

Vilniaus Universitetas
Matematikos ir Informatikos fakultetas

Magistro darbas

Salmonella enterica Serovar Typhimurium inaktyvacijos
fotosensibilizacija vertinimas ir poveikio modeliavimas

Adam Žindul

Vilnius 2011

Tikimybių teorijos ir skaičių teorijos katedra

Darbo vadovai: **doc., dr. Gintautas Misevičius**

(parašas)

prof. Živilė Lukšienė

(parašas)

Darbas apgintas 2011 m. birželio 8 d.

Registravimo Nr. _____

2011- - _____

Turinys

1	Įvadas	6
2	Teorinis pagrindimas bei duomenys	8
2.1	Naudojami duomenys	8
2.2	Teoriniai modeliai	10
2.2.1	Chick-Watson nelygybė (kinetikos modelis), Xiong modelis	10
2.2.2	Cerf ir Kamau modeliai	12
2.2.3	Gompertz modelis	12
2.2.4	Whiting-Buchanan modelis	14
2.2.5	Baranyi augimo modelis	15
2.2.6	Stochastinis modelis	16
3	Modelio taikymas	18
3.1	Lag fazės ilgis	18
3.2	Tiesinė bei liekamoji dalys	22
3.3	Lygties išvedimas	23
3.4	Rezultatų aptarimas	25
4	Išvados	31

Santrauka

Šiame tiriamajame darbe nagrinėjama bakterijos *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium inkubacijos priklausomybė nuo inkubacinio periodo. Trumpai aptariami bakterijų inaktyvavimą aprašantys dažniausiai naudojami modeliai, skaitiškai išreiškiama lag fazė, randama jos ilgį aprašanti funkcija. Toliau vertinamos tiesinė ir liekamoji dalys bei išvedama inaktyvavimą aprašanti lygtis. Darbas baigiamas išvestinės formulės praktiniu panaudojimu ir rezultatų aptarimu.

Summary

Evaluation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium inactivation by photosensitization and impact modeling

The aim goal of this research is to evaluate the influence of irradiation of UV light and incubation period on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium bacteria. Shortly discussed most commonly used mathematical models of bacterial inactivation, expressed lag phase and its function. Next step is evaluation of line part and tail of inactivation (mortality) curve. At the end of the research the inactivation formula is deduced and the results are discussed.

1 Skyrius

Įvadas

Temos aktualumas. Nepaisant didžiulių pasiekimų maisto mikrobiologijos srityje, registruojamų *Salmonella* bakterijos sukeltų ligų mastai toliau nemažėja (Public Health Laboratory Information System - PHLIS, 2006 [1], [2]). JAV Sveikatos apsaugos ekspertų vertinimais, vien Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet fiksuojama 1,4 mln. *Salmonella* bakterijos sukeltų susirgimo atvejų, iš kurių tik 40 tūkst. yra užregistruojami (CDC, 2006 [1]), o 400 pacientų iš tos aibės miršta.

Žala JAV ekonomikai, įvertinus gydymo išlaidas, smukusį žmogaus naudingumą bei kitus faktorius, siekia apie 2,65 mlrd. dolerių per metus. [3], [4]

Yra daugybė efektyvių cheminių, fizinių bei terminių metodų bakterijoms naikinti, tačiau juos naudojant, prarandamos naudingosios maistinės medžiagos, vitaminai, kartais net būna skonį lemiančių struktūrinių pasikeitimų maisto matricoje.

Pagrindiniai klausimai, vis dar išliekantys aktualūs: kaip išnaikinti bakterijas, neveikiant maistinių medžiagų bei neinicijuojant jokių struktūrinių pasikeitimų; koks yra greičiausias, pigiausias ir efektyviausias būdas tai pasiekti? Šio **darbo tikslas** yra įvertinti ir sumodeliuoti *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium žūties procesą po fotosensibilizacijos poveikio.

Šiame darbe yra naudojami matematinės statistikos metodai parametrų įverčiams nustatyti, tiriamos išlikimo kreivės, aptariami įvairūs išlikimo kreivių matematiniai modeliai, vertintas inkubacijos bei švitinimo priklausomybių poveikis bakterijos mirtingumui.

Modeliavimas yra paremtas realiais duomenimis. Modeliavimas atliekamas ORIGIN (v8.0724) programa.

Darbas susideda iš teorinių modelių nagrinėjimų, formulės, aprašančios bakterijų inaktyvavimą neterminiu būdu, išvedimas, praktinio išvestos formulės pritaikymo, modeliavimo.

Darbą baigia išvadų aptarimas, grafiškas rezultatų vaizdavimas, kiekvieno bandymo įvertinimai **RMSD** tarp išvestos formulės tiesės bei realių bandymų duomenų. Taip pat įvertinama liekamoji dalis, $f(\lambda(i)) = N_r(\lambda(i))/N_0$.

2 Skyrius

Teorinis pagrindimas bei duomenys

2.1 Naudojami duomenys

Beveik visos biologinės sistemos gali būti fotochemiškai pažeidžiamos arba sunaikinamos. Šis veiksmas ypač sustiprėja, jei pradžioje biologinės sistemos yra sensibilizuojamos aktyviomis medžiagomis (fotosensibilizatoriais), o vėliau paveikiamos šviesa (Lukšienė, 2005). Fotosensibilizatoriai, kurių šiuo metu yra žinoma nemažai, turi būti fotochemiškai aktyvūs ir efektyviai kauptis ląstelėse.

Fotosensibilizatoriaus molekulė, sukaupia ląstelėje, absorbuoja šviesos kvantą ir tampa aktyvuota, viduje susikaupęs fotosensibilizatorius sugeria šviesos energiją ir transformuoja ją į cheminę. Deguonies aplinkoje indukuojamos įvairios radikalinės citotoksinės reakcijos, kurios ir sukelia ląstelės žūtį (Smith K.C., 1989).

Eksperimentui kultūra pasėjama į sterilią 20ml tūrio skystą Luria Bertani (LB) terpę ir auginama per naktį (apie 14 h), esant 37C temperatūrai bei aeruojant 120 aps/min greičiu. Po kultūros optinio tankio išmatavimo (10.01 mm kiuvetėje 540 nm bangoje), į sterilią LB terpę užsėjama tiek ląstelių, kad pradinis optinis tankis būtų 0,164 opt.vnt. Bakterijos yra auginamos tomis pačiomis sąlygomis iki to momento, kol optinis tankis pasiekia 1.0 opt.vnt. (ląstelių tankis 6.03×10^7 cfu/ml). Būtent tokio optinio tankio ląstelių suspensija yra naudojama tyrimo duomenims gauti.

5 ml tūrio ląstelių suspensija (1.0 o.v.) centrifuguojama 20 min 6000 aps./min. dažniu, supernatantas nusiurbiamas. Nucentrifuguotos ląstelės resuspenduojamos 1 ml 0,1M PBS buferio, tai reiškia, yra gaunama ląstelių suspensija, kurioje ląstelių tankis yra $3,015 \times 10^8$ cfu/ml.

Pasibaigus centrifugacijos procedūrai, gauta ląstelių suspensija (ląstelių tankis $3,015 \times 10^8$ cfu/ml) bei 0,2 M/l ALA yra panaudojami bandinių paruošimui. Inkubavimas turi vykti tamsoje, esant 37C temperatūrai ir aeruojant 120 aps/min, o reikalinga inkubacijos trukmė - 2 min., 15 min., 30 min., 60 min.

Indukuotos fotosensibilizacijos poveikis įvertinamas skaičiuojant kolonijas formuojančius vienetus (cfu/ml). Švitintos ir nešvitintos bakterijų suspensijos skiedžiamos fiziologiniu tirpalu ir po 100 ml sėjamos ant LBA terpės. Lėkštelės dedamos į 37C termostatą. Po 19 val. Yra suskaičiuojamos bakterijų kolonijos.

Tyrimui buvo naudojamos *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium bakterijos laboratoriniai duomenys gauti aukščiau aprašytu būdu. Duomenys gauti iš Vilniaus Universiteto Biomedicininių tyrimų sektoriaus (Taikomųjų mokslų institutas), prof. Ž. Lukšienės.

2.2 Teoriniai modeliai

Mokslinėje literatūroje, susijusioje su mikrobiologija, yra aprašyta daugybė bakterijų augimo bei mirtingumo kreivėms nustatyti naudojamų modelių, kuriuose pritaikomas švitinimas UV spinduliais, karščio procedūros, švitinimas, dezinfekcijos koncentrato panaudojimas ir kt. Šiame skyriuje bus aptarta keletas iš jų, o juos išnagrinėjus remiamasi išvedant bei pritaikant formulę.

2.2.1 Chick-Watson nelygybė (kinetikos modelis), Xiong modelis

Pirmą kartą šis modelis buvo aprašytas H. Chiko (1908), vėliau modifikuotas H.E. Watsono (1908) ir modelį aprašanti nelygybė pradėta vadinti Chick-Watson nelygybe. H. Chiko pasiūlyta diferencialinė nelygybė atrodo taip:

$$\log \frac{N}{N_0} = -kt$$

H.E. Watsonas pasiūlė susieti mirtingumo normą k su empirine logaritmine funkcija E , reiškiančia dezinfekcijos koncentratą, išreiškiant $k' = kE^n$. Modifikuota nelygybė:

$$\log \frac{N}{N_0} = -k'E^n t,$$

kur k' - mikroorganizmo specifinė konstanta esant atitinkamoms sąlygoms. E - dezinfekcijos koncentratas, n - atskiedimo koeficientas.

H.E. Watsono funkcija remiasi prielaida, kad visi mikroorganizmai yra genetiškai panašūs bei kiekvieną subpopuliaciją veiks panašiai. Ši prielaida yra būtina Chick-Watson modelyje. Daugelyje atvejų n reikšmė šiame modelyje yra artima 1.0, todėl gaunama fiksuota reikšmė laiko atžvilgiu, Et .

R.Xiong darbe *A mathematical model for bacterial inactivation* su bendradarbiais aprašo tiesinę mirtingumo funkciją modifikuodamas ją į šią nelygybę:

$$\begin{cases} \frac{dN(t)}{dt} = -kN(t) & (0 \leq t \leq +\infty) \\ N(0) = N_0 & (N_0 > 0, t = 0), \end{cases}$$

kur $N(t)$ ir N_0 yra atitinkamai bakterijų būsena laiku t ir pradinėje stadijoje, k - mirtingumo norma (konstanta), $dN(t)/dt$ - mirtingumo (inaktyvavimo) norma, $[dN(t)/dt]/N(t)$ - reliatyvi inaktyvavimo norma. Toliau dešimtainį logaritmą galima pertvarkyti į:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = -\frac{t}{D}, \quad (t \geq 0),$$

kur D yra dešimtainis mažėjimo laikas, $D = \ln(10)/k$. Matyti, kad $\log[N(t)/N_0]$ siejasi su t kaip tiesi linija.

Daug mirtingumo kreivių prasideda lag faze. Priežastys to būna įvairios, organizmai bus suspensijos būsenos ar vis dar galės daugintis. Kadangi pokyčiai lag fazėje labai nežymūs, specifinė mirtingumo norma praktiškai išlieka beveik konstanta, tad tiesę reikia pastumti į kairę:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \begin{cases} 0 & (0 \leq t \leq t_{lag}) \\ -\frac{t-t_{lag}}{D} & (t \geq t_{lag}). \end{cases}$$

Išskyrus lag fazę, daug kreivių turi ir liekamąsias, reikalaujančias savo įverčio. Jos irgi susidaro dėl natūralių priežasčių: ne kiekvieną subpopuliaciją vienodai veikia naudojamos inaktyvavimo priemonės. Autoriai, atskirdami mažiau ir daugiau atsparias subpopuliacijas bei atsižvelgę į lag fazių skirtumus tarp subpopuliacijų, po nesudėtingo pertvarkymo, išvedė bendrąją formulę:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \begin{cases} 0 & (t \leq t_{lag}) \\ \log(fe^{-k_1(t-t_{lag})} + (1-f)e^{-k_2(t-t_{lag})}) & (t \geq t_{lag}), \end{cases}$$

kur f - subpopuliacijos dalis.

Remiantis modelio formulavimo reikalavimais, inaktyvavimo modelis turi būti dinamiškas laiko parametro atžvilgiu. Šioje formuluotėje yra trūkumas, kai $t = t_{lag}$, modelis nėra

dinamiškas, jis nediferencijuojamas šiame taške. Tad staigus bakterijų mirtingumas, veikiamas temperatūros ar švitinimo dozės pokyčio, bus aprašomas pirmine H. Chicco pasiūlyta nelygybe, pakartotinai nustatant t_0 laiką šiuo momentu. Taip pat reikėtų paminėti, kad t_0 perstatymas bus galimas tik temperatūrai ar švitinimo dozei esant konstantoms.

Realiai modeliuojant R.Xiongo modelis gali būti naudojamas tik tada, jei temperatūros ar švitinimo kintamieji yra aproksimuotos baigtinio skaičiaus žingsnių. Galime dar paminėti, kad šis modelis neparodo *praeities istorijos* mikrobus populiacijoje.

2.2.2 Cerf ir Kamau modeliai

Kitų dviejų modelių plačiau neaptarinėsime, pateiksime tik jų išraiškas, reikalingas tolimesniam nagrinėjimui. Cerf modelio išraiška:

$$\frac{N(t)}{N_0} = fe^{-k_1t} + (1-f)e^{-k_2t}$$

Toliau tris Kamau modelio išraiškos:

$$\frac{N(t)}{N_0} = \frac{2}{1 + e^{bt}}$$

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log(1 + e^{-b_1t/2}) - \log(1 + e^{b_2t/2})$$

ir

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log \left(\frac{2f}{1 + e^{b_1t}} + \frac{2(1-f)}{1 + e^{b_2t}} \right).$$

Žymėjimas lieka standartiniai: t žymi laiką, k_1 ir k_2 atitinkamai pagrindinės dalies populiacijos ir subpopuliacijos inaktyvavimo pagreitį, b_1 ir b_2 atramos ilgi, f ir $(1-f)$ - atitinkamai pagrindinė populiacijos dalį ir subpopuliacija.

2.2.3 Gompertz modelis

Neisoterminis kinetikos modelis buvo pastebėtas bei aprašytas Van Impe, Nicolai, Martens, De Baerdemaeker ir Vandewalle diferencijuojant Gompertzo nelygybę laiko t

atžvilgiu, suderinus Arrhenius tipo nelygybę mikrobu tankiui aprašyti kaip funkciją, priklausančią nuo laiko bei temperatūros.

Šis matematinis modelis, naudojamas mikroorganizmų mirtingumui nustatyti, sukurtas remiantis Gompertzo nelygybe:

$$\log N = \log N_0 - \log \left(\frac{N_0}{N_f} \right) \times \exp \left(- \exp \left(\frac{k \exp(1)}{\log \left(\frac{N_0}{N_f} \right)} (L - t) + 1 \right) \right),$$

kur N mikrobu kolonijų tankis konkrečiame laiko t momente, L yra laiko parametras, žymintis lag fazę arba liekamąją dalį, k žymi maksimalaus inaktyvavimo normos konstantą. N ir N_f yra pradinių bei atsparių mikrobu kolonijų tankis.

Išdiferencijavus šią nelygybę laiko atžvilgiu, gausime išraišką pritaikomą nuo laiko sąlygų priklausantiems pokyčiams:

$$\begin{aligned} \log N = \log N_0 - \int_0^t \left[k \exp(1) \exp \left(\frac{k \exp(1)}{\log \left(\frac{N_0}{N_f} \right)} (L - t') + 1 \right) \right. \\ \left. \times \exp \left(- \exp \left(\frac{k \exp(1)}{\log \left(\frac{N_0}{N_f} \right)} (L - t') + 1 \right) \right) \right] dt' \end{aligned} \quad (2.1)$$

Cristina L.M. Silva darbe [12] nagrinėjamas temperatūros poveikis laiko atžvilgiu, tad parametrai k bei L yra priklausomi nuo šių sąlygų. Parametro L apibrėžimui buvo panaudota Arrhenius tipo nelygybė:

$$L = a \exp \left(b \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right),$$

kur a ir b yra parametrai, T_{ref} yra fiksuotos charakteristikos temperatūra. k yra aprašyta nelygybė $k = c(T - d)^2$, su c ir d parametrais.

Jei pastarąsias dvi nelygybes įtrauksime į modifikuoto modelio nelygybę, gausime matematinį modelį, aprašantį mikrobu kolonijų tankį, priklausomai nuo laiko bei temperatūros (su papildomomis sąlygomis).

2.2.4 Whiting-Buchanan modelis

Whiting modelis gautas logaritminiu Kamau modelio pagrindu, atsižvelgiant į tai, kad esminis dalykas buvo lag fazės įvertinimas pradinėje mirtingumo funkcijos stadijoje. Pradinė populiacija yra padalijama į dvi subpopuliacijas, su skirtingais inaktyvavimo efektais. Taip gaunama išlikimo kreivė su dviem skirtingais tiesinio mažėjimo regionais, kur antras regionas turi mažesnį tiesės poslinkį. Taip formuluojant antro regiono atsparios bakterijos sudarys liekamąją dalį.

Matematinė išraiška atrodo taip:

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = \log_{10} \left(\frac{F_1(1 + \exp(-b_1 t_l))}{1 + \exp(b_1(t - t_l))} + \frac{(1 - F_1)(1 + \exp(-b_2 t_l))}{1 + \exp(b_2(t - t_l))} \right),$$

kur b_1 yra pirminės populiacijos maksimali mirtingumo norma ($1/h$), b_2 subpopuliacijos maksimali mirtingumo norma ($1/h$), F_1 yra pradinės populiacijos bendroje populiacijoje dalis, $F_2 = 1 - F_1$ yra pradinės populiacijos subpopuliacijoje dalis, t_l pietys arba lag fazė (h).

Priklausomai nuo to, ar bakterijos turės lag fazę, ar bakterijos natūraliai pasidalins į skirtingus regionus, šis modelis gali turėti kelis skirtingus atvejus. Pradėkime nuo atvejo, kai $F_1 = 1$.

1a. $F_1 = 1$, $t_l = 0$

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N(0)} \right) = \log_{10} \left(\frac{2}{1 + \exp(b_1 t)} \right) = \log_{10}(2) - \log_{10}(1 + \exp(b_1 t))$$

Ši nelygė iš esmės priartėja prie tiesinės kreivės. Priešingai negu galima intuityviai tikėtis, supaprastinimas nebūtinai sutampa su klasikine tiesine inaktyvavimo kinetikos kreive.

2a. $F_1 = 1$, $t_l \neq 0$

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N(0)} \right) = \log_{10} \left(\frac{1 + \exp(-b_1 t)}{1 + \exp(b_1(t - t_l))} \right)$$

Tai reikštų, kad kai $t = 0$, tada $N = N(0)$, to ir buvo tikimasi. Rezultatai lag fazėje eina kaip tiesinis mažėjimas.

Kitas atvejis yra, kai $F_1 \neq 1$.

1b. $F_1 \neq 1$, $t_l = 0$ Šituo atveju, kaip jau matyti, atsiranda du skirtingi mikroby koloniju regionai.

2b. $F_1 \neq 1$, $t_l \neq 0$ Šituo atveju yra bendras Whitingo modelis, aptartas anksčiau. Ši forma naudojama dažniausiai.

Pastaba. Verta paminėti, kad literatūroje šis modelis taip pat sutinkamas Whitingo-Buchanano pavadinimu, tik su ryškesniu akcentavimu į tai, kad t_l yra skirtingas skirtingoms subpopuliacijoms, pirmajai t_{lag1} bei antrajai t_{lag2} .

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log \left(f \frac{1 + e^{-b_1 t_{lag1}}}{1 + e^{b_1(t-t_{lag1})}} + (1-f) \frac{1 + e^{-b_2 t_{lag2}}}{1 + e^{b_2(t-t_{lag2})}} \right)$$

Liekanos įskaitymas

Modelio reikalavimams įvykdyti būtina parodyti, kad liekamoji dalis irgi likusios populiacijos dalis. Tai galime išreikšti kai $b_2 = 0$.

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N(0)} \right) = \log_{10} \left(\frac{1 + \exp(-b_1 t_l)[(1 - F_1) \exp(b_1 t) + F_1]}{1 + \exp(-b_1 t_l) \exp(b_1 t)} \right)$$

Van Impe savo darbe taip pat parodo išlinkimo tašką, kuris apskaičiuojamas

$$t_{infl} = \frac{1}{2b_1} \ln \left(\frac{1 + F_1 \exp(-b_1 t_l)}{1 - F_1} \right) + t_l.$$

Primoji išvestinė išlinkimo taško formulėje gana gerai pašalina laiko t parametą.

$$\frac{dN}{dt} = -b_1 \left(1 - \frac{N(0)(1 - F_1)}{N} \right) \left[1 - \frac{N - N(0)(1 - F_1)}{N(0)F_1(1 + \exp(-b_1 t_l))} \right] N.$$

Matyti, kad šis modelis apima klasikinę inaktyvavimo kinetikos tiesę, net parinkus $t_l = -\infty$, nors tai yra fiziškai neįmanoma.

2.2.5 Baranyi augimo modelis

Negalima nepaminti Baranyi ir Robertso augimo modelio, kuris jau tapo standartiniu modeliu daugelyje prognozuojamos mikrobiologijos tiriamųjų darbų. Supaprastinta šio modelio lygtis tokia:

$$\begin{aligned} \frac{dq}{dt} &= \mu_{max} q(t) \\ \frac{dx}{dt} &= \mu_{max} \left(\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right) \left(1 - \frac{x}{x_{max}} \right) x \end{aligned} \tag{2.2}$$

Literatūroje [10] yra detaliai aprašytas šitas modelis, aptarti visi jo kintamieji. Pilna modelio išraiška tokia:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0}) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}t} + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0})}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right), \quad (2.3)$$

kur $y(t) = \ln(x(t))$ su $x(t)$ ląstelės koncentracija (cfu/ml), $y_0 = \ln(x_0)$, $y_{max} = \ln(x_{max})$ su, atitinkamai, x_0 pradine bei x_{max} asimptotinė koncentracija, μ_{max} maksimali specifinė augimo norma (1/h), m kreivinis parametras, charakterizuojantis perėjimą iš eksponentinės fazės, ν kreivinis parametras, charakterizuojantis perėjimą į eksponentinę fazę, h_0 nedimensinis parametras, įvertinantis ląstelės pradinę fiziologinę būseną.

Kaip inaktyvavimo kreivę J. Baranyi (1996), pasiūlė augimo kreivės veidrodinį atvaizdą bei pateikė dvi prielaidas.

1. η_i yra natūralusis logaritmas išmatuotų ląstelių koncentrato inaktyvavimo kreivėje ($i = 0, \dots, k - 1$, kur k - eksperimento žingsnių skaičius). Toliau išrinkti fiksuotą reikšmę η_{fix} , didesnę už bet kurį kitą η_i , peržymėti η_i į $\eta_{fix} - \eta_i$ visuose taškuose. Naujosios η_i reikšmės nurodys inaktyvavimo kreivę.
2. Augimo funkcija gali būti sumodeliuota (2.2) nelygybių. Rezultatas μ_{max} reikš maksimalią specifinę inaktyvavimo normą, lag fazės atitikimą atramos atžvilgiu bei stacionaraus lygio atitikimą liekamajai daliai.

J.Baranyi (1996) savo darbuose pademonstravo, kad šis inaktyvavimo modelis gali gerai aprašyti atramas bei liekamasias dalis.

2.2.6 Stochastinis modelis

Augantys eksperimentų įrodymai bei teorinė analizė leidžia daryti prielaidą, kad log-tiesinis, arba pirmos rūšies, kinetikos mirtingumas yra dažniau išimtis negu taisyklė. [13] Remiantis alternatyvia prielaida, mikrobo inaktyvavimo kreivė, kaip ir visos išlikimo

kreivės, yra pasiskirstymo funkcija pagal mikrobu mirties laiką arba atskirais atvejais pagal dauginimosi nustojimo laiką.

Dažniausiai šiuos laiko momentus t aprašanti pasiskirstymo funkcija yra vadinama Weibullo. Šis modelis gali būti užrašytas įvairiomis formomis, bet pastaraisiais metais tapo įprasta jo diferencialinė arba integralinė forma.

Per laiko atkarpą Δt_1 dalis bakterijų miršta su tikimybe p_1 , o likusieji išgyvena su tikimybe $1 - p_1$. Sekančią atkarpą Δt_2 dalis iš išlikusiųjų mirs su tikimybe p_2 , kita dalis išgyvens su tikimybe $1 - p_2$, o skaičiuojant nuo pradinio laiko išgyvenusiųjų bus $1 - (1 - p_1)(1 - p_2)$. Taip tęsiant procesą gausime lygtį $P(n)$:

$$P(n) = \prod_{i=1}^n [1 - P_m(t)\Delta t].$$

Analitiškai lygybė išreiškiama:

$$\ln \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = - \int_0^t P_m(s) ds.$$

Kai Δt artėja prie nulio ir "laiptų" skaičius $n \rightarrow \infty$, pastarąją lygybę galime transformuoti į tolydų ir visiškai apibrėžtą modelį:

$$N(t) = N_0 \exp \left(- \int_0^t P_m(s) ds \right)$$

kur $N(t)$ žymi išgyvenusiųjų bakterijų skaičių momentu t , N_0 žymi pradinį bakterijų skaičių, o $P_m(s)$ - tikimybinę mirtingumo normos funkciją. Pastarąją lygybę aprašytas modelis tinkamas tik didelėms populiacijoms nagrinėti.

3 Skyrius

Modelio taikymas

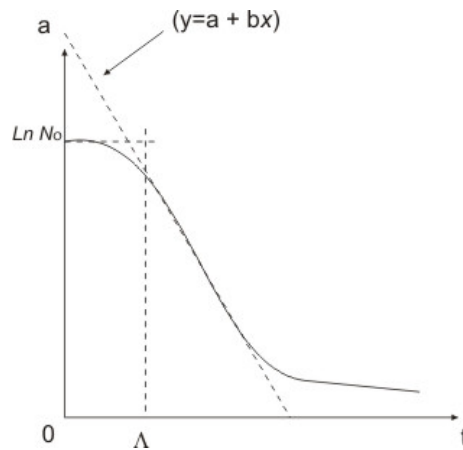
3.1 Lag fazės ilgis

Bakterijos mirtingumo kreivė yra skaidoma į tris dalis: lag fazė, mažėjimo stadija bei liekamoji dalis.

Lag fazė ($\lambda(t)$) - tai "sulėtinimo" laikas, per kurį bakterijų neįtakoja švitinimas.

Mažėjimo stadija - laikotarpis, per kurį miršta absoliuti pradinio bakterijų skaičiaus $N(t)$ dalis (dažniausiai išsiskiria natūraliai).

Liekamoji dalis - švitinimui atsparių bakterijų dalis.



3.1 brėžinys: Bendroji mirtingumo kreivė

Lag fazės ilgis priklauso nuo mažėjimo stadijos atkarpos, kuri yra interpretuojama kaip regresijos tiesė $\hat{y}(x) = \hat{a} + \hat{b}x$. Naudojant mažiausiųjų kvadratų metodą, randami atitinkami koeficientai bei μ_{max} prilyginamas b , ($\mu_{max} = b$).

Iš funkcijos $\hat{y}(x_i) = \hat{a} + \hat{b}x_i$, įverčiai \hat{a} ir \hat{b} randami minimizuojant $SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2$, kur i - i-tasis stebėjimas, n - stebėjimų skaičius. Literatūroje [5] turime išvestus šituos koeficientus:

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - (\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i) / n}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2 / n},$$

$$\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x},$$

kur $\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i / n$, $\bar{x} = \sum_{i=1}^n x_i / n$.

Pažymėkime lag fazės funkciją $\lambda(i)$, inkubacijos laiką i . 1 paveikslėlyje aiškiai matyti, kad $\lambda(i)$ - tai pradinio skaičiaus ir a koeficiento skirtumo santykis su nuokrypiu, t.y. $\lambda(i) = (\ln N_0 - a(i)) / \mu_{max}(i)$.

Prieš nustatant koeficientų pasikliautinius intervalus, reikia atlikti atskirų bandymų dispersinę duomenų analizę (ANOVA). Taikome Fišerio LSD ($\alpha = 0.05$) kriterijų duomenims ir sudarome rezultatų lentelę. Raide T pažymime, kur buvo aptiktas reikšmingas skirtumas tarp vidurkių, N - kur neaptikta (t - švitinimo laikas).

	$i = 2$	$i = 15$	$i = 30$	$i = 60$
$t = 5$	N	N	N	N
$t = 10$	N	T	N	N
$t = 15$	T	T	N	N

3.1 lentelė: ANOVA tarp bandymų.

Tarp bandymų duomenų su aptiktais vidurkių skirtumais skaičiuojami Spirmano koreliacijos koeficientai. Gaunama, kad $\rho_{15} = 0.93729$ ir $\rho_2 = 0.86249$. Vertinant procentais, būtų 8.09 proc. su $i = 2$ ir $t = 15$, 3.36 proc. su $i = 15$ ir $t = 10$ bei 9.00 proc. su $i = 15$ ir $t = 15$.

Dipersijos tarp atskirų bandymų yra nedidelės, norint gauti gana tikslias regresines tieses. stebint priklausomybę nuo inkubacinio periodo, gaunami keturių kreivių koeficientus kiekvienam bandymui. Žemiau, lentelėse 2.2 ir 2.3, pateikti atitinkamų kreivių koeficientai, o 2.4 lentelėje $\lambda_m(i)$, m - bandymo numeris, įverčiai bei įverčių pasikliautinieji intervalai.

i , min.	$\hat{a}(i)$	$\hat{a}(i)$ paklaida	$\hat{b}(i)$	$\hat{b}(i)$ paklaida
2	8,20044	0,10883	-0,30642	0,00908
15	8,49221	0,09715	-0,39533	0,00864
30	8,5003	0,09378	-0,42587	0,00816
60	8,11255	0,0605	-0,4138	0,00541

3.2 lentelė: Pirmojo bandymo įverčiai.

i , min.	$\hat{a}(i)$	$\hat{a}(i)$ paklaida	$\hat{b}(i)$	$\hat{b}(i)$ paklaida
2	8,15586	0,13066	-0,28577	0,01154
15	8,3047	0,25941	-0,36684	0,02257
30	8,20715	0,14712	-0,39169	0,01308
60	8,09063	0,0639	-0,40863	0,00569

3.3 lentelė: Antrojo bandymo įverčiai.

Šiuos įverčius gerai aprašo funkcija $\lim_{i \rightarrow 0} \lambda(i)/\log(i + pagrindas)$. Matyti, kad kai $i \rightarrow 0$, tai $\lambda(i)$ artėja apytiksliai prie 4, tad gaunama apytikslė išraiška:

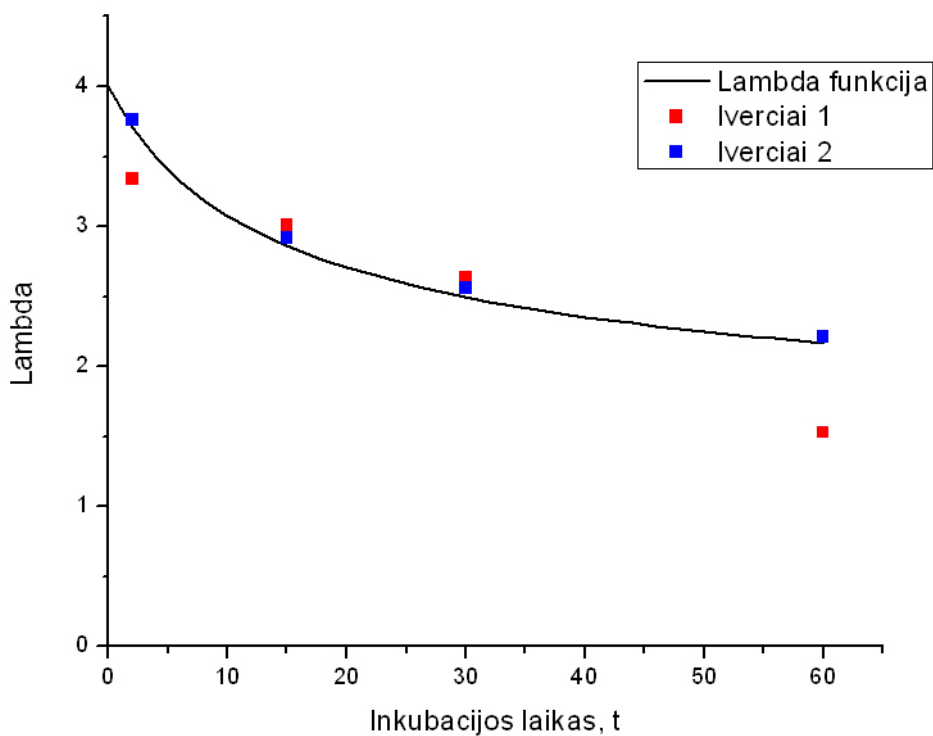
$$\lambda(i) = \frac{4}{\log(i + 10)}.$$

Modeliuojant realius duomenis matyti, kad pačioje lag fazėje irgi vyksta bakterijų nykimas, į kurį taip pat reikia atsižvelgti. Todėl turime iš visos populiacijos N reikia išskirti švitinimui neatsparią populiacijos dalį $C(\lambda(i))$,

$$\frac{dC(\lambda(i))}{dt} = -k_{max}C(\lambda(i)),$$

i , min.	$\lambda_1(i)$	$\lambda_1(i)$ intervalas	$\lambda_2(i)$	$\lambda_2(i)$ intervalas
2	3,34296	[2,9018 ; 3,81105]	3,76764	[3,18193 ; 4,40265]
15	3,01313	[2,7082 ; 3,33169]	2,92839	[2,0925 ; 3,87388]
30	2,63012	[2,3646 ; 2,90601]	2,56078	[2,11456 ; 3,03782]
60	1,53559	[1,37146 ; 1,70408]	2,21009	[2,02551 ; 2,39988]

3.4 lentelē: $\lambda_m(i)$ ģverĉiai su pasikliautiniaisiais intervalais



3.2 brēžinys: Lambda apytikslē funkcija bei realūs ģverĉiai

kur k_{max} maksimalus inaktyvavimo greitis išskirtoje populiacijos dalyje, kuris taip pat kinta priklausomai nuo švitinimo laiko t . Koregavimui yra parenkamas α su atitinkamais reikalavimais: jo reikšmė turi būti apytiksliai lygi 0 inaktyvavimo pradžioje bei apytiksliai 1 lag fazės pabaigoje,

$$\alpha = 1 - \frac{C(\lambda(i))}{C(\lambda(i)) - K_c(\lambda(i))}.$$

$K_c(\lambda(i))$ su $C(\lambda(i))$ sieja priklausomybė: jie parinkti taip, kad α būtų lygi pusei pradinės reikšmės 1. Padalijus skaitiklį ir vardiklį iš to paties skaičiaus, $K_c(\lambda(i))$, bei pertvarkius lygybę gauname

$$\alpha = \frac{1}{1 + C_c(\lambda(i))},$$

su $C_c(\lambda(i))$, žyminčia fiziologinę populiacijos, inkubuotos i minučių, būseną.

3.2 Tiesinė bei liekamoji dalys

Aprašant stochastinį inaktyvavimo modelį, jau minėta, kad log-tiesinis arba pirmos rūšies, kinetikos mirtingumas yra dažniau išimtis negu taisyklė. Dažniausiai tokia tiesė gerai aprašo tik mirtingumo kreivės nuolydį be lag fazės ir liekamosios dalies. Tuo remiantis užrašoma lygtis:

$$\frac{dN(\lambda(i))}{dt} = -kN(\lambda(i)),$$

kur

$$k = k_{max}\alpha \left(1 - \frac{N_r(\lambda(i))}{N(\lambda(i))}\right),$$

$N_r(\lambda(i))$ žymi, inkubuotą i minučių, atsparią švitinimui populiacijos dalį, k_{max} - maksimalų inaktyvavimo greitį. Daugiklis $1 - N_r(\lambda(i))/N(\lambda(i))$ reikalingas liekamosios dalies įverčiui.

3.3 Lygties išvedimas

Pertvarkius aukščiau užrašytą lygybę gaunama:

$$\frac{dN(\lambda(i))}{dt} = -k_{max} \alpha \left(1 - \frac{N_r(\lambda(i))}{N(\lambda(i))}\right) N(\lambda(i)) = -k_{max} \left(\frac{1}{1 + C_c(\lambda(i))}\right) \left(1 - \frac{N_r(\lambda(i))}{N(\lambda(i))}\right) N(\lambda(i))$$

Reikia ją išspręsti bei išreikšti $N(\lambda(i))$. Pradedama nuo švitinimui neatsparios populiacijos dalies $C(\lambda(i))$.

$$\frac{dC(\lambda(i))}{dt} = -k_{max} C(\lambda(i)), \quad dC(\lambda(i)) = -k_{max} C(\lambda(i)) dt, \quad \frac{dC(\lambda(i))}{C(\lambda(i))} = -k_{max} dt$$

Suintegruojamos abi pusės, $\ln C(\lambda(i)) = -k_{max} t$, ir gaunama

$$\boxed{C(\lambda(i)) = C_0(\lambda(i)) \exp(-k_{max} t)}.$$

Toliau išdiferencijuojamas $N(\lambda(i))$.

$$\begin{aligned} \frac{dN(\lambda(i))}{dt} &= -k_{max} \left(\frac{1}{1 + C_c(\lambda(i))}\right) \left(1 - \frac{N_r(\lambda(i))}{N(\lambda(i))}\right) N(\lambda(i)) \\ \frac{dN(\lambda(i))}{\left(1 - \frac{N_r(\lambda(i))}{N(\lambda(i))}\right) N(\lambda(i))} &= -k_{max} \left(\frac{1}{1 + C_c(\lambda(i))}\right) dt \end{aligned}$$

Supaprastinama ir įrašomas $C(\lambda(i))$ vietoje $C_c(\lambda(i))$.

$$\begin{aligned} \frac{d(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))}{N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i))} &= -k_{max} \left(\frac{1}{1 + C_0(\lambda(i)) \exp(-k_{max} t)}\right) dt \\ \frac{d(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))}{N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i))} &= -k_{max} \left(\frac{\exp(k_{max} t)}{\exp(k_{max} t) + C_0(\lambda(i))}\right) dt \end{aligned}$$

Padaromas keitinys $\exp(k_{max} t) = y$, $dy = k_{max} \exp(k_{max} t) dt$.

$$\frac{d(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))}{N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i))} = -\frac{dy}{y + C_0(\lambda(i))}$$

$$d(\ln(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))) = -\frac{d(y + C_0(\lambda(i)))}{y + C_0(\lambda(i))}$$

$$d(\ln(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))) = -d(\ln(y + C_0(\lambda(i))))$$

$$\ln(N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i))) = -\ln(y + C_0(\lambda(i)))$$

$$N(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)) = \frac{1}{y + C_0(\lambda(i))}$$

$$N(\lambda(i)) = \frac{1}{y + C_0(\lambda(i))} + N_r(\lambda(i))$$

$$N(\lambda(i)) = \frac{1}{\exp(k_{max}t) + C_0(\lambda(i))} + N_r(\lambda(i))$$

$$N(\lambda(i)) = \frac{\exp(-k_{max}t)}{1 + C_0(\lambda(i)) \exp(-k_{max}t)} + N_r(\lambda(i))$$

Taške $t = 0$ (pažymima $N(\lambda(i)) = N_0(\lambda(i))$) gaunama

$$N_0(\lambda(i)) = \frac{1}{1 + C_0(\lambda(i))} + N_r(\lambda(i)),$$

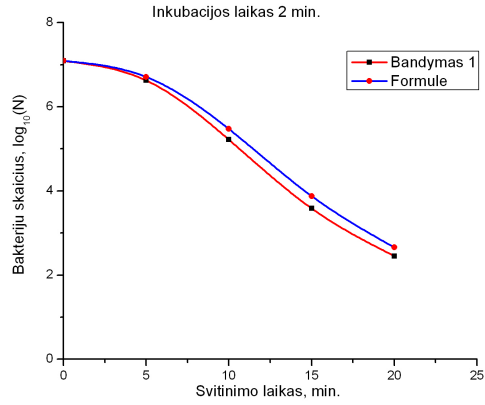
tad čia reikalingas aproksimavimo daugiklis $(1 + C_0(\lambda(i)))(N_0(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i)))$ normalizavimui nuliniame taške. Gaunamas rezultatas

$$N(\lambda(i)) = (1 + C_0(\lambda(i)))(N_0(\lambda(i)) - N_r(\lambda(i))) \frac{\exp(-k_{max}t)}{1 + C_0(\lambda(i)) \exp(-k_{max}t)} + N_r(\lambda(i)).$$

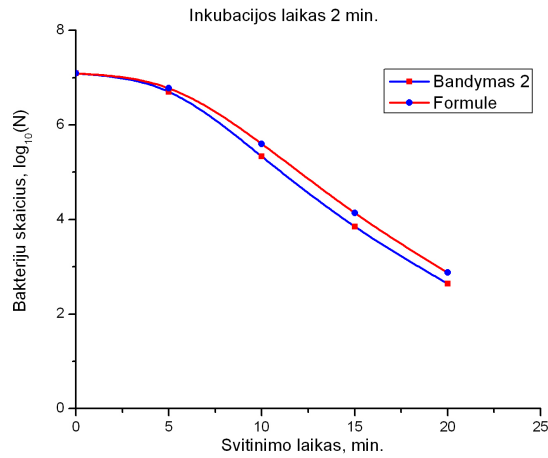
3.4 Rezultatų aptarimas

Išvedus lygtį bei atlikus modeliavimą, priartėjama prie rezultatų aptarimo. Kiekvienu atveju reikia įvertinti **RMSD** tarp išvestos formulės tiesės bei realių bandymų duomenų, įvertinti liekamąją dalį $f(\lambda(i)) = N_r(\lambda(i))/N_0$. Biologinė dažnio reikšmė - tai atsparių bakterijų procentas pradinėje populiacijoje, kuri interpretuojama kaip liekamoji dalis.

Pradedama nuo inkubuotų po 2 minutes bakterijų aptarimo. Žemiau pateikiami dviejų bandymų realiųjų rezultatų po švitinimo ir naujai išvestosios formulės grafikai.



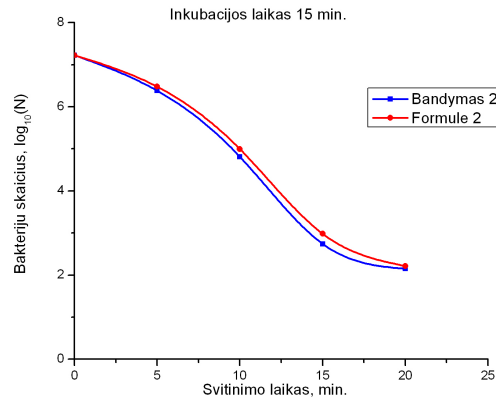
3.3 brėžinys: Pirmojo bandymo kreivės (inkubacija 2 min.)



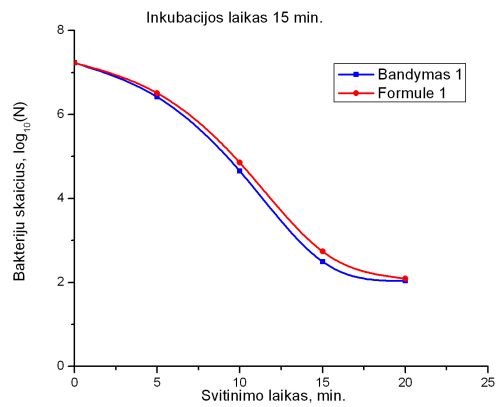
3.4 brėžinys: Antrojo bandymo kreivės (inkubacija 2 min.)

Paskaičiuojami atsparių bakterijų santykiniai dažniai $f(\lambda_m(2)) = N_r(\lambda_m(2))/N_0$.
 Gaunama $f(\lambda_1(2)) = 0,346$, $f(\lambda_2(2)) = 0,373$.

RMSD įverčiai: **RMSD**($\lambda_1(2)$) = 0.1988, **RMSD**($\lambda_2(2)$) = 0.2067.



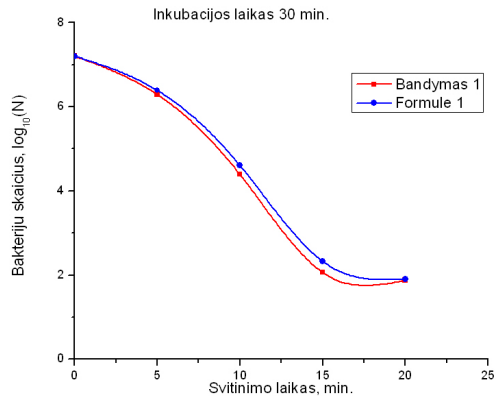
3.5 brėžinys: Pirmojo bandymo kreivės (inkubacija 15 min.)



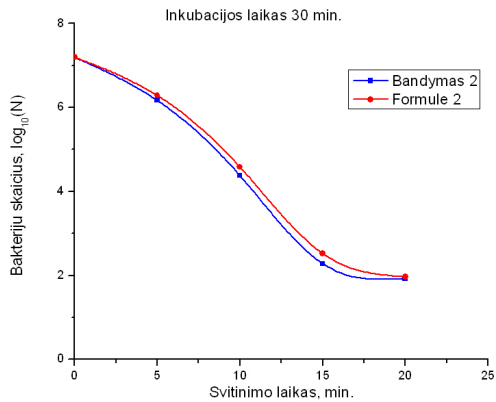
3.6 brėžinys: Antrojo bandymo kreivės (inkubacija 15 min.)

Paskaičiuojami atsparių bakterijų santykiniai dažniai $f(\lambda_m(15)) = N_r(\lambda_m(15))/N_0$.
 Gaunama $f(\lambda_1(15)) = 0,282$, $f(\lambda_2(15)) = 0,297$.

RMSD įverčiai: **RMSD**($\lambda_1(15)$) = 0.1622, **RMSD**($\lambda_2(15)$) = 0.1744.



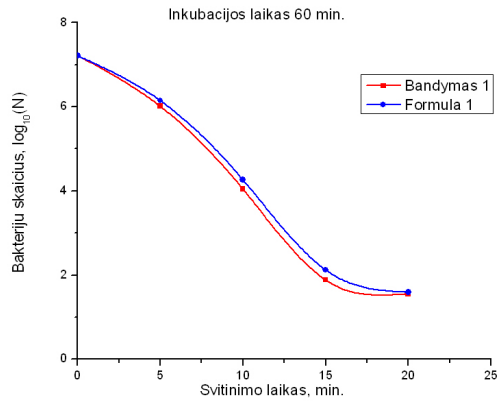
3.7 brėžinys: Pirmojo bandymo kreivės (inkubacija 30 min.)



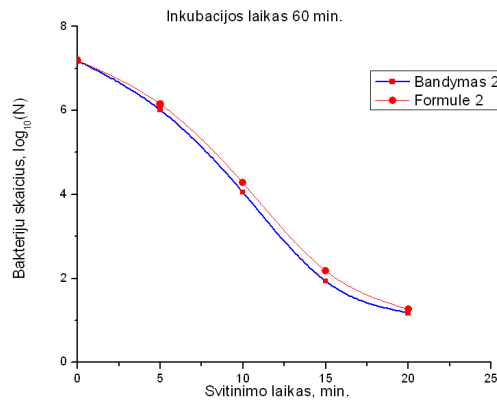
3.8 brėžinys: Antrojo bandymo kreivės (inkubacija 30 min.)

Paskaičiuojami atsparių bakterijų santykiniai dažniai $f(\lambda_m(30)) = N_r(\lambda_m(30))/N_0$.
 Gaunama $f(\lambda_1(30)) = 0,261$, $f(\lambda_2(30)) = 0,268$.

RMSD įverčiai: **RMSD**($\lambda_1(30)$) = 0.1514, **RMSD**($\lambda_2(30)$) = 0.1659.



3.9 brėžinys: Pirmojo bandymo kreivės (inkubacija 60 min.)



3.10 brėžinys: Antrojo bandymo kreivės (inkubacija 60 min.)

Paskaičiuojami atsparių bakterijų santykiniai dažniai $f(\lambda_m(60)) = N_r(\lambda_m(60))/N_0$.
 Gaunama $f(\lambda_1(60)) = 0,216$, $f(\lambda_2(60)) = 0,164$.

RMSD įverčiai: $\text{RMSD}(\lambda_1(60)) = 0.1598$, $\text{RMSD}(\lambda_2(60)) = 0.1652$.

Kaip matyti, išvesta bakterijų inaktyvavimo formulė gana gerai aprašo turimus duomenis bei atitinka jai keliamus reikalavimus:

- aprašo bakterijų inaktyvavimą kaip nuo laiko priklausančią funkciją,
- lag fazės ilgiai, inaktyvavimo normos ir liekamosios dalys susiję tarpusavyje,

- modelis turi būti dinaminis,
- neturi priklausyti nuo $N(0)$ ir t_0 dešinioje nelygybės pusėje,
- ir nekintamom sąlygom nelygybė $N = f(t)$ taške t_0 , pažymekime $N(t_0)$ turi būti lygus pradiniam dydžiui.

Apibendrinami gauti $f(\lambda_m(i))$ dažniai ir **RMSD** įverčiai surašomi į lenteles.

	$i = 2$	$i = 15$	$i = 30$	$i = 60$
$m = 1$	0.346	0.282	0.261	0.216
$m = 2$	0.373	0.297	0.268	0.164

3.5 lentelė: Santykiniai $f(\lambda_m(i))$ dažniai.

	$i = 2$	$i = 15$	$i = 30$	$i = 60$
$m = 1$	0.1988	0.1622	0.1514	0.1598
$m = 2$	0.2067	0.1744	0.1659	0.1652

3.6 lentelė: **RMSD**($\lambda_m(i)$) įverčiai.

4 Skyrius

Išvados

Šiame darbe tiriama bakterijos *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium švitinimo poveikio priklausomybė nuo inkubacinio periodo. Trumpai aptariami bakterijų inaktyvavimą aprašantys dažniausiai naudojami modeliai, tokie kaip Baranyi modelis, Gompertz modelis, Xiong modelis ir kt.

Turimoms duomenims skaitiškai išreiškiame lag fazę ir randame jos ilgį aprašančią funkciją. Remdamiesi aprašytais matematiniais modeliais išvedėme inaktyvavimą aprašančią lygtį.

Darbo pabaigoje realiems duomenims panaudojome išvestą formulę, aptarėme grafikus ir apskaičiavome RMSD.

Atlikus modeliavimą galime teigti, kad jau po 30 minučių praleistų inkubaciniame periode ir 15 minučių švitinimo, bakterijų skaičius labai priartėja prie $\log_{10}(N) = 2$, t.y. $N(\lambda(30), 15) \rightarrow 2$ ir mažai tesiskiria nuo $N(\lambda(60), t)$, kai $t = 20$ min. Likusioji populiacijos dalis praktiškai toliau nebemažėja.

Literatūra

1. CDC. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008.
2. Ž. Lukšienė, V. Gudelis, I. Buchovec, J. Raudeliūnienė (2006), Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: effects on Salmonella typhimurium viability in vitro, Journal of Applied Microbiology.
3. World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>
4. Economic Research Service, <http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>
5. Čekanavičius V., Murauskas G., Statistika ir jos taikymai. II, Vilnius: TEV, 2002.
6. Čekanavičius V., Murauskas G., Statistika ir jos taikymai. III, Vilnius: TEV, 2009.
7. R. Xiong, G. Xie, A.E. Edmondson, M.A. Sheard, A mathematical model for bacterial inactivation, International Journal of Food Microbiology, 46 (1999) 45-55.
8. A.H. Geeraerd, C.H. Herremans, J.F. Van Impe, Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment, International Journal of Food Microbiology, 59 (2000) 185-209.
9. V.P. Valdramidis, K.B., J.F. Van Impe, A.H. Geeraerd, An Alternative Approach to Non-Log-Linear Thermal Microbial Inactivation Modelling the Number of Log Cycles Reduction with Respect to Temperature, Thermal Microbial Inactivation, Food Technol. Biotechnol., 43(4) (2005) 321-327.
10. K. Grijspeerdt, P. Vanrolleghem, Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth, FoodMicrobiology, 1999, 16, 593-605.
11. Yoon-jin Lee, Sang-ho Nam, Reflection on Kinetic Models to the Chlorine Disinfection

for Drinking Water Production, The Journal of Microbiology, June 2002, p.119-124.

12. Maria M. Gil, Teresa R.S. Brandao, Cristina L.M. Silva, A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions, Universidade Catolica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia.

13. M.G. Corradini, M.D. Normand, A. Peleg, Stochastic and Deterministic Model of Microbial Heat Inactivation, Journal of Food Science, Vol.75, Nr. 2, 2010.