхранение 6°C. Използвахме други 15 слайса за контролни проби, като за тази цел ги контаминирахме с 0.1 ml стерилен физиологичен разтвор. Върху изследване от нас контролни проби добавихме количество стерилен физиологичен разтвор, сходно с количеството инокулат на *L. monocytogenes* (в нашите изследвания 0.1 ml). Съгласно техническия документ (EURL Lm) това е необходима стъпка, за да бъдат определени физико – химичните характеристики на продукта. Поставихме всички проби при температура на съхранение 6°C за 20 дни. За провеждането на втори опит контаминирахме 45 броя слайсове с 3 щама *L. monocytogenes*. След това ги поставихме при температури на съхранение 6°C, 10°C и 25°C за 20 дни. За контролни щамове използвахме също 45 броя слайсове. Третият опит представлява повторение на втори опит, със същите бройки слайсове (контаминирани и контролни) и при същите температури на съхранение.

За да бъде проучено поведението и растежа на използваните от нас лабораторни щамове върху продукт без конкурентна бактериална контаминация, включихме към изследваните от нас продукти друг вид готов за консумация продукт: термично обработено месо. Подложихме сурови свински котлети (*m. longissimus dorsi*) (различни партии при повторението) на термична обработка печене във фурна при 200°C за 2 часа. От термично обработеното месо нарязвахме слайсове със стерилен нож. Общ 84 слайса бяха получени и изследвани, разпределени

в 2 опита и три температури на съхранение - 6°C, 10°C и 25°C. Използваните от нас щамове *L. monocytogenes* са отново три на брой.

При филе Елена всеки слайс е с приблизително тегло от 3,5 гр. За да бъде осъществено успешно взимане на проби, 3 слайса са групирани в 1 проба, като това се отнася за контаминираните и контролни проби при всяка индивидуална температура. При малотрайния варено-пушен продукт – биренка теглото съответства с това на филето Елена, като пак 3 слайса са групирани в 1 проба. При малотрайния варено-пушен продукт - свинското контрафиле средното тегло е 10 грама и съответно бройката за 1 проба=1 слайс. За изследване на суровото месо след термична обработка подготвихме слайсове с единично тегло от 10 грама, 1 проба=1 слайс. При провеждането на нашите експерименти, предварително са изследвани физико-химичните параметри на изследваните продукти.

2.2.2 Подготовка на бактериалната суспензия

Използвахме суспензия от три различни щама *L. monocytogenes* за контаминиране на разрезната повърхност на продуктите. Бактериалната суспензия е съставена от два диви (теренни) щама, обозначени като щам №41NCFS, изолиран от печено пилешко филе и щам №59/17NCFS, изолиран от сурово-сушен продукт. Третият щам е референтен (от Европейската референтна лаборатория по *L. monocytogenes*) с обозначение 12MOB047LM. За да бъдат проведени комбинирания опити със серовари *Salmonella* използвахме следните референтни щамове: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* (ATCC™ 13076) и *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC™ 14028). И двата щама ни бяха предоставени от НРЛ *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococci* и AMP (НДНИВМИ, БАБХ, София, България).

Тестовите за изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests) бяха извършени с цел изследване на растежния потенциал. Щамовете *L. monocytogenes* бяха съхранени в криовиалки с мозъчно-сърдечен бульон с добавка глицерин и буферирана пептонна вода с добавка глицерин при температура -80°C. След това индивидуално ги ревитализирахме върху

Nutrient Agar (HiMedia), за период от 24 часа при 37°C. След този период, култивирахме единична колония от агара в 10 ml епруветки с бульон Soyabean-Casein Digest Medium (Casein Soyabean Digest Broth) (HiMedia) за 18 часа при 37°C. След този период бяха посяти отново върху Nutrient Agar (HiMedia) за период от 24 часа при 37°C. Щамове Salmonella бяха съхранени при -80°C в криовиалки с BPW (Buffered Peptone Water, Merck KGaA, Germany) с добавка 20% глицерол. Извършихме ревитализирането и последващото го култивиране върху Nutrient Agar (HiMedia, India) за 24±2 часа при 37°C. Ресуспендирахме от всяка петра единични колонии в епруветки със стерилен физиологичен разтвор (9 ml.).

Суспендирахме единични колонии *L. monocytogenes* от всяка петра във физиологичен разтвор (9 ml) до достигане на концентрация от 1.5×10^8 CFU/ml (150 000 000 CFU/ml). След последователни разреждания бяха достигнати концентрации на разтвора от 15000 CFU/ml („висока концентрация“) и 1500 CFU/ml („ниска концентрация“), които представляват работните концентрации на инокулума, в зависимост от необходимостта на опита. Суспензията за инокулиране беше подготвена чрез използването на равни части от течните култури на трите щама, като от всяка субкултура са използвани по 3 ml за достигане на 9 ml крайна суспензия (Annex 7.3.2, Bergis et al. (2021)). Потвърдихме наличието на бактериите в суспензията съгласно ISO 11290-1:2017. След получаване на крайната суспензия, 1 ml от нея прехвърлихме в 9 ml първична обогатителна среда (half-Fraser) и последователно поставихме на 30°C за 25±1 часа. След инкубирането, 0.1 ml от културата се прехвърля в епруветка съдържаща 10 ml вторична обогатителна среда (бульон Fraser). Получената инокулирана среда се поставя на 24±2 часа при 37°C. От първичната обогатителна среда, инкубирана на 30°C за 25±1 часа, със стерилно йозе инокулирахме повърхността на първата селективна среда, ALOA, за да получим индивидуални, добре отделени колонии. Процедирахме по подобен начин и с втората селективна среда. От втората обогатителна среда, инкубирана на 37°C за 24±2 часа повторихме гореописаната процедура. Обърнахме с агара нагоре инокулираните петри и ги поставихме в инкубатор на 37°C за 48±2 часа за ALOA агар, и за

втората селективна среда съгласно инструкциите на производител. Типичните колонии са със синьо-зеленикав цвят и безцветен пръстен около тях.

С цел проследяване наличието на *Salmonella* в готовите за консумация храни, бяха използвани методите, описани в ISO документите (6579-1:2017; 6579-3:2014). Типичните колонии (и от двете селективни среди) бяха детектирани при всяко пробовзимане и при двете температури на съхранение. Също така, те се установяваха върху селективните среди независимо от това, дали *Salmonella* е била инокулирана сама или в комбинация с щамове *L. monocytogenes*.

За селективни среди бяха използвани XLD агар и втора селективна среда по избор – Rambach агар. Върху повърхността на XLD агара бяха избрани черни колонии (съмнителни за *Salmonella*), които бяха изолирани и култивирани. От Rambach агар, розови колонии (съмнителни за *Salmonella*) също бяха изолирани и култивирани.

Тъй като използвахме два щама *Salmonella* (един Typhimurium и един Enteritidis), смесихме равни количества от бактериалната суспензия и от двата щама. Смесването на суспензията е сходно с подготовката на смесената суспензия при *L. monocytogenes*. Използвахме от всяка субкултура след разреждане 4.5 ml, за да получим 9 ml крайна смесена суспензия. Избрахме типични (характерни) единични колонии от две селективни среди; последвани от култивиране върху Nutrient Agar. Серотипизиране беше извършено чрез избиране на типични колонии от агара, първо с поливалентен антисерум (OA-OE) (Sifin Diagnostics GMBH) и след това със специфичен соматичен антисерум за серовар Typhimurium (OB) (Sifin Diagnostics GMBH) и серовар Enteritidis (OD) (Sifin Diagnostics GMBH). Извършихме аглутинация върху предметно стъкло с процедура по метод, препоръчан от производителя на серумите. Малко количество от бактериална маса от съмнителна колония прехвърлихме върху предметно стъкло с последващо смесване с капка от серума. Тази смес разбъркахме до получаване на хомогенна суспензия. Получените резултати от аглутинацията бяха оценени съгласно процедурата, описана в инструкциите на производителя.

2.2.3. Метод на контаминиране

Контаминирането на пробите беше осъществено до 24 часа след закупуване на пробите от хранителните магазини, за да се намали възможният растеж на естествената микрофлора, намираща се в продуктите. Бяха следвани инструкциите, заложили в EURL Lm Technical guidance document (Bergis et al. (2021)). Избрахме повърхностен метод на контаминиране, който да пресъздаде реален риск от вторично контаминиране по-време на приготвянето на слайсове на продукта в търговски обекти или ресторанти. Групирахме пробите спрямо дните на изследване и предназначението им (проби, заразени с *L. monocytogenes* и контролни проби), както и съгласно температурите на съхранение. Поставихме с автоматична пипета на повърхността на всеки слайс 0.1 ml от смесената суспензия с *L. monocytogenes*. Върху повърхността на контролните проби бяха поставени 0.1 ml стерилен физиологичен разтвор. Същата процедура на инокулиране използвахме и при работата ни с микс от щамове *Salmonella* и за комбинираната смес от *Listeria* и *Salmonella*. Количеството 0.1 ml беше равномерно разпределено чрез стерилно микробиологично бастунче. След инокулиране пробите бяха групирани и поставени в стерилни пликосе Стомахер с размери 30x17.5 см. Пликовете бяха затворени на 1 см от отворения им край чрез двойно прегъване и клампа и след затварянето бяха поставени в микробиологични термостатни камери с предварително зададени температури за съхранение (6°C, 10°C и 25°C).

2.2.4. Микробиологични изследвания

Пробите (слайсове) бяха изследвани на предварително определените дни. D0 е денят на контаминиране (инокулиране) на пробите. Dend представлява крайния ден на опита. Периодът на съхранение на малотрайните месни продукти беше 8-10 дни с интервал на пробовземане от 2 дни. (D₀, D₂, D₄, D₆, D₈, D_{end}). При сурово-сушените месни продукти, избрания период на съхранение е 20 дни, с интервал на пробовземане от 5 дни (D₀, D₅, D₁₀, D₁₅, D_{end}). Периодът на съхранение на термично-обработените месни продукти беше 14 дни (интервал на пробовземане от 2 дни (D₀, D₂, D₄, D₆, D₈, D₁₀, D₁₂, D_{end})).

Представените периоди и интервали за взимане на проби се касаят за температури на съхранение 6 и 10°C. Пробовземането при температура от 25°C беше осъществено на всеки ден от съхранението на продуктите (D₀, D₁, D₂, D₃, D₄, D_{end}) за период от 5 дни. Откриването и изброяването на *L. monocytogenes* е извършено съгласно ISO 11290 – 1/2017, и ISO 11290 – 2/2017 съответно.

Извършихме изброяването на *L. monocytogenes* в контаминираните проби чрез добавяне на 10 грама (еднократно пробовзимане) в плик Стомахер с предварително добавен 90 ml. стерилен физиологичен разтвор. Последва хомогенизиране на апарат Стомахер (Stomacher 400, Seward, UK) за 1 минута на 230 оборота (rpm-1).

От хомогената в торбички на Стомахер взехме 10 g или 25 g проба, която със стерилна ножица и пинцета нарязвахме на дребни парченца в близост до пламък на газова горелка.

Извършихме изолирането на *Salmonella* съгласно ISO 6579-1:2017. Преобогатяването постигнахме чрез добавяне на 10 грама проба в 90 ml. BPW. Обогажихме пробата чрез прехвърляне на 1 ml. BPW в MKTTn (Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin) бульон и 0.1 ml от BPW в Rappaport Vassiliadis (RV) бульон. Селективно обогатяване постигнахме чрез изпозване на XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar и Rambach agar. Серотипизирахме типични колонии от селективните среди съгласно CD CEN ISO/TR 6579-3:2014.

Контролните проби, инокулирани с 0.1 ml физиологичен разтвор изследвахме за изброяване на Общ брой микроорганизми (ОБМ) по техника със заливане при 30°C съгласно ISO 4833-1:2013.

Подготвените проби обработихме по ISO 11290, ISO 6579 и ISO 4833. Извършихме десетократни разреждания на първоначалната суспензия и получената суспензия разпределихме по повърхността на петрите с хранителна среда.

Измерихме pH съгласно препоръките на референтен метод ISO 2917:1999 – Месо и месни продукти – 10 грама от хомогенизирана проба се поставихме в делителен цилиндър с обем 100 ml. Заляхме до горна граница и оставихме 30 мин. на стайна температура. След това, прецедихме суспензията и част

от нея поставихме в пластмасов контейнер с обем 20 ml. Апаратът (Professional pH Meter PP-15, Sartorius) за изследване на pH беше калибриран с разтвори с предварително-зададено pH от 4.00 и 7.00. За получаване на достоверен резултат, pH измерихме трикратно.

Извършихме определянето на водната активност (a_w) чрез апарат Rotronic HygroLab C1 съгласно препоръките, заложи в ISO 18787:2017 – Храни – Определяне на водна активност. За нейното определяне, 20 g от пробите нарязвахме на частици 3-5 mm и прехвърлихме в пластмасов контейнер с обем 40 ml. След това поставихме пластмасовия контейнер в кухнята на металната измервателната сонда на апарата и затворихме херметично за 30 минути. Стойността a_w беше записана при достигане на константна величина. За получаване на достоверен резултат, водната активност (a_w) измерихме трикратно.

2.2.5. Прогнозна микробиология

Първичен прогнозен модел на растежа (Първично моделиране на *Listeria monocytogenes*)

Извършихме първично моделиране в проведените от нас опити с цел установяване на растежния потенциал и свързаните с него параметри за *L. monocytogenes* при различни месни продукти и различни температури. В оценките на модела включихме pH и a_w . Получените от моделирането два коефициента ни позволиха да се направи заключение за прогнозен срок на годност и прогнозна безопасност. Използвахме модели на софтуерно прогнозиране чрез първичен и вторичен модел. Растежната кинетика на микробиологичните популации се състои от четири фази: лаг фаза, експоненциална фаза, стационарна фаза и летална фаза.

В литературата са описани разнообразни модели, които описват тези фази. Избрахме и използвахме софтуерен модел със забавяне и разпад на данни (Sym'Previous software®), който позволява добро прогнозиране на микробиологичния растеж чрез четири дескриптивни параметъра: продължителност на лаг фазата (lag), максимален темп на растежа (μ_{max}), първоначален размер на бактериалната концентрация (N_0) и максимален размер на бактериалната концентрация (N_{max}). Данните от всеки

параметър са въведени и преизчислени по следната формула (Sym'Previous software ®) (Уравнение 1):

$$(1) \quad \ln N(t) = \begin{cases} \ln N_0 & , t \leq lag \\ \ln N_{max} - \ln \left(1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \cdot e^{-\mu_{max} \cdot (t-lag)} \right) & , t > lag \end{cases}$$

където t е време (в часове), $N(t)$ е размера на бактериалната популация във време t (CFU/g), N_0 е първоначалната бактериална концентрация (CFU/g), N_{max} е максималната бактериална концентрация (CFU/g), lag е продължителността на лаг фазата (в часове) и μ_{max} е максималния темп на растеж (h^{-1}).

За да изчислим първичните прогнозни модели са необходими получените стойности за растеж на микроорганизмите (в log) в един вид продукт при една температура, получени от всеки ден на взимане на пробите. Преди да се пристъпи към изчисление на прогнозните криви е необходимо първо да се въведат всички дни на взимане на пробите (в часове). Например ако целия период на провеждане на експеримента е бил 5 дни, а пробовзимането е осъществявано на всеки 24 часа, то ще бъдат получени следните данни: 0, 24, 48, 72, 96, 120 часа. След подредбата на тези резултати следва да бъдат въведени в статистическия софтуер (за нуждите на нашето изследване това бе софтуера SymPrevious®) данните за растежа на бактериите, като е необходимо срещу всеки етап на взимане на проби да бъдат въведени отговарящите му данни за растеж (в log единици). След като изчислихме прогнозния модел освен прогнозната крива получихме информация за темпа на растеж на микроорганизмите (μ_{max}), първоначалната и максимална популация на бактериите.

Генерационното време на *L. monocytogenes* при всички групи продукти (при трите температури на съхранение) беше получено чрез изчисление със софтуера за първично прогнозно моделиране Sym'Previous software ®.

За валидиране на данните получени от първичното моделиране избрахме коефициента на определяне (R^2), като неговото изчисление беше постигнато чрез статистически софтуер SPSS Statistics ®. Този коефициент е от особено

значение при валидиране на получените прогнозни криви като дава информация колко близо прогнозния модел се доближава до получените реални данни от изследването. Чрез него прогнозираните стойности между отделните дни са достоверни (т.е. колко добре регресионните прогнози могат да се съпоставят с реалните данни). Колкото по-близо стойността на R^2 е до 1, толкова по-достоверен е прогнозния модел. За да бъде изчислен R^2 беше необходимо първоначално да се изчисли корелационния коефициент (Pearson correlation) (също чрез SPSS Statistics ®) между периодите на пробовзимане (в часове) и получените резултати за растеж (в log CFU/g) на *L. monocytogenes*, инокулирана върху повърхността на всички изследвани продукти за всеки отделен опит. R^2 всъщност представлява корен квадратен функция на Pearson correlation. Като пример може да се даде изчислението на корелационния и определителен коефициент на *L. monocytogenes*, инокулирана върху повърхността на печено свинско месо (*m. longissimus dorsi*) (опит 1) при температура на съхранение 10°C. При въвеждането на данни в програмата беше необходимо да се попълнят поне две колони с данни (Фигура 1). В нашият пример това бяха колонки време (time) и бактериален растеж (log).

	time	log
1	.00	1.95
2	48.00	2.96
3	96.00	4.85
4	144.00	6.90
5	192.00	7.76
6	240.00	8.18
7	288.00	8.64
8	336.00	8.97

Фиг.1. Въвеждане на данни в две колони (time - време и log) за изчисление на корелационен и определителен коефициент на *Listeria monocytogenes* върху повърхността на печено свинско месо (*m. longissimus dorsi*) (опит 1) при температура на съхранение 10°C (SPSS Statistics Software ®).

Колонка time беше със следните данни (в часове) – 0 (ден 0), 48 (ден 2), 96 (ден 4), 144 (ден 6), 192 (ден 8), 240 (ден 10), 288 (ден 12), 336 (ден 14). В колонка log – 1.95, 2.96, 4.85, 6.90, 7.76, 8.18, 8.64, 8.97 за съответните дни. След попълването на данните пристъпихме към регресионен анализ на данните (от падащото меню на програмата Analyze>Regression>Linear). След приключване на анализа получихме информация както за корелационния коефициент (Pearson Correlation = R), така и за коефициента на определяне (R^2) (Фигура 2).

Correlations				
		time	log	
time	Pearson Correlation	1	.957	
	Sig. (2-tailed)		.000	
	N	8	8	
log	Pearson Correlation	.957	1	
	Sig. (2-tailed)	.000		
	N	8	8	

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.957 ^a	.915	.901	.84675

a. Predictors: (Constant), time

Фиг.2. Регресонен линеен анализ на данни на *Listeria monocytogenes* върху повърхността на печено свинско месо (*m. longissimus dorsi*) (опит 1) при температура на съхранение 10°C. Представен е коефициента на корелация (Pearson Correlation=R),който е равен на 0.957. Също така е представен и коефициента на корелация (R^2 =R Square), който представлява коренова функция на R – $\sqrt{0.957} = 0.915$ (SPSS Statistics Software ®).

За оценка и валидиране на първичните прогнозни модели, както и колко ефективно прогнозираните резултати отговарят на реалните резултати, избрахме корелационния коефициент (Pearson correlation) и коефициента на определяне (R^2) (Уравнения 2 и 3):

$$(2) \quad r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[N\sum x^2 - (\sum x)^2][N\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$(3) \quad R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^m (X_i - Y_i)^2}{\sum_{i=1}^m (\bar{Y} - Y_i)^2}$$

където X_i е прогнозната стойност на i^{th} , а Y_i е истинската стойност на i^{th} . Регресионният модел прогнозира стойността на X_i за отговарящата на нея стойност на Y_i от зададените данни.

Вторичен прогнозен модел на растежа (Вторично моделиране на *Listeria monocytogenes*)

Вторичните модели се използват за прогнозиране ефекта на параметри на средата, които повлияват на микробната кинетика в хранителните продукти: температура, pH, водна активност (a_w), NaCl, др. Ние проследихме ефекта на температурата върху максималния темп на растеж на *L. monocytogenes* върху хранителните матрици. Получените данни за максимален темп на растеж (μ_{max}), съответните температури на които са съхранени пробите и субоптималните температури на съхранение приложихме към субоптималното корен-квадратен уравнение (suboptimal square-root) (Уравнение 4):

$$(4) \quad \mu_{max} = [a(T - T_{min})]^2$$

където μ_{max} е максималния темп на растеж (h^{-1}); a е коефициент на субоптималното корен-квадратен уравнение, T е температура ($^{\circ}C$) и T_{min} е минимална температура ($^{\circ}C$).

Изчислихме вторичните прогнозни модели чрез статистическа програма (Microrisk Lab v1.2 ®). За да проучим ефекта на температурата върху растежния потенциал на *L. monocytogenes*, ни бяха необходими максималните темпове на растеж на патогенната бактерия, култивирана на една хранителна матрица при всички температури на съхранение за дадения опит. Например, когато става въпрос за вторично моделиране на динамиката на *L. monocytogenes*, инокулирана върху повърхността на филе Елена (опит 3), бяха избрани всички темпове на растеж на бактерията от този опит (0.069 ± 0.345 , 0.006 ± 0.006 , 0.010 ± 0.007) и трите температури на съхранение ($6^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ и $25^{\circ}C$). Срещу всяка температура въведохме съответния темп на растеж. Получената крива отразява прогнозирането на темпа на растеж при всяка температура в диапазона от 6 до $25^{\circ}C$.

Избраните параметри за валидиране на вторичните прогнозни модели бяха средна квадратна грешка (MSE – Mean Square Error)(Уравнение 6) и корен квадратен на средната грешка (RMSE – Root-Mean Square Error)(Уравнение 7). За да изчислим средната квадратна грешка, предварително изчислихме остатъчната квадратна стойност (RSS – residual sum of squares) (Уравнение 5):

$$(5) \quad RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$$(6) \quad MSE = \frac{RSS}{n-k}$$

$$(7) \quad RMSE = \sqrt{MSE}$$

където y_i е i^{th} наблюдавана стойност, $\hat{y}_i$ е съответстващата прогнозна стойност и n е броят на наблюдаваните резултати и k е броя на параметрите.

Прогнозиране на срок на годност

Получените от нас данни за генерационно време при изчисление на първичните прогнозни модели (изчислени от статистическия софтуер и представени в раздел Резултати) използвахме, за да установим срока на годност на продукта с оглед неговата безопасност при ниски и високи температури на съхранение. Установихме времето за достигане на критерия за безопасност (100 CFU/g), заложен в Регламент 2073/2005 за готови за консумация продукти при потенциална контаминация с този микроорганизъм. Изчислихме кога продуктите достигат този критерий при първоначална концентрация на *L. monocytogenes* от 1 CFU/g.

За да установим времето за достигане на концентрация от 1 до 100 CFU/g на *L. monocytogenes* беше използвана следната формула (8):

$$(8) \quad f = i \times 2^n$$

където f е краен брой бактерии (CFU/g) (в нашето изследване $f = 100$); i е първоначалния брой бактерии (CFU/g) (в нашето изследване $i = 1$), а n е броят на генерациите на *L. monocytogenes*. Показателят n беше изчислен като прогнозното време беше разделено на генерационното време на бактериите за всяка отделна температура.

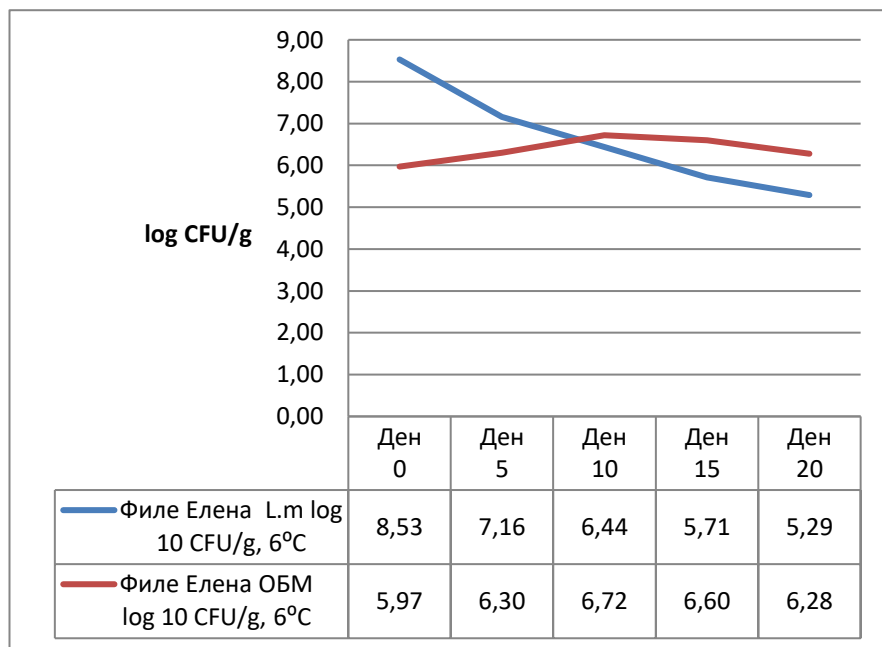
Статистически анализ

За извършване на статистически анализ е използван метод ANOVA, за проучване и анализиране на различията между средните стойности в групите проби. Използвахме статистически софтуер Microsoft Excel и SPSS statistics software. Разлика в стойността $p < .05$ се счита за значима.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Експериментално контаминиран сурово сушен месен продукт - филе „Елена“

Установеното от нас рН от 5.69 е по-високо от минималното за растеж на *L. monocytogenes* (рН от 4.2-4.4), а водната активност (a_w) 0.891 е по-ниска от 0.920 - минималната стойност позволяваща растеж на *L. monocytogenes* съгласно Регламент (ЕС) 2073/2005. Инокулираните слайсове от продукта с 0.1 мл от бактериалната суспензия на *L. monocytogenes* показаха повишена a_w с 0.015 единици стойност от $a_w = 0.906$.



Фиг.3. Растежна динамика на *Listeria monocytogenes* и ОБМ във филе „Елена“ на температура от 6°C за период на съхранение 20 дни – опит 1

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)
Ден 0	5.15 ± 0.10	6.90 ± 0.35	5.15 ± 0.10	6.90 ± 0.35	5.15 ± 0.10	6.90 ± 0.35
Ден 5	7.42 ± 0.09	7.92 ± 0.16	6.96 ± 0.18	7.56 ± 0.07	7.77 ± 0.17	8.39 ± 0.28
Ден 10	7.42 ± 0.09	8.06 ± 0.21	7.55 ± 0.33	7.93 ± 0.13	7.84 ± 0.19	8.52 ± 0.32
Ден 15	7.27 ± 0.11	8.19 ± 0.01	7.46 ± 0.18	8.01 ± 0.06	8.14 ± 0.02	8.33 ± 0.28
Ден 20	7.31 ± 0.10*	8.20 ± 0.05	7.45 ± 0.13*	8.42 ± 0.07	7.99 ± 0.13*	8.27 ± 0.02

Таблица 2. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на филе Елена, за период от 20 дни при температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C (mean + SD) – опит 2

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)
Ден 0	4.78 ± 0.12	6.81 ± 0.30	4.78 ± 0.12	6.81 ± 0.30	4.78 ± 0.12	6.81 ± 0.30
Ден 5	6.87 ± 0.08	7.53 ± 0.13	6.83 ± 0.06	7.79 ± 0.08	7.67 ± 0.40	8.43 ± 0.04
Ден 10	7.06 ± 0.09	7.64 ± 0.11	7.07 ± 0.05	7.87 ± 0.23	7.73 ± 0.39	9.09 ± 0.37
Ден 15	6.35 ± 0.17	7.99 ± 0.03	7.08 ± 0.51	8.03 ± 0.28	6.85 ± 0.13	8.57 ± 0.16
Ден 20	7.24 ± 0.28*	8.16 ± 0.07	6.32 ± 0.29*	8.26 ± 0.11	7.77 ± 0.65*	8.70 ± 0.08

Таблица 3. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на филе Елена, за период от 20 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C (mean + SD) – опит 3

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

ОБМ на продукта е със стойност от 5.97 log CFU/g в началото на експеримента (D_0). Преди инокулиране продуктът показва отрицателен резултат за наличие на *Listeria spp.*

На фигура 3 са показани резултатите от първия от двата експеримента за растежната динамика на *L. monocytogenes*, при съхранение на 6°C за период от 20 дни.

Получените от нас стойности за растеж на *L. monocytogenes* и ОБМ при провеждане на опит 2 и получени за период от 20 дни са представени във Таблица 2. В началото на експеримента стойността на pH бе 5.71, а в неговия край – 5.57. . В началото на експеримента (D_0), на повърхността на контаминираните с *L. monocytogenes* слайсове филе Елена отчетохме концентрация от 5.15 log₁₀ CFU/g. При контролните проби отчетохме стойности на ОБМ от 6.90 log₁₀ CFU/g.

Третият експеримент представляваше повторение на втори експеримент, но с по-ниска първоначална концентрация на използваната смес от щамове *L. monocytogenes* – 4.78 log CFU/g (D_0). Стойностите за растеж на *L. monocytogenes* и ОБМ по време на трети експеримент, получени за период от 20 дни, са представени в Таблица 3.

3.2. Експериментално контаминиран малотраен варено-пушен продукт „Биренка“

Преди инокулирането изследвания продукт показва стойности за pH – 6.07, a_w – 0.968 и отрицателен резултат за наличие на *L. monocytogenes*. Естествената микрофлора на биренката беше с концентрация от 5.54 log₁₀ CFU/g, отчетена на D_0 . В същия ден, повърхностната концентрация на *L. monocytogenes* върху контаминираните продукти беше 1.00 log₁₀ CFU/g

Стойностите за растеж на *L. monocytogenes* и ОБМ по време на първи опит, получени за период от 10 дни, са представени във Таблица 4.

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)
Ден 0	1.00 ± 0.09	5.54 ± 0.56	1.00 ± 0.09	5.54 ± 0.56	1.00 ± 0.09	5.54 ± 0.56
Ден 2	1.00 ± 0.23	6.27 ± 0.16	1.48 ± 0.56	6.56 ± 0.40	3.10 ± 0.06 (Ден 1)	6.21 ± 0.69 (Ден 1)
Ден 4	2.11 ± 0.56	6.93 ± 0.09	1.60 ± 0.37	7.76 ± 0.27	3.58 ± 0.29 (Ден 2)	7.31 ± 0.26 (Ден 2)
Ден 6	1.30 ± 0.08	8.03 ± 0.10	1.00 ± 0.88	8.84 ± 0.13	4.55 ± 0.10 (Ден 3)	8.69 ± 0.25 (Ден 3)
Ден 8	1.48 ± 0.27	8.66 ± 0.65	1.00 ± 0.73	8.66 ± 0.62	6.14 ± 0.09* (Ден 4)	8.73 ± 0.17 (Ден 4)
Ден 10	1.48 ± 0.27**	-	1.30 ± 0.35**	-	-	-

Таблица 4. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на малотраен-варено пушен продукт (биренка) за период от 10 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 1
Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)
Ден 0	3.28 ± 0.38	4.92 ± 0.22	3.28 ± 0.38	4.92 ± 0.22	2.34 ± 0.64	6.37 ± 0.48
Ден 2	3.50 ± 0.21	6.85 ± 0.25	3.39 ± 0.06	6.32 ± 0.18	2.51 ± 0.22 (Ден 1)	8.57 ± 0.16 (Ден 1)
Ден 4	3.51 ± 0.28	8.46 ± 0.32	3.10 ± 0.18	8.84 ± 0.18	2.04 ± 0.13 (Ден 2)	8.92 ± 0.10 (Ден 2)
Ден 6	3.64 ± 0.36	8.97 ± 0.35	3.13 ± 0.10	9.23 ± 0.12	2.04 ± 0.33 (Ден 3)	8.75 ± 0.49 (Ден 3)
Ден 8	3.42 ± 0.13	8.80 ± 0.35	2.66 ± 0.13	9.21 ± 0.21	2.73 ± 0.09** (Ден 4)	-
Ден 10	3.48 ± 0.04**	-	2.36 ± 0.12*	-	-	-

Таблица 5. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на малотраен-варено пушен продукт (биренка) за период от 10 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 2

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

	6oC			10oC		
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15);	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Salmonella</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Salmonella</i> ; Log10 CFU/g (n=15)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=15)
Ден 0	2.88 ± 0.09	2.94 ± 0.22	1.26 ± 0.09	2.88 ± 0.09	2.94 ± 0.22	1.26 ± 0.09
Ден 2	2.56 ± 0.25	2.66 ± 0.81	5.61 ± 0.36	2.66 ± 0.23	2.26 ± 0.35	1.26 ± 0.89
Ден 4	2.44 ± 0.40	2.96 ± 0.92	5.45 ± 0.43	3.59 ± 0.34	3.24 ± 0.78	6.03 ± 0.39
Ден 6	3.65 ± 1.09	3.00 ± 0.53	6.11 ± 0.07	3.67 ± 0.60	3.81 ± 0.28	7.18 ± 0.18
Ден 8	3.41 ± 0.29**	3.71 ± 0.37*	7.27 ± 0.14	3.39 ± 0.65**	4.07 ± 0.59*	8.68 ± 0.05

Таблица 6. Стойности за *Listeria monocytogenes* (самостоятелно и в комбинация със серовари *Salmonella*) и ОБМ на повърхността на малотраен варено-пушен продукт (биренка) за период от 8 дни при две температури на съхранение: 6oC и 10oC (mean + SD) – опит 3

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

Преди провеждането на втори опит (повторение) установихме липса на естествена контаминация с *L. monocytogenes*, както и показателите pH и a_w – 6.28 и 0.954. Инокулирахме пробите със смес от щамове *L. monocytogenes*. Установихме първоначалната концентрация върху повърхността на продукта (D_0) 3.28 log₁₀ CFU/g (за проби съхранени на 6°C и 10°C) и 2.34 log₁₀ CFU/g (за проби съхранени на 25°C). Отчетените стойности за ОБМ в контролните проби бяха следните: 4.92 log₁₀ CFU/g (за проби съхранени на 6°C и 10°C) и 6.37 log₁₀ CFU/g (за проби съхранени на 25°C). Получените резултати за целия период на провеждане на втори опит са представени в Таблица 5.

При провеждането на трети експеримент (повторение) прибавихме към използвания в предходните опити инокулата и серовари *Salmonella* в комбинация с щамовете *L. monocytogenes*. Подготвихме и инокулати само с отделните бактерии (само *Salmonella* и само *Listeria*) Слайсовете биренка бяха изследвани за естествено наличие на *Listeria* и *Salmonella*. Получените резултати бяха отрицателни. Водната активност на продукта (a_w) беше със стойност от 0.954, а pH – 6.45. След инокулиране на продукта в началото на експеримента (D_0) полулационната плътност на щамовете *L. monocytogenes* на повърхността на слайсовете биренка беше 2.88 log₁₀ CFU/g (за пробите инокулирани само с *L. monocytogenes*) и 2.94 log₁₀ CFU/g (инокулирани със смес от *L. monocytogenes* и *Salmonella*). Отчетохме стойности за ОБМ 1.26 log₁₀ CFU/g. Получените резултати за целия период на провеждане на трети опит са представени в Таблица 6.

3.3. Експериментално контаминиран малотраен варено-пушен продукт „Свинско контрафиле/пражка шунка“

Установихме стойности на продукта за pH – 6.19 и a_w – 0.943. Преди контаминиране изследвахме продуктът за естествено контаминиране с *L. monocytogenes*, като получения резултат беше отрицателен. ОБМ на варено-пушеното филе беше с концентрация от 6.59 log₁₀ CFU/g, отчетена в началото на опита (D_0). В същият ден, концентрацията на *L. monocytogenes* на

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)
Ден 0	1.95 ± 0.21	6.59 ± 0.17	1.95 ± 0.21	6.59 ± 0.17	1.95 ± 0.21	6.59 ± 0.17
Ден 2	2.99 ± 0.06	8.06 ± 0.10	3.61 ± 0.19	8.57 ± 0.13	4.63 ± 0.15 (Ден 1)	7.36 ± 0.26 (Ден 1)
Ден 4	3.96 ± 0.37	8.83 ± 0.18	3.26 ± 0.35	9.01 ± 0.11	6.77 ± 0.36 (Ден 2)	8.58 ± 0.17 (Ден 2)
Ден 6	3.44 ± 0.48	9.38 ± 0.45	3.61 ± 0.27	9.29 ± 0.32	6.49 ± 0.25** (Ден 3)	8.58 ± 0.30 (Ден 3)
Ден 8	2.96 ± 0.05**	-	3.89 ± 0.15*	-	-	-

Таблица 7. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на малотраен-варено пушен продукт (филе) за период от 8 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 1

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

Ден 0	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)
	2.99 ± 0.31	3.39 ± 0.71	2.99 ± 0.31	3.39 ± 0.71	1.78 ± 0.26	4.81 ± 0.03
Ден 2	3.10 ± 0.13	4.87 ± 0.21	3.15 ± 0.14	6.28 ± 0.41	4.30 ± 0.08 (Ден 1)	8.64 ± 0.12 (Ден 1)
Ден 4	3.91 ± 0.05	6.26 ± 0.18	5.61 ± 0.12	8.86 ± 0.23	5.09 ± 0.19 (Ден 2)	9.16 ± 0.12 (Ден 2)
Ден 6	4.38 ± 0.07	6.67 ± 0.38	5.71 ± 0.14	9.08 ± 0.41	6.36 ± 0.08 (Ден 3)	8.78 ± 0.52 (Ден 3)
Ден 8	5.23 ± 0.03	9.31 ± 0.38	5.50 ± 0.25	9.30 ± 0.33	7.64 ± 0.42* (Ден 4)	-
Ден 10	5.31 ± 0.18*	-	7.46 ± 0.51*	-	-	-

Таблица 8. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на малотраен-варено пушен продукт (филе) за период от 10 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 2

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

	6°C			10°C		
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5);	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Salmonella</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Salmonella</i> ; Log10 CFU/g (n=5)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=5)
Ден 0	4.46 ± 0.11	4.15 ± 0.08	6.35 ± 0.12	4.46 ± 0.11	4.15 ± 0.08	6.35 ± 0.12
Ден 2	5.59 ± 0.13	6.06 ± 0.09	8.48 ± 0.24	6.27 ± 0.33	5.72 ± 0.06	8.49 ± 0.10
Ден 4	6.66 ± 0.05	6.40 ± 0.35	9.32 ± 0.11	7.84 ± 0.62	6.85 ± 0.13	9.63 ± 0.22
Ден 6	7.07 ± 0.23	6.96 ± 0.27	9.04 ± 0.17	7.87 ± 0.13	6.94 ± 0.36	9.65 ± 0.69
Ден 8	7.29 ± 0.05*	6.41 ± 0.30*	-	7.79 ± 0.52*	6.82 ± 0.09*	-

Таблица 9. Стойности за *Listeria monocytogenes* (самостоятелно и в комбинация със серовари *Salmonella*) и ОБМ на повърхността на малотраен варено-пушен продукт (филе) за период от 8 дни при две температури на съхранение: 6°C и 10°C (mean ± SD) – опит 3

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

повърхността на филето беше $1.95 \log_{10}$ CFU/g. Пробите слайсове поставени на 25°C бяха отчитани всеки ден в продължение на четири дни, поради по-бързо настъпващите процеси на развала на продукта. Получените резултати са представени в таблица 7.

Установихме липса на естествена контаминация с *L. monocytogenes*, както и стойностите на pH и a_w – 6.41 и 0.958 в началото на втори опит. Инокулирахме пробите слайсове със щамове *L. monocytogenes*. Първоначалната концентрация върху повърхността на продукта (D_0) беше $2.99 \log_{10}$ CFU/g (6°C ; 10°C) и $1.78 \log_{10}$ CFU/g (25°C). На повърхността на контролните проби ОБМ беше със следните стойности: $3.39 \log_{10}$ CFU/g (еднакви за 6°C и 10°C) и $4.81 \log_{10}$ CFU/g (25°C). Резултатите от опит 2 за целия период на съхранение при трите температури са представени в таблица 8.

В началото на третият опит слайсовете филе бяха изследвани за естествено наличие на *L. monocytogenes* и *Salmonella*, като получения резултат беше отрицателен. Водната активност на продукта (a_w) беше със стойност от 0.958, а pH – 6.31. След инокулиране на продукта, отчетохме популационна плътност от $4.46 \log_{10}$ CFU/g (D_0) на *L. monocytogenes* при самостоятелно контаминиране и $4.15 \log_{10}$ CFU/g в комбинация с щамове *Salmonella*. Измерената стойност за ОБМ на този ден беше $6.35 \log_{10}$ CFU/g. Данните са представени в таблица 9.

3.4. Експериментално контаминирано печено свинско месо (*m. longissimus dorsi*)

След производството печеното свинско каре показва pH – 5.94, водна активност (a_w) – 0.968, отрицателен резултат за *L. monocytogenes* и ОБМ $3.48 \log_{10}$ CFU/g. След контаминиране повърхностната концентрация на *L. monocytogenes* беше $1.95 \log_{10}$ CFU/g. Получените резултати за периода на съхранение от 14 дни са представени в Таблица 10.

Преди инокулиране на пробите печено свинско каре за втория опит, установихме pH 5.83 и водна активност (a_w) 0.976. Отрицателен беше резултатът за контаминиране с *L. monocytogenes*.

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)
Ден 0	1.95 ± 0.43	3.48 ± 0.59	1.95 ± 0.43	3.48 ± 0.59	1.95 ± 0.43	3.48 ± 0.59
Ден 2	2.26 ± 0.39	3.66 ± 0.92	2.96 ± 0.03	2.66 ± 0.23	4.76 ± 0.59 (Ден 1)	2.80 ± 0.52 (Ден 1)
Ден 4	3.62 ± 0.55	3.83 ± 0.79	4.85 ± 0.32	3.27 ± 0.44	7.49 ± 0.70 (Ден 2)	4.71 ± 0.21 (Ден 2)
Ден 6	4.08 ± 0.08	3.85 ± 0.86	6.90 ± 0.17	3.92 ± 0.84	9.27 ± 0.13 (Ден 3)	7.85 ± 0.53 (Ден 3)
Ден 8	4.83 ± 0.14	4.51 ± 0.87	7.76 ± 0.21	3.92 ± 0.91	9.44 ± 1.01* (Ден 4)	8.87 ± 0.22 (Ден 4)
Ден 10	5.72 ± 0.21	4.49 ± 0.84	8.18 ± 0.09	4.59 ± 0.82	-	-
Ден 12	7.14 ± 0.11	4.75 ± 0.93	8.64 ± 0.08	4.72 ± 0.87	-	-
Ден 14	7.80 ± 0.12*	3.39 ± 0.27	8.97 ± 0.37*	3.82 ± 0.20	-	-

Таблица 10. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на печено свинско месо (*longissimus dorsi*) за период от 14 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 1
Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

	6°C		10°C		25°C	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)	<i>Listeria monocytogenes</i> ; Log10 CFU/g (n=8)	ОБМ; Log10 CFU/g (n=8)
Ден 0	2.00 ± 0.06	3.06 ± 0.34	2.00 ± 0.06	3.06 ± 0.34	2.00 ± 0.06	3.06 ± 0.34
Ден 2	2.86 ± 0.58	2.86 ± 0.57	2.26 ± 0.12	2.66 ± 0.78	3.91 ± 0.70 (Ден 1)	2.86 ± 0.34 (Ден 1)
Ден 4	2.56 ± 0.16	2.56 ± 0.69	2.56 ± 1.01	2.26 ± 0.58	7.43 ± 0.72 (Ден 2)	5.14 ± 0.22 (Ден 2)
Ден 6	3.67 ± 0.06	4.73 ± 0.09	3.33 ± 0.15	2.26 ± 1.15	9.14 ± 0.32 (Ден 3)	6.75 ± 0.06 (Ден 3)
Ден 8	5.03 ± 0.16	5.03 ± 0.28	5.74 ± 0.10	3.40 ± 0.59	8.91 ± 0.27* (Ден 4)	8.05 ± 0.19 (Ден 4)
Ден 10	6.29 ± 0.11	5.32 ± 0.05	6.99 ± 0.16	4.06 ± 0.09	-	-
Ден 12	6.88 ± 0.10	5.66 ± 0.07	8.10 ± 0.11	5.83 ± 0.04	-	-
Ден 14	8.00 ± 0.08*	6.86 ± 0.14	7.60 ± 0.05*	4.80 ± 0.58	-	-

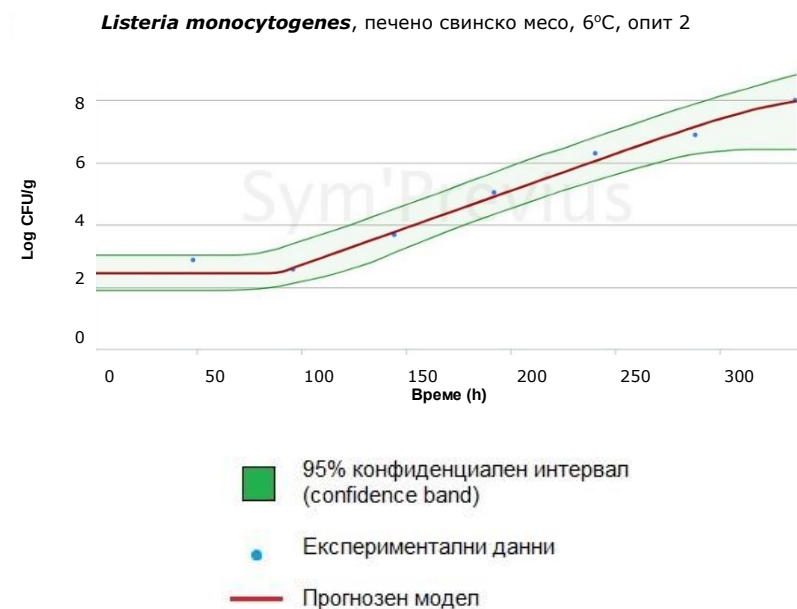
Таблица 11. Стойности за *Listeria monocytogenes* и ОБМ на повърхността на печено свинско месо (*longissimus dorsi*) за период от 14 дни при три температури на съхранение: 6°C, 10°C и 25°C. (mean + SD) – опит 2

Легенда: Статистическа значимост * ($p \leq .05$); ** ($p > .05$)

Отчетохме стойност след контаминиране на *L. monocytogenes* от 2.00 log₁₀ CFU/g (D₀), а ОБМ в контролните проби - 3.06 log₁₀ CFU/g (D₀). Резултатите, получени по време на провеждане на втори опит (експеримент) са обобщени в Таблица 11.

3.5. Прогнозна микробиология чрез първично и вторично моделиране

3.5.1. Първично моделиране (Primary growth modelling)



Фиг.4. Първично моделиране на растежа на *Listeria monocytogenes*, получен в резултат на два опита с инокулация върху повърхността на термично-обработен продукт (печено свинско каре) при 6°C.

Фигура 4 представя резултатът от първичното моделиране чрез софтуера за прогнозиране на микорбиологични данни (Sym'Previous ®). При тълкуване на получените резултати (криви) взехме предвид отделните елементи на кривата. Конфиденциалният интервал (95%) е представен като зелена зона на всяка една от фигурите. В неговите граници попадат експерименталните данни, както и прогнозния модел. Конфиденциалният интервал се изразява в проценти (в нашия случай беше с фиксиран на 95% конфиденциален интервал). Това означава, че повтори ли се същия експеримент безброй пъти в 95% от случаите получените резултати ще отговарят на резултатите получени от реалния бактериален растеж. Като пример може да се даде конфиденциалния интервал на *L. monocytogenes* инокулирана върху печено свинско месо, опит 2 (6°C), ден 10 от пробовзимане (Фиг. 4). Конфиденциалният интервал на 240-ния час (ден 10) беше в границите 5.54 – 6.96 (log CFU/g). Това означава, че ако повторим опита по същия начин, в 95% от с получените резултати ще попадат в границата 5.54 – 6.96 (log CFU/g). Прогнозните данни са представени като дълга непрекъсната (червена) линия, а експерименталните (реални) данни са представени като точки (сини), които съвпадат или не с прогнозните данни. При високи стойности на R^2 , прогнозните и реални данни съвпадат и това се вижда визуално като прогнозната червена линия преминава през повечето реални данни. При стойност от 1.00 на R^2 прогнозната линия ще премине през всички експериментални данни. Връщайки се към горния пример, на 240 час получената реална стойност е 6.29 log CFU/g. Прогнозната стойност е 6.02 log CFU/g. R^2 за този продукт при 6°C е 0.98, т.е стойност близка до 1.00. Предимството на този тип модели е в това, че дават информация за темпа на растеж на микроорганизмите във всеки един момент от периода на съхранение на продукта, без да е необходимо да се извършва пробовзимане в дадения период. След като се уверихме, че дадения прогнозен модел е достоверен (валидиран), приложихме тези данни при определяне срока на годност на продукта и с какъв темп бактериите биха се развили в него за интересувания ни период. Отново като пример може да се даде инокулираната върху печено свинско месо, опит 2

(6°C) *L. monocytogenes*. Изхождайки от факта, че полученият от нас прогнозен модел е валиден (стойност на R^2 близка до 1.00) можем да дадем информация за растежа на час 70 от инокулацията на патогена – 2.43 log CFU/g, час 168 – 4.33 log CFU/g, час 300 – 7.45 log CFU/g и така нататък. За тези часове не са налични експериментални (реални) данни.

3.5.2. Модел за прогнозиране на срок на годност в месни продукти

На фигури 5, 6, 7 и 8 са представени времената (в часове) за достигане на 100 CFU/g на *L. monocytogenes* в четири месни продукта. На фигурите са представени кривите на модела на растеж на патогенния микроорганизъм (в синьо). Също така ясно си личи и критерия за безопасност за *L. monocytogenes* в този тип продукти (оранжева непрекъсната линия) от 100 CFU/g. След неговото достигане изследвания продукт спира да бъде безопасен за консумация (Регламент 2073/2005). Използвайки генерационното време, получено от първичните прогнозни модели и изчисляването чрез формула (формула 8, раздел „Материал и методи“) успяхме да прогнозираме времето за увеличаване на броя от една колония образуваща единица (1 CFU/g) до 100 CFU/g при потенциална контаминация с *L. monocytogenes* в хранителен продукт. Моделът може да бъде приложен и при началани концентрации, различни от 1 CFU/g (2 CFU/g, 5 CFU/g, 10 CFU/g и др.), както и при различни температури на съхранение и генерационни времена.

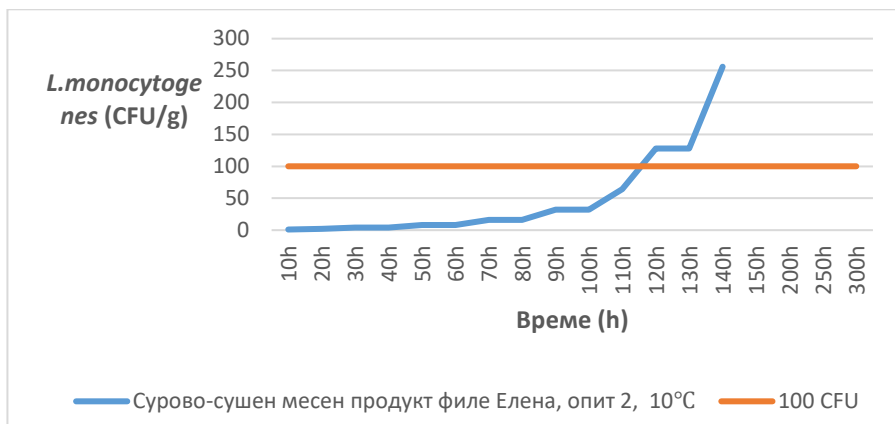
При прогнозиране на срока на годност на филе Елена (опит 2, 10°C) от гледната точка на неговата безопасност за консумация, използвахме предходни данни за генерационното време на този продукт за изчислението на нов прогнозен модел. Използвахме получената стойност за генерационно време от 18.35 (h). Изчислявайки чрез гореспоменатата формула установихме времето за достигане на концентрация от 100 CFU/g между 110 и 120 час, при температура на съхранение от 10°C и генерационно време 18.35(h) (фигура 5). Броят на генерациите на *L. monocytogenes* за този период беше 6, т.е делението на бактерията беше настъпило шест пъти ($110/18.35 = 6$). Получената стойност (6) представляваше стойността на n във

формулата и ни беше необходима, за да изчислим количеството бактерии в този времеви диапазон. По същият начин, но с различни стойности за генерационно време изчислихме и още три бактериални концентрации (при продукти биренка, свинско филе и печено свинско месо). Получените стойности за брой на генерациите бяха закръглени до цяло число.

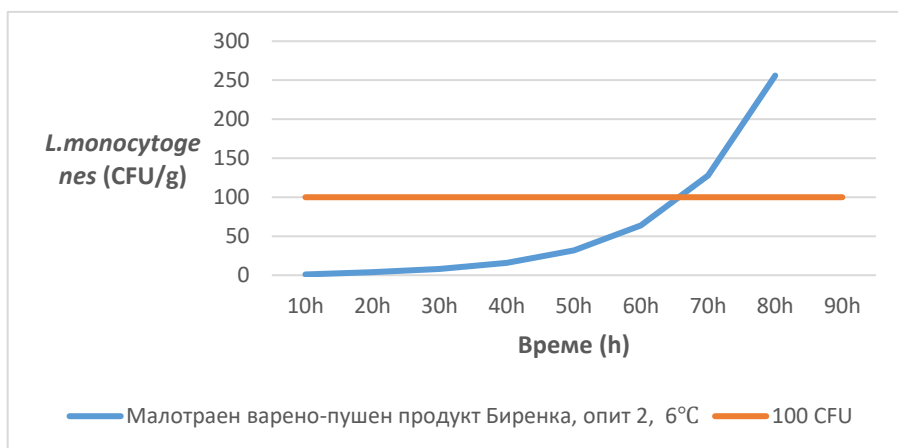
Изследвайки малотрайният варено – пушен продукт Биренка (опит 2, 6°C) установихме времето за достигане на концентрация от 100 CFU/g на *L. monocytogenes* да бъде в периода 60 – 70 час (фигура 6). Генерационното време на *L. monocytogenes* върху повърхността на слайсовете продукт беше 10.33 (h). Генерациите на *L. monocytogenes* бяха отново 6 на брой. ($60/10.33 = 6$).

При провеждане на нашите опити с малотраен варено – пушен продукт свинско филе (опит 1, 10°C) установихме време за достигане на концентрация от 100 CFU/g на *L. monocytogenes* между 200 – 250 час (фигура 7). Причината за по – дългият период на достигане на тази стойност, в сравнение с останалите ни продукти, е по – високата стойност за генерационно време – 37.24 (h). Поради тази причина отчетохме и само 5 генерации на *L. monocytogenes* ($200/37.24 = 5$).

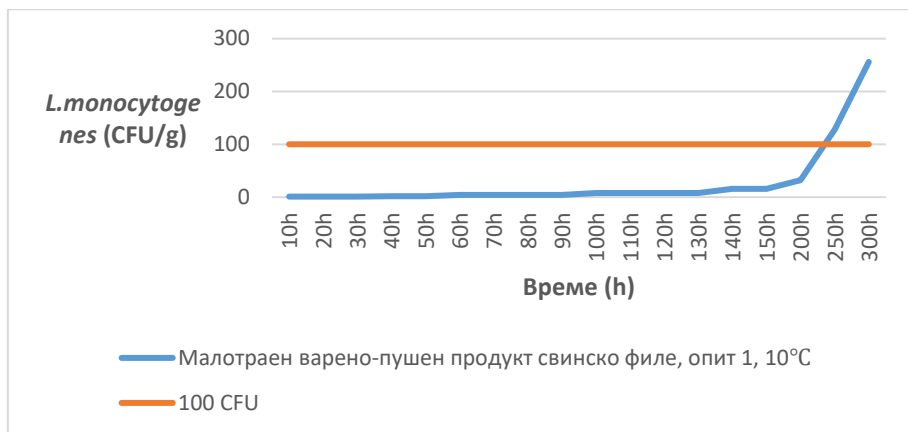
На последно място установихме период между 50 – 60 час (фигура 8) за достигане на 100 CFU/g. Тази стойност е получена чрез използването на генерационното време на *L. monocytogenes*, контаминирала слайсове печено свинско месо (опит 1, 10°C). В това изследване отчетохме 6 броя генерации на този патогенен микроорганизъм. Чрез този модел е възможно да бъде прогнозиран срока на годност за определен период от гледната точка на безопасност на хранителните продукти.



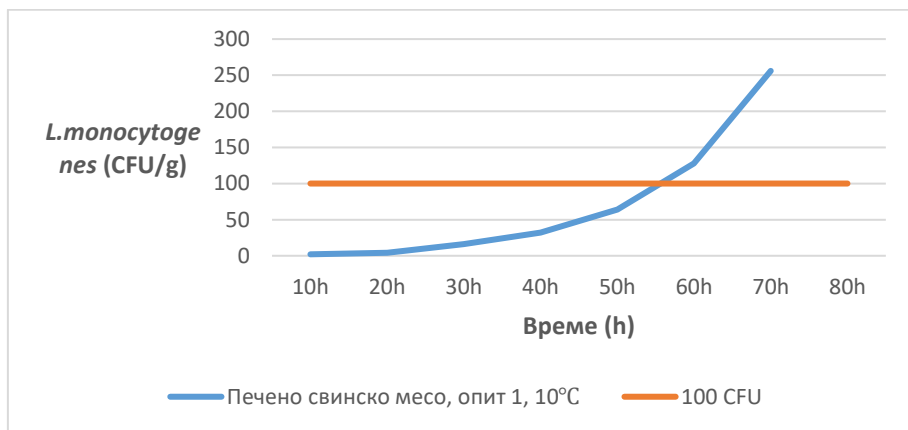
Фигура 5. Прогнозиране на срок на годност на филе "Елена" чрез време за достигане (в часове) на критерия за безопасност от 100 CFU/g (представена с червена линия) на *L. monocytogenes* от една колония образувача единица (1 CFU/g) върху повърхността на филе Елена (опит 2), 10°C.



Фигура 6. Прогнозиране на срок на годност на малотраен варено – пушен продукт Биренка чрез време за достигане (в часове) на критерия за безопасност от 100 CFU/g (представена с червена линия) на *L. monocytogenes* от една колония образувача единица (1 CFU/g) върху повърхността на малотраен варено – пушен продукт Биренка (опит 2), 6°C.



Фигура 7. Прогнозиране на срок на годност на малотраен варено – пушен продукт свинско филе чрез време за достигане (в часове) на критерия за безопасност от 100 CFU/g (представена с червена линия) на *L. monocytogenes* от една колония образувача единица (1 CFU/g) върху повърхността на малотраен варено – пушен продукт свинско филе (опит 1), 10°C.



Фигура 8. Прогнозиране на срок на годност на печено свинско месо чрез време за достигане (в часове) на критерия за безопасност от 100 CFU/g (представена с червена линия) на *L. monocytogenes* от една колония образувача единица (1 CFU/g) върху повърхността на печено свинско месо (опит 1), 10°C.

4. ИЗВОДИ

1. Установи се увеличена лаг фаза и/или липса на растеж на щамове *L. monocytogenes*, инокулирана върху малотрайни варено-пушени месни продукти при ниски температури на съхранение (6 и 10°C). При температура от 25°C този ефект не беше установявен, докато ОБМ и при трите температури на съхранение (6, 10 и 25°C) нарастнаха. Основна причина за това би могло да бъде приложението на консерванти в рецептурите на продуктите.

2. Установихме темпове на растеж върху повърхността на биренка при самостоятелно инокулиране (само *L. monocytogenes*) от 0.023 ± 0.022 (6°C) и 0.021 ± 0.028 (10°C), а при комбинирано контаминиране със *Salmonella* – 0.034 ± 0.011 (6°C) и 0.034 ± 0.073 (10°C). Генерационните времена бяха 30.70 ± 29.72 и 32.71 ± 42.90 (6 и 10°C, *L. monocytogenes*), а при комбиниране със *Salmonella* – 20.35 ± 6.80 (6°C) и 18.52 ± 36.20 (10°C). Това показва, че при комбинирано контаминиране на *L. monocytogenes* и *Salmonella* не следва да се очакват съществени разлики върху темпа на растеж и генерационното време на *L. monocytogenes*.

3. Темповете на растеж на *L. monocytogenes* не се повлияха от наличието на щамове *Salmonella* в малотрайните варено – пушени колбаси (биренка и свинско филе).

4. Върху слайсовете сурово-сушен продукт „филе Елена“ с водна активност ($a_w=0.906$) близка до минималната ($a_w=0.920$) установихме растеж на *L. monocytogenes*, поради увеличената водна активност на повърхността на продукта.

5. В сравнение с използването на натриев нитрат влагането на стартерна култура от *L. plantarum* и *D. hansenii* в месните продукти предотвратява растежа на патогенните и оцеляването на санитарно показателните бактерии.

6. Стартерна култура 2 съдържаща два типа лиофилизирани микроорганизми – млечнокисели бактерии *L. plantarum* GLP3 и дрожди *D. hansenii* ATCC 36329 показва по-добри инхибиращи свойства срещу патогенните бактерии в „Панагюрска луканка“, дори и пълно инхибиране на *Cl. perfringens* и *E. coli*.

7. Използването на статистически и прогнозни програми позволява по - лесно изчисление на прогнозните модели. Необходимо е получените резултати да бъдат валидирани чрез подходящи за модела параметри (R^2 , MSE, RMSE, др.). След успешна валидация прогнозните данни могат да бъдат използвани за прогнозиране срока на годност.

5. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. При провеждане на лабораторни изследвания за изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests) следва да се обръща внимание на вариациите на растеж и оцеляваемост на щамовете *L. monocytogenes*. Препоръчва се използване на няколко щам на даден патоген, за да се обхване вариабилността между бактериите.

2. Тестовите за изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests) и прогнозните микробиологични модели могат да бъдат използвани в лабораторната практика последователно един след друг, като по този начин те се допълват и дават цялостен отговор на въпроса „как патогенните микроорганизми се развиват в продукта на всеки етап от неговия срок на годност“.

3. Първичните прогнозни модели могат да се използват за проследяване на микробното развитие (растеж, оцеляваемост, отмиране) в готови за консумация месни продукти като функция на времето (в часове, дни). Чрез тях може да се изчислят кинетичните параметри на микроорганизмите (темп на растеж, генерационно време), необходими за извършване на вторичното прогнозно моделиране

4. Вторичните прогнозни модели могат да се използват за прогнозиране (след необходимото валидиране на модела) максималния темп на растеж на патогенните бактерии в готови за консумация месни продукти при променливи температури в широк диапазон.

5. Софтуерните програми (или третични модели) внедряват в себе си първичните и вторични прогнозни модели и могат да се използват при оценка на безопасността на месните продукти,

както и при разработването на срок на годност на нови хранителни продукти.

6. Прогнозирането на растежа на *L. monocytogenes* може да се използва за прогнозиране на срока на годност от гледната точка на безопасност на месните продукти. Също така може да бъде приложено и при оценка на системите за качество в месопереработвателните предприятия.

6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Проведени са едни от първите изследвания за изкуствено контролирано контаминиране (challenge tests) в страната върху готови за консумация традиционни месни продукти. Тези изследвания са съобразени с напътствията за провеждането им на Техническия документ на Европейската референтна лаборатория за *L. monocytogenes* и ISO 20976-1:2019 (E)

2. Извършено е едно от първите по рода си изследвания, имащи за цел проучването на синергистичното или антагонистично действие на *L. monocytogenes* и *S. enterica* при едновременна комбинирана контаминация на малотрайни варено-пушени месни продукти.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е, че използване на инокулум с по-високи концентрации води до по-бързи темпове на инактивиране, както и бързо намаляване количеството на *L. monocytogenes* върху повърхността на продукта, както и че тази редукция е по-силно изразена при температура 25°C отколкото при по-ниски температури на съхранение (6 и 10°C).

2. Потвърдено е, че ако бъде осъществено кръстосано контаминиране след термичната обработка на храните (напр. слайс-машини, ножове за рязане, др.), *L. monocytogenes* може да се намножи в големи количества, както при хладилно съхранение, така и при стайна температура.

7. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Milanov M. V.**, Mateva G. I. & Stoyanchev T. T. (2022). Survival and growth dynamics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* on artificially contaminated cooked ready-to-eat meat products, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2022, 25, No 1, 147-160. DOI: 10.15547/bjvm.2430
2. **Milanov M.V.** & Stoyanchev T.T. (2022). Challenge test studies on *Listeria monocytogenes* grown in ready-to-eat dry cured pork product stored at home-simulated conditions. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 28 (No 2) 2022, 355–361
3. Krumova Valcheva G., Gyurova E., Mateva G., **Milanov M.**, Tropcheva R., Lukach E. & Daskalov H. (2023). Microbiological effect of complete replacement of nitrites/nitrates with starter cultures in traditional raw-dried fermented sausage "Lukanka Panagyurska", Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, DOI: 10.15547/bjvm.2021-0043 - книжка 3/2023 г.
4. **Milanov M.V.** & Stoyanchev T.T., 2022. Приложение на *Listeria monocytogenes* в лабораторни тестове за определяне срок на годност на храните. Ветеринарна сбирка (под печат за април 2022).

8. SUMMARY

Food shelf life can be influenced by microbial, chemical and sensory changes and the methods for its determination are dependent on regulatory documents. Food shelf life must be determined based on scientific principles, which take into account specifics such as food recipe, manufacturing, distribution and storage. The shelf life of a food product is specific to said product and its storage requirements and could not be applied to other products and/or storage conditions. Determining the correct shelf life for each product could be a key factor for its commercial success and it should be determined in the early stages of the development of new products.

The main aspect of the shelf life studies is to try to determine the period of time in which the food product is able to keep its quality parameters as per requirement from the business (food producers). This is relevant both for its production and storage. These type of studies often take into account only the growth of microorganisms, which are naturally found in the tested product batch. These studies could not determine the growth potential of pathogenic bacteria, because it is highly unlikely for these bacteria to be present in the product during routine testing.

Conducting challenge tests is often done with the purpose of tracking if food composition and storage temperature could control the growth of pathogenic (or spoilage) bacteria for the whole shelf life of the food product. Attention is given to the fact if said bacteria were present in the ingredients used for the product's production or a secondary contamination scenario occurred during the storage. For the whole period in which these tests are conducted, the food product is purposefully contaminated with the target bacteria. Their growth is observed in laboratory environment.

The advantage of the challenge tests is that they give an answer to the question "what would happen if..." which is not typical for the traditional shelf life studies. The most common contaminant in food products, stored at refrigeration temperatures is *Listeria monocytogenes*. Despite this there are none traditional studies with this pathogen for determining shelf life in the scope of food safety after secondary contamination in ready to eat products.

Predictive microbiology uses computer simulations to determine the probable growth for both spoilage and pathogenic bacteria. It has found application in determining different food product recipes and storage conditions. The mathematical – statistical models provide the opportunity for quick and efficient solutions in developing new products or analyzing shortcoming in storage conditions. Data could be had about the duration of lag phase, the growth rate, the time required to reach a specific bacterial concentration and the effect of different storage conditions on the product. Many models could be used to predict the effect of optimal and suboptimal storage temperatures, changes in pH and water activity (a_w), etc.

Predictive models represent a very quick, efficient and easy-to-use option to determine the growth potential of microorganisms, placed in specific environment.