

Modelovanie rastu *Neosartorya fischeri* v závislosti od aktivity vody

LUBOMÍR VALÍK - ELENA PIECKOVÁ
- FRIDRICH GÖRNER - ANDREA SZABÓOVÁ

SÚHRN. Využívajúc postupy prediktívneho modelovania sa v práci sledoval vplyv aktivity vody na rast kolónií termorezistentnej mikromycéty *Neosartorya fischeri* na Sabouraudovom agare. Aktivita vody média sa v intervale hodnôt 0,99 až 0,85 upravila sacharózou. Z priemerov kolónií nameraných pri experimentálnych podmienkach sa matematicky popísali a graficky znázornili rastové čiary, z ktorých sa následne vypočítali hodnoty lag fázy a rýchlosti rastu v logaritmickú fázu. Pre praktické využitie v mikrobiologickej analýze sa parametre rastových čiar v závislosti od aktivity vody vyhodnotili pomocou lineárnej regresnej analýzy a popísali funkciou prvého a druhého poriadku.

Radiálny rast *N. fischeri* sa podrobil modelovaniu podľa Baranyiho D-modelu (Food Microbiol., 10, 1993, s. 43-59). Lag fáza sa pri znižovaní aktivity vody predlžovala v intervale 0,8 d až 3,2 d lineárne podľa rovnice: $\lambda = -15,304a_v + 16,178$ ($R^2 = 0,965$). Vplyv aktivity vody na špecifickú rastovú rýchlosť *N. fischeri* sa opísal kvadratickou rovnicou: $\ln g = -47,48 + 98,97a_v + 49,03a_v^2$ ($R^2 = 0,947$).

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Neosartorya fischeri*, aktivita vody, rýchlosť rastu, lag fáza, prediktívna mikrobiológia

Moderný smer potravinárskej mikrobiológie zahŕňajúci matematické modelovanie rastu mikroorganizmov poskytuje v súčasnosti dostatok prakticky využiteľných informácií, ktoré sa týkajú správania sa predovšetkým patogénnych a toxinogénnych mikroorganizmov. Určujúcimi sú pritom faktory vnútorného a vonkajšieho prostredia požívatín ako napríklad aktivita vody (a_v), aktívna kyslosť (pH), redoxný potenciál (E_h), teplota, obsah konzervačnej látky a pod. [1-4].

Ing. Lubomír VALÍK, PhD., Prof. Dr. Ing. Fridrich GÖRNER, DrSc., Ing. Andrea SZABÓOVÁ, Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Elena PIECKOVÁ, MPH, PhD., Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14, 833 01 Bratislava.

Výsledky prediktívnej mikrobiológie sa v súčasnosti zostavujú do databáz a v rámci systému HACCP sa v praxi využívajú nielen ako informácie, ale aj ako použitý prístup a metóda. Konkrétne sa uplatňujú pri analýzach potenciálnych nebezpečenstiev, pri hodnotení pravdepodobnosti ochorenia vyplývajúceho z nebezpečenstva, t.j. pri odhade rizika a rovnako aj pri určovaní limitov v kritických ovládacích (kontrolných) bodoch technologického procesu výroby potravín [5,6].

Týmto postupom sa dostávame ku zovšeobecneniu, že jedny informácie poskytujú ďalšie, avšak už na kvalitatívne vyššej úrovni. Prediktívna mikrobiológia teda na jednej strane vyžaduje informácie charakterizujúce prostredie potraviny, t.j. výsledky stanovenia hodnôt a_v , pH, E_h , teploty a pod. a na druhej strane zase poskytuje komplexné syntetické informácie o ich trvanlivosti, o zdravotnej bezpečnosti potravín, ako aj ďalšie poznatky slúžiace pre zhodnotenie akosti, resp. pre posúdenie ich potenciálneho znehodnotenia.

Neosartorya fischeri produkuje tremorgénne mykotoxíny: verrukulogén, fumitremorgény A, C a terreín a vytvára aj termorezistentné askospóry [7,8]. Navyše je schopná rásť v širokej oblasti hodnôt a_v , čo ju predurčuje k tomu, že môže znehodnocovať také potraviny, pri výrobe ktorých sa uplatňuje tepelné opracovanie a súčasne aj zníženie aktivity vody, resp. zvýšenie osmotického tlaku. Takýmito potravinami sú ovocné kompóty, džemy, rôsoly a pod.

N. fischeri (v anamorfnom štádiu *Aspergillus fischeri*) tvorí polguľovité, guľaté, ako aj elipsoidné konídie s hladkým až mierne ornamentovaným povrchom. Kleistotécia sú guľovité, majú dvoj- až trojvrstvový obal a začínajú sa tvoriť od stredu kolónie v sústredných kružnicových vrstvách. Asky, ktoré sa z kleistotécií uvoľňujú po niekoľkých dňoch, sú bezfarebné, bikonvexné, hladké až drsné [9].

N. fischeri sa vyskytuje vo vysokých počtoch aj v pôde nášho klimatického pásma bez ohľadu na jej typ a iné faktory vonkajšieho prostredia. Kmene *N. fischeri* rastú pri teplotách 10–52 °C s optimálnou teplotou v oblasti 26–45 °C. Maximálna produkcia toxínov verrukulogénu, fumitremorgénu A a C pri pH 7 bola zistená pri teplotách 25, 30 a 37 °C v poradí [7,10].

Askospóry *N. fischeri* prežívajú účinok teploty 70 °C pôsobiacej 120 min, ako aj 85 °C 60 min. D-hodnoty, t.j. čas potrebný na inaktiváciu 90 % askospór, sa pri teplote 88 °C pohybovali v rozmedzí od 4 do 16 min, pričom vyššie D-hodnoty sa zistili v ovocných šťavách ako vo fosfátovom pufrí [10,11]. Táto skutočnosť je známa aj z iných prác. Vyššia koncentrácia sacharidov nielenže zhoršuje prestup tepla v prostredí potravín, ale tiež fyziologicky chráni mikroorganizmy pred účinkom vysokých teplôt. Prostredie

s vysokým osmotickým tlakom, resp. so zníženou aktivitou vody, indukuje všeobecne v mikroorganizmoch, mikromycéty nevynímajúc, osmoregulačné mechanizmy. V mycéliu, ako aj v spórach, sa zvýši koncentrácia rozpustných látok, ako napríklad niektorých aminokyselín, sacharidov, trehalózy, glycerolu, manitolu, sorbitolu a iných polyolov. Tým sa mikrobiálne bunky stanú odolnejšími voči účinku vyšších teplôt. Rovnaký mechanizmus využívajú pri prechode z osmoticky zriedenejšieho prostredia do prostredia s vyšším osmotickým tlakom, čiže so zníženou hodnotou a_v [12,13].

Nielsen a kol. [7] zistili, že rast na agare s kvasničným autolyzátom, chloramfenikolom a glukózou bol značne inhibovaný pri aktivite vody $a_v = 0,925$, pričom však kolónie ešte dorástli za 32 dní na priemer 32 mm. Autori tiež uviedli, že pri hodnote a_v 0,90 a 0,88 askospóry už nevyklíčili. Fruktózou upravené hodnoty a_v neovplyvnili rast *N. fischeri* odlišne od glukózy. Na druhej strane však autori poukázali na skutočnosť, že sacharóza mala pri daných hodnotách a_v na rast väčší inhibičný účinok. Klíčenie askospór bolo inhibované už pri hodnote a_v 0,955.

Cieľom tohto príspevku je prezentovať výsledky experimentálneho štúdia a matematického vyhodnotenia vplyvu aktivity vody na rast toxinogénnej termorezistentnej mikromycéty *Neosartorya fischeri* do databázy informácií potravinárskych mikrobiológov.

Materiál a metódy

Kmeň

Neosartorya fischeri použitý v tejto práci bol izolovaný Dr. Pieckovou z pôdy a je deponovaný v zbierke vlákňitých húb mykologického laboratória Ústavu preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave.

Použité médiá

Všetky pokusy sa vykonali na Sabouraudovom agare (Fluka, Švajčiarsko). Aktivitu vody použitých agarových médií sme upravovali príslušným prídavkom sacharózy (Lachema, Česká republika). Výsledné hodnoty pH médií sa pohybovali v rozmedzí $6,1 \pm 0,1$.

Stanovenie aktivity vody Sabouraudovho agaru

Skutočné hodnoty a_v Sabouraudovho agaru s prídavkami sacharózy sa stanovovali podľa STN 56 0030 „Meranie aktivity vody“ prístrojom Novasina TH 200 (Novasina, Švajčiarsko). Prístroj bol kalibrovaný šiestimi nasýtenými roztokmi solí v intervale hodnôt a_v 0,98 až 0,11.

Inokulácia a kultivácia

Kleistotécium, resp. askus *N. fischeri*, sa naočkovalo do stredu Petriho misky s príslušným agarovým médiom. Inokulované paralelné Petriho misky s priemerom 170 mm sa inkubovali pri teplote 25 ± 1 °C kvôli vysušeniu v polyetylénových vreckách. Rast vyšetrovanej mikromycéty sa sledoval meraním priemeru kolónií posuvným meradlom s dielikmi po $\pm 0,05$ mm. Priemery kolónií sa merali denne v rovnaký čas v dvoch paralelných pokusoch dvakrát v navzájom kolmých smeroch pri 8 zvolených hodnotách a_v v intervale od 0,995 po 0,85. Stredné hodnoty zo štyroch nameraných priemerov kolónií *N. fischeri* sa použili v matematickom modelovaní.

Matematické a štatistické metódy

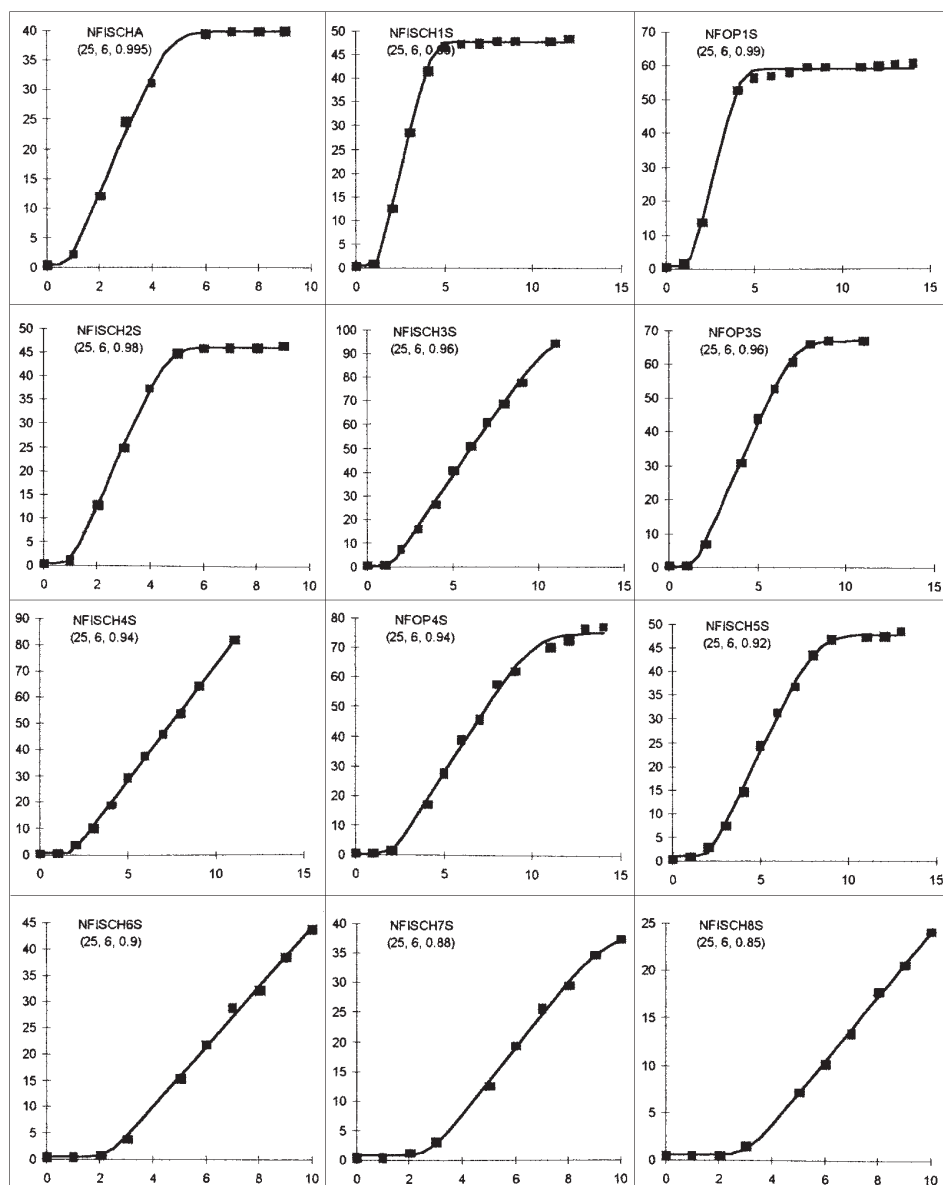
V práci sa použili funkcie, ktorými bolo možné modelovať rastové čiary so stacionárnou fázou alebo bez nej [14]. Maximálne rastové rýchlosti kolónií (g) a lag fázy (λ) sa vypočítali z funkcií rastových čiar, ktoré sa zhodovali s nameranými experimentálnymi hodnotami priemerov kolónií. Tieto parametre sa ďalej analyzovali vo vzťahu k hodnotám a_v použitých agarových médií. Prirodzený logaritmus rastovej rýchlosti sa modeloval pomocou nasledovnej jednoparametrovej kvadratickej funkcie:

$$\ln g = C_0 + C_1 a_v + C_2 a_v^2 \quad (1)$$

Koeficienty C_0 , C_1 a C_2 sa určili lineárnou regresiou.

Výsledky a diskusia

Modelovanie výsledkov rastu kolónií *N. fischeri* zahŕňalo rastové čiary, ktoré sú znázornené na obr. 1. Čiary obsahovali všetky atribúty typickej rastovej krivky mikroorganizmov: lag fázu, lineárnu časť opisujúcu exponenciálnu fázu a stacionárnu fázu. Z rastových čiar, t. j. závislosti priemerov kolónií [mm] od času [d], je aj napriek nerovnakej mierke na prvý pohľad vidieť, že sa lag fáza v závislosti od aktivity vody predlžovala. Smernica lineárnej časti rastovej čiary sa znižovala, čo znamenalo, že špecifická rastová rýchlosť klesala. Tieto skutočnosti sa stali predmetom matematického modelovania vplyvu aktivity vody ako jedného z faktorov vnútorného prostredia na horeuvedené parametre rastu *N. fischeri*.



OBR. 1. Rastové čiar *N. fischeri* v závislosti od aktivity vody Sabouraudovho agaru pri teplote 25 ± 1 °C a pH 6. Hodnoty a_w boli upravené prídavkom sacharózy.

FIG. 1. The growth curves of *N. fischeri* as dependence of the a_w values of Sabouraud's agar at 25 ± 1 °C and pH 6. The a_w values were adjusted with sucrose.

Vplyv aktivity vody na dĺžku lag fázy rastu

Závislosť dĺžky trvania lag fázy od aktivity vody upravenej sacharózou je graficky znázornená na obr. 2. Ako je vidieť, predmetnú závislosť bolo možné matematicky definovať pomocou lineárnej rovnice prvého poriadku ($R^2 = 0,965$) s vyhovujúcou pravdepodobnosťou omylu. V tomto prípade sa lag fáza so znižovaním aktivity vody pomocou sacharózy predlžovala podľa rovnice:

$$\lambda = -15,304a_v + 16,178 \quad (2)$$

Z praktického hľadiska uvedená rovnica čiastočne popisuje proces vyklíčenia askospór a počiatočný rast mycélia až po dosiahnutie viditeľnej a merateľnej kolónie.

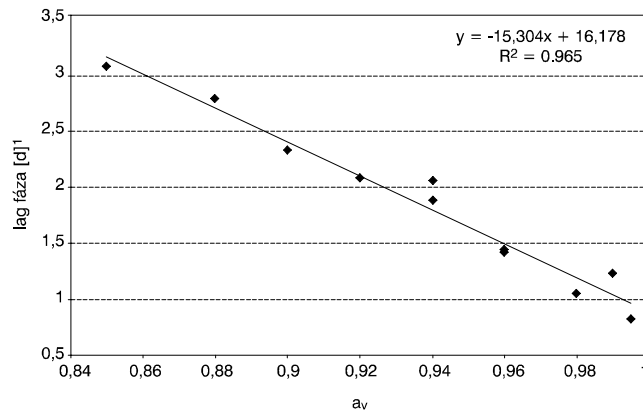
Z teoretického hľadiska sa môže predpokladať, že živné prostredie s hodnotou a_v upravovanou prídavkami sacharózy nekladie z nasledovne uvedených dôvodov veľkú bariéru pre tvorbu kolónií sledovanej mikromycéty. *N. fischeri* môže sacharózu zo živného prostredia difúziou využiť v rámci osmoregulačných procesov ako látku kompatibilnú s vnútrobunkovým obsahom. Difúzia a akumulácia sacharózy sú pre mikromycétu energeticky všeobecne menej náročné ako syntéza iných osmoprotektívnych látok. Z tohto dôvodu je možné vysloviť predpoklad, že uvedená rovnica (model) je platná pre prostredie s prídavkami sacharózy alebo veľkosťou molekuly podobných iných sacharidov. V prípade, že hodnota a_v v prostredí sa upravuje inou látkou, napríklad NaCl, môžeme očakávať, že uvedený model pre *N. fischeri* nebude platiť. Dôvodom môže byť skutočnosť, že v takomto prostredí v rámci osmoregulačných procesov prichádza do úvahy skôr vnútrobunková syntéza viacerých účinnejších osmoprotektívnych látok ako akumulácia Na^+ a Cl^- iónov, ktoré sú všeobecne toxické pre mikrobiálne bunky [15].

Vplyv aktivity vody na radiálnu rýchlosť rastu kolónií

Závislosť rastovej rýchlosti *N. fischeri* od aktivity vody Sabouraudovho agaru sa matematicky analyzovala metódou lineárnej regresie. V analýze sa použil horeuvedený model opísaný kvadratickou funkciou, ktorý bol použitý vo viacerých prácach [16,17]. Graficky je znázornený na obr. 3. V našom prípade rovnica:

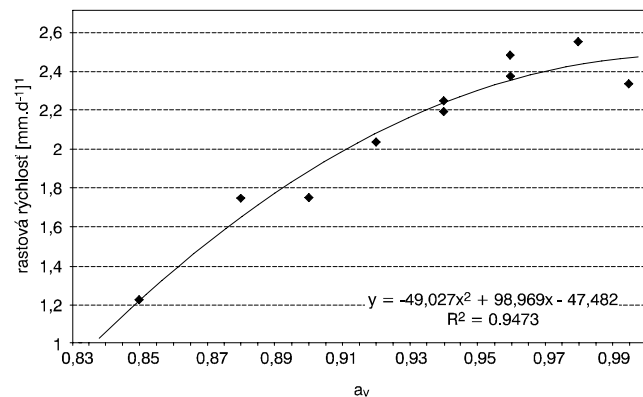
$$\ln g = -47,48 + 98,97a_v + 49,03a_v^2 \quad (3)$$

s pravdepodobnosťou omylu $p = 0,02$ definovala vzťah medzi prirodzeným logaritmom maximálnej rastovej rýchlosti počas exponenciálnej fázy rastu a aktivitou vody ($R^2 = 0,947$). Zhodu medzi predpovedanými hodnotami



OBR. 2. Závislosť dĺžky lag fázy *N. fischeri* od aktivity vody Sabouraudovho agaru pri teplote 25 ± 1 °C a pH 6. Hodnoty a_v boli upravené prídavkom sacharózy.

FIG. 2. Lag-phase of *N. fischeri* as dependence of a_w value of Sabouraud's agar at 25 ± 1 °C and pH 6. The a_w values were adjusted with sucrose.
1 - lag-phase.



OBR. 3. Závislosť rastovej rýchlosti *N. fischeri* od aktivity vody Sabouraudovho agaru pri teplote 25 ± 1 °C a pH 6. Hodnoty a_v boli upravené prídavkom sacharózy.

FIG. 3. The growth rates of *N. fischeri* as dependence of the a_w values of Sabouraud's agar at 25 ± 1 °C and pH 6. The a_w values were adjusted with sucrose.
1 - growth rate [$mm \cdot d^{-1}$].

rastových rýchlostí a experimentálne zistenými hodnotami vypočítanými z rastových kriviek sme charakterizovali aj smerodajnou odchýlkou definovanou anglickým termínom „root mean square error“ (RMSE):

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |\text{predpovedaná} - \text{zistená}|^2}{n}}$$

v ktorom n je počet porovnaní [18]. Týmto spôsobom vypočítaná smerodajná odchýlka predpovedí na základe rovnice (3) sa rovnala 0,11 mm.d⁻¹.

Ako vyplýva z obr. 3, zo získanej rovnice (3) a z horeuvedených parametrov, aktivita vody významne určovala rast skúmanej mikromycéty. Na druhej strane je však vidieť, že v oblasti vysokých hodnôt a_v sa použitý model dostatočne neprispôbil experimentálnym výsledkom. Kvadratická rovnica pochopiteľne z praktického ani z teoretického hľadiska nevystihuje skutočnosť, že rastová rýchlosť mikroorganizmov sa znižuje so zvyšujúcim sa zriedovaním média smerom k čistej vode. Dôkazom tohto je nižšia rastová rýchlosť 10,2 mm.d⁻¹, ktorú sme vypočítali pri najvyššej hodnote $a_v = 0,995$ a vyššia rýchlosť 12,6 mm.d⁻¹ pri nižšej hodnote $a_v = 0,98$. Inými slovami, nie najvyššia, ale $a_v = 0,98$ je optimálnou hodnotou pre rast študovanej vláknitej huby. Bolo by vhodné nájsť spôsob ako získať rovnicu (3) modifikovať, aby sa lepšie prispôbila rýchlostiam rastu v oblasti hodnôt a_v 0,96 až 0,995.

Výsledky modelovania rastu skúmanej vláknitej huby by sa mali porovnať s ostatnými literárnymi poznatkami. Experimentálne údaje alebo práce, pomocou ktorých by sme mohli overiť platnosť prezentovaných rovníc, sme v dostupnej literatúre nenašli. Na druhej strane sme však mohli z rovnice (3) vypočítať teoretickú minimálnu hodnotu $a_v = 0,836$ pre rast vyšetrovanej mikromycéty. Táto hodnota reprezentovala aktivitu vody, pri ktorej rýchlosť rastu kolónií bola rovná nule. Z porovnania s minimálnou hodnotou $a_v = 0,955$ pre klíčenie spór *N. fischeri* na agare s kvasničným autolyzátom, chloramfenikolom a sacharózou, ktorú zistili Nielsen a kol. [7], vyplýva, že nimi prezentovaná minimálna hodnota je významne vyššia, ako je naša. V skutočnosti by sa však nemali navzájom príliš odlišovať, pričom práve minimálna hodnota a_v pre klíčenie spór by mala byť nižšia. Okrem toho náš výsledok je v tomto prípade podporený opakovanými pokusmi pri piatich hodnotách a_v nižších ako 0,955 ($a_v = 0,85; 0,88; 0,90; 0,92$ a $0,94$), pri ktorých sme zistili dobrý rast vyšetrovanej mikromycéty *N. fischeri* (Obr. 1).

Na hodnotenie možností rastu vyšetrovanej vláknitej huby v požívatinách, pri ktorých sa uplatňujú vyššie koncentrácie sacharózy, ako sú džemy,

ovocné šťavy, kompóty a rôsoly, z predloženej práce vyplynulo, že aktivita vody v oblasti $a_v = 0,88$ až $0,86$, nie je dostatočnou bariérou pre rast termo-rezistentných mikromycét. Pre inhibíciu ich rastu v požívatinách je treba, ak je to možné, využiť multifaktoriálny bariérový systém pozostávajúci z viacerých faktorov vnútorného alebo vonkajšieho prostredia požívatin.

Výsledky predloženej práce potvrdili skutočnosť vyslovenú v predošlej práci [6], že postupy prediktívnej mikrobiológie, t.j. matematické modelovanie rastu mikroorganizmov, zohrávajú v súčasnosti významnú úlohu pri odhade rizika spojeného s konzumáciou požívatin. Ich výsledky sa môžu využívať priamo vo výrobnej praxi pri vykonávaní skúšok na dodržanie mikrobiologických limitov (angl. challenge tests), skladovacích skúšok, ako aj pri špecifikácii limitov v rámci systému HACCP.

Literatúra

1. McMEEKIN, T. A. - OLLEY, J. N. - ROSS, T. - RATKOWSKY, D. A.: Predictive microbiology: Theory and application. Taunton, Research studies press 1993. 340 s.
2. SCHAFFNER, D. W. - LABUZA, T. P.: Predictive Microbiology: Where are we, and where are we going? Food Technology, 51, 1997, s. 95-99.
3. VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Predpovedná mikrobiológia. Bulletin potravinárskeho výskumu, 34, 1995, s. 123-134.
4. VALÍK, L.: Predikcia v potravinárskej mikrobiológii. Bulletin potravinárskeho výskumu, 36, 1997, s. 225-236.
5. NOTERMANS, S.: Risiko-Analyse als Basis der Herstellung sicherer Lebensmittel. Lebensmittel und Biotechnologie, 3, 1997, s. 98-101.
6. GÖRNER, F. - VALÍK, L.: Analýza rizika z hľadiska HACCP a prediktívna mikrobiológia. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 71-82.
7. NIELSEN, P. - BEUCHAT, L. R. - FRISVAD, J. C.: Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. Applied & Environmental Microbiology, 54, 1988, s. 1504-1510.
8. BEUCHAT, L. R.: Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. Journal of Food Science, 51, 1989, s. 1506-1510.
9. RAPER, K. B. - FENNELL, D. J.: The genus *Aspergillus*. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1965. 686 s.
10. JESENSKÁ, Z. - PIECKOVÁ, E. - ŠEPITKOVÁ, J.: Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri*. Some ecological considerations. Journal of Food Protection, 54, 1991, s. 581-584.
11. RAJASHEKHARA, E. - SURESH, E. R. - ETHIRAJ, S.: Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. Journal of Applied Bacteriology, 81, 1996, s. 337-340.
12. CORRY, J. E. L.: The effect of water activity on the heat resistance of bacteria. In: Water relation of foods. Ed. R. B. Duckworth. London, Academic Press 1975, s. 325-337.
13. CORRY, J. E. L.: Relationships of water activity to fungal growth. In: Food and beverage mycology. Ed. L. R. Beuchat. Westport, AVI Publ. Co. 1988, s. 51-99.

14. BARANYI, J. - ROBERTS, T. A. - MCCLURE, P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 1993, s. 43-59.
15. TROLLER, J. A.: Adaptation and growth of microorganisms in environments with reduced water activity. In: *Water activity: theory and application to food*. Ed. L. B. Rockland, L. R. Beuchat. New York and Basel, Marcel Dekker, Inc. 1987, s. 101-117.
16. DAVEY, K. R.: Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 1994, s. 295-303.
17. BARANYI, J. - GIBSON, A. M. - PITT, J. I. - EYLES, M. J. - ROBERTS, T. A.: Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. *Food Microbiology*, 14, 1996, s. 347-351.
18. ROSS, T.: Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 1996, s. 501-508.

Do redakcie došlo 12.8.1998.

Growth modelling of *Neosartorya fischeri* with respect to water activity

VALÍK, L. - PIECKOVÁ, E. - GÖRNER, F. - SZABÓOVÁ, A.:
Bull. potrav. Výsk., 37, 1998, p. 173-182.

SUMMARY. Using a predictive modelling approach, the effect of water activity (a_w) on the colony growth of thermoresistant filamentous fungi *Neosartorya fischeri* on Sabouraud agar was studied. Water activity of the media, within the values of 0.99–0.85, was adjusted with sucrose. Growth curves were fitted from colony diameters measured under experimental conditions to estimate the growth rate and lag-phase of the curves. Both, the colony growth rate and lag time, were modelled with linear regression. For practical reasons, these growth curve parameters were described by linear and quadratic functions with respect to water activity.

The radial growth of *N. fischeri* was modelled by the D-model of Baranyi (*Food Microbiol.*, 10, 1993, p. 43-59). The lag-phase was prolonged from 0.8 to 3.2 days linearly with the decrease of the a_w in accordance with the equation: $\lambda = -15.304a_w + 16.178$ ($R^2 = 0.965$). The effect of a_w on specific rate of *N. fischeri* was characterized with the quadratic equation $\ln g = -47.48 + 98.97a_w + 49.03a_w^2$ ($R^2 = 0.947$).

KEYWORDS: *Neosartorya fischeri*, water activity, growth rate, lag-phase, predictive microbiology