

18

Microbiologia predittiva

La microbiologia predittiva ha come scopo fondamentale quello di trovare delle relazioni numeriche (cioè dei modelli matematici) che siano in grado di descrivere, e quindi in una fase successiva di prevedere, il comportamento di una popolazione o di una comunità microbica in funzione di una o più variabili indipendenti di natura fisico-chimica o ambientale.

L'obiettivo fondamentale di un modello è quello di focalizzare l'attenzione sulle caratteristiche essenziali che determinano un fenomeno, omettendo altri aspetti che sono ritenuti secondari. Un modello è quindi una semplificazione della realtà, né sarebbe d'altra parte pensabile né tantomeno gestibile un modello che si identificasse con la realtà. Questa semplificazione è spiegabile con il cosiddetto "paradosso della mappa", secondo il quale una mappa che descriva esattamente ogni minimo aspetto del paesaggio risulterebbe inutilizzabile. Quindi un modello può essere visto come un compromesso fra la estrema complessità di un sistema reale e la necessità di individuare la sua essenza, vale a dire le variabili che più delle altre intervengono a condizionarne l'andamento.

Il termine "microbiologia predittiva" viene usato nel settore alimentare a partire dai primi anni '80, anche se le origini di questa branca della microbiologia degli alimenti possono essere fatte risalire, secondo alcuni, agli anni '20 del secolo scorso, quando venne teorizzata la relazione lineare, su scala semilogaritmica, fra la morte delle cellule microbiche e la durata di un trattamento termico dettando le basi tecnologiche, tutt'ora adottate, per la conduzione dei processi industriali di sterilizzazione e pastorizzazione. Negli anni '60 e '70 vennero elaborati i primi modelli cinetici utilizzabili per lo studio dello sviluppo microbico.

La demarcazione che delinea la microbiologia predittiva in senso moderno può essere indicata nell'equazione di Ratkowsky (*vedi par. 18.4*) che, attorno al 1980, descrisse la relazione fra la velocità di crescita in fase esponenziale di un microorganismo e la temperatura di incubazione. Da allora il numero di articoli, monografie e simposi dedicati a questo specifico argomento è aumentato in modo esponenziale.

La costruzione di un modello non deve ridursi a un esercizio in cui i dati a disposizione sono correlati secondo una equazione matematica, ma dovrebbe cercare di fornire ulteriori informazioni. I primi passi della microbiologia predittiva "moderna" sono stati accompagnati spesso da scetticismo da parte di molti microbiologi. In essa veniva vista una disciplina quasi numerologica e, per certi aspetti, il risultato della consultazione della "palla di cristallo". Ciò nonostante, il costante progresso ottenuto in questa disciplina ne ha fatto un pilastro fondamentale per supportare la microbiologia alimentare moderna e, come tale, viene ampiamente accettata e viene riconosciuta come essenziale nella legislazione alimentare nonché nell'industria alimentare, in cui viene utilizzata per garantire la

qualità e la sicurezza degli alimenti e anche per lo studio di nuovi prodotti e di nuovi processi. D'altra parte, l'enorme mole di lavoro svolta negli ultimi decenni non è naturalmente spiegabile da un puro e semplice interesse accademico, ma basa anzi le sue motivazioni nei vasti campi di applicazione che la microbiologia predittiva ha trovato a livello industriale. I prodotti e le procedure forniti dalla microbiologia predittiva sono infatti parte essenziale delle pratiche di autocontrollo (HACCP) e dell'analisi del rischio, ma sono divenuti anche strumenti imprescindibili per l'industria alimentare nell'ottimizzazione delle formulazioni alimentari o nella messa a punto di formulazioni di nuovi prodotti. Sono anche strumenti indispensabili per la razionalizzazione dei processi tradizionali (quali, ad esempio i processi termici) o per la valutazione dell'impatto di tecniche innovative sulla *shelf life* e sulla sicurezza degli alimenti. In questo contesto, gli strumenti forniti dalla microbiologia predittiva acquistano sempre maggiore visibilità anche all'interno delle normative internazionali che regolano i criteri individuati per definire l'accettabilità microbiologica degli alimenti. È il caso, ad esempio della normativa europea definita dal Regolamento CE 2073/05, modificato dal Regolamento CE 1441/07, in cui la microbiologia predittiva viene riconosciuta implicitamente ed esplicitamente come fondamentale supporto per le decisioni relative agli aspetti igienico sanitari degli alimenti nonché per la corretta conduzione dei processi produttivi.

Lo scopo di questo capitolo è di fornire un'introduzione ai concetti e ai metodi della microbiologia predittiva, per la cui comprensione sono necessarie conoscenze minime di statistica e matematica.

18.1 LA MODELLAZIONE DEI FENOMENI BIOLOGICI

Per rappresentare e comprendere la realtà tutti noi costruiamo ogni giorno modelli più o meno complessi e ce ne serviamo in maniera non sempre cosciente. Per quanto complesso, un modello è solo una rappresentazione della realtà, costruita in termini verbali o matematici. L'uso della modellazione dinamica ha ormai una tradizione consolidata in tutti i campi della microbiologia ed è particolarmente importante per comprendere, prevedere e controllare i fenomeni dipendenti dalla crescita o dalla sopravvivenza dei microrganismi (deterioramento, crescita di microrganismi pericolosi per la salute nei cibi o nell'ambiente, produzione di metaboliti utili o dannosi), e molti dei concetti presentati in questo capitolo possono essere applicati ai processi fermentativi industriali e ai processi biogeochimici, di depurazione e biorisanamento.

La costruzione di un modello dinamico di un fenomeno biologico e delle sue interazioni con i processi fisici, chimici e fisico-chimici è un processo estremamente stimolante, che può essere affrontato a livelli diversi di complessità. La modellazione:

- a. aiuta a comprendere i fenomeni dinamici, permettendo di individuare le variabili più importanti e le loro relazioni;
- b. aiuta a selezionare le variabili più importanti in modo da poter progettare in modo efficiente gli esperimenti necessari alla comprensione o all'ottimizzazione di un processo;
- c. può essere usata per predire il comportamento di un sistema biologico;
- d. può essere utilizzata nell'ottimizzazione di un processo produttivo;
- e. può essere utilizzata per scopi didattici

Un processo di modellazione prevede diversi passaggi (fig. 18.1) che affrontano vari livelli di complessità e possono essere ripetuti in maniera iterativa fino al raggiungimento del risultato desiderato.

In microbiologia predittiva i modelli matematici sono utilizzati per preve-

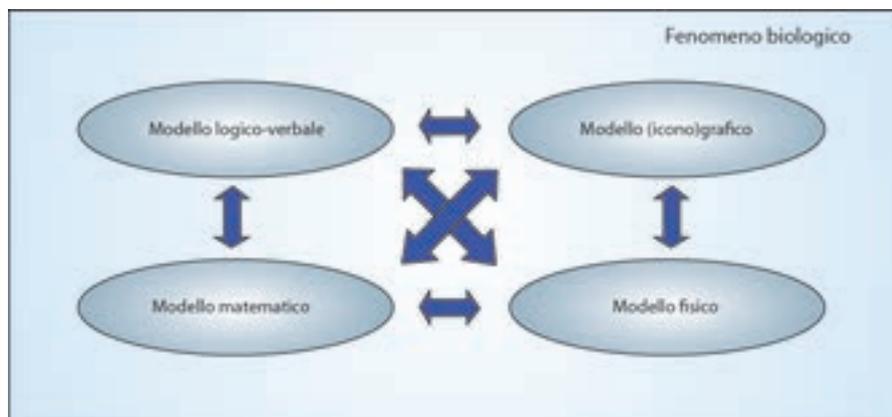


Figura 18.1

I passaggi della modellazione di un fenomeno biologico.

Il modello logico-verbale è una descrizione verbale del sistema e fornisce un elenco delle variabili principali (variabili di stato, convertitori, flussi) e delle loro relazioni. Un modello iconografico rappresenta il modello logico-verbale in forma

grafica, generalmente sotto forma di diagramma di flusso.

Il modello fisico utilizza, per analogia, relazioni derivate dalle leggi della fisica e della chimica per rappresentare il fenomeno, mentre il modello matematico formalizza questa rappresentazione sotto forma di equazioni (generalmente sotto forma di un sistema di equazioni differenziali).

dere fenomeni come la crescita, la sopravvivenza, la morte dei microrganismi o la produzione di metaboliti e il consumo di substrati (**modelli primari**, *vedi* par. 18.2) e l'effetto di parametri ambientali o di processo sui fenomeni elencati (**modelli secondari**, *vedi* par. 18.3). In alcuni casi è interesse del ricercatore modellare non il valore esatto di una variabile (per esempio il numero di cellule vitali), ma la probabilità che ci sia un certo numero di cellule vive o una certa quantità di un metabolita in un dato insieme di condizioni ambientali o dopo un determinato insieme di trattamenti (**modelli probabilistici**, *vedi* par. 18.3). Recentemente, sono state applicate con successo a problemi di microbiologia predittiva anche le reti neurali artificiali (*vedi* Box 18.1). Per rendere i risultati della modellazione fruibili a utenti non particolarmente esperti nelle discipline necessarie al processo di modellazione (matematica, statistica, informatica, oltre che microbiologia e ingegneria di processo), sono stati sviluppati software e database relativamente semplici che permettono di estrarre molte delle informazioni necessarie nelle principali applicazioni pratiche (**modelli terziari**, *vedi* par. 18.5).

Il processo di modellazione si sviluppa in diverse fasi, che sono descritte in figura 18.2, utilizzando come esempio la crescita di un microrganismo, e che vengono spesso eseguite in maniera iterativa, fino a raggiungere il risultato desiderato in termini di complessità, di correttezza della rappresentazione della realtà, di efficacia in termini predittivi.

Esistono due categorie fondamentali di modelli: i modelli empirici e i modelli meccanicistici. I primi sono rappresentati da un'espressione matematica di forma adatta a rappresentare il fenomeno. Esempi di modelli empirici sono l'equazione di Gompertz riparametrizzata (fig. 18.2, par. 18.2.1), un modello primario, o i modelli secondari basati su equazioni polinomiali, che sono frequentemente utilizzati per rappresentare le relazioni fra parametri ambientali e parametri dei modelli primari (*vedi* par. 18.4.3). Benché i modelli empirici siano relativamente semplici da sviluppare e utilizzare, non sempre i loro parametri hanno un significato biologico preciso e sono difficili da estrapolare¹. I modelli

¹ Mentre l'interpolazione è il processo utilizzato per stimare il valore di una funzione fra due punti compresi nel dominio dell'esperimento (per esempio fra 0 e 150 h, figura 18.3), l'estrapolazione è il processo utilizzato per prevedere ciò che avviene al di fuori dell'intervallo sperimentale (per esempio, oltre le 150 h, figura 18.3)

BOX 18.1**LE RETI NEURONALI ARTIFICIALI**

Le reti neurali artificiali simulano in software i processi di apprendimento e inferenza del cervello; esse sono costituite da una serie di unità di calcolo (i neuroni artificiali), generalmente disposte in strati successivi. Il primo strato è lo strato di input, a ciascun neurone del quale corrispondono gli input numerici del problema; l'ultimo strato è lo strato di output, i cui neuroni forniscono i risultati dell'elaborazione. I neuroni di ogni strato possono essere collegati ad alcuni o tutti i neuroni degli strati successivi con connessioni. Durante un processo di apprendimento

supervisionato la rete viene "addestrata", esponendola ai risultati corrispondenti a ciascun insieme di dati di input. Una rete bene addestrata è in grado di fornire risultati numerici continui o discontinui in fase di predizione, spesso con risultati migliori rispetto ai tradizionali metodi statistici. D'altra parte, le reti neurali artificiali si comportano come "scatole nere": è molto difficile identificare le regole che hanno portato a un determinato risultato. Come tali non aiutano a migliorare la comprensione di un problema tecnico o scientifico.

meccanicistici sono costituiti da espressioni matematiche derivate (anche per analogia) da leggi chimiche o fisiche. Sono generalmente sotto la forma di sistemi di equazioni differenziali, i loro parametri hanno un significato biologico diretto e la loro estrapolazione fornisce spesso risultati più affidabili. Esempi di modelli meccanicistici sono il D-model di Baranyi e Roberts, un modello primario per la crescita, o l'applicazione dell'equazione di Arrhenius alla cinetica di disattivazione termica dei microrganismi (*vedi* par. 18.2.1 e 18.4.4), un modello secondario.

Nell'ambito del processo di semplificazione usato nelle fasi iniziali della modellazione, i microrganismi sono spesso considerati come unità indifferenziate, che condividono le stesse proprietà in ogni istante del tempo: ciò equivale a dire che, durante la crescita, le singole cellule sono sostanzialmente identiche fra loro, e che le cellule in fase lag, esponenziale e stazionaria hanno le stesse proprietà, un'affermazione evidentemente abbastanza lontana dalla realtà. I modelli di questo tipo sono **modelli non strutturati**, mentre i modelli che introducono esplicitamente differenze fra lo stato dei microrganismi nell'orizzonte temporale o spaziale del modello vengono chiamati **modelli strutturati**. Recentemente è diventato più frequente l'uso di **modelli stocastici**, che utilizzano distribuzioni di probabilità per rappresentare la variabilità dello stato delle cellule: per esempio, la variabilità dello stato delle cellule nella fase lag determina il momento in cui in ogni singola cellula avverrà la prima divisione cellulare (*vedi* par. 18.2.1), mentre la variabilità della resistenza individuale al calore delle cellule può essere usata per spiegare le code delle curve di sopravvivenza (*vedi* par. 18.2.2). Ulteriori complicazioni sono legate, nell'applicazione dei modelli a situazioni reali, alla fluttuazione di parametri ambientali importanti (per esempio la temperatura) durante la produzione e lo stoccaggio degli alimenti e alla variabilità delle condizioni di processo e dei livelli di contaminazione iniziale negli alimenti o all'incertezza della stima dei parametri del modello. Mentre il primo problema può essere affrontato in maniera relativamente semplice introducendo modifiche opportune nei modelli secondari, il secondo problema è più complesso e richiede simulazioni statistiche che permettono di valutare la distribuzione di probabilità del numero di microrganismi vitali (in caso di crescita) o sopravvissuti (in caso di processi di inattivazione) in un alimento.

I paragrafi successivi affronteranno in dettaglio gli aspetti di base della modellazione applicata alla microbiologia predittiva.

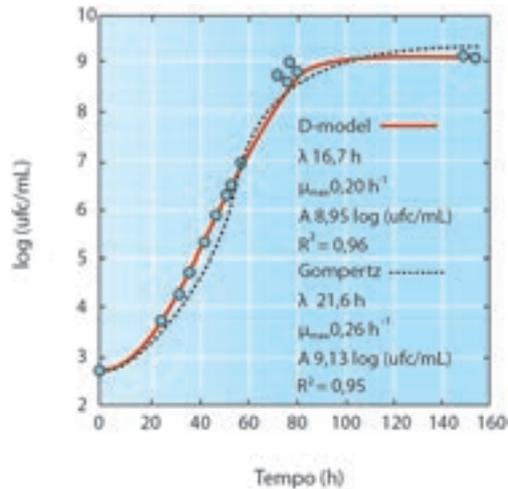


Figura 18.2
Il processo di modellazione:
la curva di crescita dei
microrganismi.

Sebbene la rappresentazione usi il logaritmo decimale del numero dei microrganismi, per ottenere una stima corretta della velocità specifica di crescita è necessario usare il logaritmo naturale del numero di microrganismi.

18.2 MODELLI PRIMARI

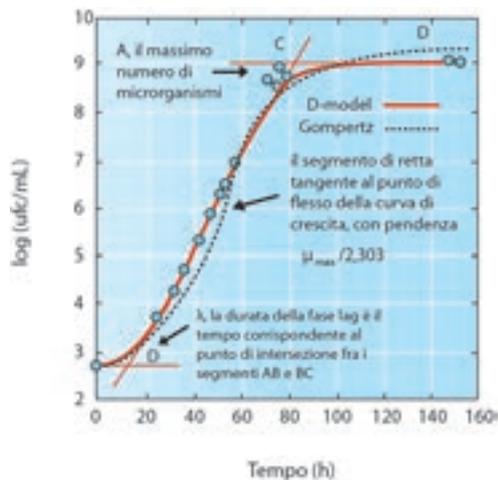
I modelli primari vengono sviluppati per prevedere e rappresentare la crescita, la morte o l'inattivazione dei microrganismi in un dato insieme di condizioni ambientali.

18.2.1 La modellazione della crescita e della produzione di metaboliti

La crescita microbica e i fenomeni che ad essa si accompagnano sono stati descritti nel capitolo 6. Tipicamente, un modello primario viene sviluppato per descrivere la curva di crescita di un microrganismo (o gruppo di microrganismi) patogeno, agente di deterioramento, o agente di fermentazioni in un determinato insieme di condizioni (substrato, pH, a_w , temperatura, composizione dell'atmosfera di incubazione, presenza di inibitori, presenza di altri microrganismi ecc.) allo scopo di valutare la sicurezza igienica, la *shelf life* o la qualità di un alimento. Per esempio, la legislazione attuale (Regolamento CE 2073/05, modificato dal Regolamento CE 1441/07) prevede che gli operatori del settore alimentare possano ricorrere a prove di crescita e a modelli matematici per prevedere se negli alimenti pronti che possono supportare la crescita di *Listeria monocytogenes*, i livelli di contaminazione con questo microrganismo si manterranno entro quelli previsti per legge durante tutta la *shelf life* dell'alimento.

Per poter controllare in maniera accurata l'esperimento vengono generalmente introdotte delle semplificazioni: gli esperimenti sono condotti spesso in substrati liquidi piuttosto che in alimenti (la composizione degli alimenti è variabile e difficile da controllare; i substrati liquidi utilizzati in microbiologia generalmente non causano limitazioni della crescita dovute alla carenza o indisponibilità di nutrienti essenziali) e in coltura pura, inoculando un solo ceppo o una miscela di ceppi del microrganismo target (il livello di contaminazione degli alimenti può variare notevolmente sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, e i microrganismi presenti possono limitare significativamente, per competizione o amensalismo la crescita del microrganismo target); come risultato la crescita in queste condizioni è maggiore di quella che si verificherebbe in realtà. Per quanto il modello che ne risulterebbe fornisca previsioni sbagliate, esso "fallisce in modo sicuro" (è *fail-safe*) perché risulta nella previsione di un rischio maggiore di quello che si verificherebbe in realtà, una situazione sicuramente migliore di quella che potrebbe risultare nella previsione di un rischio minore di quello che si verifica in realtà.

Figura 18.3
La modellazione della curva di crescita.
 La curva di crescita è quella presentata in figura 18.2. Se si usa il logaritmo naturale del numero di microrganismi la pendenza di BC è μ_{max} .



La crescita può essere misurata con una varietà di metodi (*vedi* cap. 6), ciascuno dei quali presenta vantaggi e svantaggi. I due metodi più comuni sono la misura indiretta della crescita mediante la valutazione dell'assorbanza (esistono in commercio attrezzature che consentono di eseguire un gran numero di prove in parallelo in substrati liquidi e registrare i risultati in maniera automatizzata, o attrezzature che consentono di semplificare la conta in substrati liquidi o solidi (*vedi* cap. 6)). In alternativa, possono essere misurati, con metodi chimici o biochimici, metaboliti che sono prodotti durante la crescita (tossine, enzimi, o, nel caso di fermentazioni alimentari, prodotti di fermentazione, sostanze aromatiche ecc.). Quale che sia il metodo utilizzato, il risultato dell'esperimento sarà costituito, per ogni insieme di condizioni sperimentali, da un insieme di coppie di punti (tempo/numero di microrganismi, fig. 18.3), più o meno affetti dall'errore sperimentale. Maggiore è il numero di punti e migliore la loro distribuzione (è particolarmente importante coprire con un numero di misurazioni sufficienti le zone di transizione, per esempio la fase immediatamente successiva alla fase lag e immediatamente precedente alla fase stazionaria in una curva di crescita, fig. 18.3), tanto più robusto sarà il modello e più affidabili saranno i risultati della modellazione. Lo scopo della modellazione è quello di individuare una relazione matematica che permetta di prevedere la crescita in ogni istante del tempo e di stimare i tre parametri più importanti della curva di crescita: la durata della fase lag (λ), la velocità specifica di crescita massima (μ_{max}) e il livello massimo raggiunto dalla popolazione microbica (A) (fig. 18.3).

L'importanza di questi tre parametri è abbastanza ovvia: per microrganismi patogeni o agenti di deterioramento è desiderabile inibire la crescita prolungando λ , diminuendo μ_{max} o limitando A ; per microrganismi utili è desiderabile ottenere risultati opposti.

Fino alla seconda metà degli anni '90 l'approccio più frequente era basato sulla stima di questi parametri utilizzando modelli empirici e tecniche di regressione non lineare (Box 18.2) Il modello empirico più utilizzato è l'equazione di Gompertz riparametrizzata:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

dove N è il numero di microrganismi all'istante t , N_0 il numero di microrganismi al tempo 0, A il numero massimo di microrganismi (l'asintoto superiore della curva), μ_{max} la velocità specifica di crescita, e la base dei logaritmi naturali, λ la durata della fase lag e t il tempo).

BOX 18.2**LA TECNICA DI REGRESSIONE**

La regressione è una tecnica statistica che permette di stimare i parametri di una relazione funzionale fra una coppia di variabili (variabile dipendente, per esempio numero di microrganismi nel caso della crescita, e variabile indipendente, generalmente tempo, nel caso dei modelli primari; nei modelli secondari vengono utilizzate tecniche di regressione multipla per valutare la relazione fra una variabile indipendente, per esempio μ_{max} , e una o più variabili indipendenti, come temperatura di crescita, pH ecc.) minimizzando un determinato criterio di qualità (per esempio la somma dei quadrati degli scarti fra valori stimati e dati sperimentali). La bontà della regressione viene giudicata sulla base di diversi parametri: il coefficiente di determinazione (R^2), che varia fra 0 e 1 (un valore elevato indica una migliore capacità predittiva), la valutazione della distribuzione dei residui, la differenza tra valori stimati e valori sperimentali ecc. Mentre per semplici relazioni lineari o linearizzabili (per esempio, una relazione non lineare del tipo $y = ae^{bx}$ può essere trasformata in una relazione lineare utilizzando una trasformazione logaritmica: $\ln(y) = \ln(a) + bx$) è possibile usare il metodo dei minimi quadrati, per le complesse relazioni non lineari utilizzate in microbiologia predittiva vengono usate generalmente tecniche iterative di regressione non-lineare (vedi la sezione sui modelli terziari per riferimenti a software utilizzabili per questi scopi).

Quando sono presenti numerose variabili indipendenti, non tutte necessariamente importanti nel predire il comportamento della variabile dipendente, è possibile individuare un sottoinsieme di variabili indipendenti utilizzando procedure di regressione "stepwise". Questo tipo di procedure si basa sull'individuazione di un modello iniziale e su un successivo meccanismo di "stepping" che consiste in una modificazione del modello acquisito nella fase precedente aggiungendo o togliendo un predittore secondo dei criteri preimpostati che determinano la significatività (*ad es.* $p \leq 0,05$) al di sotto della quale un predittore non viene accettato nel modello finale. Nel caso della *forward stepwise regression*, ad ogni passo successivo al passo 0 il predittore più significativo sulla base dei criteri di entrata selezionati viene acquisito nel modello e il processo si ferma, restituendo il modello finale selezionato, quando nessuna delle variabili residue soddisfa queste condizioni. Inverso è il caso *backward stepwise regression* in cui, partendo dal modello completo (passo 0), di passo in passo un predittore per volta viene rimosso sulla base delle peggiori performance rispetto ai criteri di eliminazione adottati; la procedura ha termine quando tutti i predittori residui non soddisfano tali criteri.

L'equazione di Gompertz è adattabile a una varietà di situazioni e fornisce spesso risultati accettabili. Tuttavia essa presenta alcuni problemi di carattere teorico e statistico e non riflette accuratamente alcuni aspetti della crescita: per esempio mentre in realtà è possibile osservare una fase lag in cui non si ha alcuna crescita e una fase esponenziale in cui, per lo meno per un breve intervallo di tempo, la velocità specifica di crescita è costante, l'equazione di Gompertz si discosta da entrambe queste condizioni; inoltre è difficile stimare in maniera indipendente λ e μ_{max} .

Per queste ragioni sono stati sviluppati modelli meccanicistici, il più importante dei quali è il D-model di Baranyi e Roberts, rappresentato, in una delle sue formulazioni, nelle equazioni da 2 a 4:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = \mu_{max} \cdot A(t) - \frac{1}{m} \ln\left[1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{max} \cdot A(t)} - 1}{e^{m \cdot (\mu_{max} - \gamma_0)}}\right] \quad (2)$$

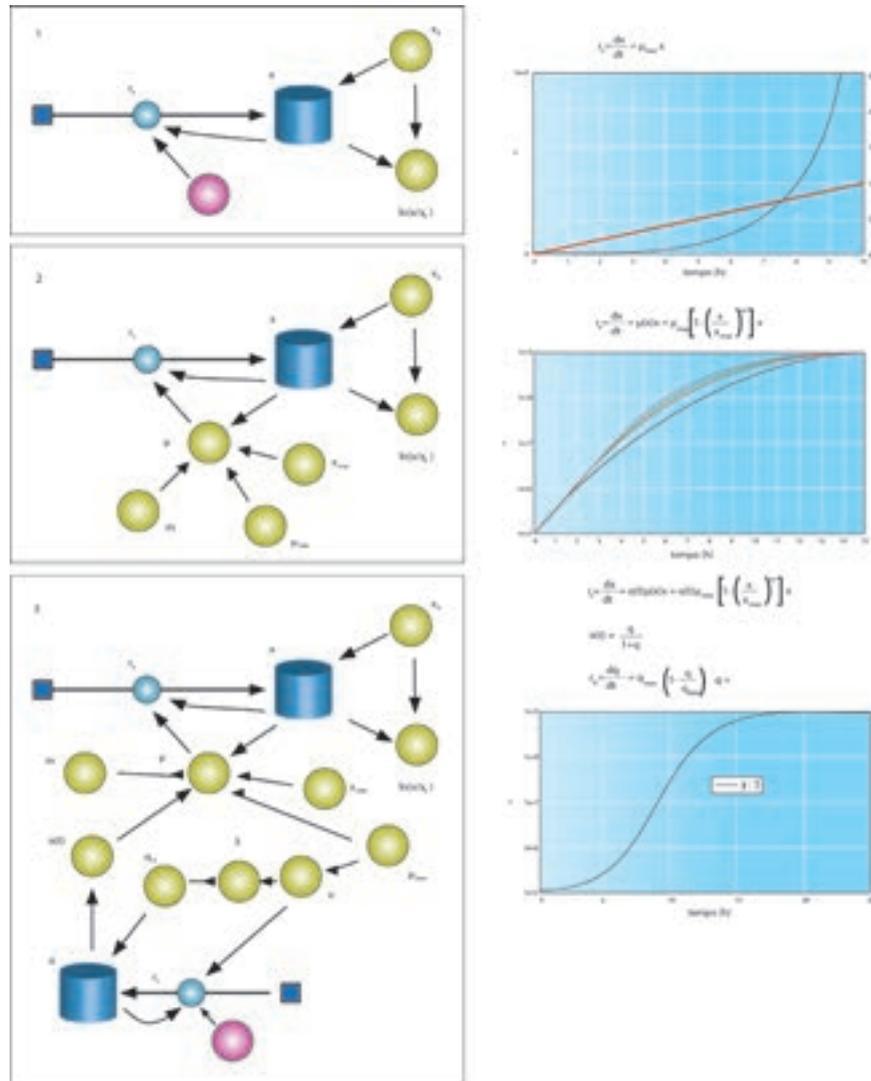
$$A(t) = t + \frac{1}{\nu} \ln\left(\frac{e^{-\nu t} + q_0}{1 + q_0}\right) \quad (3)$$

$$\lambda = \frac{\ln\left[1 + \frac{1}{q_0}\right]}{\nu} = \frac{-\ln(\alpha_0)}{\nu} = \frac{b_0}{\nu} \quad (4)$$

Figura 18.4

Le fasi dello sviluppo di un modello meccanicistico, il D-model di Barany e Roberts.

Partendo dall'osservazione dei dati sperimentali (ad es. fig. 18.3) viene sviluppato un modello meccanicistico che permette di descrivere prima la sola fase esponenziale, poi la fase esponenziale e la fase stazionaria e infine l'intera curva di crescita. Nei modelli iconografici i cilindri rappresentano le variabili di stato (o serbatoi), le sfere i convertitori (variabili e costanti necessarie alla definizione del modello), le frecce spesse in blu le variabili di controllo (o flussi, rappresentano le velocità alle quali si riempiono e svuotano i serbatoi), le frecce in nero la dipendenza fra variabili (per esempio, nel modello 1, per calcolare β sono necessari m , μ_{max} , x_{max} e x). In questo modo viene costruito un diagramma di flusso che rappresenta una mappa delle relazioni fra le variabili. Il modello matematico è rappresentato da una o più equazioni differenziali, che possono essere risolte mediante metodi di integrazione numerica. Diagrammi di flusso e modelli matematici possono essere creati e calcolati utilizzando programmi come Berkeley Madonna (uno shareware disponibile all'indirizzo <http://www.berkeleymadonna.com>). Oltre a sviluppare i modelli questi programmi permettono di simulare l'effetto dei singoli parametri (ad es. per il modello 2 il grafico simula l'effetto della variazione del parametro m da 0,5 a 2) o stimare mediante regressione non lineare i parametri del modello partendo dai dati sperimentali.



dove m è un parametro del modello di Richards (il modello è una generalizzazione della funzione logistica; se m ha un valore di 1 rappresenta una logistica, per valori inferiori e superiori si ottengono curve più o meno asimmetriche), $A(t)$ è una funzione di "adattamento", che esprime l'avvicinamento delle cellule alla condizione nella quale si svilupperanno alla velocità μ_{max} , q_0 la quantità iniziale di un composto essenziale necessario per raggiungere lo sviluppo massimo (fig. 18.4), ν la velocità alla quale questo composto viene accumulato (che si assume generalmente uguale a μ_{max}) e h_0 un parametro che esprime lo stato delle cellule all'inoculo: tanto più basso è il suo valore, tanto più lungo sarà l'adattamento. Incidentalmente, dall'equazione (4) è evidente che, a parità di h_0 , la durata della fase lag è inversamente proporzionale a ν , (che è per definizione uguale a μ_{max}), una condizione che viene spesso osservata sperimentalmente,

Per quanto la sua formulazione matematica possa sembrare più complessa dell'equazione di Gompertz il suo sviluppo è relativamente intuitivo e basato su principi più robusti ed è descritto in dettaglio in figura 18.4.

Recentemente, la difficoltà di stimare correttamente la durata della fase lag e considerazioni basate sulla mancanza di omogeneità delle popolazioni microbiche

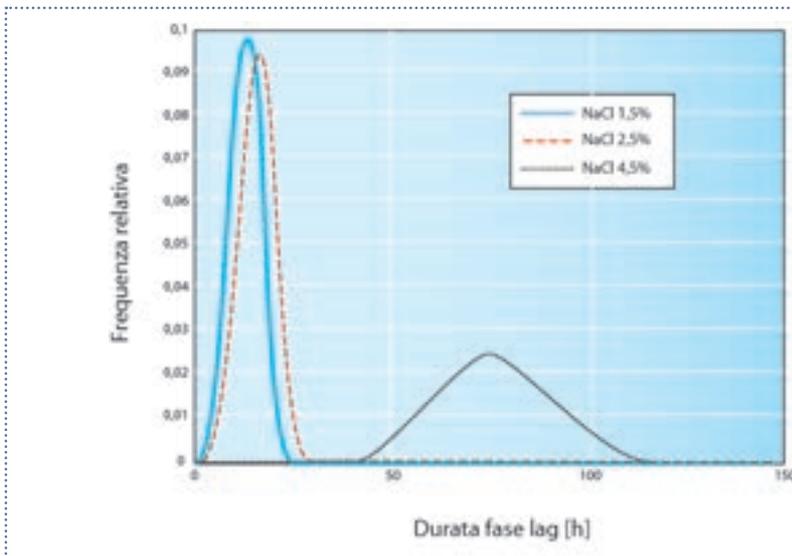


Figura 18.5
Distribuzione di probabilità della durata della fase lag di singole cellule di *Salmonella* in substrati con diverse concentrazioni di NaCl.

Modificata da Kutalik, Z., Razaz, M., Baranyi, J. (2005) "Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth", *Journal of Theoretical Biology*, **232**, pp. 285-299.

hanno portato allo sviluppo di modelli stocastici specialmente per la descrizione della fase lag. Infatti, è possibile dimostrare sperimentalmente che l'intervallo fra l'inoculo in un substrato e la prima divisione cellulare (τ) varia significativamente fra le cellule. Mentre alcune cellule si dividono immediatamente, altre richiedono un tempo molto lungo di adattamento prima di poter passare alla prima divisione cellulare (fig. 18.5): più stressante è l'ambiente o maggiore è lo stress subito dalle cellule prima di essere inoculate nel nuovo ambiente, più lungo il tempo medio per la prima divisione e la varianza della distribuzione.

In molti casi, oltre alla crescita è interessante modellare la produzione di metaboliti (tossine, enzimi, ammine vasoattive, sostanze responsabili del deterioramento) da parte dei microrganismi presenti negli alimenti. Ciò è in parte legato al fatto che i metodi chimici per la misurazione di prodotti del metabolismo microbico sono in genere più rapidi e sensibili dei tradizionali metodi microbiologici basati sulle conte. In molti casi esiste una relazione diretta di proporzionalità fra velocità di crescita e produzione di metaboliti:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu(x) \cdot x \quad (5)$$

$$r_p = \frac{dp}{dt} = Y_{p/x} \cdot r_x \quad (6)$$

dove r_x e r_p sono rispettivamente le velocità assolute di crescita e di produzione del metabolita e $Y_{p/x}$ è la resa in metabolita per unità di biomassa formata. In alternativa a modelli semi-meccanicistici di questo tipo, più o meno complessi, è possibile adattare gli stessi modelli utilizzati per la crescita alla produzione di metaboliti in microbiologia industriale.

18.2.2 La modellazione della morte dei microrganismi

Come riportato nell'introduzione, per certi aspetti, i primi modelli di inattivazione microbica causata da trattamenti termici erano basati sulle cinetiche di primo ordine. Essi furono messi a punto circa 80 anni fa e possono in qualche modo essere considerati la "protostoria" della microbiologia predittiva.

Secondo questo modello, durante l'esposizione a una temperatura letale unifor-

me, il numero di cellule (o spore microbiche) decresce esponenzialmente nel tempo o, in altre parole, la velocità di disattivazione dipende dal numero di cellule vitali presenti. Questo andamento è spiegato con il fatto che l'esito letale del trattamento dipenderebbe esclusivamente dall'azione esercitata dal calore su un singolo costituente cellulare (la proteina più termolabile) il che renderebbe appunto assimilabile l'andamento della morte cellulare a una reazione chimica del primo ordine.

In questo contesto, l'efficacia di un trattamento termico (o comunque di un trattamento in grado di portare alla morte cellulare) è misurabile come segue:

$$S(t) = \frac{N(t)}{N_0} \quad (7)$$

dove $N(t)$ è il numero di microorganismi presenti dopo il tempo t di trattamento e N_0 è il numero di microorganismi inizialmente presenti. Conseguentemente $S(t)$ definisce il rapporto di sopravvivenza (al tempo t).

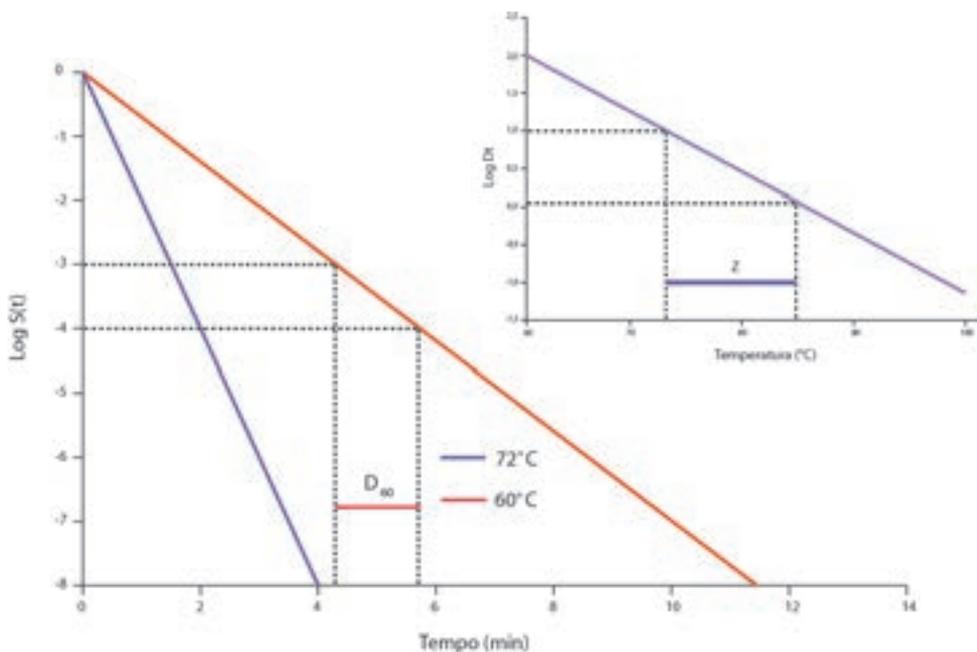
Secondo il modello basato sulle cinetiche di primo ordine, a temperatura costante, la curva di abbattimento termico sarà descritta da:

$$\log S(t) = -\frac{k(T)}{2,303} \cdot t \quad (8)$$

dove $k(T)$ è una costante di abbattimento esponenziale dipendente dalla temperatura applicata. La curva di sopravvivenza descritta da questa equazione ha ovviamente un andamento lineare (fig. 18.6). Secondo il modello di primo ordine, la sterilità assoluta non è ottenibile poiché con una cinetica di inattivazione esponenziale il numero dei sopravvissuti tende a 0 asintoticamente, senza tuttavia mai raggiungere questo valore. Per questo si parla di "sterilità commerciale", vale a dire un livello di abbattimento che, definite le caratteristiche dell'alimento, risulti commercialmente accettabile. In termini di PNSU (probabilità di un'unità non sterile) per agenti di deterioramento si accetta in genere una PNSU di 10^{-6} mentre per patogeni si accetta una PNSU di 10^{-9} . È da notare che

Figura 18.6
Modello di disattivazione termica del primo ordine.

In grafico è riportata anche la relazione fra il Log D_t e la temperatura di trattamento.



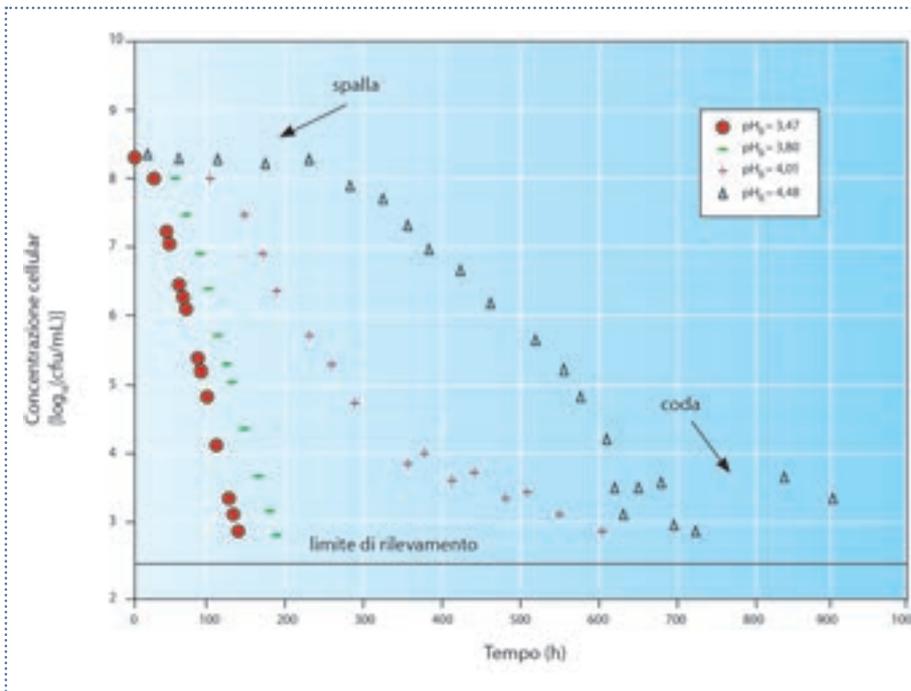


Figura 18.7
Curve di inattivazione di *Listeria innocua* in funzione del pH del substrato.

Da Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Van Houteghem, N., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. (2007), "Individual and Combined Effects of pH and Lactic Acid Concentration on *Listeria innocua* Inactivation: Development of a Predictive Model and Assessment of Experimental Variability", *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 1601-1611.

un alimento è commercialmente sterile anche se i microrganismi sopravvissuti non sono in grado di crescere. Per esempio, anche se le spore di bacilli termofili come *Geobacillus stearothermophilus* possono sopravvivere in conserve non acide, esse non sono in grado di germinare alle temperature di conservazione usate nei paesi temperati.

Il reciproco di $k(T)$ è noto come valore D , che corrisponde al tempo necessario per ridurre, alla temperatura T , la carica microbica di un fattore 10 (90%), rendendo conto della resistenza termica del microorganismo trattato. Il presupposto di questo modello è, similmente a quanto avviene per il decadimento radioattivo, che la probabilità di morte delle cellule sia assolutamente indipendente dal tempo. Questo presupposto, che poteva avere ragion d'essere 80 anni fa, oggi è altamente discutibile. Esistono diversi processi biochimici o biofisici che possono causare la morte di una cellula o la disattivazione di una spora a seguito dell'esposizione a temperature più o meno elevate. È inoltre facilmente ipotizzabile (e dimostrabile) che due o più di questi processi concorrano (e interagiscano) al danneggiamento cellulare. Queste considerazioni minano gravemente le fondamenta del modello di primo ordine. Tuttavia, ancora oggi, questo modello trova amplissima applicazione nel settore industriale (e anche accademico). I processi di sterilizzazione commerciale sono in gran parte basati ancora sul concetto dei 12D, cioè su un trattamento in grado di abbattere 12 cicli logaritmici di *Clostridium botulinum*.

Nonostante questo suo diffuso utilizzo soprattutto a livello empirico, le conoscenze attuali indicano che il modello di primo ordine non può assolutamente essere considerato un modello universale. La maggior parte delle curve di abbattimento non hanno andamento lineare (fig. 18.7), presentando "spalle" o "code" o entrambe. La presenza di andamenti lineari deve essere considerata un caso particolare delle curve microbiche di morte che spesso, in aggiunta, è legata ad artefatti dipendenti dalla modalità di raccolta dei dati o alla conduzione della prova sperimentale.

Un primo tentativo di correggere l'evidente incapacità delle curve di primo ordine a rendere conto delle cinetiche di disattivazione microbica risale agli anni '70 ed è basato sulle cosiddette curve di abbattimento bifasiche. Questi andamenti, riscontrati soprattutto in *Salmonella*, devono il loro nome alla possibile individuazione, sulla base dei dati sperimentati, di almeno due fasi distinte nella

cinetica di morte cellulare, entrambe con andamento lineare, ma con pendenze diverse, in una prima fase più accentuate, poi meno intense. Per questi casi è stata proposta la seguente equazione:

$$S(t) = a \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + (1 - a) \cdot e^{(-k_2 \cdot t)} \quad (9)$$

dove k_1 e k_2 sono le costanti di morte nelle due fasi di abbattimento, mentre a è la frazione di cellule abbattute con velocità k_1 , mentre $(1 - a)$ è la rimanente abbattuta con velocità k_2 .

Anche le equazioni utilizzate per la descrizione dello sviluppo di microrganismi sono state proposte per la descrizione di cinetiche di abbattimento cellulare. In questo caso ovviamente il parametro che rende conto della cinetica in fase esponenziale (vedi par. 18.2.1) assume valori negativi. In questo senso è stata utilizzata l'equazione di Gompertz, ma più spesso, nel caso della disattivazione delle cellule, l'equazione di Al di là dei successi di natura puramente empirica che si possono conseguire con questi modelli, appare chiaramente il diverso significato che una parte importante della curva (quella che descrive la "fase lag") assume nel caso della morte delle cellule, a cui quindi non può essere assegnato il significato biologico che ha nelle curve di crescita. Ciò nonostante, come già detto, questo tipo di elaborazione può essere particolarmente utile nel caso che si presentino spalle o code nei dati sperimentali.

Ma che significato hanno spalle e code? Questa domanda assume particolare significato nel caso di trattamenti condotti a temperature relativamente basse, come sempre più frequentemente accade nell'industria alimentare. Una spalla, sostanzialmente, rappresenta una forma di resistenza della popolazione cellulare o di una sua frazione a una temperatura ostile. I danneggiamenti che quest'ultima procura alle strutture cellulari possono considerarsi, almeno in questa prima fase, sub-letali, quindi la cellula non muore. Proseguendo nella somministrazione di calore, questi danneggiamenti si aggravano, anche perché altre strutture cellulari possono essere coinvolte e la cellula non è più in grado di far fronte alla riparazione dei danni, iniziando una fase di morte con cinetiche accentuate. Per contro, una coda è il risultato di un adattamento cellulare alle condizioni termiche applicate che, dopo una prima fase di morte con velocità accentuata, si manifestano decisamente più resistenti o per la selezione, nell'ambito della popolazione iniziale, delle cellule più resistenti, o per la messa a punto di strategie cellulari che proteggono dalle temperature meno favorevoli.

Quindi, in definitiva, una curva di sopravvivenza costituisce la forma cumulativa di una distribuzione temporale di eventi di mortalità o distruzione. Pertanto un processo di disattivazione microbica può essere visto come il risultato di un fallimento, in particolare il fallimento di una cellula nel contrastare le condizioni ostili che si creano nell'ambiente (in seguito a un trattamento termico). Per questo, alle cinetiche di morte cellulare è stato applicato con successo il modello noto come distribuzione di Weibull, originariamente applicato allo studio delle difettosità di macchine utensili.

La sua forma, adattata a rappresentare curve di sopravvivenza è:

$$\log S(t) = -\frac{1}{2,303} \cdot \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (10)$$

dove $S(t)$ è la frazione di sopravvissuti all'istante t , α il tempo caratteristico e β il parametro di forma, che dipende dalla distribuzione della mortalità delle sin-

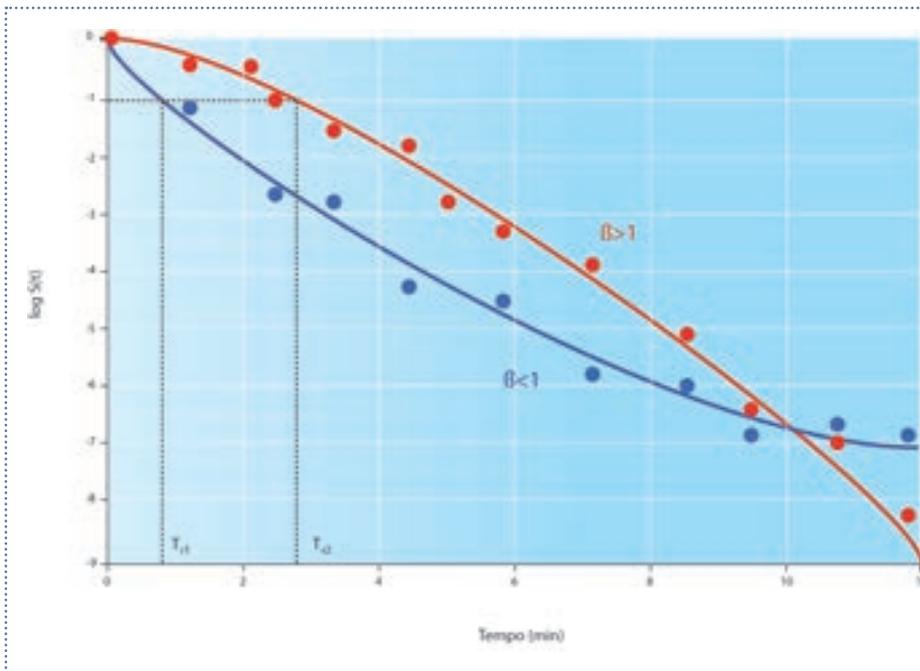


Figura 18.8
Esempi dell'applicazione della funzione di Weibull alla modellazione della morte microbica - $\text{Log } S(t)$ - a seguito dell'applicazione di trattamenti termici.

La curva rossa mostra un caso in cui la concavità della curva (determinata da $\beta > 1$) descrive una "spalla" mentre la curva blu ($\beta < 1$) ha una concavità che descrive una "coda". Nel caso di $\beta = 1$ il modello si risolve in una retta. In grafico sono anche riportati i valori di T_d .

gole cellule. Per $\beta = 1$ l'equazione si riduce a un semplice modello log-lineare, mentre per $\beta < 1$ la curva mostra una concavità verso l'alto (coda) e per $\beta > 1$ una concavità verso l'alto (spalla). L'equazione può essere facilmente riarrangiata per calcolare il tempo di trattamento necessario a ottenere d riduzioni decimali della popolazione iniziale (fig. 18.8).

$$t_d = \alpha \cdot \left[-\ln\left(10^{-d}\right)^{\frac{1}{\beta}} \right] \quad (11)$$

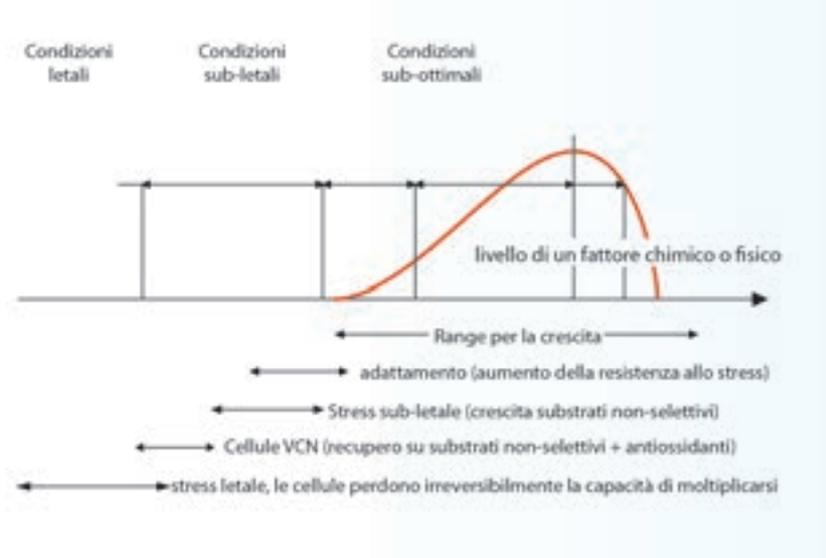
L'applicabilità dell'equazione di Weibull è stata dimostrata anche in applicazioni di fattori di abbattimento della carica cellulare diversi dai trattamenti non termici. In particolare, esistono in letteratura casi di uso del modello di Weibull per descrivere le cinetiche di morte cellulare in seguito all'applicazione di campi elettrici pulsati, di alte pressioni idrostatiche e anche di dosi crescenti di sostanze antimicrobiche, quali oli essenziali. Partendo dal modello di Weibull, inoltre, è stato messo a punto un modello cinetico che dà ottimi risultati anche in condizioni non isoterme, cioè tenendo conto dell'effetto della temperatura nella sua fase di innalzamento prima di raggiungere la temperatura prefissata per il trattamento. L'applicazione di questo modello può rendere molto più efficiente la conduzione di un trattamento industriale.

18.2.3 La modellazione dell'inattivazione

Una condizione intermedia fra la crescita e la morte cellulare relativamente rapida causata da trattamenti fisici letali è l'inattivazione, più o meno lenta, che i microrganismi possono subire in condizioni che non permettono la crescita (per esempio quando pH e attività dell'acqua sono troppo bassi) o in presenza di conservanti artificiali o naturali (nitriti, oli essenziali ecc.). In realtà, in funzione della concentrazione o intensità di un parametro fisico o chimico, i microrganismi si possono trovare in una varietà di condizioni (fig. 18.9), perdendo in maniera più o meno reversibile la capacità di moltiplicarsi. Mentre l'inattivazione con fattori fisici può essere modellata spesso in maniera semplice con modelli log-

Figura 18.9
Relazioni fra crescita, stress e sopravvivenza in funzione della concentrazione o intensità di un fattore fisico o chimico.

VNC cellule vitali ma non coltivabili. Adattato da Ray, B. *Fundamental food microbiology*, CRC PRESS, fig. 9.5, pag. 118, 2004.



lineari (*vedi* par. 18.3), le curve di sopravvivenza in condizioni non permissive per la crescita si discostano significativamente dalla linearità. Esempi di curve di sopravvivenza non lineari sono mostrati nella figura 18.7. Anche se ai livelli di stress più elevati la cinetica di inattivazione può essere approssimata da un modello log-lineare, ai livelli di stress più bassi sono evidenti spalle e code nelle curve di inattivazione, che possono assumere una forma con convessità verso l'alto (spalla), concavità verso l'alto (coda), o mostrare entrambe le caratteristiche. Curve di inattivazione di questo tipo riflettono in genere l'eterogeneità della popolazione microbica di partenza, con frazioni della popolazione con diversa sensibilità al fattore di stress o, in alternativa, meccanismi di inattivazione più complessi di quelli che sottendono l'inattivazione termica, con più siti sui quali il fattore di stress deve agire.

Benché i modelli primari usati per la crescita possano essere facilmente adattati a rappresentare queste situazioni, l'uso di modelli empirico-probabilistici, come quelli basati sulla distribuzione di Weibull sono spesso più appropriati (*vedi* par. 18.2.2).

Un altro modello utilizzato di frequente per rappresentare l'inattivazione è il modello logistico. Un adattamento dell'equazione logistica conveniente per la rappresentazione di relazioni dose/risposta è:

$$\left(\frac{N}{N_0}\right) = 1 - K \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{\mu \cdot (m-D)}} - \frac{1}{1 + e^{\mu \cdot m}}\right) \quad (12)$$

dove K , μ e m sono parametri del modello e D è la dose del fattore letale.

La frazione minima di sopravvissuti e la dose in grado di causare il 50% di inattivazione possono essere calcolati come:

$$K' = K \cdot \left(\frac{e^{\mu \cdot m}}{1 + e^{\mu \cdot m}}\right) \quad (13)$$

$$m' = \frac{1}{m} \cdot \ln(2 + e^{\mu \cdot m}) \quad (14)$$

18.3 I MODELLI PROBABILISTICI

In ragione del loro obiettivo, i modelli utilizzati in microbiologia predittiva possono essere classificati in due categorie fondamentali: i modelli cinetici e i modelli probabilistici.

Nonostante la loro valenza più generale, i modelli probabilistici attraggono ancora oggi un interesse relativamente scarso rispetto alle loro potenzialità. Sicuramente i modelli probabilistici che mostrano maggiori attitudini all'applicazione nel campo della microbiologia alimentare sono i modelli basati sull'equazione logistica.

L'equazione logistica è stata già citata quando si è parlato dei possibili modelli empirici utilizzabili per descrivere lo sviluppo microbico. Similmente all'equazione di Gompertz, è una curva sigmoide che si muove fra due asintoti, uno superiore e uno inferiore, entrambi paralleli all'asse delle ascisse. Un modello probabilistico pone fundamentalmente in relazione la probabilità che un evento abbia luogo a una o più variabili esplicative.

I modelli derivati dall'equazione logistica sono ampiamente utilizzati per analisi statistiche in diversi settori per valutare le relazioni che esistono fra una variabile di risposta categorica (cioè una variabile i cui valori conducono a categorie di informazione come ad esempio, maschio/femmina) e un gruppo di variabili esplicative (indipendenti).

Nel settore della microbiologia predittiva, questo tipo di elaborazione diviene particolarmente utile, ad esempio, qualora si vogliano esplorare variabili di risposta in cui le osservazioni prevedano valutazioni di carattere binario (dicotomico) quali sviluppo/assenza di sviluppo di un certo microrganismo (in particolare un patogeno) in funzione di specifiche variabili (a_w , temperatura, pH, conservanti ecc.) o qualora si voglia valutare la probabilità di una crescita microbica inaccettabile (limiti di *shelf life*). Ancora, questo approccio può essere utilizzato per saggiare le condizioni che non consentono la produzione di tossine microbiche (amine biogene, micotossine ecc.).

Un caso particolare dell'equazione logistica trova sempre più importanti applicazioni nel settore della microbiologia predittiva e in particolare nell'ambito dei modelli probabilistici. La peculiarità dell'equazione logistica utilizzata in questi casi consiste nel fatto che i due asintoti della curva si hanno per $y = 0$ e $y = 1$. In questo caso, la più semplice notazione dell'equazione logistica è la seguente.

$$P = \frac{e^{\left(\sum \beta_i \cdot x_i\right)}}{1 + e^{\left(\sum \beta_i \cdot x_i\right)}} \quad (15)$$

dove P è la probabilità che l'evento abbia luogo variando da 0 (l'evento non accade) a 1 (l'evento accade) e dipende dalla variabile x_i . È facilmente dimostrabile che questa equazione si linearizza fino a ottenere la cosiddetta trasformazione logit:

$$\text{Logit}P = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = \sum \beta_i \cdot x_i \quad (16)$$

Il rapporto $P/(1-P)$ costituisce il rapporto fra la probabilità che l'evento abbia luogo e la probabilità che non abbia luogo. Questa riparametrizzazione indica che per $P = 1$ $\text{logit}P$ tende a $+\infty$ mentre per $P = 0$ va a $-\infty$, a causa della natura asintotica dell'equazione logistica. Similmente, per $P = 0,5$ $\text{logit}P$ è uguale a 0.

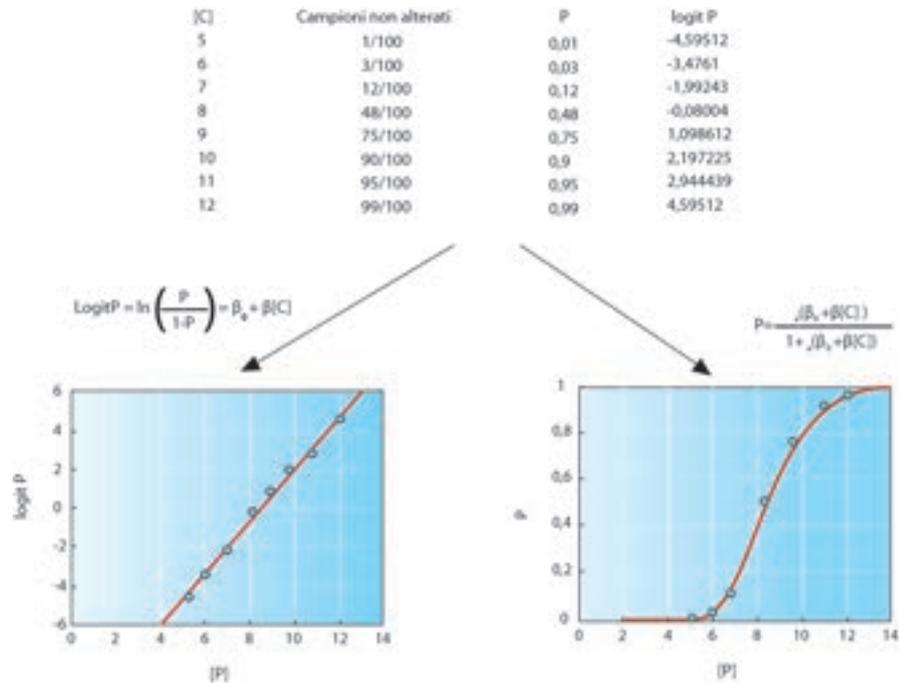
Questo significa che, in fase previsionale, il modello non può essere interrogato sul valore di x che definisce $P = 1$, bensì sulla quantità di x che dà una probabilità che P si avveri in modo soddisfacente (ad es. $P = 0,9999$).

Le osservazioni per la costruzione del modello sono raccolte solitamente in

Figura 18.10

Esempio di applicazione della trasformazione logitP.

Nell'esempio riportato P è la probabilità di impedire l'alterazione (in seguito a sviluppo microbico) in un alimento in funzione della concentrazione di un conservante [C]. In questo caso, essendo logitP calcolabile per ogni condizione di [C] è possibile applicare direttamente il modello linearizzato. Qualora ciò non fosse possibile, è necessario ricorrere a specifiche procedure di regressione non lineare.



forma dicotomica, assegnando valori di 1 o 0 a seconda che l'evento sia avvenuto o meno. Supponiamo ad esempio di voler valutare la probabilità che lo sviluppo dei microrganismi presenti in un prodotto alimentare sia impedito dalla presenza di dosi crescenti di un conservante (fig. 18.10). Naturalmente la robustezza e l'attendibilità del modello ottenibile dipende dal numero di osservazioni con cui viene costruito. Nel settore della microbiologia predittiva, le strategie di acquisizione dei dati possono seguire sostanzialmente due vie (con sfumature intermedie). In un primo caso si possono considerare singole osservazioni ottenute per molte concentrazioni del conservante, ravvicinate fra di loro. In alternativa, si può considerare un numero di concentrazioni più limitato predisponendo però per ciascuna osservazione un numero elevato di ripetizioni.

La soluzione può limitarsi a una semplice regressione lineare quando si abbiano più osservazione per ogni valore di x testato previa trasformazione dei dati di P in $\text{logit}P$, quando questo è possibile.

Negli altri casi, che costituiscono la norma della microbiologia predittiva, il modello è elaborato utilizzando procedure di stima non lineare specifiche che sono presenti nei software comunemente utilizzati. In generale queste procedure operano utilizzando massima verosimiglianza per stimare i parametri del modello.

Se fino ad ora abbiamo trattato del caso più semplice di regressione logit, in cui solo una variabile esplicativa viene considerata, è invece importante sottolineare che, come avviene per le regressioni ordinarie, anche la regressione logistica può essere estesa a comprendere più di una variabile esplicativa, e che quindi la stima dei parametri si può estendere a verificare anche la presenza di effetti interattivi fra le variabili, utilizzando, ad esempio, equazioni polinomiali. In questo caso si possono effettuare operazioni di stepwise (sia forward che backward) per semplificare il modello (*vedi* par 18.4, Box 18.2)

18.4 MODELLI SECONDARI

È già stato riportato che sono definiti secondari quei modelli utilizzati per l'elaborazione di dati microbiologici (spesso ottenuti attraverso i modelli primari) in funzione delle variabili ambientali, quali pH, a_w , temperatura ecc.

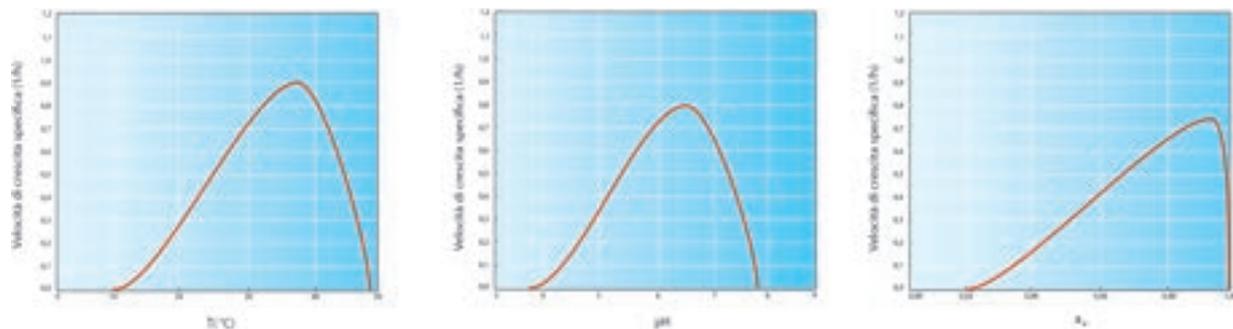


Figura 18.11

Un esempio di modello cardinale.

Effetto della temperatura (a pH e a_w costanti), del pH (a temperatura e a_w costanti) e dell'attività dell'acqua (a temperatura e pH costanti), sulla velocità di crescita

specifici di *Weissella cibaria*. Per ciascuno dei fattori è possibile individuare i valori minimo, massimo e ottimale. Per ottenere le curve continue è stato utilizzato il modello descritto dall'equazione (21).

Infatti, le cinetiche di sviluppo dei microorganismi sono nel loro complesso determinate dai fattori ambientali, siano essi intrinseci (cioè dipendenti dalle caratteristiche del prodotto) o estrinseci (determinati dalle condizioni di conservazione). I modelli secondari descrivono gli effetti di queste condizioni ambientali di natura chimica, fisica o biologica sui parametri ottenibili dai modelli primari o comunque su parametri legati allo sviluppo microbico, quali produzione di tossine, di metaboliti, consumo di nutrienti ecc.

18.4.1 Modello di Ratkowsky

Come già ricordato, i primi passi della microbiologia predittiva come disciplina possono essere fatti coincidere con la messa a punto del modello di Ratkowsky che è un modello secondario in quanto mette in relazione la radice quadrata della velocità di sviluppo in fase esponenziale con la temperatura (assoluta). Nella sua forma più completa il modello proposto da Ratkowsky è il seguente:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \left\{ 1 - e^{-c(T - T_{\max})} \right\} \quad (17)$$

dove μ_{\max} è la velocità massima di sviluppo in fase esponenziale, T_{\min} è la temperatura minima (in °K) a cui si osserva moltiplicazione, T_{\max} (°K) è la temperatura massima alla quale si osserva moltiplicazione e T (°K) è la temperatura osservata, vale a dire la variabile indipendente. La figura 18.11 mostra l'andamento di tale funzione, che permette anche di valutare la temperatura ottimale per la crescita microbica.

Questo tipo di approccio è stato ampliato a descrivere anche gli effetti di altri fattori (come pH e a_w) e sono stati proposti modelli idonei alla descrizione dell'effetto combinato di questi fattori, come il seguente:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \left\{ 1 - e^{-c(T - T_{\max})} \right\} \cdot \sqrt{(a_w - a_{w\min}) \left[1 - e^{-d(a_w - a_{w\min})} \right]} \quad (18)$$

che rappresenta l'effetto combinato di temperatura e a_w sulla velocità di sviluppo in fase esponenziale. Modelli analoghi sono stati ottenuti anche per altri fattori, quali ad esempio il pH.

18.4.2 Gamma concept e modelli cardinali

Gli aspetti teorici sui quali è basato questo tipo di approccio sono stati rinforzati a seguito dell'elaborazione del cosiddetto "γ concept" (all'inizio degli anni '90) secondo il quale molti dei fattori che influenzano la crescita microbica agiscono indipendentemente l'uno dall'altro e quindi l'effetto di ogni fattore misurabile può rappresentare una frazione della massima velocità di sviluppo. Sulla base di tale assunto (al di là delle possibili riserve che può comportare) l'effetto cumulativo dei diversi fattori considerati a un livello sub ottimale, può essere stimato tramite il prodotto delle inibizioni relative causate da ciascun fattore. Il fattore γ è quindi un parametro adimensionale che varia fra 0 (nessuno sviluppo) a 1 (sviluppo in condizioni ottimali):

$$\gamma = \frac{\text{Velocità di sviluppo alle condizioni studiate}}{\text{Velocità di sviluppo alle condizioni ottimali}} \quad (19)$$

Per esempio, la velocità specifica di crescita in funzione di un determinato fattore fisico o chimico può essere descritta dalla seguente equazione:

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \cdot CM(x, p_{\min}, p_{opt}, p_{\max}) \quad (20)$$

dove μ_{opt} è la velocità di crescita nelle condizioni ottimali, CM è una funzione cardinale, x è il valore attuale del parametro (°C, pH, a_w , concentrazione di un inibitore), p_{\min} , p_{opt} e p_{\max} sono rispettivamente i valori del parametro che corrispondono ai valori cardinali (minimo, ottimo e massimo).

Un modello relativamente flessibile per una funzione cardinale è:

$$CM(x, p_{\min}, p_{opt}, p_{\max}) = \begin{cases} x \leq p_{\min}, 0 \\ \frac{(x - p_{\min})^2 \cdot (x - p_{\max})}{(p_{opt} - p_{\min}) \cdot [(p_{opt} - p_{\min}) \cdot (x - p_{opt}) - (p_{opt} - p_{\max}) \cdot (p_{opt} + p_{\min} - 2x)]} \\ x \geq p_{\max}, 0 \end{cases} \quad (21)$$

il valore di CM varia quindi fra 0 (per condizioni uguali o minori del minimo, uguali o maggiori del massimo) e 1 (in condizioni ottimali).

Normalmente si assume che, in presenza di diversi parametri, non esista un effetto interattivo e che sia semplicemente possibile moltiplicare le diverse funzioni cardinali. Per esempio, nella valutazione dell'effetto combinato di pH e temperatura (fig. 18.12):

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \cdot CM_1(T, T_{\min}, T_{opt}, T_{\max}) \cdot CM_2(pH, pH_{\min}, pH_{opt}, pH_{\max}) \quad (22)$$

18.4.3 Equazioni polinomiali

Fra i modelli secondari utilizzati dalla microbiologia predittiva, le equazioni polinomiali sono probabilmente le più utilizzate. Le ragioni della diffusione di questi modelli lineari, nonostante presentino alcuni aspetti critici, dipendono dalla

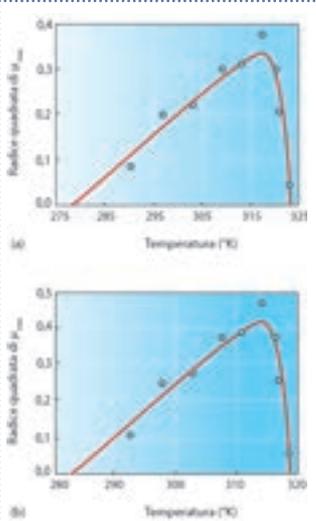


Figura 1812
Modello di Ratkowski. Utilizzato per modellare la relazione fra radice quadrata della velocità di sviluppo in fase esponenziale e temperatura (in °K) per un ceppo di *Salmonella enteritidis* (figura in alto) e un ceppo di *Staphylococcus aureus* (figura in basso) (da Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, M., Guerzoni, M.E. (2001), "Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration", *Food Microbiology*, 18, pp. 659-668).

semplicità di utilizzo e dalla flessibilità che essi dimostrano nella descrizione degli effetti combinati di diversi fattori ambientali sullo sviluppo microbico in sistemi modello o in sistemi reali.

Lo studio dell'effetto contestuale di più predittori su di una variabile pone spesso il problema delle dimensioni del campione da esplorare; se da un lato è evidente che l'affidabilità del risultato è tanto maggiore quanto più è esteso il campione, è pur anche vero che da un punto di vista empirico e analitico si pone un problema pratico di gestione del campione. È per questa ragione che gli studi in cui sono sondati gli effetti di più variabili sono abbinati all'uso di un disegno sperimentale, il quale può essere definito come uno strumento per ottenere informazioni affidabili con il minimo costo, cioè minimizzando le dimensioni del campione.

Esistono diversi tipi di disegni sperimentali codificati a questo scopo e la scelta dell'uno piuttosto dell'altro non è neutra rispetto al risultato ottenibile al momento del trattamento dei dati. Un altro aspetto fondamentale in fase di progettazione del lavoro consiste nella definizione degli intervalli delle variabili indipendenti, sapendo che questo tipo di elaborazioni non si prestano ad estrapolazioni delle previsioni al di fuori di questo intervallo.

Come già detto le equazioni polinomiali sono sovente utilizzate per l'elaborazione dei dati ottenuti tramite disegni sperimentali dettati dalla complessità dei sistemi studiati. L'equazione polinomiale comunemente utilizzata è quella di secondo grado.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot x_i + \sum \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (23)$$

La struttura di questo modello indica come esso sia in grado di rendere evidente, sia pure da un punto di vista esclusivamente empirico, l'effetto lineare delle singole variabili predittive (x_i), quello delle loro interazioni considerate due a due ($x_i x_j$) nonché, attraverso i termini quadratici, la presenza di valori delle variabili indipendenti che massimizzano o minimizzano il valore della variabile di risposta.

Si tratta di un modello lineare che è risolto stimando i coefficienti (β) attraverso il metodo dei minimi quadrati. Il numero dei coefficienti aumenta ovviamente all'aumentare delle variabili indipendenti prese in considerazione. Sono infatti 9 se si considerano 3 variabili, 14 con 4 variabili e 20 con 5 variabili.

Al di là della natura puramente empirica priva di qualunque significato biologico dei coefficienti stimati, l'elevato numero di coefficienti è uno dei principali punti critici di questo approccio. In primo luogo perché contravviene alla regola della parsimonia dei modelli e secondariamente in quanto spesso molti dei coefficienti possono essere caratterizzati da scarsa significatività. Infatti la semplificazione dei modelli è importante per numerose ragioni. I modelli che necessitano la stima di molti parametri o coefficienti possono di fatto avere coefficienti di correlazione elevatissimi e prevedere i dati utilizzati per crearli con grande accuratezza. Questa accuratezza può tuttavia essere controproducente in fase di validazione, quando cioè si usa il modello per stimare risposte di osservazioni non utilizzate per creare il modello. Ciò dipende dal fatto che la sovrapparametrizzazione (cioè l'inserimento di un numero eccessivo di variabili indipendenti) dei modelli può portare alla predizione del rumore di fondo (errore sperimentali), piuttosto che del reale andamento dei dati stessi: il modello che ne risulta, pur essendo pienamente adeguato a descrivere i dati sperimentali che lo hanno generato, è poco efficace nel predire i risultati per nuovi insiemi di dati sperimentali. La semplificazione del modello rende anche più agevole il confronto fra gli andamenti ottenuti ed eventuali meccanismi biologici alla base delle risposte. Proprio questi aspetti sconsigliano l'utilizzo di equazioni polinomiali di grado superiore al secondo.

MODELLO COMPLETO					MODELLO SEMPLIFICATO (BACKWARD)				
	Coefficiente	Err. St.	t	p	Coefficiente	Err. St.	t	p	
INTERCETTA	-2742.51	2166.479	-1.26588	0.229580	-1663.15	355.5093	-4.37821	0.000115	
V1	1475.93	793.062	1.86106	0.087403	761.36	90.2463	8.43652	0.000000	
V1^2	-177.53	94.124	-1.88616	0.083703					
V2	90.24	18.814	4.79626	0.000436	87.45	15.6143	5.60073	0.000012	
V2^2	0.34	0.085	4.06627	0.001564	0.36	0.0908	3.94548	0.000689	
V3	-1033.73	376.278	-2.74724	0.017692	-591.48	261.6569	-2.26051	0.034025	
V3^2	-116.01	33.884	-3.42359	0.005045	-110.47	36.3244	-3.04129	0.005992	
V4	-41.62	223.472	-0.18626	0.855351					
V4^2	-11.94	,471	-1.40998	0.183935	-6.60	1.3389	-4.92719	0.000063	
V5	211.70	188.139	1.12525	0.282485					
V5R^2	-6.34	8.471	-0.74876	0.468423					
V1*V2	-29.13	3.881	-7.50508	0.065701	-29.13	4.1776	-6.97192	0.000001	
V1*V3	157.17	77.616	2.02503	0.277344					
V2*V3	-2.65	2.328	-1.13797	0.275367					
V1*V4	44.35	38.808	1.14291	0.826961					
V2*V4	0.26	1.164	0.22343	0.020970					
V3*V4	61.83	23.285	2.65537	0.641616					
V1*V5	-18.53	38.808	-0.47746	0.008937	63.42	24.8315	2.55383	0.018100	
V2*V5	-3.63	1.164	-3.11500	0.051081					
V3*V5	50.45	23.285	2.16686	0.546076	-2.54	0.9197	-2.75650	0.011516	
V4*V5	-7.23	11.642	-0.62122		72.27	18.3931	3.93012	0.000715	
R^2					0.957				
F-test					23.68				

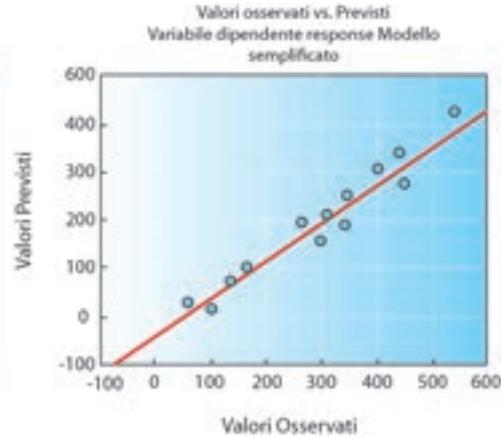
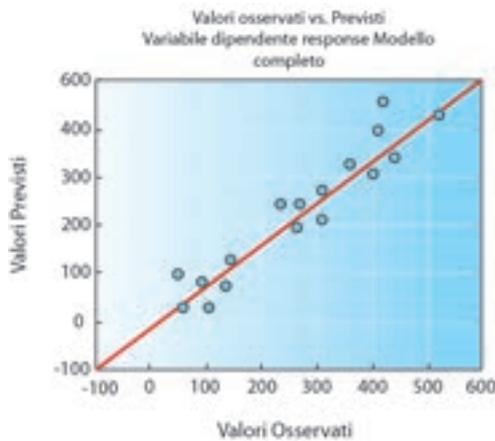


Figura 18.13
Semplificazione di un modello polinomiale quadratico attraverso una procedura stepwise (backward).
 Il piano sperimentale prevede lo studio della variabile di risposta in funzione di 5 predittori (V1, V2, V3, V4, V5). I

coefficienti con elevata significatività ($p \leq 0,05$) sono riportati in rosso. Nei due grafici sono riportate le relazioni fra valori osservati (sperimentali) e valori predetti (calcolati sulla base del modello) ottenuti con i 2 modelli.

Tuttavia, anche i modelli polinomiali quadratici possono essere semplificati utilizzando procedure di regressione stepwise (*vedi* Box 18.2) che consistono sostanzialmente o nella rimozione dal modello completo (comprendente cioè tutti i coefficienti) di quei coefficienti che di volta in volta presentano la significatività più bassa o, viceversa, nell'inserimento dei soli coefficienti con elevata significatività. È una procedura che comporta necessariamente un abbassamento del coefficiente di correlazione ma non necessariamente degli altri diagnostici della bontà del modello finale e della sua capacità di descrivere il fenomeno studiato (fig. 18.13).

I risultati di questi modelli possono essere resi graficamente attraverso la cosiddetta Response Surface Methodology, originariamente sviluppata in associazione a specifici disegni sperimentali (Central Composite Design) il cui uso è ormai esteso a descrivere risultati ottenuti sulla base di altri disegni sperimentali. I valori predetti del modello vengono rappresentati con grafici tridimensionali in cui a due variabili indipendenti (assi x e y) si associa una superficie di risposta che mostra il valore predetto per la variabile indipendente (fig. 18.14).

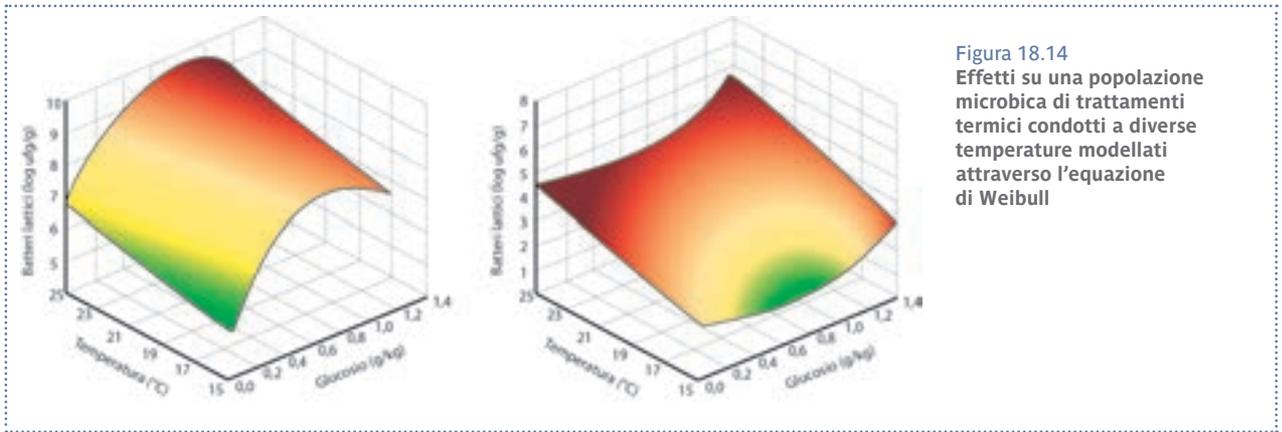


Figura 18.14
Effetti su una popolazione
microbica di trattamenti
termici condotti a diverse
temperature modellati
attraverso l'equazione
di Weibull

18.4.4 Modellazione secondaria dell'abbattimento termico

Nel caso del modello di inattivazione del primo ordine i valori di D ricavati alle diverse temperature sono generalmente posti in relazione alle temperature di trattamento utilizzando una relazione log lineare:

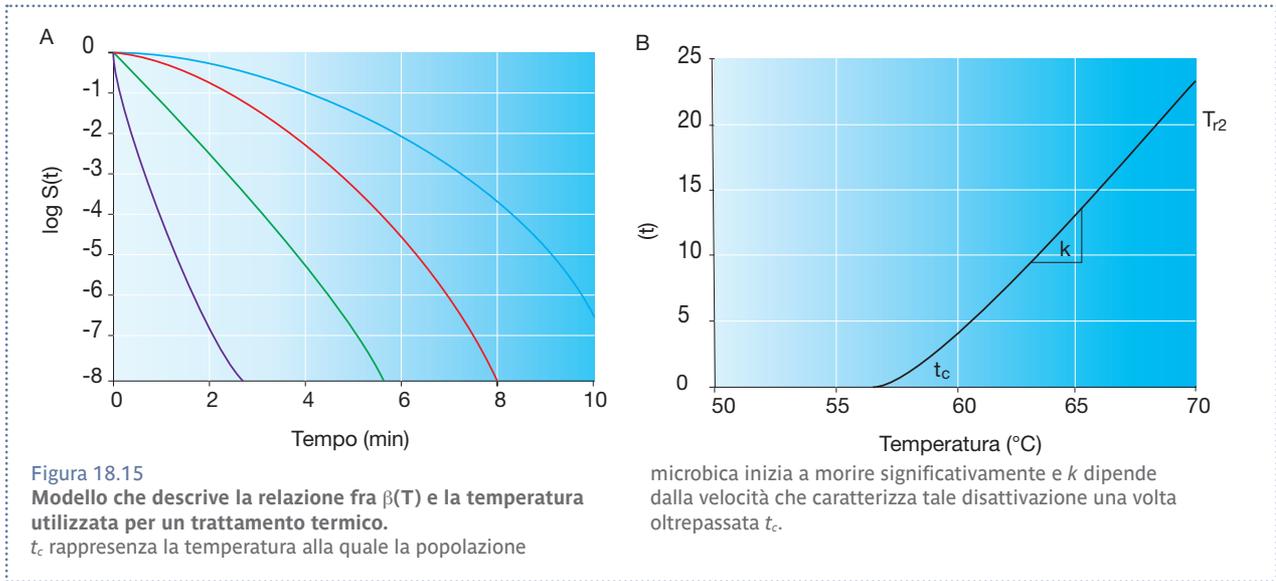
$$\log\left(\frac{D}{D_{ref}}\right) = -\frac{T - T_{ref}}{z} \quad (24)$$

In questo caso la relazione viene presentata in una forma che contiene una temperatura di riferimento (T_{ref}) e ha in z una differenza di temperatura necessaria per aumentare (o diminuire) di un fattore 10 il valore di D (fig. 18.6). Nel caso dei prodotti soggetti a sterilizzazione commerciale, la temperatura di riferimento è solitamente 121,1 °C e l'efficienza di un processo termico viene espressa in termini di minuti equivalenti a questa temperatura, necessari per ottenere il livello di inattivazione desiderato. Naturalmente, questo approccio di modellazione secondaria risente di tutte le debolezze rilevate per il modello primario da cui sono derivate.

Anche per i parametri stimati per i modelli di Weibull (α e β) sono state studiate le possibili relazioni con la temperatura. Per quanto riguarda β , il parametro che descrive la forma della curva, generalmente non sono trovate relazioni numeriche precise con la temperatura. Piuttosto, si assume che, in intervalli di temperatura di trattamento ristretti, possa ritenersi costante per cui, dopo una prima stima di β (all'interno dell'intervallo considerato) le curve vengono ricalcolate utilizzando la media di β ottenuta, riducendo la regressione alla sola stima di α , che risulterebbe in tal senso più accurata. Diverso è il discorso riguardante α , la cui dipendenza dalla temperatura è stata chiaramente dimostrata. In particolare α è legato a T dalla relazione:

$$\alpha(T) = \ln\left\{1 + e^{\left[k \cdot (T - T_c)\right]}\right\} \quad (25)$$

dove T_c (temperatura critica) è la temperatura alla quale $\alpha(T)$ aumenta rapidamente (ricordando che $\alpha(T)$ è l'inverso del tempo necessario per abbattere il 90% delle cellule inizialmente presenti) mentre k rappresenta la velocità (costante) alla quale $\alpha(T)$ aumenta (una volta oltrepassato T_c) all'aumentare della temperatura (fig. 18.15).



18.5 I SOFTWARE E GLI STRUMENTI PER LA MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

Circa 30 anni di storia della microbiologia predittiva hanno portato, oltre all'accumulo di una quantità impressionante di dati sperimentali sulla crescita e sopravvivenza di microrganismi patogeni, utili e agenti di deterioramento negli alimenti, allo sviluppo di numerosi strumenti più o meno semplici per condurre almeno alcune delle operazioni necessarie a predire lo sviluppo e la morte dei microrganismi.

Mentre per la progettazione, l'esecuzione e l'analisi di un tipico esperimento di microbiologia predittiva sono necessari ricercatori esperti e software specialistici, sono oggi disponibili e fruibili, gratuitamente o a pagamento diversi strumenti, prevalentemente sotto forma di database o di software stand-alone o di add-in per Microsoft Excel, per il calcolo di parametri di curve di crescita o di morte o per la formulazione di modelli secondari. In questa sezione verranno citati e descritti brevemente gli strumenti più importanti.

La *Food Standards Agency* e l'*Institute of Food Research*, nel Regno Unito, l'*Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center*, dell'*US Department of Agriculture* e il *Food Safety Centre*, Australia, sono responsabili di un'iniziativa congiunta che mette a disposizione di ricercatori e tecnici un potente database che raccoglie dati di crescita e sopravvivenza di microrganismi in substrati sintetici o alimenti (Combase) e una serie di strumenti on-line per la modellazione della crescita o per l'analisi di crescita e sopravvivenza dei microrganismi (Combase modelling toolbox). Entrambi gli strumenti sono disponibili, previa registrazione, all'indirizzo <http://www.combase.cc>. Combase comprende, alla data di scrittura di questo capitolo, oltre 50000 record contenenti dati sulla crescita e sopravvivenza di un gran numero di microrganismi. Gli utenti registrati possono accedere al database e visualizzare o scaricare sul loro computer i dati richiesti. La figura 18.16 mostra un esempio di accesso al database.

Dati grezzi ottenuti dal database o generati mediante esperimenti possono essere utilizzati per calcolare i parametri di modelli primari. Un esempio di procedura per il calcolo di una curva di crescita è riportato in figura 18.17.

DMfit è inoltre disponibile come add-in per Microsoft Excel e può essere ottenuto collegandosi all'indirizzo <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMfit/default.html>.

Infine, modelli primari e secondari per la crescita e l'inattivazione di numerosi patogeni sono accessibili on-line mediante interfacce relativamente semplici da



1. Utilizzando menu a tendina o caselle di spunta l'utente può selezionare i record di suo interesse



2. La ricerca può essere raffinata escludendo alcuni record, e i dati possono essere scaricati in formato testo

Time (h)	log
0	0.000
2	0.500
4	0.900
6	1.200
8	1.500
10	1.800
12	2.100
14	2.400
16	2.700
18	3.000
20	3.300

3. I dati grezzi comprendono diverse informazioni e dati di curve di crescita o sopravvivenza.

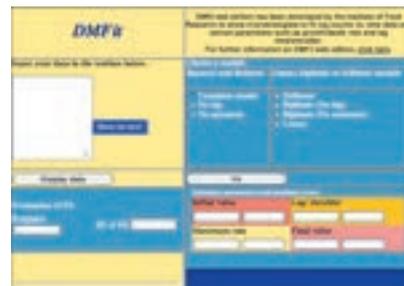


4. I dati grezzi possono essere inseriti in Dmfit on-line, un'applicazione per calcolare i parametri delle curve di crescita o sopravvivenza

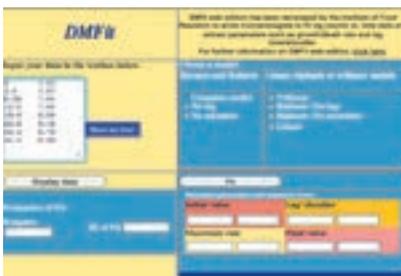
Figura 18.16
Accesso e moduli di richiesta per Combase, il database per la microbiologia predittiva (<http://www.combase.cc>).



1. Dmfit on-line è accessibile mediante il ComBase modelling toolbox.



2. È possibile inserire i dati con una semplice operazione di copia e incolla e scegliere il tipo di modello adeguato.



3. Una volta inseriti i dati utilizzando il tasto <Fit> vengono stimati i parametri del modello e ottenere indicazioni sulla bontà della regressione.

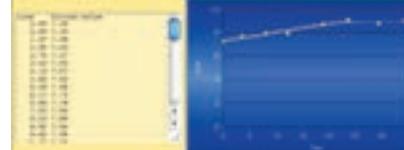
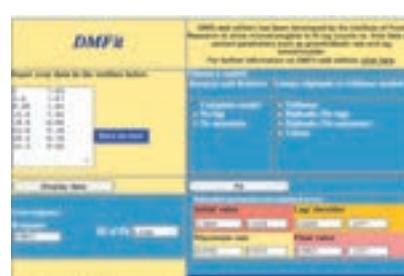
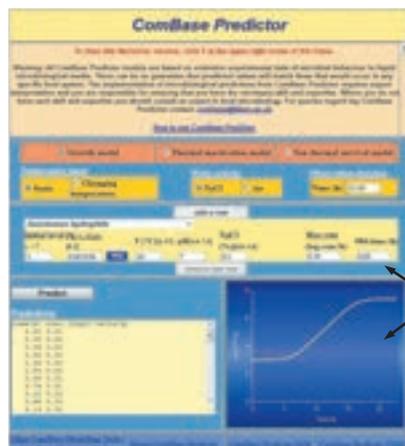


Figura 18.17
Accesso e uso di DMfit on-line.

Figura 18.18
Applicazioni on-line per la simulazione di crescita e inattivazione dei microrganismi. ComBase Predictor (http://modelling.combase.cc/ComBase_hedictor.aspx).



tipo di modello
 è possibile scegliere regimi isotermi o temperature fluttuanti, e modelli basati sulla %NaCl o a_w
 è possibile scegliere diversi microrganismi, indicando inoculo stato fisiologico, temperatura, pH e %NaCl

il software mostra la velocità di crescita specifica, i dati predetti e la/le curve di crescita

usare. I due esempi più importanti sono ComBase Predictor (http://modelling.combase.cc/ComBase_hedictor.aspx, vedi figura 18.18), che fa parte del ComBase Modelling Toolbox, e il Pathogen Modelling Program (<http://pmp.arserrc.gov/PMPOne.aspx>).

18.6 CONCLUSIONI

In pochi decenni la microbiologia predittiva ha conquistato uno spazio molto importante nel contesto della microbiologia alimentare e ha fornito strumenti essenziali per chi opera nel settore. L'importanza della microbiologia predittiva è stata riconosciuta e recepita anche da alcune legislazioni nazionali e internazionali, oltre che essere implementata nelle procedure di molte industrie per la messa a punto di nuovi prodotti o l'ottimizzazione dei processi. Altrettanto importante è l'incidenza che questa disciplina ha assunto nell'ambito delle procedure HACCP e nella valutazione quantitativa del rischio.

Partendo da questi presupposti, le sfide che attendono la microbiologia predittiva sono molte. Dal punto di vista biologico la più interessante è sicuramente data dal superamento (peraltro già in atto) della semplificazione determinata dalla suddivisione delle cellule microbiche in vive e morte, affrontando il problema della sorte delle cellule danneggiate a diversi livelli il cui comportamento è cruciale per molti prodotti alimentari. Inoltre, è auspicabile uno sviluppo che riesca a integrare i dati della vitalità e della crescita cellulare con i sempre più interessanti risultati ottenuti rispetto alle funzioni cellulari o tramite la genomica.

Inoltre, deve incrementare lo sforzo per fornire agli utenti, che spesso non sono figure specializzate in questo senso, degli strumenti gestibili e interpretabili in maniera sempre più semplice e sicura. Da questo punto di vista, l'esempio fornito da Combase dovrebbe costituire uno stimolo e un incentivo per diffondere sempre di più la possibilità di accesso facilitato agli operatori del settore.

Un altro punto chiave dello sviluppo della microbiologia predittiva è sicuramente costituito dalla riduzione del *gap* esistente fra i risultati ottenuti in condizioni di laboratorio e la risposta microbica in prodotti reali cioè in alimenti. Per correggere queste distorsioni è anzitutto fondamentale un maggiore sforzo per la comprensione degli effetti della fluttuazione di alcune variabili spesso osservabili nei processi alimentari e durante la fase di conservazione.

Infine, è necessaria la preparazione di figure professionali con specifici obiettivi formativi indirizzati verso queste tematiche, per un effettivo e ottimale utilizzo delle potenzialità di questa disciplina, la cui diffusione è ancora spesso ridotta ad ambiti accademici o comunque a nicchie circoscritte.