



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΚΟΚΚΙΝΟΥ**

**ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ**



**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**ΑΝΤΩΝΗΣ ΚΟΚΟΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2011**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου στο Ε.Μ.Π., κ. Κοκόση Αντώνη, για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου στο Πανεπιστήμιο του Manchester, κ. Θεοδωρόπουλο Κωνσταντίνο, για τη βοήθεια και την άψογη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας στο Manchester, μέσω του προγράμματος εράσμων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Antonio Alonso, για την βοήθεια που μου προσέφερε στην κατανόηση του προβλήματος από μαθηματικής πλευράς, καθώς και στην επίλυσή του.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δόκτωρ Ιωάννη Μπόνη, για την υπομονή και τη βοήθειά του όποτε εμφανιζόταν οποιοδήποτε πρόβλημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους, για την υπομονή, την κατανόηση και τη στήριξη τους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
2.1 Ασφάλεια Τροφίμων .....	5
2.2 Μικροβιολογία Τροφίμων .....	5
2.2.1 Φρέσκα Τρόφιμα .....	6
2.2.2 Είδη και παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	7
2.2.3 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης .....	9
2.2.4 Προρρητική Μικροβιολογία.....	11
2.3 Μοντέλα ανάπτυξης Μικροοργανισμών .....	13
2.3.1 Το μοντέλο Monod.....	13
2.3.2 Η συνάρτηση Gompertz.....	13
2.3.3 Η λογιστική συνάρτηση.....	14
2.3.4 Το μοντέλο Baranyi .....	15
2.4 Ανάλυση της Βιβλιογραφίας.....	16
2.4.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο .....	16
2.4.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο .....	20
2.5 Στόχος και Κατεύθυνση της Διπλωματικής Εργασίας.....	21
3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ .....	23
3.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο .....	24
3.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο .....	27
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
4.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο .....	31
4.1.1 Ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi .....	31
4.1.2 Στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού (Μοντέλο Α) .....	34
4.1.3 Στοχαστικό μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Μοντέλο Β) ....	36
4.1.4 Νέο στοχαστικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμού (Μοντέλο Γ) .....	39
4.1.5 Κατανομή του πληθυσμού ως προς το μέγεθος του μικροοργανισμού .....	42
4.1.6 Σύγκριση των μοντέλων με βάση το συνολικό μέγεθος του πληθυσμού μικροοργανισμών ..	54
4.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο .....	59
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α .....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β .....	69

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σύγχρονη ανάγκη για μεγάλης κλίμακας μικροβιακούς ελέγχους με μικρό κόστος για τη βιομηχανία τροφίμων, οδήγησε στην ανάπτυξη της προορρητικής μικροβιολογίας, που χρησιμοποιεί μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εισαγωγή δύο νέων μοντέλων πρόβλεψης, που να δίνουν ακριβέστερα, για το μικροσκοπικό, και ταχύτερα, για το μακροσκοπικό, αποτελέσματα συγκριτικά με τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα.

Αρχικά αναλύεται το νέο, στοχαστικό, μικροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμών που προτείνεται και στη συνέχεια συγκρίνεται με κάποια ήδη υπάρχοντα στοχαστικά μοντέλα και με το βασικό ντετερμινιστικό μοντέλο στο οποίο στηρίζονται. Η σύγκριση πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το χρόνο, και με βάση την κατανομή του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το μέγεθος του κυττάρου, σε σταθερή κατάσταση. Προκύπτει ότι το μοντέλο που δίνει τα κοντινότερα αποτελέσματα με το ντετερμινιστικό είναι το νέο μικροσκοπικό μοντέλο που προτάθηκε.

Στη συνέχεια αναλύεται το νέο μακροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμών που προτείνεται και ακολούθως συγκρίνεται με ένα παραπλήσιο μικροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης, καθώς δεν υπήρχε προγενέστερο μακροσκοπικό για να συγκριθεί. Η σύγκριση πραγματοποιείται με βάση την μεταβολή της κατανομής του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το μέγεθος του κυττάρου, με το πέρασ του χρόνου και σε σταθερή κατάσταση. Προκύπτει ότι το νέο μακροσκοπικό μοντέλο που προτάθηκε εμφανίζει μικρές, αλλά δικαιολογημένες αποκλίσεις από το αντίστοιχο μικροσκοπικό.

## **2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **2.1 Ασφάλεια Τροφίμων**

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι ένας επιστημονικός κλάδος που έχει ως στόχο την προστασία των τροφίμων από αλλοιώσεις και μολύνσεις και κατά συνέπεια την προστασία των καταναλωτών από διατροφικές ασθένειες. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, ο κλάδος ασχολείται με την περιγραφή του χειρισμού, της προετοιμασίας, και της αποθήκευσης των τροφίμων με τρόπους που εμποδίζουν την μόλυνση και ρύπανση τους. Αυτό περιλαμβάνει μια σειρά από περίπλοκες ρουτίνες, οι οποίες κατοχυρώνονται σε παγκόσμιο επίπεδο ως πρότυπα, που πρέπει να ακολουθούνται για την αποφυγή δυνητικά σοβαρών κινδύνων για την υγεία του καταναλωτή.

Τα τρόφιμα μπορούν να δράσουν είτε ως φορέας μίας νόσου, και να την μεταδώσουν από άτομο σε άτομο, είτε ως μέσο ανάπτυξης για μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα, και γι' αυτό η μελέτη της επίδρασης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ασφάλεια τροφίμων. Η επιστήμη που ασχολείται με την μελέτη των μικροοργανισμών που επιβιώνουν και αναπτύσσονται στα τρόφιμα ονομάζεται μικροβιολογία τροφίμων.

### **2.2 Μικροβιολογία Τροφίμων**

Για να μπορεί να επιτευχθεί η παρασκευή και η διανομή ασφαλών και υγιεινών τροφίμων, είναι απαραίτητος ο μικροβιολογικός έλεγχος του προϊόντος κατά τη διάρκεια της παραγωγής του. Υπάρχουν όμως, ανάλογα με την κατηγορία τροφίμου, σημαντικές διαφορές στη διαδικασία παραγωγής για κάθε κατηγορία, που σε μερικές περιπτώσεις καθιστούν πολύ δυσκολότερο τον έλεγχο της ποιότητάς και της διατηρησιμότητας του αντίστοιχου προϊόντος. Μία κατηγορία τροφίμων που να ανήκει σε αυτές τις περιπτώσεις είναι αυτή με την οποία ασχολείται η παρούσα διπλωματική, και είναι η κατηγορία των φρέσκων τροφίμων, δηλαδή τρόφιμα τα

οποία έχουν περάσει από την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία κατά τη διάρκεια της παραγωγής.

### **2.2.1 Φρέσκα Τρόφιμα**

Από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση, τα τρόφιμα περνούν από διάφορα στάδια επεξεργασίας ώστε να μετατραπούν, από την αρχική ακατέργαστη μορφή τους, σε τελικό προϊόν. Στη σύγχρονη αγορά όμως, έχει αναδειχθεί σε ολοένα και σημαντικότερη, μία κατηγορία προϊόντων που να συνδυάζει την ευκολία χρήσης, την υψηλή ποιότητα και τη διατηρησιμότητα με τη μέγιστη δυνατή φρεσκάδα. Είναι δηλαδή τρόφιμα που έχουν περάσει από την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία, περιέχουν τα λιγότερα δυνατά συντηρητικά και των οποίων η διατηρησιμότητα στηρίζεται κατά βάση στις ιδιότητες της συσκευασίας τους, καθώς και της ατμόσφαιρας εντός της συσκευασίας.

Οι εταιρείες παραγωγής τροφίμων όμως, επιθυμούν να παράγουν τρόφιμα τα οποία όχι μόνο να είναι απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς, που να μπορούν να αλλοιώσουν το προϊόν ή να προκαλέσουν ασθένειες, αλλά και να έχουν τη μέγιστη δυνατή διατηρησιμότητα, για λόγους μεταφοράς και διάθεσης του προϊόντος. Αυτός ο στόχος των εταιρειών όμως έρχεται σε αντίθεση με την όλη λογική των ελάχιστα επεξεργασμένων τροφίμων, και γι αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν τρεις προσεγγίσεις που να διασφαλίζουν την υγιεινή και την ποιότητα των τροφίμων.

Οι προσεγγίσεις αυτές έχουν ως στόχο τη συστηματοποίηση και τη βέλτιστη αξιοποίηση της έρευνας και της συλλογικά αποκτώμενης γνώσης της μικροβιολογίας τροφίμων, και είναι η τεχνολογία εμποδίων, το σύστημα διασφάλισης ασφάλειας και υγιεινής HACCP και η προρρητική μικροβιολογία. Από τις τρεις αυτές προσεγγίσεις, αυτή στην οποία εντάσσεται και η προσπάθεια που πραγματοποιείται με την παρούσα διπλωματική εργασία είναι η προρρητική μικροβιολογία.

### 2.2.2 Είδη και παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μικροβιολογία τροφίμων ονομάζεται η επιστήμη που ασχολείται με την μελέτη των μικροοργανισμών που επιβιώνουν και αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Με τον όρο μικροοργανισμός, ονομάζεται ένα έμβιο ον, το οποίο δεν είναι ορατό με γυμνό οφθαλμό, και για να παρατηρηθεί απαιτείται μικροσκόπιο. Μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι ανάλογα με την πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας που απαιτούν για την επιβίωσή τους, χωρίζονται στις εξής τέσσερις ομάδες:

- τα φωτοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>
- τα φωτοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις
- τα χημειοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν το CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα και αντλούν ενέργεια από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανοργάνων ουσιών
- τα χημειοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες και αντλούν ενέργεια από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οργανικών ουσιών

Από τις τέσσερις αυτές ομάδες, οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην τελευταία, δηλαδή τα χημειοετερότροφα, είναι αυτά που ενδιαφέρουν κυρίως τη μικροβιολογία τροφίμων. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα τρόφιμα μπορεί να είναι ανεπιθύμητοι (παθογόνοι ή αλλοιογόνοι), ή ωφέλιμοι (ζυμώσεις, ωρίμανση), και ταξινομούνται με βάση τις εξής κατηγορίες: τάξη, γένος, είδος και στέλεχος.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός ενός μικροοργανισμού σε ένα τρόφιμο, βρίσκονται σε διαρκή αλληλεπίδραση μεταξύ τους και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους ενδογενείς και τους εξωγενείς. Οι ενδογενείς παράγοντες σχετίζονται με την σύσταση του τροφίμου στο οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός, όπως το pH, τα θρεπτικά

συστατικά, η ενεργότητα νερού ή άλλα μικρόβια τα οποία μπορεί να αναπτύσσονται ανταγωνιστικά. Οι εξογενείς παράγοντες σχετίζονται με τις συνθήκες στις οποίες συντηρείται το τρόφιμο, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και η ατμόσφαιρα. Για κάθε παράγοντα που επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενός μικροοργανισμού έχουν προσδιορισθεί τρεις τιμές, η ελάχιστη (minimum), η άριστη (optimum) και η μέγιστη (maximum).

Μία άλλη κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών, η οποία είναι συνηθισμένη στη μικροβιολογία τροφίμων είναι ο διαχωρισμός τους σε βακτήρια, ζυμομύκητες και ευρωτομύκητες.

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι, προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν σφαιρικό, ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα, και το μέγεθός τους μετριέται σε μm. Απαντώνται παντού στη φύση σε πολύ μεγάλους αριθμούς, της τάξης των εκατομμυρίων, και αποτελούν την κυριότερη πηγή αλλοίωσης των τροφίμων. Αυτό συμβαίνει γιατί ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν, μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, ενεργότητας νερού, θρεπτικού υποστρώματος, και ατμόσφαιρας (αναερόβια ανάπτυξη), ενώ παράλληλα έχουν την δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων και της έκκρισης τοξινών στο περιβάλλον τους.

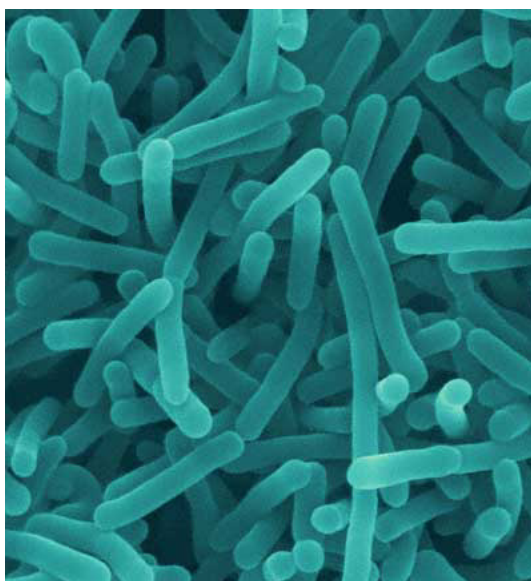
Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, δηλαδή έχουν διακριτό και οργανωμένο πυρήνα, έχουν σφαιρικό, ελλειπτικό ή ραβδόμορφο σχήμα, και το μέγεθός τους μετριέται σε μm. Είναι αερόβιοι, διατρέφονται από οργανικά συστατικά ζώντων ή νεκρών οργανισμών, είναι ανθεκτικοί σε χαμηλό pH και ενεργότητα νερού, αλλά ευαίσθητοι σε υψηλές θερμοκρασίες, και πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση, διχοτόμηση ή σπορογονία.

Οι ευρωτομύκητες είναι αερόβιοι, πολυκύτταροι μικροοργανισμοί, έχουν νηματοειδή μορφή και όσοι αναπτύσσονται στα τρόφιμα δεν είναι παθογόνοι εκτός από ελάχιστες ακραίες περιπτώσεις. Όπως και οι ζυμομύκητες, είναι μπορούν να



επιβιώσουν σε χαμηλές θερμοκρασίες, pH και ενεργότητα νερού, αλλά είναι συνήθως ευαίσθητοι στις υψηλές θερμοκρασίες.

Ο μικροοργανισμός από τον οποίο ελήφθησαν τα δεδομένα ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διπλωματική είναι ο *Listeria Innocua*. Ο *Listeria Innocua* είναι ένας από τους 6 μικροοργανισμούς που ανήκουν στο γένος *Listeria*, και είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στο έδαφος ή στην τροφή. Μπορεί να επιβιώσει σε ακραίες συνθήκες pH και θερμοκρασίας, καθώς και σε υψηλή συγκέντρωση αλατιού. Είναι ακίνδυνος για τον άνθρωπο, αλλά μελετάται από τη μικροβιολογία τροφίμων γιατί παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με ένα άλλο μέλος του γένους *Listeria*, τον *Listeria Monocytogenes*, ο οποίος είναι παθογόνος και αναπτύσσεται επίσης στα τρόφιμα. Η μορφή του μικροοργανισμού *Listeria Innocua* εμφανίζεται στην ακόλουθη εικόνα:

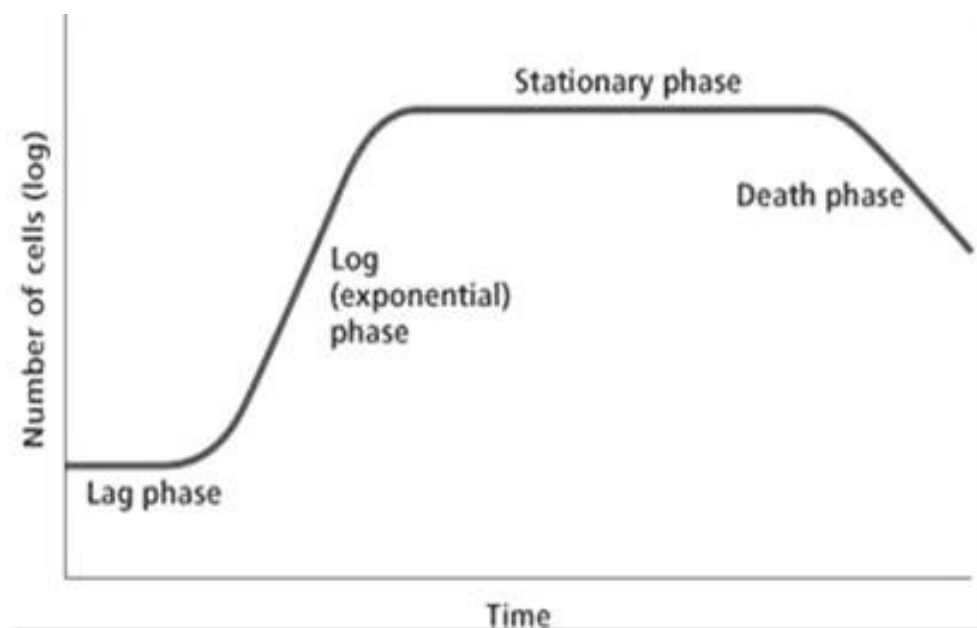


Εικόνα 1: Μορφή του μικροοργανισμού *Listeria Innocua*

### 2.2.3 Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης

Κάθε πληθυσμός μικροοργανισμών, όπως και κάθε μικροοργανισμός ως μονάδα, αν βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, θα αναπτυχθεί και τα πολλαπλασιαστεί, ακολουθώντας μία συγκεκριμένη κινητική ανάπτυξης. Η κινητική

αυτή έχει μελετηθεί διεξοδικά, εμφανίζει τις ίδιες φάσεις για κάθε ομοιογενή πληθυσμό μικροοργανισμών, και παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 2: Κινητική ανάπτυξης μικροοργανισμών

Η καμπύλη που εμφανίζεται προκύπτει από τον λογάριθμο του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου, επηρεάζεται από τη σύνθεση του τροφίμου, την ηλικία και την κατάσταση των μικροοργανισμών, καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και εμφανίζει τις εξής τέσσερις φάσεις κατά χρονολογική σειρά:

- 1) Λανθάνουσα φάση
- 2) Εκθετική φάση
- 3) Φάση στασιμότητας
- 4) Φάση θανάτου

Η λανθάνουσα φάση είναι η φάση, κατά τη διάρκεια της οποίας ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στο καινούριο περιβάλλον που βρίσκεται. Στη φάση αυτή δεν υπάρχει μεταβολή του αριθμού των κυττάρων, ενώ η διάρκειά της εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο νέο περιβάλλον.

Στην εκθετική φάση, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται λογαριθμικά, αυξάνοντας τον αριθμό τους (βακτήρια, ζύμη) ή τη βιομάζα τους (μύκητες, νηματοειδείς οργανισμοί) ανά μονάδα χρόνου, όπως φαίνεται και από τη θετική κλίση της

καμπύλης. Για όσο χρονικό διάστημα υπάρχει περίσσεια υποστρώματος, ο ρυθμός αναπτύξεως είναι ο μέγιστος και ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ ολόκληρη η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων κατευθύνεται στην αναπαραγωγή. Καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων συνεχίζει να αυξάνεται, η συσσώρευση των μεταβολιτών μέσα στο περιβάλλον φτάνει στο επίπεδο του να παρεμποδίζει πλέον την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στο θάνατο μερικών από αυτά. Έτσι ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού σταδιακά μειώνεται μέχρι που οδηγείται στην επόμενη φάση της κινητικής ανάπτυξης.

Στη φάση στασιμότητας, το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί, ο ρυθμός ανάπτυξης μηδενίζεται, εξού και ο λογάριθμος του πληθυσμού αποκτά σταθερή τιμή και ο αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει, και στο τέλος η συσσώρευση τοξινών στο περιβάλλον, οδηγεί στο σταδιακό θάνατο των κυττάρων και τη μετάβαση στην επόμενη φάση.

Τέλος, στη φάση θανάτου, οι οργανισμοί πεθαίνουν λόγω έλλειψης ενέργειας, ο πληθυσμός μειώνεται και αντίστοιχα η καμπύλη αποκτά πλέον αρνητική κλίση.

#### **2.2.4 Προρρητική Μικροβιολογία**

Η συνεχής και εκτεταμένη μελέτη της κινητικής της μικροβιακής ανάπτυξης, και η χρήση της γνώσης, που αποκτάται από τη μελέτη αυτή, σε πρακτικές εφαρμογές είναι το αντικείμενο της προρρητικής μικροβιολογίας. Η προρρητική μικροβιολογία, συνδυάζει τη γνώση για την κινητική ανάπτυξης των κυττάρων με τη μαθηματική και τη στατιστική ανάλυση και δίνει τη δυνατότητα μεγάλης κλίμακας μικροβιολογικών προβλέψεων, έχοντας ως απαίτηση ένα μικρό αριθμό πειραματικών επαληθεύσεων. Έτσι μειώνει ουσιαστικά και το χρονικό κόστος, και το κόστος πρώτων υλών και ανθρώπινης εργασίας για τη βιομηχανία τροφίμων, και επιτυγχάνεται παράλληλα και ο βασικός στόχος του να φτάσει το προϊόν ασφαλές και αναλλοίωτο στον καταναλωτή.

Ουσιαστικά, η προρρητική μικροβιολογία στηρίζεται συλλογή πειραματικών δεδομένων, που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, που να μπορούν να προβλέψουν το ρυθμό ανάπτυξης ή θανάτου των μικροοργανισμών κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Όμως, δεν περιορίζεται στη μελέτη συγκεκριμένων συστημάτων, αλλά διεξάγοντας πειράματα στα οποία μεταβάλλεται μόνο μία από τις μεταβλητές του περιβάλλοντος, π.χ. η θερμοκρασία, επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση της επίδρασης μίας ανεξάρτητης μεταβλητής στον μικροοργανισμό, και άρα αυξάνεται το εύρος χρήσης των μαθηματικών μοντέλων.

Από τις φάσεις ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού που αναλύθηκαν παραπάνω, οι πιο σημαντικές για την προρρητική μικροβιολογία είναι η λανθάνουσα φάση και η φάση στασιμότητας. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης και οι παράγοντες που την επηρεάζουν αποτελούν σημαντικές γνώσεις, καθώς κατά τη διάρκειά της ο μικροοργανισμός δεν πολλαπλασιάζεται, άρα το τρόφιμο δεν αλλοιώνεται, οπότε η επιμύκηση της λανθάνουσας φάσης αποτελεί μεγάλο κέρδος για τον συνολικό χρόνο συντήρησης του τροφίμου. Αντίστοιχα, η κινητική ανάπτυξης στην εκθετική φάση είναι σημαντική, γιατί για να προβλεφθεί η ημερομηνία λήξης του τροφίμου, πρέπει να είναι γνωστό, όχι μόνο πόσο διαρκεί η λανθάνουσα φάση, αλλά και αφού βρεθεί ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στην εκθετική, σε πόσο χρόνο θα φτάσει σε απαγορευτικά επίπεδα για την κατανάλωση του τροφίμου.

Καθίσταται λοιπόν απαραίτητη, για τους σκοπούς της προρρητικής μικροβιολογίας, η όσο το δυνατόν πιο ακριβής μοντελοποίηση της λανθάνουσας και της εκθετικής φάσης ανάπτυξης μικροοργανισμών. Πολλοί επιστήμονες έχουν ασχοληθεί με τον προσδιορισμό των κινητικών των δύο φάσεων και τη μαθηματικοποίηση των παραγόντων που τις επηρεάζουν, και είναι ένα ζήτημα που δεν θεωρείται λήξαν ακόμα και σήμερα. Παρόλα αυτά υπάρχουν στη βιβλιογραφία μοντέλα, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων, δίνουν ικανοποιητικά ακριβείς προβλέψεις, και τα οποία αναλύονται ακολούθως.

## 2.3 Μοντέλα ανάπτυξης Μικροοργανισμών

Υπάρχουν πολλά μοντέλα που να περιγράφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, τα οποία αποτελούνται από μαθηματικές συναρτήσεις που περιγράφουν τη σιγμοειδή καμπύλη που σχηματίζεται από την λανθάνουσα, την εκθετική και τη φάση στασιμότητας. Οι συναρτήσεις αυτές προέκυψαν από μαθηματικές τεχνικές, που προσδιορίζουν τις γραμμές που προσαρμόζονται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα, και οδηγούν σε αναπαραγωγίσιμα, ως ένα βαθμό, αποτελέσματα. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιημένες από αυτές τις συναρτήσεις παρουσιάζονται στη συνέχεια.

### 2.3.1 Το μοντέλο Monod

Με βάση τον Monod, ο ρυθμός με τον οποίο αυξάνεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι ανάλογος με τον αριθμό των μελών του πληθυσμού, ενώ για τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός. Το μοντέλο Monod περιγράφεται από την εξίσωση:

$$N = N_0 \times e^{[k \times (t - t_L)]}$$

, όπου  $N$  ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο  $t$ ,  $N_0$  το αρχικό φορτίο,  $k$  ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και  $t_L$  ο χρόνος λανθάνουσας φάσης. Το μοντέλο αυτό είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιημένο μοντέλο, γιατί είναι απλό και ικανοποιητικά ακριβές.

### 2.3.2 Η συνάρτηση Gompertz

Η συνάρτηση που είχε προταθεί από τον Gompertz, είναι μία σιγμοειδής συνάρτηση, είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί για την προσαρμογή δεδομένων που αφορούσαν την ανθρώπινη θνησιμότητα, κατόπιν όμως χρησιμοποιήθηκε και για πρόβλεψη της ανάπτυξης μικροοργανισμών. Με βάση αυτό το μοντέλο, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροβίων δεν είναι σταθερός με το χρόνο, αλλά αυξάνεται μέχρι ενός μεγίστου και κατόπιν μειώνεται, μία λογική θεωρία, αφού γνωρίζουμε ότι το θρεπτικό υπόστρωμα του τροφίμου μπορεί να καλύψει τις ανάγκες μέχρι ενός

συγκεκριμένου πλήθους μικροοργανισμών, και ότι για μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών δημιουργείται συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών. Το μοντέλο Gompertz, δεν συμπεριλαμβάνει και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην λανθάνουσα φάση, και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$N_t = C \times e^{[-B \times (t-M)]}$$

, όπου  $t$  είναι ο χρόνος,  $N_t$  η πυκνότητα πληθυσμού σε χρόνο  $t$ ,  $C$  η τιμή της ανώτερης ασύμπτωτης, δηλαδή η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού που δίνεται όταν ο χρόνος φτάνει στο άπειρο,  $M$  είναι ο χρόνος στον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος και  $B$  ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης σε χρόνο  $M$ . Η συνάρτηση Gompertz εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα, όμως η ακρίβειά της επηρεάζεται έντονα από τον αριθμό των παρατηρήσεων που γίνονται για την καμπύλη ανάπτυξης και τη στατιστική ποιότητα αυτών των μετρήσεων.

### 2.3.3 Η λογιστική συνάρτηση

Η λογιστική συνάρτηση, είναι μία σιγμοειδής συνάρτηση, παρόμοια με τη συνάρτηση Gompertz, δηλαδή θεωρεί ότι ο παρατηρούμενος ρυθμός ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού επηρεάζεται από την πυκνότητα του πληθυσμού, αποκτά μία μέγιστη τιμή, και στη συνέχεια στην φάση στασιμότητας μειώνεται στο 0. Η λογιστική συνάρτηση είναι η εξής:

$$N_t = \frac{C}{1 + e^{[-B \times (t-M)]}}$$

, όπου  $t$  είναι ο χρόνος,  $N_t$  η πυκνότητα πληθυσμού σε χρόνο  $t$ ,  $C$  η τιμή της ανώτερης ασύμπτωτης, δηλαδή η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού που δίνεται όταν ο χρόνος φτάνει στο άπειρο,  $M$  είναι ο χρόνος στον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος  $B/2$  ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο  $t=M$  και όπου  $N_0 \ll C$ ,  $B$ :ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο  $t=0$ . Αξίζει να παρατηρηθεί ότι στην εξίσωση δεν εμφανίζεται κάποιος όρος για την αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών. Αυτό συμβαίνει γιατί ουσιαστικά το μοντέλο αυτό περιγράφει μία καμπύλη συγκέντρωσης πληθυσμού από την οποία θα περάσει χρονικά ο πληθυσμός, οπότε,

αν εμφανίζει μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση, απλά ξεκινά από μεταγενέστερο σημείο της καμπύλης.

### 2.3.4 Το μοντέλο Baranyi

Το μοντέλο Baranyi περιγράφει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην λανθάνουσα και την εκθατική φάση, ενώ περιγράφει τη λανθάνουσα φάση ως μια διαδικασία προσαρμογής του μικροοργανισμού στο νέο περιβάλλον. Το μοντέλο αυτό, έχει ως βασικό πλεονέκτημα, ότι για τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης και τη λανθάνουσα φάση δεν είναι απαραίτητη η συγκέντρωση δεδομένων από τη φάση στασιμότητας, σε αντίθεση με τις σιγμοειδείς συναρτήσεις που αναλύθηκαν παραπάνω. Το μοντέλο Baranyi περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\frac{dx}{dt} = \mu(x) \times a(t) \times x(t)$$

, όπου  $x$  είναι η κυτταρική συγκέντρωση,  $\mu(x)$  είναι ο δυνητικός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο νέο περιβάλλον, ενώ  $a(t) \cdot \mu(x)$  ο πραγματικός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Το  $a(t)$  ονομάζεται συνάρτηση προσαρμογής στο νέο περιβάλλον και εξαρτάται από τις διαφορές μεταξύ του περιβάλλοντος από το οποίο προήλθε ο μικροοργανισμός, και αυτού στο οποίο κατέληξε. Συνήθως, σε εργαστηριακό επίπεδο, αρχικά ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, και μετά εμβολιάζεται στο νέο περιβάλλον, όπου η στιγμή του εμβολιασμού είναι ο χρόνος 0.

Η συνάρτηση  $a(t)$  παίρνει τιμές από 0 μέχρι 1, αντίστοιχα με την επίδραση του νέου περιβάλλοντος στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αφού κοντά στο 0 σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει ακόμα προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον και άρα δεν μπορεί να αναπτυχθεί με το μέγιστο δυνατό ρυθμό, ενώ όταν φτάνει στην τιμή 1, σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός προσαρμόστηκε πλήρως στο νέο περιβάλλον. Μία ευρέως χρησιμοποιημένη μορφή της συνάρτησης προσαρμογής είναι η:

$$a(t) = \frac{t^n}{\lambda^n + t^n}$$

, όπου  $\lambda$  και  $n$  θετικές παράμετροι του μοντέλου, και η παράμετρος  $\lambda$  ονομάζεται παράμετρος λανθάνουσας φάσης.

## **2.4 Ανάλυση της Βιβλιογραφίας**

Τα δύο νέα μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών που προτείνονται στην εργασία αυτή, προέκυψαν στηριζόμενα σε προγενέστερη δουλειά σημαντικών επιστημόνων στον τομέα της προρρητικής μικροβιολογίας, μία δουλειά που όχι μόνο υποστηρίζει την αξία των μοντέλων, αλλά και δίνει κατευθυντήριες γραμμές για τη μεταγενέστερη βελτίωσή τους.

### **2.4.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο**

Το μικροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης που εμφανίζεται στην παρούσα εργασία είναι ένα νέο μοντέλο, στηριγμένο στο μικροσκοπικό μοντέλο του Baranyi, και γι' αυτό είναι απαραίτητο να αναφερθούν οι προσπάθειες για τη δημιουργία και τη βελτίωση του μοντέλου που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία.

Το 1994, οι Jozsef Baranyi και Terry Roberts δημοσίευσαν μία μαθηματική ανάλυση με στόχο τη μοντελοποίηση της ανάπτυξης βακτηρίων. Αναλύοντας όλα τα υπάρχοντα μοντέλα, και σε ποιες συνθήκες είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί το καθένα από αυτά, καταλήγουν, με τη χρήση κάποιων απλοποιήσεων, σε μία διαφορετική εξίσωση που περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης των κυττάρων ενός πληθυσμού μικροοργανισμών με το χρόνο, όταν ο μικροοργανισμός αυτός βρίσκεται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής του. Οι απλοποιήσεις ήταν απαραίτητες για να γεφυρωθεί το χάσμα ανάμεσα στην περιπλοκότητα ενός βιολογικού συστήματος και στην ακρίβεια και την ποσότητα των δεδομένων που μπορούμε να αποκτήσουμε από αυτό. Τελικά, το μοντέλο που προέκυψε εμφάνισε μεγάλη πρακτική χρησιμότητα για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και επιβεβαιώθηκε η αξία του από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν μεταγενέστερα. [2]



Την ίδια χρονιά, η προσπάθεια των συγγραφέων εστιάζεται στη βελτίωση του μοντέλου, έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνει και τη λανθάνουσα φάση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, εισάγουν μία καινούρια μεταβλητή την οποία ονομάζουν κατάσταση της φυσιολογίας του κυττάρου, η οποία για επαναλήψιμα πειράματα είναι ανεξάρτητη από τις μετέπειτα συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Έδειξαν επίσης πως η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην εκθετική φάση σχετίζεται με την ανάπτυξή του στη λανθάνουσα φάση, και απέδειξαν τη μαθηματική σχέση που τις συσχετίζει. Συνέπεια αυτής της απόδειξης είναι ότι, γνωρίζοντας την επιρροή του περιβάλλοντος στον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού, μπορούν να περιγραφούν και η λανθάνουσα φάση και η εκθετική, ενώ παράλληλα για τη χρήση του μοντέλου, δεν είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων από τη φάση στασιμότητας, κάτι που το καθιστά πολύ εύχρηστο. Αν επίσης θεωρηθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης αλλάζει άμεσα ανάλογα με την αλλαγή των συνθηκών, συμπεραίνουν πως το νέο μοντέλο που προτείνουν μπορεί να περιγράψει και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον όπου παράγοντες όπως, η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα του νερού μεταβάλλονται με το χρόνο. [3]

Το 1998, ο Baranyi δημοσιεύει μία σύγκριση μεταξύ του ντετερμινιστικού μοντέλου που είχε αρχικά προτείνει, και ενός νέου στοχαστικού μοντέλου βασισμένου στο ντετερμινιστικό. Το καινούριο μοντέλο λαμβάνει υπ' όψιν τη διαφοροποίηση της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης για κάθε ξεχωριστό κύταρο, ενώ αποδεικνύεται ότι τα αποτελέσματα που δίνει είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα. [4]

Πέντε χρόνια αργότερα, το 2003, ο Filip Poschet σε δημοσίευσή του, καταδεικνύει μία μέθοδο ανάλυσης Monte Carlo με την οποία, ξεκινώντας από πειραματικά δεδομένα και ένα ντετερμινιστικό μοντέλο, μπορεί κάποιος να δημιουργήσει συναρτήσεις πυκνότητας πιθανότητας για τις παραμέτρους του μοντέλου, καθώς και προβλέψεις για τη μεταβολή τους συναρτήσει του χρόνου. Τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποίησε, ήταν δεδομένα ανάπτυξης των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Listeria innocua*, ενώ η κατανομή των δεδομένων ήταν κανονική. Η μέθοδος υπήρξε απαραίτητη για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων των μοντέλων που αναπτύχθηκαν αργότερα. [16]

Τον επόμενο χρόνο, ο Florent Baty πραγματοποίησε μία σύγκριση ανάμεσα στα διάφορα μοντέλα βακτηριακής ανάπτυξης που είχαν προταθεί μέχρι τότε, όσον αφορά την ικανότητά τους να περιγράψουν με ακρίβεια τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Τα μοντέλα που συγκρίθηκαν έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα, αλλά από όλα, το μοντέλο που είχε προταθεί από τον Baranyi ήταν, αν όχι το καλύτερο, σίγουρα το πιο σταθερό, καθώς έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα για μία πληθώρα δεδομένων, και επειδή έδινε ικανοποιητικά ακριβείς εκτιμήσεις της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης. [7]

Το 2005, η συνεργασία των Baranyi, Kutalik και Razaz, οδήγησε στην δημοσίευση του μικροσκοπικού μοντέλου, στο οποίο βασίστηκε αυτό που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία. Με τη χρήση ενός συστήματος μικροσκοπίας θαλάμου ροής, συνέλεξαν δεδομένα που συνδέουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria innocua*, με το μέγεθος που έχουν σε δεδομένο χρόνο. Μετά από ανάλυση των δεδομένων κατέληξαν σε ένα νέο στοχαστικό μοντέλο που να στηρίζεται στην ανάπτυξη κάθε κυττάρου ξεχωριστά από τα υπόλοιπα, το οποίο μάλιστα απέδειξαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και για κύτταρα που έχουν υποστεί θερμική καταπόνηση. Ακόμα, απέδειξαν ότι η διαφορά μεταξύ των λανθάνουσων φάσεων των κυττάρων ενός πληθυσμού, προκύπτει από την καθυστέρηση που εμφανίζει η αύξηση του μήκους κάθε κυττάρου ξεχωριστά. [12,13]

Τον ίδιο χρόνο, οι Membre JM., Leporq B., Vialette M., Mettler E., Perrier L., Thuault D., Zwietering M., συνέβαλαν σημαντικά στη μικροβιολογία τροφίμων, αναλύοντας την επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών, όπως η *Listeria monocytogenes*, η *Salmonella* και άλλων. Οι ρυθμοί εμφάνιζαν κανονική κατανομή, με 95% συσχέτιση με τα πειραματικά δεδομένα. Η καταγραφή αυτή των ρυθμών είναι σημαντική για να μπορεί να γίνει επαλήθευση των πειραματικών δεδομένων από υπολογιστικά, καθώς και για την εκτίμηση της επιρροής της θερμοκρασίας στη βακτηριακή ανάπτυξη συγκριτικά με τους υπόλοιπους αστάθμητους παράγοντες. [14]

Το 2006, η Carmen Pin, σε συνεργασία με τον Baranyi, δημιούργησαν κατανομές για να προσομοιώσουν την ανάπτυξη ενός πληθυσμού βακτηρίων ως αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από τα οποία αποτελείται. Πραγματοποίησαν πειράματα, που συγκρίνοντάς τα με τις κατανομές, κατάφεραν να αποδείξουν ότι η αύξηση του πληθυσμού μπορεί να προβλεφθεί με ικανοποιητική ακρίβεια, αν είναι γνωστή η κατανομή των χρόνων, για μερικές από τις πρώτες διχοτομήσεις των κυττάρων. [15]

Παράλληλα, η ομάδα των Francois, Devlieghere, Uyttendaele, Standaert, Geeraerd, Nadal, Van Impe, και Debevere, ασχολήθηκε με τη μεταβλητότητα του ρυθμού ανάπτυξης μεμονομένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε πατέ συκωτιού και σε μαγειρεμένο ζαμπόν. Στόχος ήταν η σύγκριση των πειραματικών δεδομένων που προέκυψαν, με πειραματικά δεδομένα που είχαν συλλέξει ήδη, για την ανάπτυξη του ίδιου μικροοργανισμού στο εργαστήριο. Αποτέλεσμα της μελέτης ήταν ότι τα μεμονωμένα κύτταρα του μικροοργανισμού εμφανίζουν πολύ μεγάλη διαφορά μεταξύ τους, και κρίθηκε απαραίτητο, στην περίπτωση που πραγματοποιείται ένας συγκεκριμένος αριθμός τεστ, κάτι που είναι σύνηθες στη βιομηχανία, τα τεστ αυτά να γίνονται πάνω σε μεγάλο αριθμό κυττάρων, τουλάχιστον 1000, για να μειωθεί το σφάλμα που προκαλείται από τη διαφορά μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πολύ σημαντικό για την επιτυχή χρήση του μοντέλου Baranyi στη βιομηχανία. [10]

Ακόμα, οι Geysen, Escalona, Verlinden, Aertsen, Geeraerd, Michiels, Van Impe, Nicolai, χρησιμοποιώντας το μοντέλο Baranyi, κατάφεραν να περιγράψουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Pseudomonas fluorescens* και *Listeria innocua*, σε συνάρτηση με το χρόνο αλλά και στη συγκέντρωση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρά τους. Ενώ το μοντέλο που πρότειναν για τον *P. fluorescens* είχε καλή συσχέτιση με τα πειραματικά δεδομένα, το αντίστοιχο που πρότειναν για τον *L. innocua* δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, τα οποία όμως οι συγγραφείς καταφέρουν να εξηγήσουν. Αυτή η μελέτη συνέβαλε στην βελτίωση της γνώσης για τη μετέπειτα χρήση του μοντέλου Baranyi, καθώς αυξήθηκαν οι μεταβλητές από τις οποίες μπορεί να επηρεαστεί, καθώς μέχρι τότε, είχε επιβεβαιωθεί μόνο ότι μπορούσε να επηρεαστεί από τη θερμοκρασία, το pH και την ενεργότητα νερού. [11]

Τέλος, το 2009, οι Baranyi, George, και Kutalik, εισήγαγαν μία καινούρια μέθοδο για την εκτίμηση των παραμέτρων της κατανομής της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης μεμονωμένων κυττάρων. Το πλεονέκτημα της νέας μεθόδου ήταν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και για πολύ μικρούς αρχικούς πληθυσμούς κυττάρων, όπου ο πληθυσμός ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί μόνο αφού είχε περάσει στην εκθετική φάση. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής γίνεται πολύ πιο εύκολη και ακριβής η πρόβλεψη του χρόνου στον οποίο ένας πληθυσμός μικροοργανισμών θα φτάσει σε επικίνδυνα επίπεδα συγκέντρωσης. [5]

Η έρευνα πάνω στο μοντέλο Baranyi συνεχίζεται μέχρι και σήμερα, καθώς είναι ένα από τα πιο ακριβή και εύχρηστα μοντέλα. Βασικός στόχος της έρευνας αυτής είναι η βελτίωση της ικανότητας του μοντέλου στην πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, και στην επίτευξη αυτού του στόχου προσπαθεί να συμβάλει και η παρούσα εργασία, με την πρόταση μίας καινούριας μορφής του μοντέλου, η οποία παρουσιάζεται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

#### **2.4.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο**

Το μακροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης που εμφανίζεται στην παρούσα εργασία είναι στηριγμένο στο μικροσκοπικό μοντέλο του Baranyi, σχεδιάστηκε από τους επιβλέποντες της διπλωματικής, και δεν είχε δημοσιευτεί ακόμα πριν την περάτωση της. Όμως, υπάρχουν παρόμοια με αυτό το μοντέλο στη βιβλιογραφία, η ύπαρξη των οποίων συνέβαλε και στην επινόηση του, και γι' αυτό είναι σημαντικό να αναφερθούν κάποια από αυτά.

Το 2004, οι Basse, Wake και Walls ασχολήθηκαν με την κατανομή του ποσοστού ενός πληθυσμού πλαγκτόν ως προς το μέγεθός τους. Πρότειναν για την περιγραφή της κατανομής αυτής μία μερική διαφορική εξίσωση που να περιγράφει την αύξηση του πληθυσμού των πλαγκτόν σε συνάρτηση με το μέγεθός τους και το χρόνο, και απέδειξαν ότι η κατανομή αυτή καταλήγει σε μία σταθερή καμπύλη, η οποία δεν μεταβάλλεται πλέον με το χρόνο. [6]

Πέντε χρόνια αργότερα, οι Binder και Landman προτείνουν ένα μοντέλο που ονομάζεται κυτταρικά αυτόματα, και στηρίζεται σε μία μερική διαφορική εξίσωση που θα χρησιμεύει σε βιολογικά συστήματα. Η εξίσωση αυτή περιέχει και έναν όρο διάχυσης, που συμπεριλαμβάνεται για να μπορεί η εξίσωση να περιγράψει τη στοχαστικότητα, η οποία εμφανίζεται πάντα σε δεδομένα που προκύπτουν από βιολογικά πειράματα. Επεκτείνουν μάλιστα το μοντέλο τους για να περιγράψει παραπάνω από ένα είδη μικροοργανισμών. Στόχος της προσπάθειάς τους ήταν η καλύτερη κατανόηση της ανάπτυξης των κυττάρων από μικροσκοπικού και μακροσκοπικού επιπέδου. [8]

Το 2011, οι Brunt και Wake, μελέτησαν την μετατροπή μίας συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας σε διαφορική εξίσωση δευτέρου βαθμού. Οι συγγραφείς ασχολήθηκαν με την αρχική συνάρτηση, επειδή χρησιμοποιούνταν συχνά για τη μοντελοποίηση της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, αλλά και για πολλές άλλες εφαρμογές. Η προσπάθειά τους συνέβαλε στο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η καινούρια διαφορική εξίσωση για πιο γενικές περιπτώσεις. [9]

## **2.5 Στόχος και Κατεύθυνση της Διπλωματικής Εργασίας**

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση και μελέτη δύο νέων μοντέλων που περιγράφουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε τρόφιμα, το ένα μικροσκοπικό και το άλλο μακροσκοπικό, καθώς και η σύγκριση των μοντέλων αυτών με ήδη υπάρχοντα.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την ανάλυση της συμπεριφοράς και των αποτελεσμάτων των δύο μοντέλων, με παράλληλη ανάλυση άλλων προυπάρχοντων μοντέλων και σύγκριση των αποτελεσμάτων τους για το μέγεθος του πληθυσμού, αλλά και για την κατανομή του πληθυσμού των μικροοργανισμών ως προς το μέγεθος του μικροοργανισμού σε μόνιμη κατάσταση.

Πιο συγκεκριμένα, στο τρίτο κεφάλαιο αναλύονται τα μοντέλα που θα μελετηθούν και παρουσιάζονται οι διαφορικές εξισώσεις από τις οποίες αποτελούνται. Το νέο μικροσκοπικό μοντέλο είναι στοχαστικό και στηρίζεται σε ένα προυπάρχον μοντέλο

με τη διαφορά ότι περιέχει δύο ακόμα στοχαστικές μεταβλητές που το βοηθούν να περιγράψει καλύτερα την πραγματικότητα. Το νέο μακροσκοπικό μοντέλο αποτελεί καινούρια προσέγγιση στην πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και γι' αυτό η εξίσωση στην οποία στηρίζεται χρειάστηκε να εξαχθεί εκ νέου με τη χρήση μαθηματικών μεθόδων.

Αντίστοιχα, στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίλυσης των νέων μοντέλων και συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της επίλυσης των προυπάρχοντων, για την περίπτωση του μικροσκοπικού, ενώ το μακροσκοπικό μοντέλο, καθώς δεν υπήρχε προυπάρχον μοντέλο, συγκρίνεται με ένα μικροσκοπικό το οποίο έχει τις ίδιες ιδιότητες.

Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο αναλύονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση των νέων μοντέλων με τα προγενέστερα, και προτείνονται στόχοι της μελλοντικής έρευνας που θα πραγματοποιηθεί στηριγμένη στα ίδια μοντέλα, έτσι ώστε να βελτιωθούν τα αποτελέσματά τους, και με τη χρήση των μοντέλων αυτών να γίνει πιο ασφαλής η πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε τρόφιμα.

### 3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Το πρόβλημα στο οποίο αποσκοπεί να δώσει λύση η παρούσα διπλωματική είναι η ακριβής πρόβλεψη του μεγέθους του πληθυσμού του μικροοργανισμού *Listeria Innocua*, που έχει αναπτυχθεί σε ένα μη επεξεργασμένο τρόφιμο σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Όμως, οι ίδιες εξισώσεις που περιγράφουν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, έχει αποδειχθεί ότι περιγράφουν και την ανάπτυξη οποιουδήποτε άλλου μικροοργανισμού με τη μόνη διαφορά ότι ανάλογα με τις συνθήκες και το μικροοργανισμό, αλλάζουν οι τιμές των σταθερών των εξισώσεων.

Αντίστοιχα, όπως περιγράφεται και στην ανάλυση βιβλιογραφίας που προηγήθηκε, με την προσθήκη κατάλληλων εξισώσεων, μπορούν οι υπάρχουσες να περιγράψουν την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού όχι μόνο σε σταθερές, αλλά και σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και άλλες. Άρα, με τις σωστές μετατροπές, το πρόβλημα μπορεί να γενικευθεί σε πρόβλεψη της ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών, σε ένα μη επεξεργασμένο τρόφιμο, σε σταθερό ή μεταβλητό περιβάλλον.

Τα υπολογιστικά μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών εμφανίζουν πρακτική χρησιμότητα μόνο σε βιομηχανικό επίπεδο, καθώς αν δίνουν ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα, τότε μειώνεται η ανάγκη για συχνότητα των μικροβιολογικών ελέγχων ενός προϊόντος, και άρα μειώνονται αντιστοίχως τα κόστη για την επιχείρηση.

Η λύση αυτού του προβλήματος προσεγγίζεται με δύο διαφορετικά στοχαστικά μοντέλα, ένα που περιγράφει την ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού ξεχωριστά και ονομάζεται μικροσκοπικό, και ένα που περιγράφει την ανάπτυξη του συνόλου των μικροοργανισμών και ονομάζεται μακροσκοπικό. Ο λόγος που προτείνονται δύο διαφορετικά μοντέλα είναι ότι εμφανίζουν και διαφορετικά πλεονεκτήματα για όποιον τα χρησιμοποιήσει. Επίσης, ο λόγος που προτιμούνται τα στοχαστικά από τα ντετερμινιστικά μοντέλα είναι ότι ανταποκρίνονται καλύτερα στην πραγματικότητα.

Το μικροσκοπικό μοντέλο επιλύει τις διαφορικές εξισώσεις της ανάπτυξης του κάθε κυττάρου ξεχωριστά, περιγράφει δηλαδή το μέγεθος κάθε κυττάρου του

πληθυσμού μία δεδομένη χρονική στιγμή και το αν διαιρείται ή όχι. Έτσι, μπορεί να δώσει πιο ακριβή αποτελέσματα για το μέγεθος του πληθυσμού, όμως εμφανίζει πολύ μεγάλο χρόνο επίλυσης.

Αντίθετα, το μακροσκοπικό μοντέλο επιλύει τη μερική διαφορική εξίσωση της ανάπτυξης του συνόλου του πληθυσμού, περιγράφει δηλαδή το το ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος κυττάρου σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Έτσι, μπορεί να προβλεφθεί η ανάπτυξη του πληθυσμού, αλλά με μικρότερη ακρίβεια, όμως εμφανίζει πολύ μικρό χρόνο επίλυσης, κάτι που αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τη χρήση της από τη βιομηχανία.

### 3.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο

Μικροσκοπική κλίμακα, ονομάζεται η κλίμακα μεγέθους ή μήκους που χρησιμοποιείται για να περιγράψει αντικείμενα που δεν μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με γυμνό μάτι, και απαιτείται η χρήση ενός φακού ή μικροσκοπίου για να τα διακρίνει κανείς. Το πρώτο μοντέλο που παρουσιάζεται ονομάζεται μικροσκοπικό, γιατί περιγράφει την ανάπτυξη ενός πληθυσμού μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το χρόνο, αλλά αντιμετωπίζει τον κάθε μικροοργανισμό ατομικά, κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και της εκθετικής φάσης ανάπτυξής του. Είναι μία καινούρια εκδοχή του μικροσκοπικού μοντέλου που περιέγραψαν οι Baranyi και Kutalik [12], και στηρίζεται στις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \times a(t) \times x(t) \quad (1)$$

$$\frac{dq}{dt} = v \times q(t) \quad (2)$$

$$a(t) = \frac{q(t)}{1 + q(t)} \quad (3)$$

, όπου  $x$  είναι το μέγεθος του μικροοργανισμού στο χρόνο  $t$ ,  $\mu$  ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενώ  $a(t)$  ονομάζεται η συνάρτηση προσαρμογής του μικροοργανισμού σε ένα νέο περιβάλλον. Στη συνάρτηση αυτή, το  $q(t)$  είναι μία μεταβλητή που ονομάζεται εσωτερική ενέργεια του κυττάρου, η



οποία αυξάνεται εκθετικά από τη στιγμή που εισάγεται το κύτταρο σε νέο περιβάλλον, όπου  $v$  είναι ο ειδικός ρυθμός αύξησης της. Η συνάρτηση  $a(t)$  παίρνει τιμές από 0 έως 1, οπότε το  $\mu \times a(t)$  συγκλίνει στο  $\mu$ , και από τη στιγμή που θα συγκλίνει και μετά, σημαίνει ότι το κύτταρο έχει προσαρμοστεί πλήρως στο νέο περιβάλλον. Ουσιαστικά η συνάρτηση  $a(t)$  εκμηδενίζει όλους τους όρους της εξίσωσης (1), άρα εκμηδενίζει τη μεταβολή του  $x(t)$ , μέχρι το πέρας του χρόνου που αντιστοιχεί στη λανθάνουσα φάση.

Από τις εξισώσεις (2) και (3), με μία απλή μετατροπή, η οποία παρουσιάζεται στο Παράρτημα Α, προκύπτει η εξίσωση:

$$\frac{da}{dt} = v \times a(t) \times (1 - a(t)) \quad (4)$$

Χάρη σε αυτή τη μετατροπή, το μοντέλο μπορεί να περιγραφεί από δύο μόνο εξισώσεις αντί για 3, συγκεκριμένα τις εξισώσεις 1 και 4, ενώ παράλληλα εξαλείφεται η παράμετρος  $q$ , κάτι που καθιστά το νέο μοντέλο πιο εύχρηστο. Μία άλλη σημαντική παράμετρος του μοντέλου είναι η παράμετρος  $\lambda$ , που ονομάζεται παράμετρος λανθάνουσας φάσης, και που στη συγκεκριμένη περίπτωση ισούται με:

$$\lambda = -\frac{\ln(a_0)}{v} \quad (5)$$

Το μοντέλο που παρουσιάστηκε ως τώρα είναι πλήρως ντετερμινιστικό. Στη μαθηματική μοντελοποίηση, ντετερμινιστικό ονομάζεται ένα μοντέλο, οι τιμές των μεταβλητών του οποίου καθορίζονται με μοναδικό τρόπο από τις παραμέτρους του μοντέλου και από προηγούμενες τιμές που είχαν οι μεταβλητές αυτές. Κατά συνέπεια, για δεδομένες αρχικές συνθήκες, ένα ντετερμινιστικό μοντέλο παράγει πάντα τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα.

Το πρόβλημα με τη χρήση ενός ντετερμινιστικού μοντέλου, όπως απέδειξε και ο ίδιος ο Baranyi για τις εξισώσεις του, είναι ότι δεν περιγράφει με ικανοποιητική ακρίβεια την πραγματικότητα. Για παράδειγμα, στο σύστημα που εξετάζεται, αλλά και σε κάθε σύστημα που αναπτύσσεται ένα πλήθος μικροοργανισμών, ο ρυθμός με τον οποίο αναπτύσσεται ένας μικροοργανισμός δεν είναι ο ίδιος για κάθε ένα μέλος ενός πληθυσμού κυττάρων, αλλά ακολουθεί κανονική κατανομή. Για να μπορέσει

λοιπόν να περιγραφεί καλύτερα η πραγματικότητα απαιτείται ένα στοχαστικό μοντέλο, δηλαδή ένα μοντέλο στο οποίο οι διαφορετικές καταστάσεις περιγράφονται από συναρτήσεις πιθανότητας.

Προτείνουμε λοιπόν δύο διαφορετικές στοχαστικές εκδοχές της εξίσωσης (1):

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times a(t) \times x(t)) + \xi(t) \quad (6)$$

$$\frac{dx}{dt} = (\mu + \xi(t)) \times a(t) \times x(t) \quad (7)$$

, όπου  $\xi(t)$  ο στοχαστικός όρος που ακολουθεί κανονική κατανομή με μέσο ίσο με το 0. Και στις δύο περιπτώσεις ο στοχαστικός όρος επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού, επιταχύνοντας ή επιβραδύνοντάς την, οδηγώντας σε διαφοροποίηση της ανάπτυξης μεταξύ των διαφορετικών ατόμων ενός πληθυσμού. Η ουσιαστική διαφορά μεταξύ των δύο εξισώσεων είναι ότι στην εξίσωση (6), ο στοχαστικός όρος επηρεάζει άμεσα την τιμή του  $x$ , ενώ στην εξίσωση (7) επηρεάζει έμμεσα την τιμή του  $x$ , μεταβάλλοντας την σταθερά του ειδικού ρυθμού ανάπτυξής του.

Μετά από διερεύνηση των αποτελεσμάτων και των δύο εκδοχών, προτείνουμε ένα πλήρες μοντέλο, το οποίο να στηρίζεται στις εξισώσεις (4) και (6) και το οποίο συμπεριλαμβάνει δύο πρόσθετα χαρακτηριστικά, που το διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα.

Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι το μέγεθος στο οποίο διαιρείται ο μικροοργανισμός. Στο μοντέλο Baranyi, θεωρείται ότι ο μικροοργανισμός διαιρείται πάντα σε συγκεκριμένο μέγεθος, ενώ τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι το μέγεθος αυτό δεν είναι ακριβές, αλλά ακολουθεί κάποια κατανομή, η οποία δεν μελετήθηκε από τον Baranyi. Το τελικό μοντέλο που προτείνεται, θεωρεί αντίστοιχα ότι το μέγιστο μέγεθος το οποίο μπορεί να φτάσει ένας μικροοργανισμός πριν να διαιρεθεί ακολουθεί κανονική κατανομή, με μέσο το αρχικά προτεινόμενο μέγιστο μέγεθος.

Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι το ποσοστό του μικροοργανισμού το οποίο μοιράζεται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Στο μοντέλο Baranyi, θεωρείται ότι όταν ένας μικροοργανισμός διαιρείται, παράγει δύο θυγατρικά κύτταρα με το ίδιο μέγεθος, δηλαδή διαιρείται ακριβώς στη μέση. Όμως, τα περιματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, μπορεί το ένα να είναι μεγαλύτερο και το άλλο μικρότερο, για παράδειγμα το ένα να έχει το 60% του μήκους του μητρικού κυττάρου και το άλλο το 40%, αντί για 50%-50% που είναι η ντετερμινιστική εκδοχή. Το τελικό μοντέλο που προτείνεται, θεωρεί αντίστοιχα ότι το ποσοστό του μητρικού κυττάρου που θα αποτελέσει το κάθε ένα από τα δύο θυγατρικά ακολουθεί κανονική κατανομή, με μέσο το αρχικά προτεινόμενο 50%.

Συνοψίζοντας, το νέο μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμού που προτείνεται, αποτελείται από τις ακόλουθες δύο διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times \alpha(t) \times x(t)) + \xi(t) \quad (6)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = \nu \times \alpha(t) \times (1 - \alpha(t)) \quad (4)$$

, για τις οποίες το μέγιστο μέγεθος ανάπτυξης του μικροοργανισμού πριν τη διάσπασή του, καθώς και το ποσοστό του μητρικού κυττάρου που παίρνει το κάθε θυγατρικό θεωρούνται κατανομές, δηλαδή δεν έχουν σταθερές τιμές.

### 3.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο

Στη μικροβιολογία τροφίμων, για να μελετηθεί ένας μικροοργανισμός απαιτείται συνήθως μικροσκόπιο, αλλά είναι δυνατόν να μελετηθεί με γυμνό μάτι, αν έχει πολλαπλασιαστεί αρκετά για να είναι ορατός ο πληθυσμός, όπως στην περίπτωση της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τρυβλία. Το δεύτερο μοντέλο που παρουσιάζεται ονομάζεται μακροσκοπικό, γιατί περιγράφει την ανάπτυξη ενός πληθυσμού μικροοργανισμών, χωρίς να ασχολείται με τον κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά. Το μοντέλο στηρίζεται σε μία μερική διαφορική εξίσωση και αναπτύχθηκε από τους επιβλέποντες αυτής της εργασίας. Στόχος του μοντέλου είναι να περιγράψει το ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων που εμφανίζει

συγκεκριμένο μέγεθος κάθε χρονική στιγμή, στηριζόμενο όμως σε κάποιες παραδοχές.

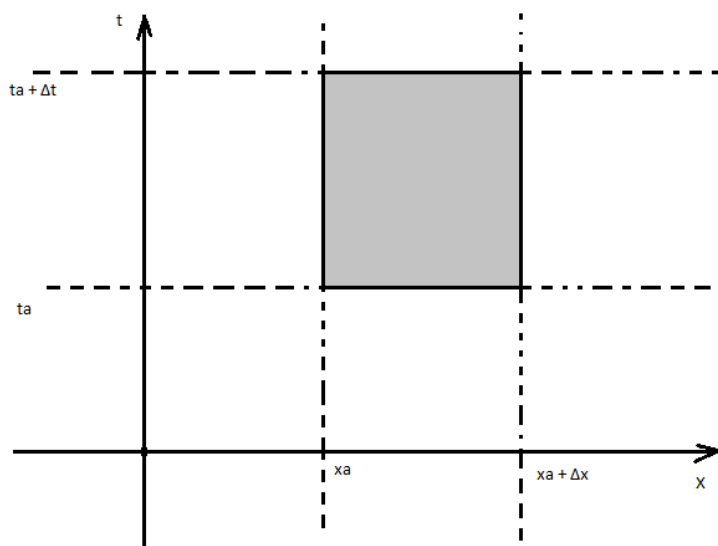
Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο στηρίζεται στην αρχική εξίσωση των Baranyi και Kutalic, δηλαδή την:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times a(t) \times x(t)) + \xi(t) \quad (6)$$

, με τη διαφορά όμως ότι σε αυτό το μοντέλο θεωρείται ότι όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε εκθετική φάση, δηλαδή δεν λαμβάνεται υπ' όψιν η λανθάνουσα φάση του μικροοργανισμού, άρα ο όρος  $a(t)$  είναι ίσος με τη μονάδα, δηλαδή:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times x(t)) + \xi(t) \quad (8)$$

Ας θεωρήσουμε έναν δισδιάστατο χώρο όπου ο άξονας  $x$  αντιπροσωπεύει το μέγεθος του μικροοργανισμού και ο άξονας  $t$  αντιπροσωπεύει το χρόνο, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



**Εικόνα 3: Χώρος ολοκλήρωσης της μεταβολής του μεγέθους ενός πληθυσμού κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο**

Ολοκληρώνοντας τον γκριζο χώρο που εμφανίζεται στην εικόνα 3, δηλαδή το χώρο που ορίζεται από μία μεταβολή  $\Delta x$  στον άξονα των  $x$  και  $\Delta t$  στο άξονα του χρόνου, και με βάση την εξίσωση 8, καθώς και την παραδοχή ότι το μέγεθος ενός κυττάρου

δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερο των 16 pixels και αντίστοιχα δεν μπορεί να είναι μικρότερο των 8 pixels, προκύπτει η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο που είναι η εξής:

$$\frac{\partial y}{\partial t} + \frac{\partial(\mu \times x \times y)}{\partial x} = D \times \frac{\partial^2 y}{\partial x^2} + \left[ \frac{B}{N} \right] - y \times \mu \times x_{in} \times y_{in} \quad (9)$$

(1)                      (2)                      (3)                      (4)                      (5)

,όπου με  $y$  συμβολίζεται το ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή,  $\left[ \frac{B}{N} \right]$  ονομάζεται ο όρος πηγής και  $x_{in}$ ,  $y_{in}$  ονομάζονται το μέγεθος κάθε κυττάρου μετά το διπλασιασμό, δηλαδή 8 pixels, και το ποσοστό του πληθυσμού που έχει αυτό το μέγεθος αντίστοιχα.

Η εξίσωση αυτή έχει πέντε διαφορετικούς όρους οι οποίοι θα αναλυθούν ξεχωριστά. Ο πρώτος όρος περιγράφει τη μεταβολή του ποσοστού του πληθυσμού, που έχει συγκεκριμένο μέγεθος, ως προς το χρόνο. Ο δεύτερος όρος είναι ένας όρος συναγωγής, που ουσιαστικά περιγράφει το πως τα ποσοστά του πληθυσμού που έχουν παραπλήσια μεγέθη επηρεάζουν το ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος. Ο τρίτος όρος είναι ένας όρος διάχυσης, που ουσιαστικά αντικαθιστά το στοχαστικό όρο της εξίσωσης 6.

Ο τέταρτος όρος είναι ο όρος πηγής, και περιγράφει το φαινόμενο της γέννησης δύο θυγατρικών κυττάρων από ένα μητρικό. Ο όρος αυτός έχει τιμή μόνο στα άκρα του πεδίου, δηλαδή στα μεγέθη 8 και 16 pixels αντίστοιχα, και σε αυτά τα σημεία ισούται με:

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = +2 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 8 \text{ pixels})$$

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = -1 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 16 \text{ pixels})$$

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = 0 \quad (8 < x < 16 \text{ pixels})$$

,όπου και  $x_{out}$ ,  $y_{out}$  ονομάζονται το μέγεθος κάθε κυττάρου αμέσως πριν το διπλασιασμό, δηλαδή 16 pixels, και το ποσοστό του πληθυσμού που έχει αυτό το μέγεθος αντίστοιχα.

Τέλος, ο πέμπτος όρος της εξίσωσης είναι ένας διορθωτικός όρος, που στηρίζεται στο γεγονός ότι η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων, επιφέρει ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των κυττάρων που έχει συγκεκριμένο μέγεθος, για κάθε μέγεθος στο πεδίο, δηλαδή από 8 έως 16 pixels.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Μικροσκοπικό Μοντέλο

#### 4.1.1 Ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi

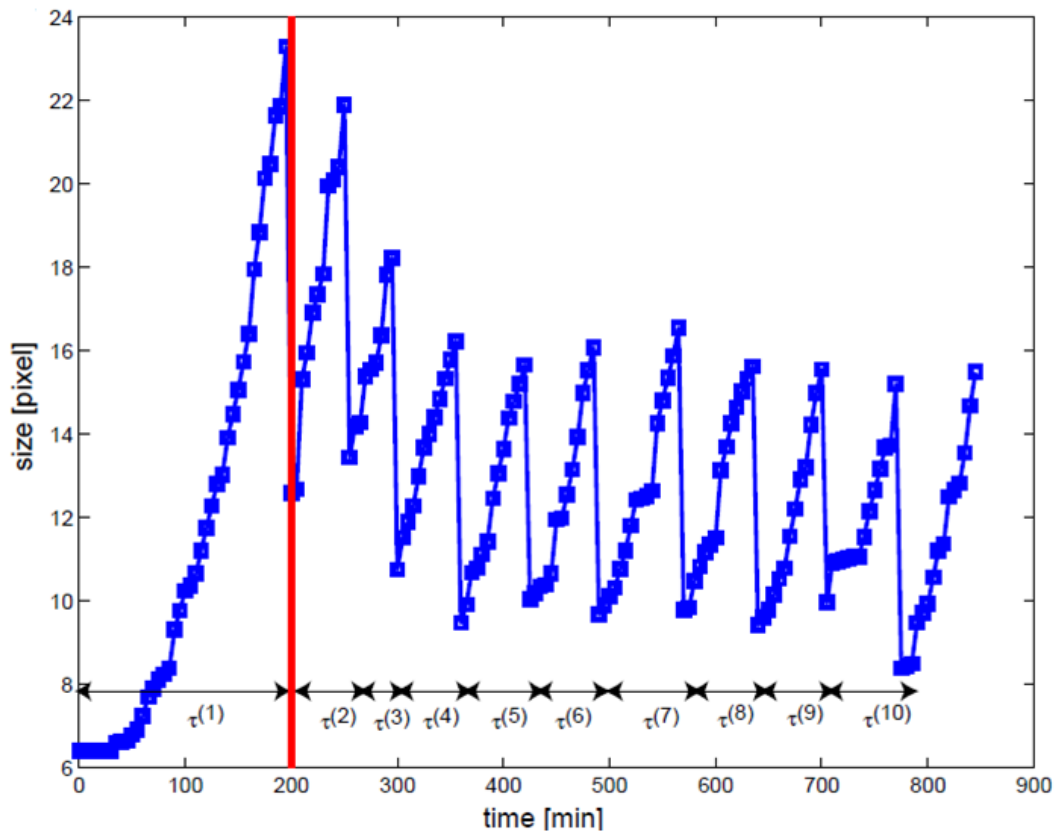
Το πρώτο στάδιο για τη μελέτη των στοχαστικών μοντέλων, είναι η δημιουργία ενός προγράμματος που να αναπαράγει σωστά το ντετερμινιστικό. Το ντετερμινιστικό μοντέλο αποτελείται από τις διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \times a(t) \times x(t) \quad (1)$$

$$\frac{da}{dt} = \nu \times a(t) \times (1 - a(t)) \quad (4)$$

Για τη επίλυση αυτών των διαφορικών εξισώσεων γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Fortran 95. Η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο Runge Kutta 4<sup>ου</sup> βαθμού, την πιο ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδο επίλυσης διαφορικών εξισώσεων, στην οποία η λύση της εξίσωσης στο επόμενο χρονικό σημείο, προσεγγίζεται από τη λύση της εξίσωσης στο αμέσως προηγούμενο, με την προσθήκη ενός σταθμισμένου μέσου όρου τεσσάρων βημάτων επίλυσης. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι ικανοποιητική για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος.

Ένα παράδειγμα του πως θα έπρεπε να μοιάζει το αποτέλεσμα της επίλυσης των εξισώσεων, εμφανίζεται σε δημοσίευση των Baranyi, Kutalik και Razaz [12], και είναι το ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 4: Το μέγεθος ενός κυττάρου *Listeria Innocua* σε συνάρτηση με το χρόνο

Στην εικόνα 4 εμφανίζεται η ανάπτυξη ενός μεμονωμένου κυττάρου από έναν πληθυσμό *Listeria Innocua*. Η διχοτόμηση του κυττάρου αναπαριστάται στο διάγραμμα με υποδιπλασιασμό του μήκους του κυττάρου από τη μία χρονική στιγμή στην επόμενη. Στα 200 λεπτά μετά τον εμβολιασμό, πραγματοποιείται η πρώτη κυτταρική διαίρεση, που διαφοροποιείται συγκριτικά με τις υπόλοιπες, ως προς το μέγιστο μέγεθος στο οποίο φτάνει το κύτταρο πριν διχοτομηθεί και ως προς το χρόνο που διαρκεί η ανάπτυξή του μέχρι τη στιγμή της διαίρεσης.

Αυτό συμβαίνει γιατί το κύτταρο πρέπει πρώτα να περάσει από τη λανθάνουσα φάση πριν αρχίσει να διχοτομείται κανονικά, κάτι που φαίνεται να επηρεάζει τους δύο παράγοντες που μόλις αναφέρθηκαν. Η επιρροή αυτή μοιάζει να ασκείται και για τις επόμενες δύο επαναλήψεις, όμως δεν υπάρχουν πειραματικές μετρήσεις πάνω στο συγκεκριμένο ζήτημα, κάτι που προτείνεται έντονα να πραγματοποιηθεί στο μέλλον, καθώς φαίνεται να επηρεάζουν αρκετά το αποτέλεσμα. Μετά τις δύο, τρεις πρώτες επαναλήψεις όμως ακολουθείται πλέον ένα σταθερό προφίλ, το οποίο



μελετήθηκε για όλα τα κύτταρα του πληθυσμού, και από το οποίο προέκυψαν τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια.

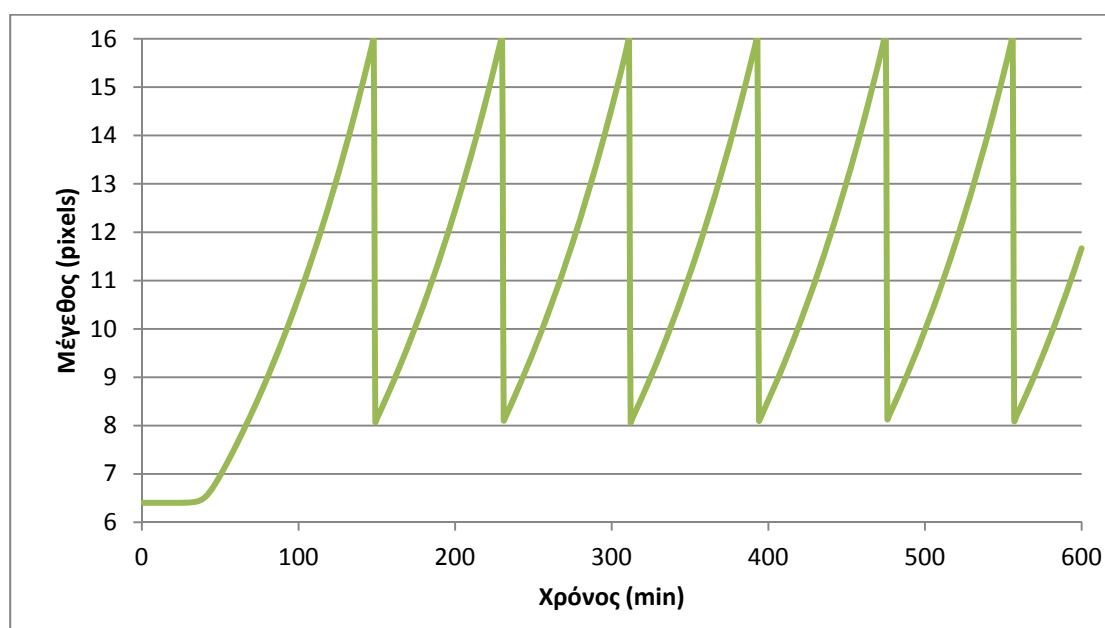
Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 1: Δεδομένα του ντετερμινιστικού μοντέλου Baranyi για τον πληθυσμό *Listeria Innocua*

Σταθερά	Τιμή
$\mu$	0.0085 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\nu$	0.34 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\chi_0$	6.4 (pixels)
$\alpha_0$	1.20E-06
$\chi_{\max}$	16 (pixels)
$\lambda$	40 (min)

Τα δεδομένα αυτά έχουν εξαχθεί από δημοσιεύσεις των Baranyi, Kutalik και Razaz [12,13]. Θεωρείται επίσης ότι κάθε μητρικό κύτταρο γεννά δύο θυγατρικά και ότι κάθε ένα από αυτά έχει το 50% του μήκους του μητρικού κατά τη στιγμή της διχοτόμησης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, πραγματοποιείται επίλυση των διαφορικών εξισώσεων από το πρόγραμμα, και τα αποτελέσματα που προκύπτουν για το ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 5: Το μέγεθος ενός κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το μοντέλο Baranyi

Η εικόνα 4 εμφανίζει ορισμένες διαφορές με την εικόνα 3, οι οποίες αξίζει να αναλυθούν. Συγκεκριμένα, δεν εμφανίζεται το προφίλ που παρατηρείται στην εικόνα 3 για τις τρεις πρώτες διχοτομήσεις του κυττάρου, οι οποίες είναι πολύ διαφορετικές από τις υπόλοιπες. Ο λόγος είναι ότι δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για το μέσο ύψος των κορυφών αυτών, και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε το μέγιστο ύψος της εκθετικής φάσης, για το οποίο υπάρχουν δεδομένα. Για τον ίδιο λόγο ο χρόνος μέχρι την πρώτη διχοτόμηση είναι μικρότερος στην εικόνα 5 απ' ό,τι στην εικόνα 4. Η εργαστηριακή μελέτη της επιρροής της λανθάνουσας φάσης στο μέγιστο μέγεθος ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια των πρώτων τριών διχοτομήσεων, κρίνεται σημαντική για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων του μοντέλου. Κατά τα άλλα το κύτταρο διχοτομείται κάθε 82 λεπτά που ήταν το αναμενόμενο.

#### 4.1.2 Στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού (Μοντέλο A)

Το επόμενο στάδιο για τη μελέτη των στοχαστικών μοντέλων, είναι η δημιουργία ενός προγράμματος που να αναπαράγει το στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού. Το μοντέλο αυτό, αποτελείται από τις διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times a(t) \times x(t)) + \xi(t) \quad (6)$$

$$\frac{da}{dt} = \nu \times a(t) \times (1 - a(t)) \quad (4)$$

Για τη επίλυση αυτών των διαφορικών εξισώσεων γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Fortran 95. Η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο Runge Kutta 4<sup>ου</sup> βαθμού. Για την στοχαστική μεταβλητή  $\xi(t)$ , χρησιμοποιήθηκε κώδικας για μία γενήτρια παραγωγής αριθμών στο διάστημα [-1,1], που να ακολουθούν ομοιόμορφη κατανομή [17]. Οι ομοιόμορφα κατανεμημένοι αριθμοί, μέσα από μία μαθηματική μετατροπή που ονομάζεται Box-Muller, μετατρέπονται σε αριθμούς που ακολουθούν κανονική κατανομή.

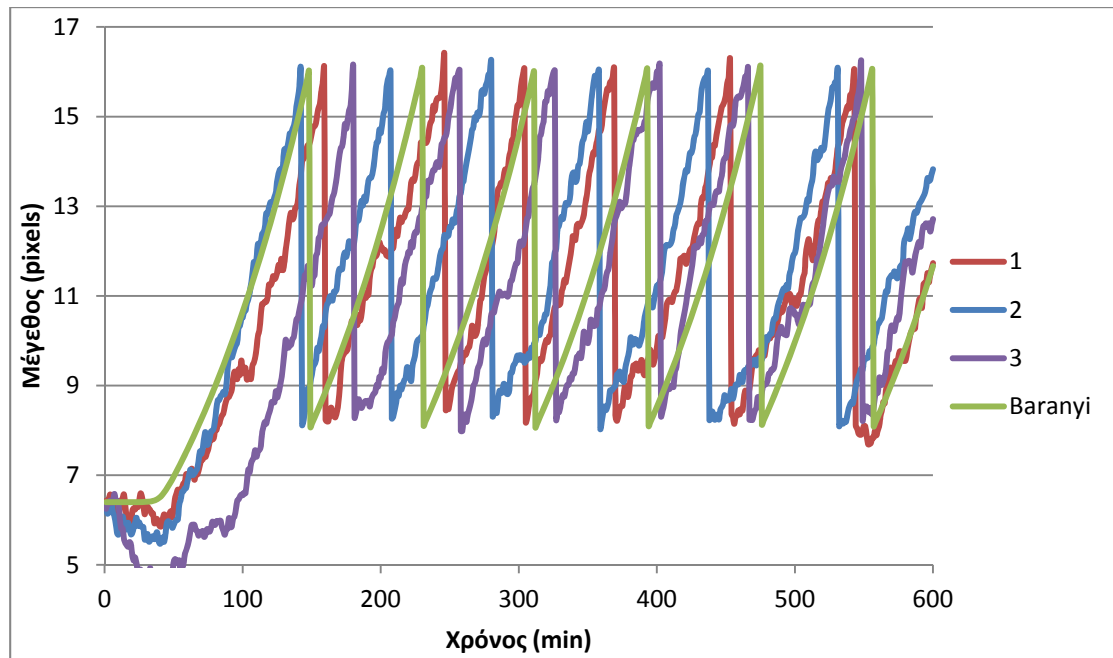
Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

**Πίνακας 2: Δεδομένα του στοχαστικού μοντέλου για το μέγεθος του μικροοργανισμού**

Σταθερά	Τιμή
$\mu$	0.0085 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\nu$	0.34 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\chi_0$	6.4 (pixels)
$\alpha_0$	1.20E-06
$\chi_{\max}$	16 (pixels)
$\lambda$	40 (min)
$\xi$	$0 \pm 0.625$ (κανονική κατανομή)

Τα δεδομένα αυτά έχουν εξαχθεί από δημοσιεύσεις των Baranyi, Kutalik και Razaz [12,13], εκτός από την τυπική απόκλιση της στοχαστικής μεταβλητής  $\xi$ , στην οποία δόθηκε μία λογική τιμή με βάση αντίστοιχες τιμές που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία [13]. Θεωρείται επίσης ότι κάθε μητρικό κύτταρο γεννά δύο θυγατρικά και ότι κάθε ένα από αυτά έχει το 50% του μήκους του μητρικού κατά τη στιγμή της διχοτόμησης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, πραγματοποιήθηκε επίλυση του μοντέλου A από το πρόγραμμα, και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα, για το μέγεθος ενός μικροοργανισμού από τη χρονική στιγμή 0 μέχρι τη χρονική στιγμή 600 min, για τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου κώδικα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 6: Το μέγεθος ενός κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος

Στην εικόνα 6 εμφανίζονται τρεις διαφορετικές επαναλήψεις επίλυσης των εξισώσεων από το πρόγραμμα, καθώς και η λύση του ντετερμινιστικού μοντέλου Baranyi για σύγκριση. Από το διάγραμμα αυτό επαληθεύεται ότι το μοντέλο είναι στοχαστικό, καθώς με τις ίδιες αρχικές συνθήκες, η επίλυση των εξισώσεων δίνει κάθε φορά διαφορετικά αποτελέσματα. Παράλληλα γίνεται ξεκάθαρο ότι η προσθήκη της στοχαστικής μεταβλητής οδηγεί σε μεγάλη διαφορά μεταξύ των λύσεων. Γι' αυτό κρίνεται λογικό ότι για τη μελέτη του μοντέλου πρέπει να γίνει σε μέσο όρο δέκα επαναλήψεων, και όχι να λαμβάνονται τα αποτελέσματα μίας μόνο επανάληψης.

#### 4.1.3 Στοχαστικό μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Μοντέλο Β)

Το επόμενο στάδιο για τη μελέτη των στοχαστικών μοντέλων, είναι η δημιουργία ενός προγράμματος που να αναπαράγει το στοχαστικό μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Το μοντέλο αυτό, αποτελείται από τις διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu + \xi(t)) \times a(t) \times x(t) \quad (7)$$

$$\frac{da}{dt} = \nu \times a(t) \times (1 - a(t)) \quad (4)$$

Για τη επίλυση αυτών των διαφορικών εξισώσεων γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Fortran 95. Η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο Runge Kutta 4<sup>ου</sup> βαθμού. Για την στοχαστική μεταβλητή  $\xi(t)$ , χρησιμοποιήθηκε κώδικας για μία γενήτρια παραγωγής αριθμών στο διάστημα [-1,1], που να ακολουθούν ομοιόμορφη κατανομή [17]. Οι ομοιόμορφα κατανεμημένοι αριθμοί, μέσα από μία μαθηματική μετατροπή που ονομάζεται Box-Muller, μετατρέπονται σε αριθμούς που ακολουθούν κανονική κατανομή.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

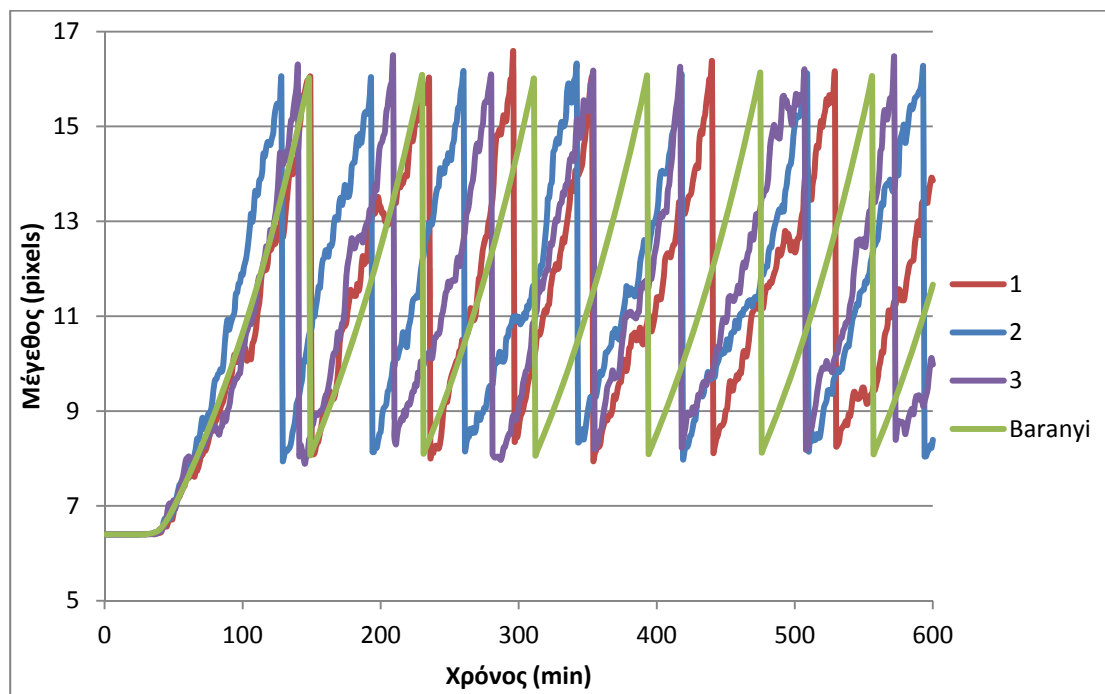
**Πίνακας 3: Δεδομένα του στοχαστικού μοντέλου για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού**

Σταθερά	Τιμή
$\mu$	0.0085 (min <sup>-1</sup> )
$\nu$	0.34 (min <sup>-1</sup> )
$\chi_0$	6.4 (pixels)
$\alpha_0$	1.20E-06
$\chi_{\max}$	16 (pixels)
$\lambda$	40 (min)
$\xi$	0 ± 0.0625 (κανονική κατανομή)

Τα δεδομένα αυτά έχουν εξαχθεί από δημοσιεύσεις των Baranyi, Kutalik και Razaz [12,13], εκτός από την τυπική απόκλιση της στοχαστικής μεταβλητής  $\xi$ , στην οποία δόθηκε μία λογική τιμή με βάση αντίστοιχες τιμές που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία [13]. Θεωρείται επίσης ότι κάθε μητρικό κύτταρο γεννά δύο θυγατρικά και ότι κάθε ένα από αυτά έχει το 50% του μήκους του μητρικού κατά τη στιγμή της διχοτόμησης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, πραγματοποιήθηκε επίλυση του μοντέλου Β από το πρόγραμμα, και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα, για το μέγεθος ενός μικροοργανισμού από τη χρονική στιγμή 0 μέχρι τη χρονική στιγμή

600 min, για τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου κώδικα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το στοχαστικό μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 7: Το μέγεθος ενός κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το στοχαστικό μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης

Στην εικόνα 7 εμφανίζονται τρεις διαφορετικές επαναλήψεις επίλυσης των εξισώσεων από το πρόγραμμα, καθώς και η λύση του ντετερμινιστικού μοντέλου Baranyi για σύγκριση. Από το διάγραμμα αυτό επαληθεύεται ότι το μοντέλο είναι στοχαστικό, καθώς με τις ίδιες αρχικές συνθήκες, η επίλυση των εξισώσεων δίνει κάθε φορά διαφορετικά αποτελέσματα. Παράλληλα γίνεται ξεκάθαρο ότι η προσθήκη της στοχαστικής μεταβλητής οδηγεί σε μεγάλη διαφορά μεταξύ των λύσεων. Γι' αυτό κρίνεται λογικό ότι για τη μελέτη του μοντέλου πρέπει να γίνει σε μέσο όρο δέκα επαναλήψεων, και όχι να λαμβάνονται τα αποτελέσματα μίας μόνο επανάληψης.

Ακόμα, παρατηρούμε μία σημαντική διαφορά σε σχέση με την εικόνα 6, η οποία είναι ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων δεν είναι εμφανής παρά μόνο μετά τη λανθάνουσα φάση του μικροοργανισμού, δηλαδή μετά το πέρας των 40 min. Αυτό συμβαίνει λόγω της επιρροής της μεταβλητής  $\alpha$  στην εξίσωση (7). Η

μεταβλητή αυτή έχει αρχικά πολύ μικρές τιμές, της τάξης του  $10^{-6}$ , οπότε δεν έχουν μεγάλη σημασία οι τιμές που έχουν οι υπόλοιποι όροι της εξίσωσης, και άρα το μέγεθος του μικροοργανισμού δεν μεταβάλλεται μέχρι η τιμή του  $\alpha$  να αυξηθεί αρκετά, κάτι που σηματοδοτεί τη λήξη της λανθάνουσας φάσης.

#### **4.1.4 Νέο στοχαστικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμού (Μοντέλο Γ)**

Το επόμενο στάδιο για τη μελέτη των στοχαστικών μοντέλων, είναι η δημιουργία ενός προγράμματος που να αναπαράγει το νέο στοχαστικό μοντέλο ανάπτυξης του μικροοργανισμού που προτείνεται. Το μοντέλο αυτό, αποτελείται από τις διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times \alpha(t) \times x(t)) + \xi(t) \quad (6)$$

$$\frac{da}{dt} = \nu \times \alpha(t) \times (1 - \alpha(t)) \quad (4)$$

, αλλά εμφανίζει ορισμένες διαφορές με το στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μέγιστο μέγεθος ανάπτυξης του μικροοργανισμού πριν τη διάσπασή του, καθώς και το ποσοστό του μητρικού κυττάρου που παίρνει το κάθε θυγατρικό θεωρούνται κατανομές, δηλαδή δεν έχουν σταθερές τιμές, κάτι που οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των μικροοργανισμών. Θεωρείται επίσης ότι κάθε μητρικό κύτταρο γεννά δύο θυγατρικά.

Για τη επίλυση αυτών των διαφορικών εξισώσεων γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Fortran 95. Η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων πραγματοποιείται με την μέθοδο Runge Kutta 4<sup>ου</sup> βαθμού. Για την στοχαστική μεταβλητή  $\xi(t)$ , χρησιμοποιήθηκε κώδικας για μία γενήτρια παραγωγής αριθμών στο διάστημα  $[-1,1]$ , που να ακολουθούν ομοιόμορφη κατανομή [17]. Οι ομοιόμορφα κατανεμημένοι αριθμοί, μέσα από μία μαθηματική μετατροπή που ονομάζεται Box-Muller, μετατρέπονται σε αριθμούς που ακολουθούν κανονική κατανομή.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

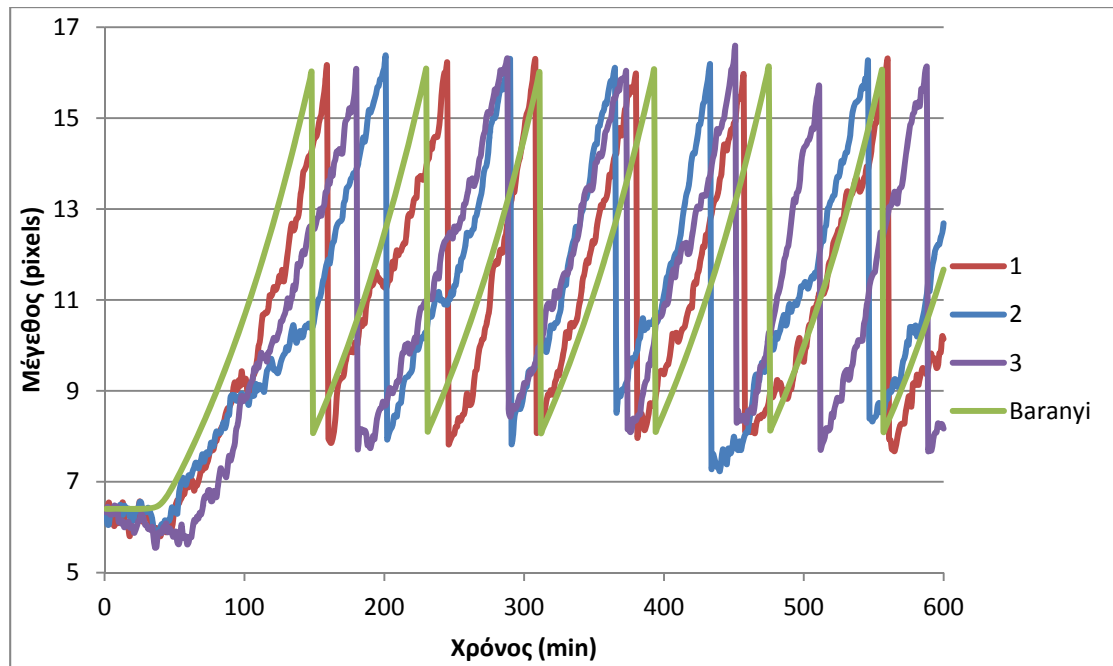
**Πίνακας 4: Δεδομένα του νέου στοχαστικού μοντέλου ανάπτυξης μικροοργανισμού**

Σταθερά	Τιμή
$\mu$	0.0085 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\nu$	0.34 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\chi_0$	6.4 (pixels)
$\alpha_0$	1.20E-06
$\chi_{\max}$	16 $\pm$ 1 (pixels) (κανονική κατανομή)
$\lambda$	40 (min)
$\xi$	0 $\pm$ 0.625 (κανονική κατανομή)
ποσοστό διαίρεσης	0.5 $\pm$ 0.1 (κανονική κατανομή)

Τα δεδομένα αυτά έχουν εξαχθεί από δημοσιεύσεις των Baranyi, Kutalik και Razaz [12,13], εκτός από την τυπική απόκλιση της στοχαστικής μεταβλητής  $\xi$ , στην οποία δόθηκε μία λογική τιμή με βάση αντίστοιχες τιμές που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία [13].

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, πραγματοποιήθηκε επίλυση του μοντέλου A από το πρόγραμμα, και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα, για το μέγεθος ενός μικροοργανισμού από τη χρονική στιγμή 0 μέχρι τη χρονική στιγμή 600 min, για τρεις διαφορετικές επαναλήψεις του ίδιου κώδικα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το στοχαστικό μοντέλο για το μέγεθος του μικροοργανισμού παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:





Εικόνα 8: Το μέγεθος ενός κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το νέο στοχαστικό μοντέλο ανάπτυξης

Στην εικόνα 8 εμφανίζονται τρεις διαφορετικές επαναλήψεις επίλυσης των εξισώσεων από το πρόγραμμα, καθώς και η λύση του ντετερμινιστικού μοντέλου Baranyi για σύγκριση. Από το διάγραμμα αυτό επαληθεύεται ότι το μοντέλο είναι στοχαστικό, καθώς με τις ίδιες αρχικές συνθήκες, η επίλυση των εξισώσεων δίνει κάθε φορά διαφορετικά αποτελέσματα. Παράλληλα γίνεται ξεκάθαρο ότι η προσθήκη της στοχαστικής μεταβλητής οδηγεί σε μεγάλη διαφορά μεταξύ των λύσεων. Γι' αυτό κρίνεται λογικό ότι για τη μελέτη του μοντέλου πρέπει να γίνει σε μέσο όρο δέκα επαναλήψεων, και όχι να λαμβάνονται τα αποτελέσματα μίας μόνο επανάληψης.

Ακόμα, παρατηρούμε διαφορές σε σχέση με την εικόνα 6. Συγκεκριμένα, το μέγιστο μέγεθος ανάπτυξης του μικροοργανισμού εμφανίζει διαφοροποίηση, καθώς πλέον έχει στοχαστική μορφή, όπως εμφανίζεται για την τρίτη επανάληψη και για χρόνο 460 min, όπου αντί να διαιρεθεί για μέγεθος 16 pixels, διαιρείται για μέγεθος 16.5 pixels. Αντίστοιχα, το ποσοστό του μητρικού μικροοργανισμού που αποκτά ο κάθε θυγατρικός εμφανίζει διαφοροποίηση, καθώς πλέον έχει στοχαστική μορφή, όπως εμφανίζεται για τη δεύτερη επανάληψη και για χρόνο 435 min, όπου από μέγεθος

16.2 pixels καταλήγει σε μέγεθος 7,4 pixels, άρα το θυγατρικό πήρε περίπου το 45% του συνολικού μεγέθους του μητρικού.

#### **4.1.5 Κατανομή του πληθυσμού ως προς το μέγεθος του μικροοργανισμού**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη των στοχαστικών μοντέλων εμφανίζει η κατανομή του πληθυσμού ως προς το μέγεθος του κάθε μικροοργανισμού, καθώς δεν έχει μελετηθεί προγενέστερα. Στο ντετερμινιστικό μοντέλο, όπου δεν εμφανίζεται καμία διαφοροποίηση μεταξύ των μελών ενός πληθυσμού, σε κάθε χρονική στιγμή όλοι οι μικροοργανισμοί έχουν το ίδιο μέγεθος και όταν φτάσουν στο μέγιστο μέγεθος ανάπτυξης διχοτομούνται όλοι ταυτόχρονα. Όμως στα στοχαστικά μοντέλα η ανάπτυξη κάθε ενός μικροοργανισμού διαφέρει, άρα κάθε μικροοργανισμός έχει διαφορετικό μήκος σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, και αντίστοιχα κάποιοι διαιρούνται νωρίτερα και κάποιοι αργότερα. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει η εικόνα της κατανομής των μικροοργανισμών ως προς το μέγεθος για κάθε χρονική στιγμή, η οποία όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια αποκτά σταθερό σχήμα με την πάροδο του χρόνου.

Αφού το μέγεθος του πληθυσμού αυξάνεται με το χρόνο, δεν θα μπορούσε να μελετηθεί η κατανομή του πληθυσμού ως προς το μήκος με βάση τον αριθμό των μικροοργανισμών που έχουν συγκεκριμένο μήκος κάθε χρονική στιγμή. Μελετάται λοιπόν η κατανομή του πληθυσμού ως προς το μήκος με βάση το ποσοστό του συνόλου των μικροοργανισμών που έχει συγκεκριμένο μήκος κάθε χρονική στιγμή.

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μελέτη, ορίστηκε το διάστημα ανάμεσα στο μέγιστο και το ελάχιστο μέγεθος που μπορεί να έχει ένας μικροοργανισμός όταν βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής του, και το διάστημα αυτό χωρίστηκε σε δέκα ίσα μέρη, που είναι ικανοποιητικός αριθμός περιοχών για να μελετηθεί μία κατανομή. Στη συνέχεια ελήφθησαν δεδομένα από τα προγράμματα, για το μέγεθος κάθε ενός από τους μικροοργανισμούς σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Από τα δεδομένα αυτά, καταγράφηκε ο αριθμός των μικροοργανισμών που ανήκει σε κάθε ένα από τα δέκα διαστήματα, και μετά διαιρέθηκε με τον συνολικό αριθμό των

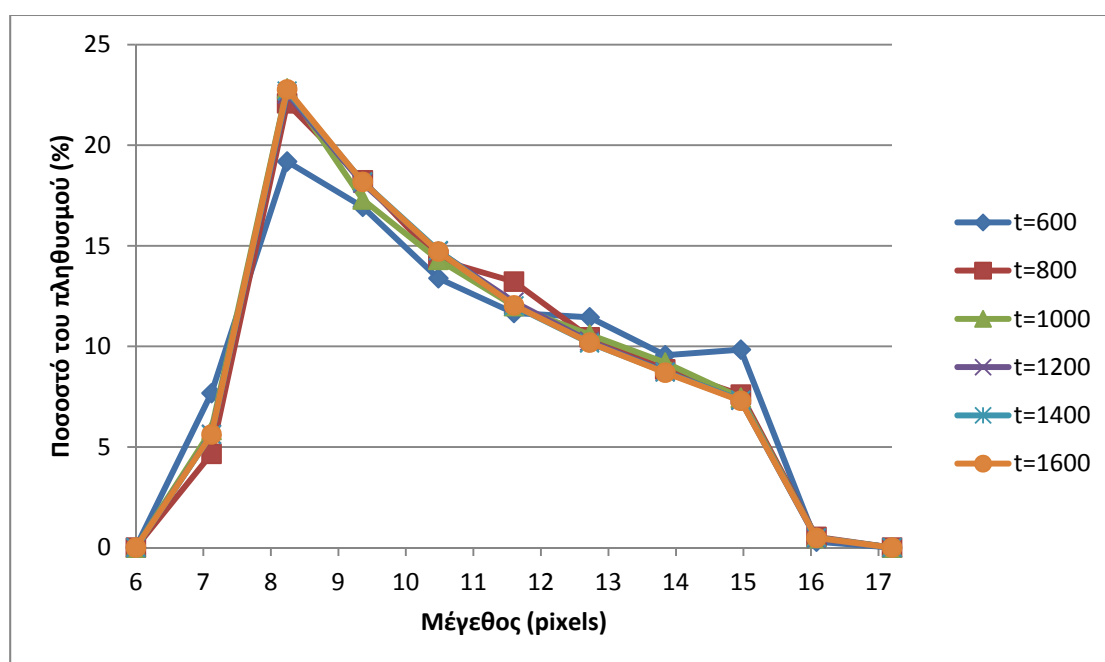
μικροοργανισμών για να προκύψουν ποσοστά επί τοις εκατό του συνόλου του πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το μοντέλο A παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα και το ακόλουθο διάγραμμα:

Πίνακας 5: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο A

Από	Έως	t=600	t=800	t=1000	t=1200	t=1400	t=1600
6	7.12	0	0	0	0	0.001344	0.001035
7.12	8.24	7.675796	4.661603	5.844219	5.634652	5.61479	5.62221
8.24	9.36	19.19117	22.08685	22.82643	22.5515	22.69654	22.77484
9.36	10.48	16.94016	18.25942	17.30568	18.10582	18.18565	18.1791
10.48	11.6	13.38894	14.32232	14.30743	14.73538	14.7685	14.71716
11.6	12.72	11.65993	13.22386	12.00761	12.21075	12.01867	12.03987
12.72	13.84	11.44665	10.4549	10.58533	10.26009	10.17064	10.19185
13.84	14.96	9.563126	8.857231	9.197662	8.739981	8.727492	8.695318
14.96	16.08	9.839371	7.602177	7.449369	7.319442	7.325035	7.296455
16.08	17.2	0.29485	0.531646	0.476279	0.44238	0.49133	0.482171

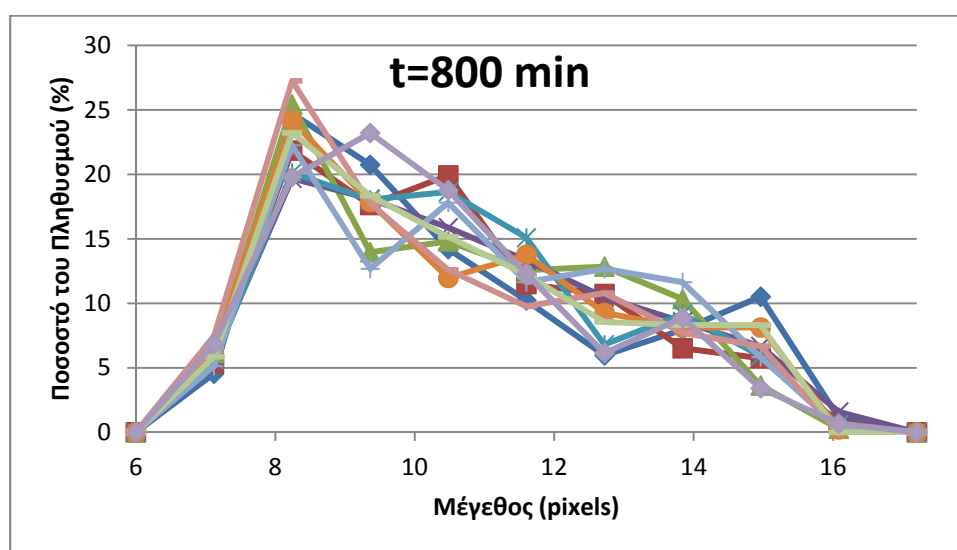
Στον πίνακα 5, οι στήλες από – έως, ορίζουν το μέγεθος του μικροοργανισμού σε pixels και οι στήλες t=600, 800 κλπ., ορίζουν τη χρονική στιγμή σε min. Έτσι για κάθε χρονική στιγμή, είναι καταγεγραμμένο στον πίνακα το ποσοστό του πληθυσμού που βρίσκεται στην αντίστοιχη περιοχή μεγεθών.



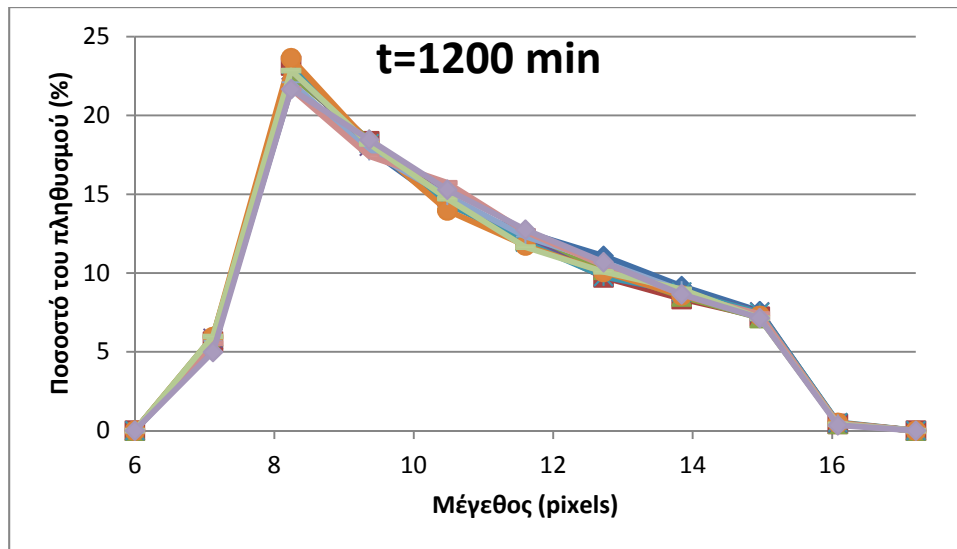
Εικόνα 9: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο A

Στην εικόνα 9 παρατηρούμε ότι η κατανομή του πληθυσμού μεταβάλλεται με το χρόνο, μέχρι που αποκτά σταθερό σχήμα μετά τη χρονική στιγμή 1200 min, όπου οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών δεν είναι ορατές στην εικόνα. Από τον πίνακα 5 παρατηρούμε ότι οι διαφορές αυτές είναι της τάξεως του  $10^{-1}$  με  $10^{-2}$ . Άρα από την επίλυση του μοντέλου A, προκύπτει μία κατανομή του πληθυσμού η οποία οδηγείται με την πάροδο του χρόνου σε μόνιμη κατάσταση. Η κατανομή αυτή προκύπτει ως μέσος όρος 10 διαφορετικών επαναλήψεων του ίδιου κώδικα.

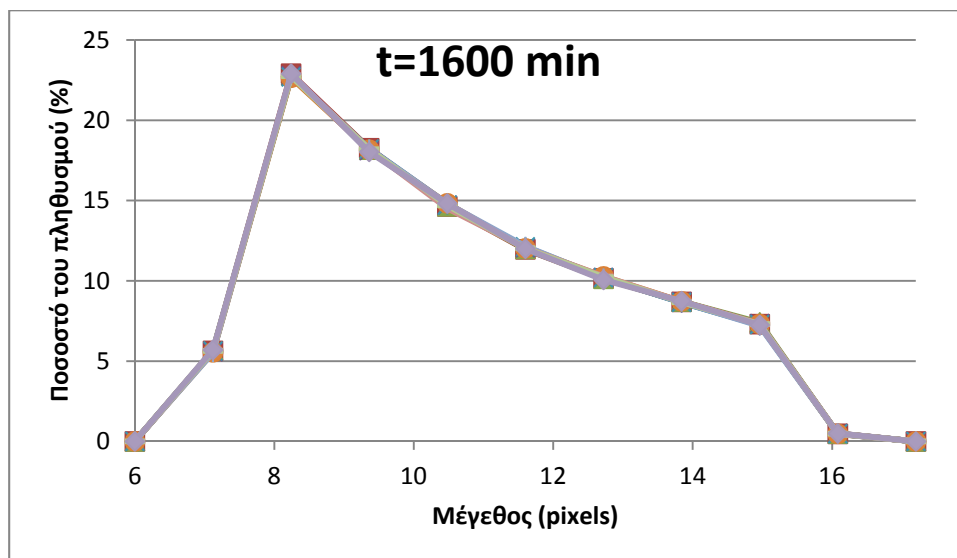
Όμως, προκύπτει ένα επιπλέον συμπέρασμα από τη μελέτη της κατανομής που εμφανίζει η κάθε μία από τις 10 επαναλήψεις ξεχωριστά, για κάθε χρονική στιγμή. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε μία από τις 10 επαναλήψεις, με βάση το μοντέλο A παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα:



Εικόνα 10: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή t=800 min με βάση το μοντέλο A, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις



Εικόνα 11: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1200$  min με βάση το μοντέλο A, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις



Εικόνα 12: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1600$  min με βάση το μοντέλο A, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις

Στην εικόνα 10, παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στις κατανομές που εμφανίζουν οι 10 διαφορετικές επαναλήψεις, μία διαφορά που καθώς περνά ο χρόνος εξαλείφεται, όπως φαίνεται από τις εικόνες 11 και 12, μέχρι που δεν είναι πλέον ορατή. Έτσι αποδεικνύεται ότι η μόνιμη κατάσταση στην οποία οδηγείται ο πληθυσμός είναι δεν επηρεάζεται από την τυχαιότητα που υπάρχει στο σύστημα, είναι δηλαδή μία κατάσταση ισορροπίας στην οποία το σύστημα θα καταλήξει

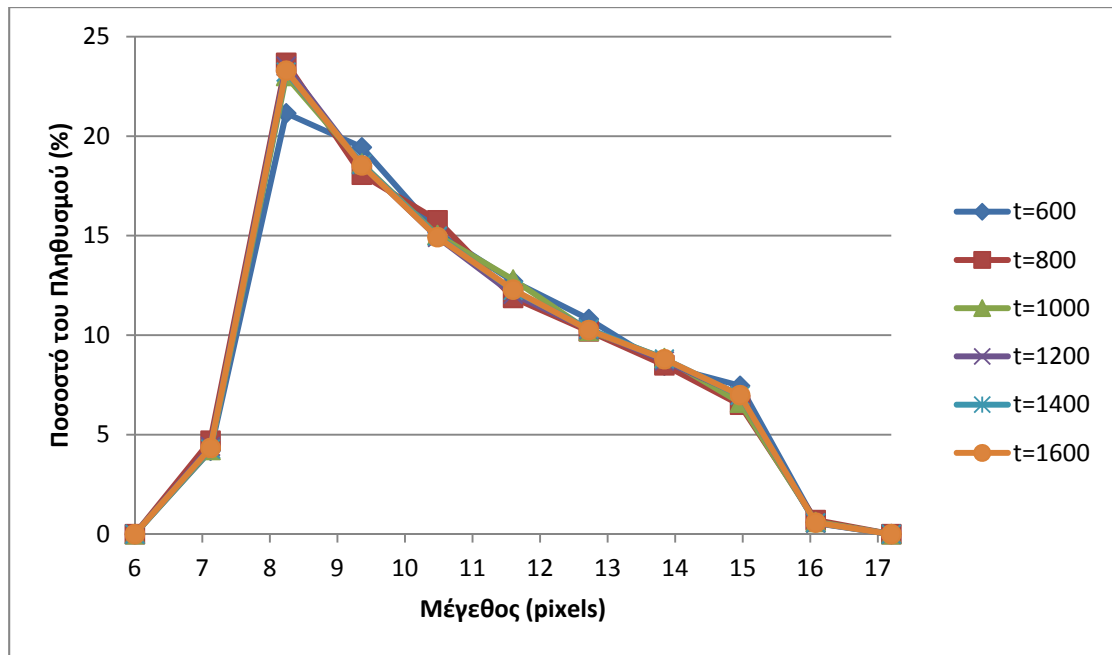
οτιδήποτε και να συμβεί. Άρα το σύστημα είναι εργοδικό, δηλαδή ένα σύστημα που με την πάροδο του χρόνου οδηγείται στο ίδιο αποτέλεσμα, ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες.

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το μοντέλο Β παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα και το ακόλουθο διάγραμμα:

**Πίνακας 6: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο Β**

Από	Έως	t=600	t=800	t=1000	t=1200	t=1400	t=1600
6	7.12	0	0	0	0	0	0
7.12	8.24	4.191366	4.700301	4.235283	4.41057	4.281891	4.332406
8.24	9.36	21.15513	23.68555	23.02764	23.52599	23.22322	23.29563
9.36	10.48	19.44406	18.06441	18.61835	18.55104	18.59505	18.53385
10.48	11.6	15.16291	15.77684	15.0303	14.91968	14.98198	14.92694
11.6	12.72	12.7109	11.87454	12.7939	12.05202	12.2498	12.29087
12.72	13.84	10.80898	10.19306	10.21878	10.27776	10.31888	10.2586
13.84	14.96	8.46998	8.491809	8.84826	8.705447	8.807426	8.794596
14.96	16.08	7.457997	6.506269	6.613092	7.005583	6.97075	6.988603
16.08	17.2	0.598679	0.707222	0.614385	0.551916	0.571002	0.578491

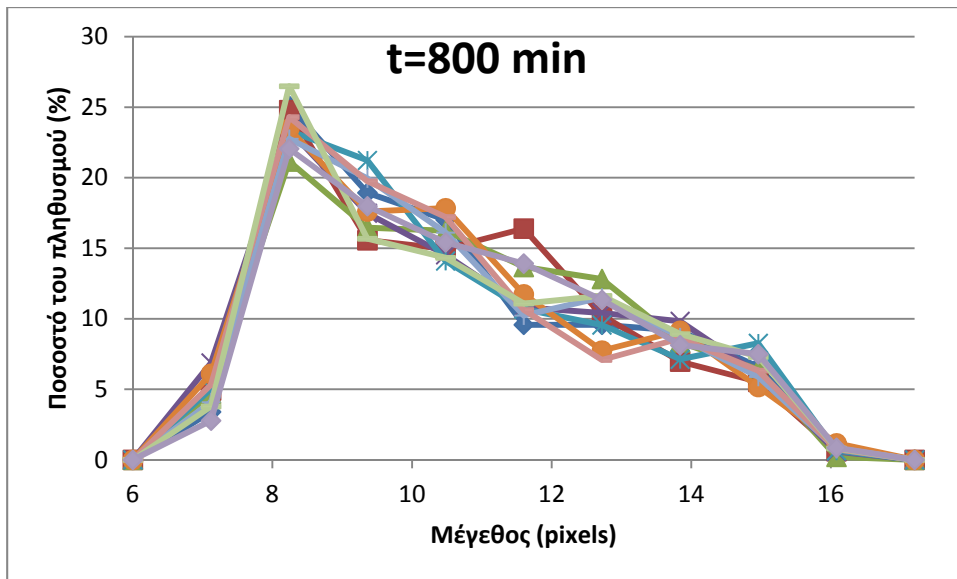
Στον πίνακα 6, οι στήλες από – έως, ορίζουν το μέγεθος του μικροοργανισμού σε pixels και οι στήλες t=600, 800 κλπ., ορίζουν τη χρονική στιγμή σε min. Έτσι για κάθε χρονική στιγμή, είναι καταγεγραμμένο στον πίνακα το ποσοστό του πληθυσμού που βρίσκεται στην αντίστοιχη περιοχή μεγεθών.



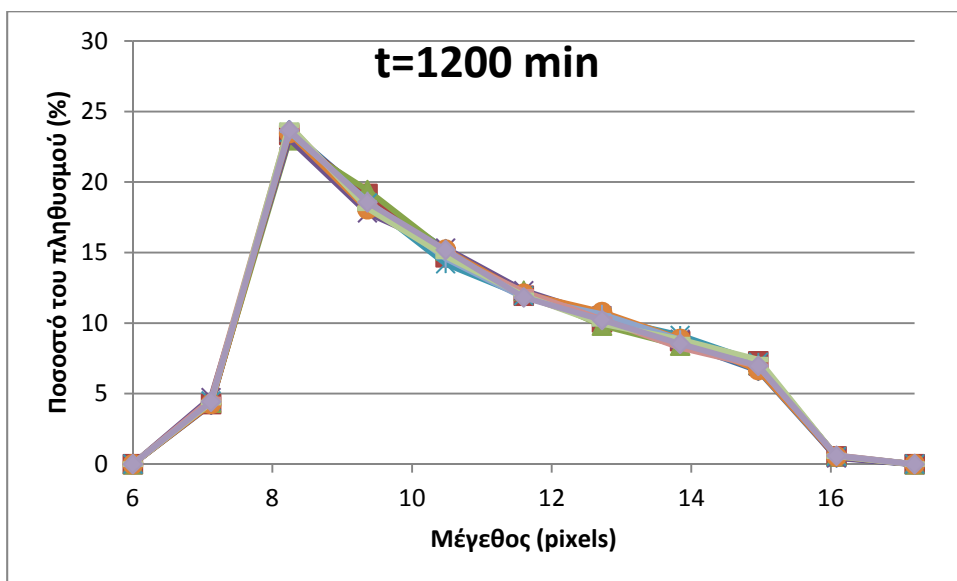
Εικόνα 13: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο Β

Στην εικόνα 13 παρατηρούμε ότι η κατανομή του πληθυσμού μεταβάλλεται με το χρόνο, μέχρι που αποκτά σταθερό σχήμα μετά τη χρονική στιγμή 1200 min, όπου οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών δεν είναι ορατές στην εικόνα. Από τον πίνακα 5 παρατηρούμε ότι οι διαφορές αυτές είναι της τάξεως του  $10^{-1}$  με  $10^{-2}$ . Άρα από την επίλυση του μοντέλου Β, προκύπτει μία κατανομή του πληθυσμού η οποία οδηγείται με την πάροδο του χρόνου σε μόνιμη κατάσταση. Η κατανομή αυτή προκύπτει ως μέσος όρος 10 διαφορετικών επαναλήψεων του ίδιου κώδικα.

Όπως και για το μοντέλο Α, έτσι και για το μοντέλο Β επιβεβαιώνεται ότι είναι εργοδικό, δηλαδή οδηγείται σε μία σταθερή κατάσταση, ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε μία από τις 10 επαναλήψεις, με βάση το μοντέλο Β, παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα:

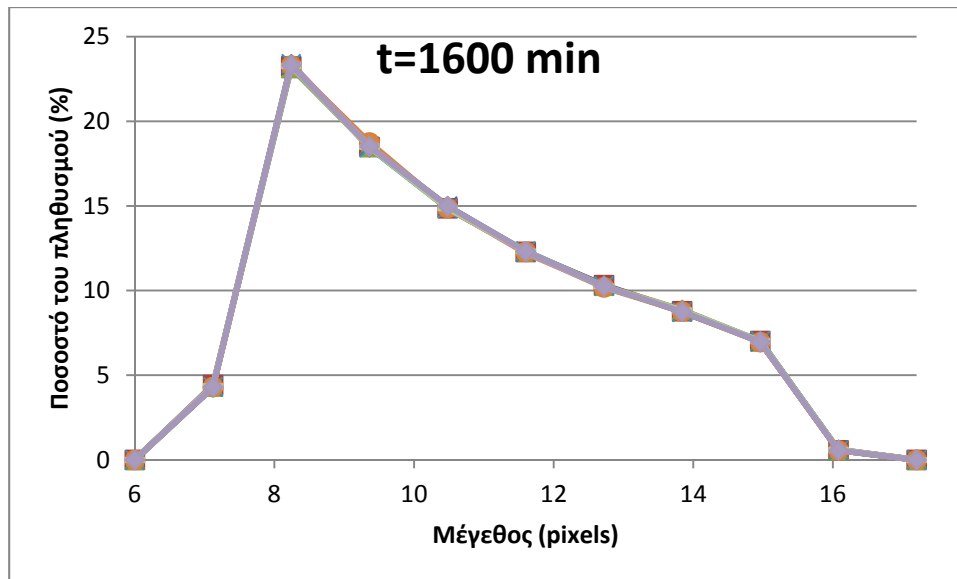


Εικόνα 14: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=800$  min με βάση το μοντέλο B, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις



Εικόνα 15: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1200$  min με βάση το μοντέλο B, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις





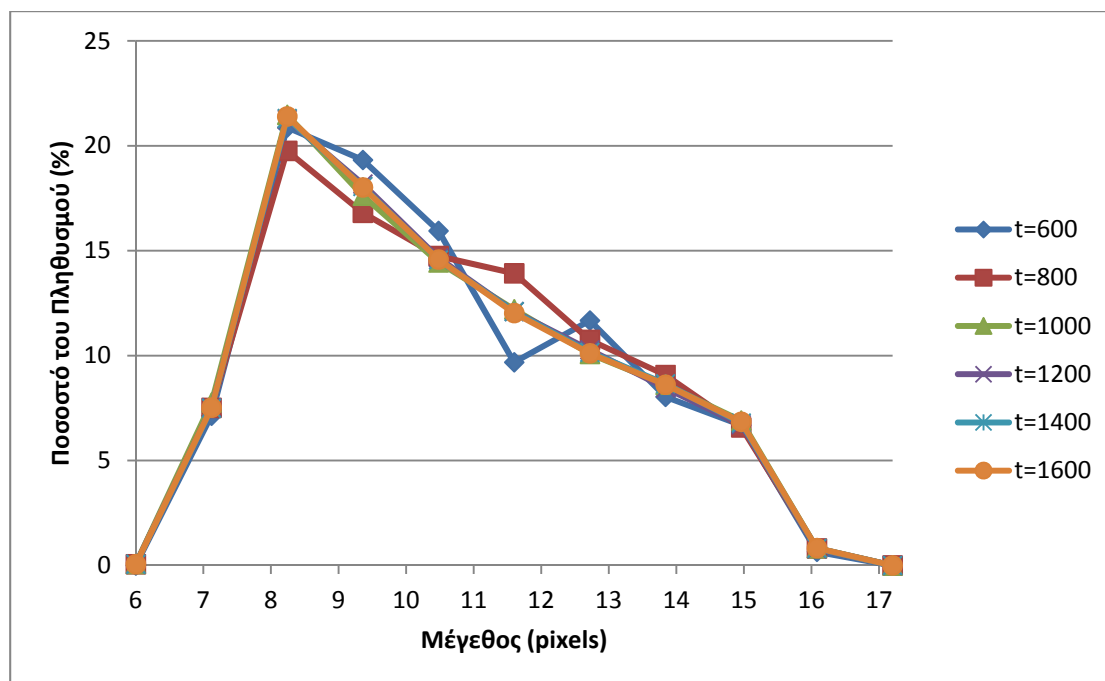
Εικόνα 16: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1600$  min με βάση το μοντέλο Β, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις

Στην εικόνα 14, παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στις κατανομές που εμφανίζουν οι 10 διαφορετικές επαναλήψεις, μία διαφορά που καθώς περνά ο χρόνος εξαλείφεται, όπως φαίνεται από τις εικόνες 15 και 16, μέχρι που δεν είναι πλέον ορατή. Έτσι αποδεικνύεται ότι το σύστημα είναι εργοδικό, δηλαδή με την πάροδο του χρόνου οδηγείται στο ίδιο αποτέλεσμα, ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το νέο μοντέλο που προτείνεται, δηλαδή το μοντέλο Γ, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα και το ακόλουθο διάγραμμα:

Πίνακας 7: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο Γ

Από	Έως	t=600	t=800	t=1000	t=1200	t=1400	t=1600
6	7.12	0	0.060279	0.071817	0.057339	0.059618	0.061619
7.12	8.24	7.135811	7.510766	7.76549	7.523163	7.491147	7.519663
8.24	9.36	20.87256	19.75503	21.47511	21.2511	21.30215	21.39791
9.36	10.48	19.32148	16.80385	17.62176	18.17575	18.05986	18.01443
10.48	11.6	15.9415	14.74191	14.43925	14.65845	14.56361	14.57954
11.6	12.72	9.680873	13.91968	12.20674	12.10374	12.09525	12.02752
12.72	13.84	11.67339	10.74576	10.0785	10.27504	10.15885	10.11008
13.84	14.96	8.033561	9.07415	8.614287	8.455154	8.661637	8.612583
14.96	16.08	6.685639	6.578593	6.907762	6.706834	6.789172	6.848167
16.08	17.2	0.655188	0.809985	0.819284	0.793437	0.818709	0.828476

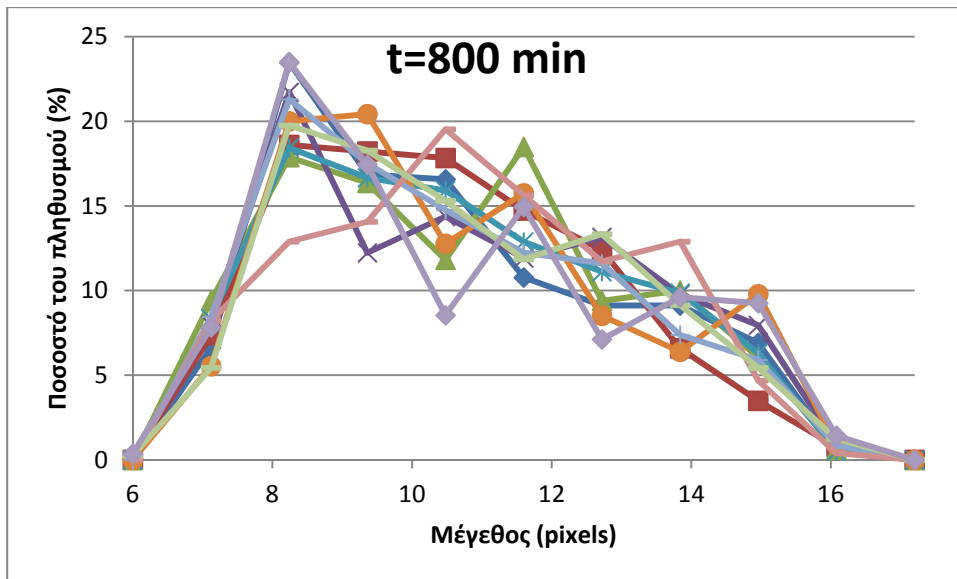
Στον πίνακα 7, οι στήλες από – έως, ορίζουν το μέγεθος του μικροοργανισμού σε pixels και οι στήλες t=600, 800 κλπ., ορίζουν τη χρονική στιγμή σε min. Έτσι για κάθε χρονική στιγμή, είναι καταγεγραμμένο στον πίνακα το ποσοστό του πληθυσμού που βρίσκεται στην αντίστοιχη περιοχή μεγεθών.



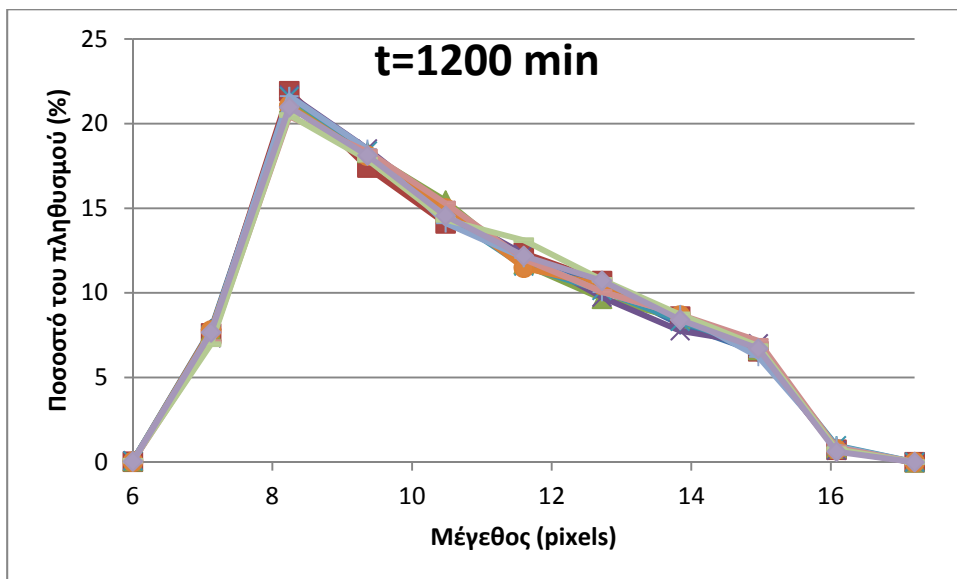
Εικόνα 17: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή με βάση το μοντέλο Γ

Στην εικόνα 17 παρατηρούμε ότι η κατανομή του πληθυσμού μεταβάλλεται με το χρόνο, μέχρι που αποκτά σταθερό σχήμα μετά τη χρονική στιγμή 1200 min, όπου οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών δεν είναι ορατές στην εικόνα. Από τον πίνακα 5 παρατηρούμε ότι οι διαφορές αυτές είναι της τάξεως του  $10^{-1}$  με  $10^{-2}$ . Άρα από την επίλυση του μοντέλου Γ, προκύπτει μία κατανομή του πληθυσμού η οποία οδηγείται με την πάροδο του χρόνου σε μόνιμη κατάσταση. Η κατανομή αυτή προκύπτει ως μέσος όρος 10 διαφορετικών επαναλήψεων του ίδιου κώδικα.

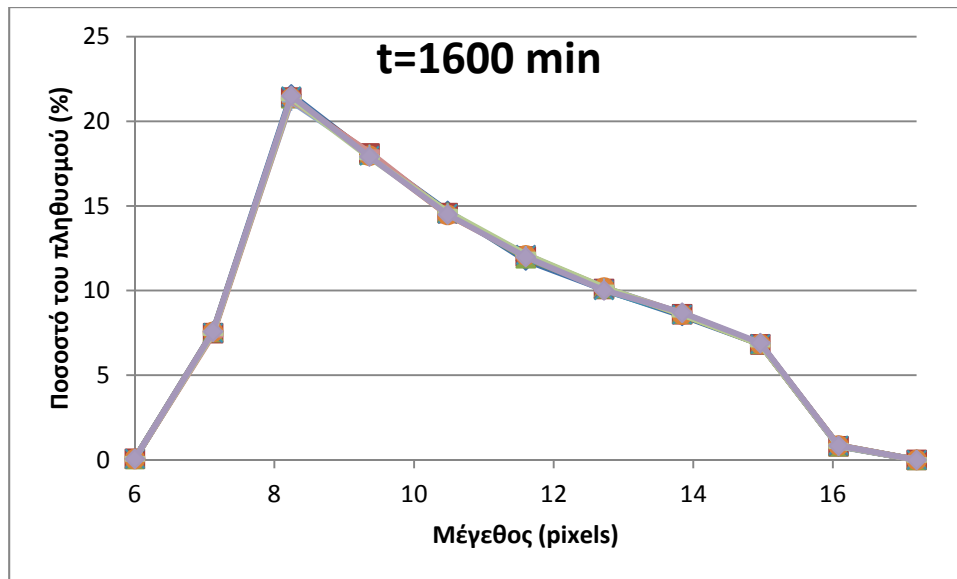
Όπως και για τα μοντέλα Α και Β, έτσι και για το μοντέλο Γ επιβεβαιώνεται ότι είναι εργοδικό, δηλαδή οδηγείται σε μία σταθερή κατάσταση, ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε μία από τις 10 επαναλήψεις, με βάση το μοντέλο Β, παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα:



Εικόνα 18: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=800$  min με βάση το μοντέλο Γ, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις



Εικόνα 19: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1200$  min με βάση το μοντέλο Γ, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις



Εικόνα 20: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος τη χρονική στιγμή  $t=1600$  min με βάση το μοντέλο Γ, για 10 διαφορετικές επαναλήψεις

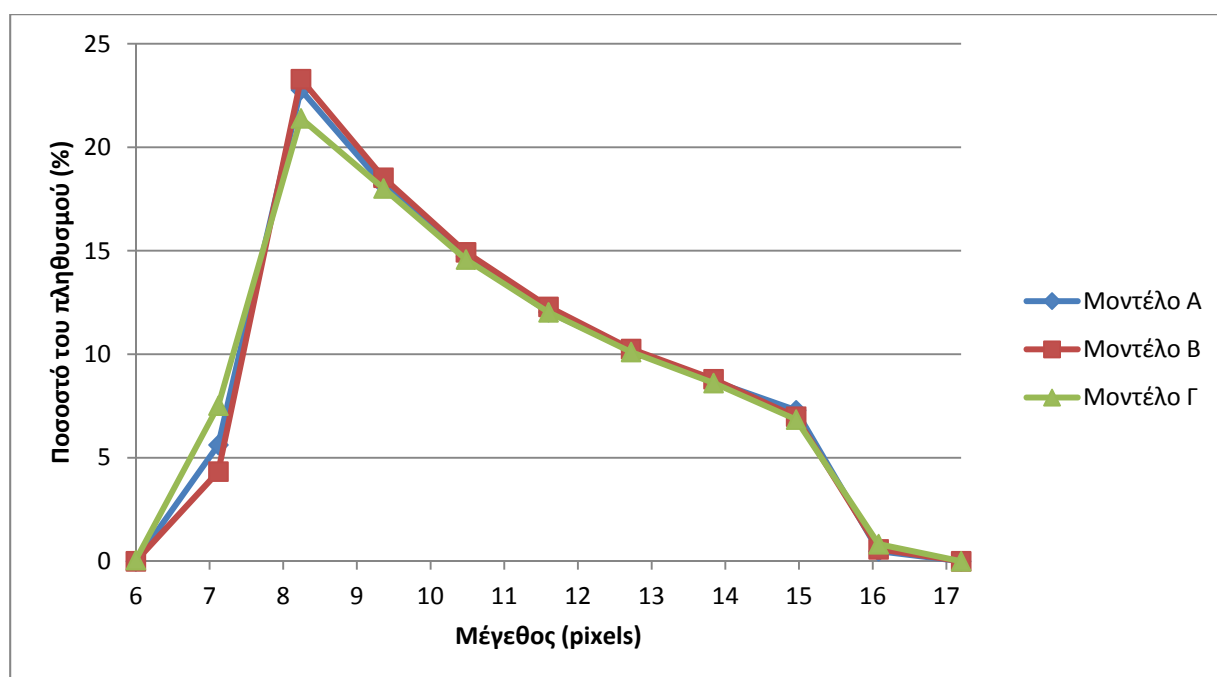
Στην εικόνα 18, παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στις κατανομές που εμφανίζουν οι 10 διαφορετικές επαναλήψεις, μία διαφορά που καθώς περνά ο χρόνος εξαλείφεται, όπως φαίνεται από τις εικόνες 19 και 20, μέχρι που δεν είναι πλέον ορατή. Έτσι αποδεικνύεται ότι το σύστημα είναι εργοδικό, δηλαδή με την πάροδο του χρόνου οδηγείται στο ίδιο αποτέλεσμα, ανεξάρτητα από τις αρχικές συνθήκες.

Επιβεβαιώθηκε λοιπόν ότι η κατανομή του πληθυσμού ως προς το μέγεθος του κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο, οδηγείται σε μόνιμη κατάσταση και για τα τρία μοντέλα. Όμως, η μορφή της κατανομής στη μόνιμη κατάσταση δεν είναι ίδια και για τα τρία μοντέλα, και για να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ τους παρατίθενται ο ακόλουθος πίνακας και το ακόλουθο διάγραμμα:

Πίνακας 8: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε μόνιμη κατάσταση με βάση τα τρία μοντέλα που μελετήθηκαν

Από	Έως	Μοντέλο Α	Μοντέλο Β	Μοντέλο Γ
6	7.12	0.001034714	0	0.061618579
7.12	8.24	5.622210269	4.332406274	7.519662798
8.24	9.36	22.77483794	23.29563462	21.39790946
9.36	10.48	18.17909616	18.53385359	18.01443414
10.48	11.6	14.71716429	14.926943	14.57954104
11.6	12.72	12.03986518	12.2908744	12.0275245
12.72	13.84	10.19184737	10.25859747	10.11008416
13.84	14.96	8.695318454	8.794595904	8.612582597
14.96	16.08	7.2964546	6.988603307	6.848167136
16.08	17.2	0.482171025	0.578491432	0.828475591

Στον πίνακα 8, οι στήλες από – έως, ορίζουν το μέγεθος του μικροοργανισμού σε pixels και οι στήλες t=600, 800 κλπ., ορίζουν τη χρονική στιγμή σε min. Έτσι για κάθε χρονική στιγμή, είναι καταγεγραμμένο στον πίνακα το ποσοστό του πληθυσμού που βρίσκεται στην αντίστοιχη περιοχή μεγεθών.



Εικόνα 21: Ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε μόνιμη κατάσταση με βάση τα τρία μοντέλα που μελετήθηκαν

Όπως φαίνεται από τον πίνακα και το διάγραμμα, τα τρία μοντέλα εμφανίζουν ουσιαστικές διαφορές, δηλαδή διαφορές της τάξεως του  $10^0$ , για τις περιοχές

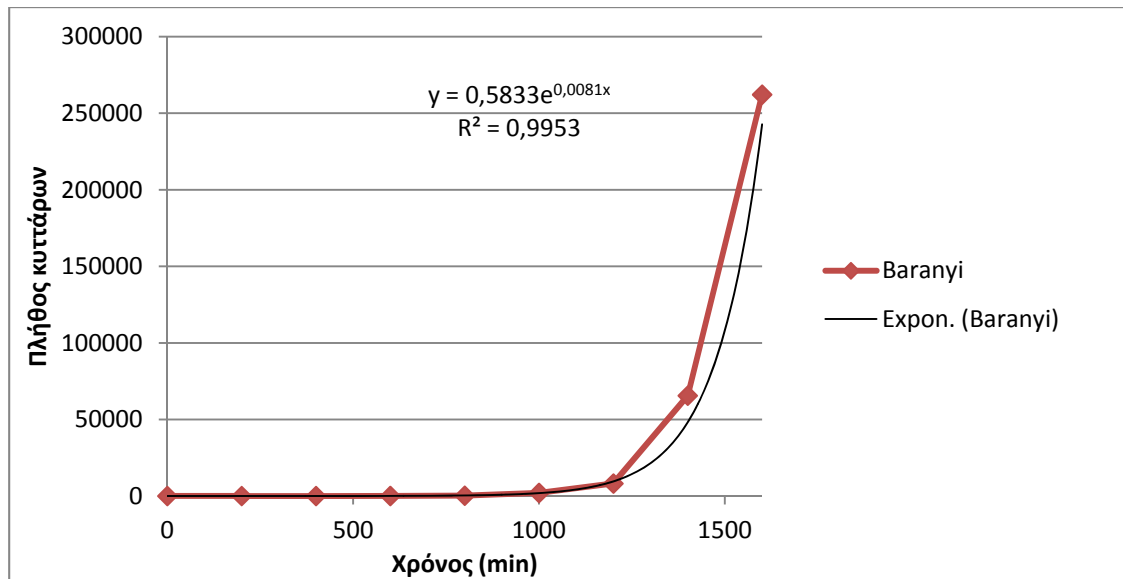
μεγέθους 7.14 με 9.36 pixels, ενώ για τις υπόλοιπες περιοχές, το ποσοστό του πληθυσμού που αντιστοιχεί σε αυτές είναι σχεδόν το ίδιο και για τα τρία μοντέλα.

#### **4.1.6 Σύγκριση των μοντέλων με βάση το συνολικό μέγεθος του πληθυσμού μικροοργανισμών**

Το πιο σημαντικό μέγεθος που προκύπτει από την επίλυση των τριών μοντέλων είναι ο αριθμός των κυττάρων *Listeria Innocua* σε συνάρτηση με το χρόνο. Για το ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi, ο αριθμός των κυττάρων είναι εύκολο να υπολογιστεί από τα δεδομένα με τη χρήση των διαφορικών εξισώσεων, καθώς κάθε φορά που ένας μικροοργανισμός φτάνει στο μέγιστο μέγεθος, δηλαδή 16 pixels, γεννά δύο μικροοργανισμούς με μέγεθος 8 pixels. Και αφού είναι απόλυτα ισοδύναμοι οι δύο νέοι μικροοργανισμοί, θα φτάσουν ταυτόχρονα στο μέγιστο μέγεθος και θα παράγουν 4 νέους, απόλυτα ισοδύναμους μικροοργανισμούς, και ούτω καθεξής. Έτσι, το μόνο που χρειάζεται για να προκύψει το μέγεθος του πληθυσμού από την επίλυση των εξισώσεων είναι, κάθε φορά που διασπάται ένα κύτταρο, να διπλασιάζεται το μέγεθος του πληθυσμού.

Το ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi περιγράφει μόνο τη λανθάνουσα και την εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε η καταγραφή του πλήθους των μικροοργανισμών που προκύπτει από το μοντέλο αυτό θα δώσει αποτελέσματα πολύ μεγαλύτερα από τα πραγματικά, αφού δεν προβλέπεται η φάση στασιμότητας και ο θάνατος των κυττάρων.

Έτσι προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα για το ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi:



Εικόνα 22: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το ντετερμινιστικό μοντέλο Baranyi

Η εκθετική εξίσωση που εμφανίζεται στην εικόνα 20 περιγράφει τη μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με ικανοποιητική ακρίβεια ( $R^2 = 0.99$ ). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η:

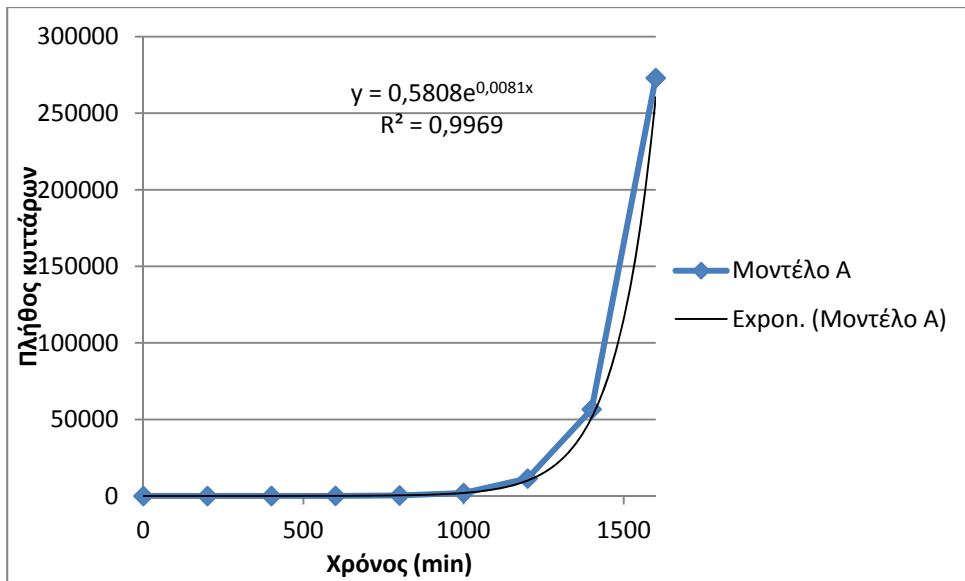
$$\text{Πλήθος} = 0.5833 \times e^{0.0081t} \quad (10)$$

Η αντίστοιχη εξίσωση που προκύπτει από την επίλυση της διαφορικής εξίσωσης του ντετερμινιστικού μοντέλου Baranyi για την εκθετική φάση ανάπτυξης είναι η:

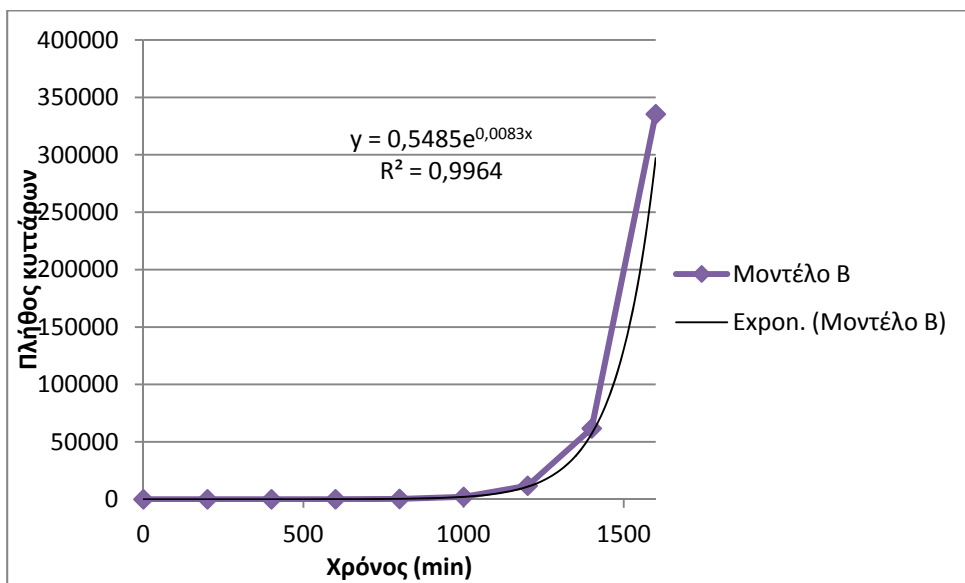
$$\chi = e^{0.0085t} \quad (11)$$

Παρατηρούμε ότι ο συντελεστής του εκθετικού μέρους, δηλαδή το 0.0081 είναι κοντινός σε μέγεθος αλλά όχι ίσος με τον αντίστοιχο συντελεστή για την εκθετική ανάπτυξη του μικροοργανισμού που είναι 0.0085. Αυτό συμβαίνει γιατί η συνολική αύξηση του πληθυσμού επηρεάζεται και από τη λανθάνουσα φάση, η οποία καθυστερεί την αύξηση του πληθυσμού, και γι αυτό ο συντελεστής είναι μειωμένος. Δηλαδή η αύξηση του πληθυσμού είναι ανάλογη της αύξησης του μεγέθους του κυττάρου κατά την εκθετική φάση, απλά η μικρή απόκλιση που εμφανίζεται εξαρτάται από τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης.

Με τον ίδιο τρόπο, που περιγράφηκε παραπάνω, προκύπτουν τα διαγράμματα αύξησης πληθυσμού για τα μοντέλα Α, Β και Γ:

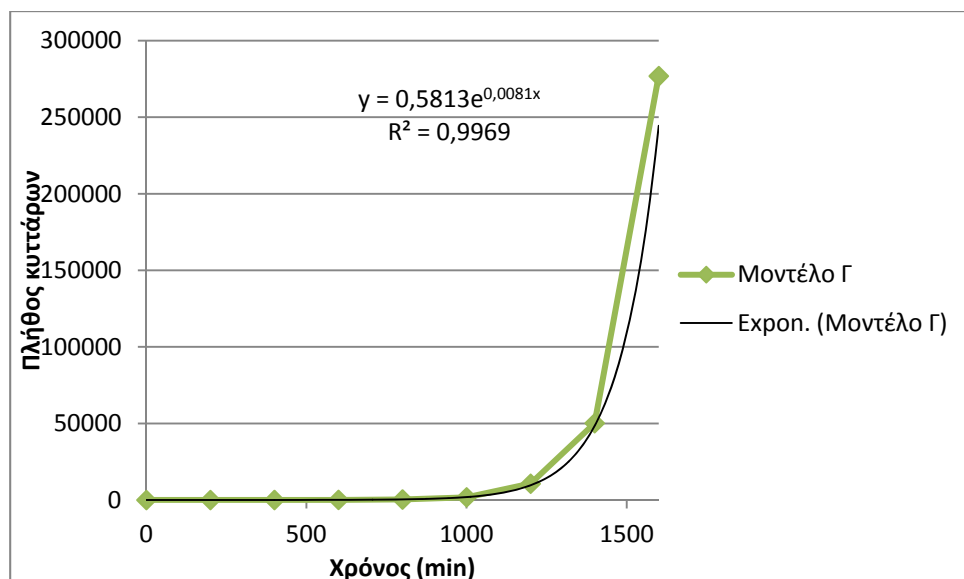


Εικόνα 23: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το μοντέλο A



Εικόνα 24: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το μοντέλο B





Εικόνα 25: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με βάση το μοντέλο Γ

Οι εκθετικές εξισώσεις που εμφανίζονται στις εικόνες 23 έως 25, περιγράφουν τη μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο με ικανοποιητική ακρίβεια ( $R^2 = 0.99$  και για τις τρεις). Οι εξισώσεις που προκύπτουν είναι:

$$\text{Πλήθος} = 0.5808 \times e^{0.0081t} \text{ (Μοντέλο Α)} \quad (12)$$

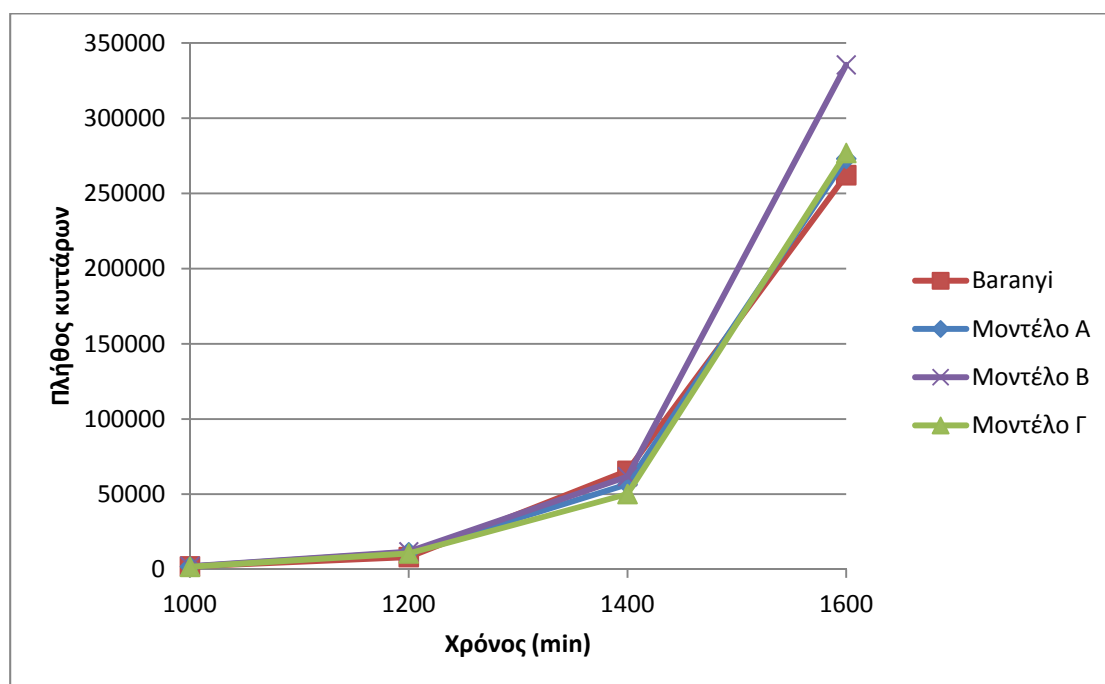
$$\text{Πλήθος} = 0.5485 \times e^{0.0083t} \text{ (Μοντέλο Β)} \quad (13)$$

$$\text{Πλήθος} = 0.5813 \times e^{0.0081t} \text{ (Μοντέλο Γ)} \quad (14)$$

Στον ακόλουθο πίνακα και το ακόλουθο διάγραμμα, εμφανίζεται ο αριθμός των κυττάρων για κάθε μοντέλο σε συνάρτηση με το χρόνο:

Πίνακας 9: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για όλα τα μοντέλα

t (min)	Baranyi	Μοντέλο Α	Μοντέλο Β	Μοντέλο Γ
0	1	1	1	1
200	2	2	2	2
400	16	12	12	12
600	64	66	66	70
800	256	345	333	335
1000	2048	1912	2113	1756
1200	8192	11387	11799	10648
1400	65536	56585	61675	50144
1600	262144	273022	335485	276867



Εικόνα 26: Πλήθος κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για όλα τα μοντέλα

Ο πληθυσμός που είναι καταγεγραμμένος για κάθε μοντέλο προκύπτει από το μέσο όρο δέκα επαναλήψεων. Στην εικόνα 26 φαίνεται ότι το μοντέλο Β εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόκλιση από το ντετερμινιστικό, ενώ τα μοντέλα Α και Γ έχουν αποτελέσματα πολύ πιο κοντινά με το μοντέλο Baranyi.

Επειδή ο διπλασιασμός ενός κυττάρου στο ντετερμινιστικό μοντέλο συμβαίνει σε συγκεκριμένα σημεία στο χρόνο, ενώ στα στοχαστικά μπορεί να συμβεί οποτεδήποτε, ο πιο ακριβής τρόπος να συγκρίνουμε τα τρία μοντέλα με το ντετερμινιστικό δεν είναι να συγκρίνουμε τους απόλυτους αριθμούς των κυττάρων, αλλά τις βέλτιστες καμπύλες που περιγράφουν τη μεταβολή του αριθμού των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο. Συγκρίνοντας τις εξισώσεις 11, 12, 13 και 14, προκύπτει ότι από τα τρία μοντέλα, αυτό που δίνει το κοντινότερο αποτέλεσμα στο ντετερμινιστικό είναι το Μοντέλο Γ, δηλαδή το νέο μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμού.

## 4.2 Μακροσκοπικό Μοντέλο

Για τη μελέτη του μακροσκοπικού μοντέλου, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός προγράμματος που να επιλύει τη μερική διαφορική εξίσωση στην οποία στηρίζεται. Η μερική διαφορική εξίσωση (PDE) είναι η εξής:

$$\frac{\partial y}{\partial t} + \frac{\partial(\mu \times x \times y)}{\partial x} = D \times \frac{\partial^2 y}{\partial x^2} + \left[ \frac{B}{N} \right] - y \times \mu \times x_{in} \times y_{in} \quad (9)$$

,όπου το  $\left[ \frac{B}{N} \right]$  παίρνει τιμές:

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = +2 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 8 \text{ pixels})$$

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = -1 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 16 \text{ pixels})$$

$$\left[ \frac{B}{N} \right] = 0 \quad (8 < x < 16 \text{ pixels})$$

, ενώ  $\mu=0.0085 \text{ min}^{-1}$  και  $D= \frac{\sigma^2}{2} = 0.0078125$ , όπου  $\sigma=0.125$ , η διασπορά του στοχαστικού μοντέλου A, του οποίου είναι παραπλήσιο στο μακροσκοπικό μοντέλο, και στόχος είναι η σύγκριση μεταξύ τους. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των δύο μοντέλων είναι ότι το μακροσκοπικό περιγράφει μόνο την εκθετική φάση ανάπτυξης του κυττάρου και όχι και τη λανθάνουσα. Γι' αυτό, θα συγκριθεί με το μοντέλο A, αλλά χωρίς τη λανθάνουσα φάση, δηλαδή με ένα μικροσκοπικό μοντέλο που περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times x(t)) + \xi(t) \quad (8)$$

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την επίλυση του μικροσκοπικού μοντέλου που θα συγκριθεί με το μακροσκοπικό παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 10: Δεδομένα του στοχαστικού μοντέλου που συγκρίνεται με το μακροσκοπικό

Σταθερά	Τιμή
$\mu$	0.0085 ( $\text{min}^{-1}$ )
$\chi_0$	8 (pixels)
$\chi_{\max}$	16 (pixels)
$\lambda$	40 (min)
$\xi$	$0 \pm 0.625$ (κανονική κατανομή)

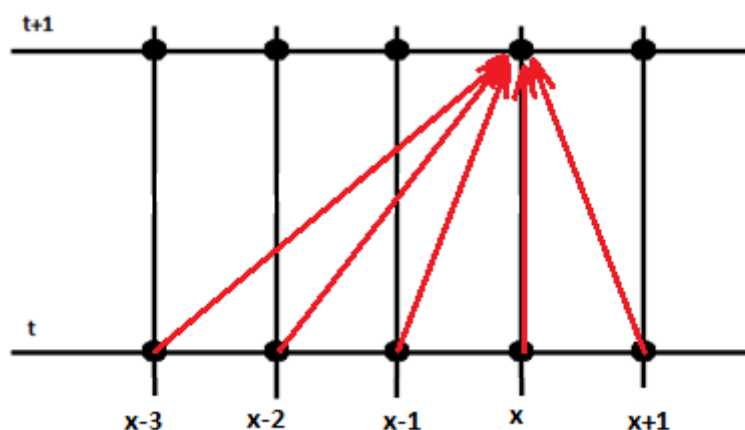
Τα δεδομένα αυτά έχουν εξαχθεί από δημοσιεύσεις των Baranyi, Kutalik και Razaz [12,13], εκτός από την τυπική απόκλιση της στοχαστικής μεταβλητής  $\xi$ , στην οποία δόθηκε μία λογική τιμή με βάση αντίστοιχες τιμές που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία [13]. Θεωρείται επίσης ότι κάθε μητρικό κύτταρο γεννά δύο θυγατρικά και ότι κάθε ένα από αυτά έχει το 50% του μήκους του μητρικού κατά τη στιγμή της διχοτόμησης.

Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι αυτή τη φορά το  $\chi_0$  είναι 8 pixels και όχι 6.4, όπως ήταν στα υπόλοιπα μικροσκοπικά μοντέλα. Αυτό συμβαίνει γιατί το μακροσκοπικό μοντέλο θεωρεί ελάχιστο μέγεθος για το κύτταρο τα 8 pixels, που είναι το ελάχιστο μέγεθος που εμφανίζει ο μικροοργανισμός κατά την εκθετική φάση, άρα και το μικροσκοπικό έπρεπε να έχει το ίδιο ελάχιστο μέγεθος.

Για τη επίλυση αυτών του συγκριτικού μοντέλου γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Fortran 95. Η επίλυση της διαφορικής εξίσωσης πραγματοποιείται με την μέθοδο Runge Kutta 4<sup>ου</sup> βαθμού, την πιο ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδο επίλυσης διαφορικών εξισώσεων, στην οποία η λύση της εξίσωσης στο επόμενο χρονικό σημείο, προσεγγίζεται από τη λύση της εξίσωσης στο αμέσως προηγούμενο, με την προσθήκη ενός σταθμισμένου μέσου όρου τεσσάρων βημάτων επίλυσης. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι ικανοποιητική για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος.

Για τη επίλυση αυτών του μακροσκοπικού μοντέλου γράφηκε πρόγραμμα σε κώδικα Matlab. Η επίλυση της μερικής διαφορικής εξίσωσης πραγματοποιείται με την μέθοδο των πεπερασμένων διαφορών, μία ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδο επίλυσης μερικών διαφορικών εξισώσεων, στην οποία η λύση της εξίσωσης στο

επόμενο χρονικό σημείο για ένα σημείο στο χώρο, προσεγγίζεται από τη λύση της εξίσωσης στο αμέσως προηγούμενο σημείο στο χρόνο, αλλά επηρεάζεται παράλληλα από τις τιμές των κοντινών σημείων στο χώρο. Συγκεκριμένα, λόγω της μεγάλης δυσκολίας επίλυσης της συγκεκριμένης διαφορικής εξίσωσης, τα κοντινά σημεία στο χώρο που επηρεάζουν την λύση της εξίσωσης είναι 4, ενώ συνήθως είναι μόνο 2. Μία σχηματική αναπαράσταση για καλύτερη κατανόηση της μεθόδου εμφανίζεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 27: Μέθοδος πεπερασμένων διαφορών με κατάντη (ή εμπρός) διαφορές 4 σημείων στο χώρο

Η ακρίβεια της μεθόδου είναι η βέλτιστη για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος, με βάση τις μεθόδους που προτείνονται από τη βιβλιογραφία για αντίστοιχα προβλήματα [18].

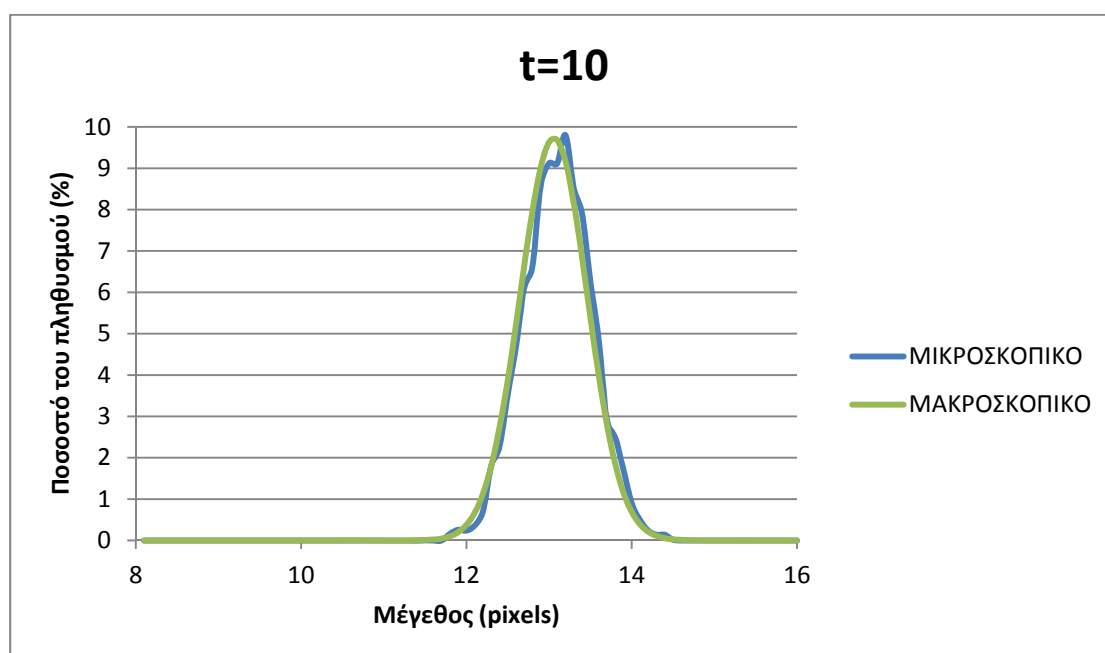
Το μακροσκοπικό μοντέλο θεωρεί την περιοχή μεταξύ 8 και 16 pixels χωρισμένη σε 81 σημεία, δηλαδή σε 80 υποπεριοχές, μεταξύ των οποίων επιλύεται, με στόχο να δίνει πιο ακριβή αποτελέσματα. Για να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των μοντέλων λοιπόν, η στατιστική επεξεργασία του μικροσκοπικού μοντέλου γίνεται επίσης σε 80 περιοχές, αντί για 10 που είχε γίνει προτύτερα για τα υπόλοιπα μικροσκοπικά μοντέλα. Για τον ίδιο λόγο, στο μικροσκοπικό μοντέλο θεωρείται ότι ο αρχικός πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι 5000, έτσι ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα δύο μοντέλα για μικρούς χρόνους με ικανοποιητική ακρίβεια, ενώ δεν έχει σημασία το μέγεθος του πληθυσμού, αφού συγκρίνονται τα αποτελέσματα σε ποσοστά του πληθυσμού.

Τα σημεία στα οποία θα συγκριθούν τα δύο μοντέλα είναι τα εξής:

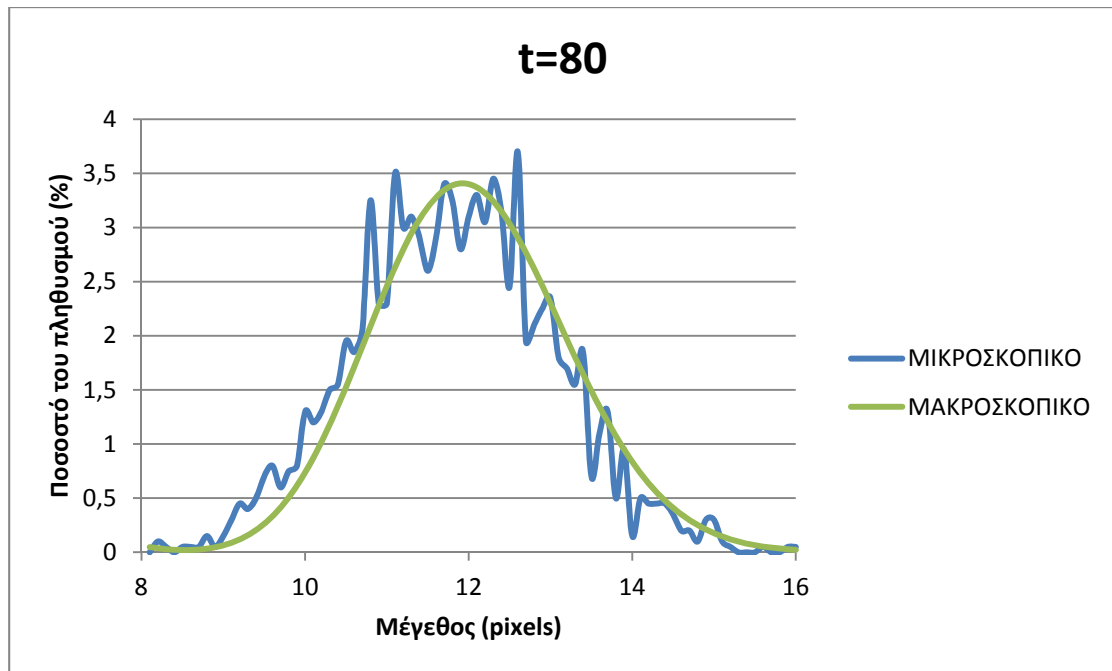
- Αν μεταβάλλεται η κατανομή τους σε συνάρτηση με το χρόνο με τον ίδιο τρόπο
- Αν οδηγούνται στην ίδια μόνιμη κατάσταση

Αν οι παραπάνω προϋποθέσεις ισχύουν, τότε τα μοντέλα θεωρούνται ισοδύναμα, και άρα η ανάπτυξη του μακροσκοπικού μοντέλου ήταν επιτυχής.

Την πρώτη προϋπόθεση, δηλαδή η κατανομή και των δύο μοντέλων σε συνάρτηση με το χρόνο να μεταβάλλεται με τον ίδιο τρόπο, την καλύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα:



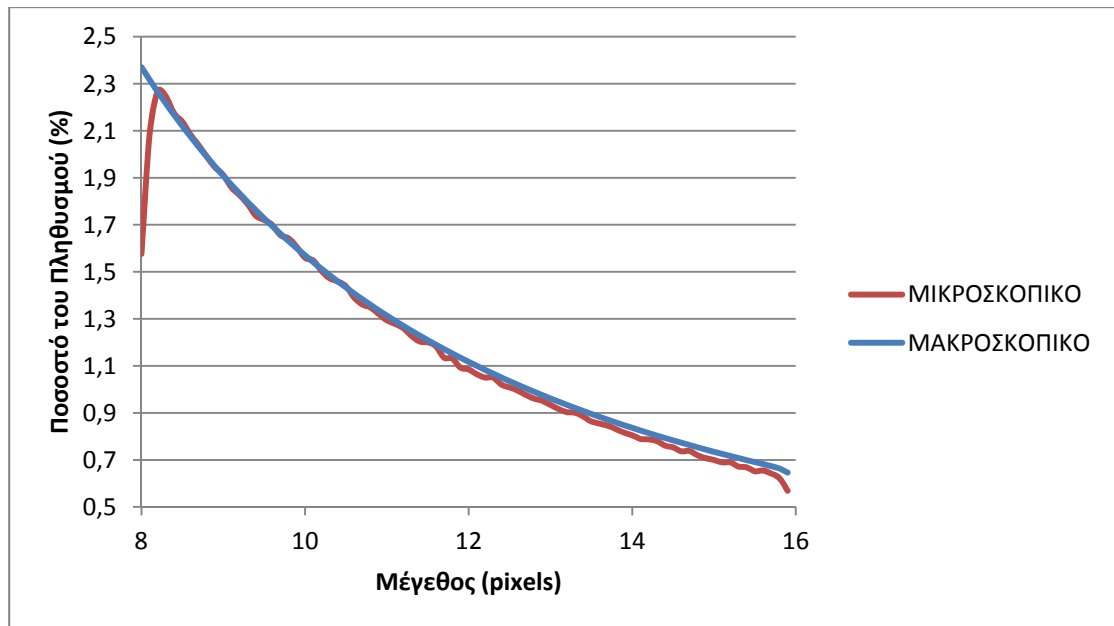
Εικόνα 28: Σύγκριση των δύο μοντέλων για t=10 min



Εικόνα 29: Σύγκριση των δύο μοντέλων για  $t=80$  min

Στις εικόνες 28 και 29 φαίνεται ότι η κατανομή του πληθυσμού μετακινείται με τον ίδιο τρόπο, και ως προς τη θέση της καμπύλης και ως προς το μέγεθος των ποσοστών. Οι διαφορές που εμφανίζουν οι δύο καμπύλες στηρίζονται στο γεγονός ότι το μακροσκοπικό μοντέλο είναι ανεξάρτητο του μεγέθους του πληθυσμού, άρα είναι σαν να λαμβάνονται τιμές από άπειρα κύτταρα, ενώ στην περίπτωση του μικροσκοπικού μοντέλου, τα κύτταρα είναι περίπου 10000 στα 80 min, που δεν είναι αρκετά για να δοθεί μία καθαρή εικόνα της καμπύλης, αν και ακόμα και να ήταν, σίγουρα δεν θα μπορούσε να συγκριθεί με το κατά πολύ ακριβέστερο αποτέλεσμα της μερικής διαφορικής εξίσωσης.

Τη δεύτερη προϋπόθεση, δηλαδή το αν τα δύο μοντέλα οδηγούνται στην ίδια μόνιμη κατάσταση, την καλύπτει το ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 30: Σύγκριση των δύο μοντέλων για μόνιμη κατάσταση

Στην εικόνα 30 φαίνεται ότι και η καμπύλη για το μικροσκοπικό μοντέλο, και η καμπύλη για το μακροσκοπικό, έχουν οδηγηθεί στην ίδια μόνιμη κατάσταση, με κάποιες μικρές αποκλίσεις. Οι αποκλίσεις αυτές οφείλονται στο γεγονός ότι τα όρια στα άκρα του πεδίου θεωρούνται, ως βασική προϋπόθεση, κλειστά για το μακροσκοπικό μοντέλο, ενώ στο μικροσκοπικό η προσθήκη της στοχαστικής μεταβλητής οδηγεί ορισμένα κύτταρα και σε μεγέθη ελάχιστα μικρότερα των 8 και αντίστοιχα ελάχιστα μεγαλύτερα των 16 pixels, και γι αυτό αλλοιώνεται η μορφή της καμπύλης.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Προτάθηκε ένα νέο στοχαστικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμού, το οποίο στηρίχθηκε στο ντετερμινιστικό μοντέλο των Baranyi και Kutalik, που είναι ένα εδραιωμένο μοντέλο στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων. Το μοντέλο αυτό αντιμετωπίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε μικροσκοπικό επίπεδο. Από θεωρητικής άποψης, το νέο στοχαστικό μοντέλο θα έπρεπε να δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα, καθώς λαμβάνει υπ' όψιν δύο ακόμα παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, που είναι το μέγιστο μέγεθος διχοτόμησης, και το ποσοστό του μητρικού κυττάρου που παίρνει το κάθε θυγατρικό.

Πραγματοποιήθηκε η σύγκριση του νέου μικροσκοπικού μοντέλου με τα ήδη υπάρχοντα μικροσκοπικά μοντέλα, καθώς και με το αρχικό ντετερμινιστικό, ως προς το συνολικό μέγεθος του πληθυσμού μικροοργανισμών και ως προς την κατανομή του πληθυσμού μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το μέγεθος του κυττάρου, σε σταθερή κατάσταση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το νέο μοντέλο ανάπτυξης είναι πιο κοντινό στο ντετερμινιστικό από τα προϋπάρχοντα στοχαστικά μοντέλα.

Όμως, για να μπορέσει να δώσει το νέο μικροσκοπικό μοντέλο αποτελέσματα τα οποία να ανταποκρίνονται καλύτερα στην πραγματικότητα, θα πρέπει μελλοντικά να πραγματοποιηθεί στατιστική επεξεργασία των δεδομένων για τους δύο επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και αναλύθηκαν πρωτίτερα, για να προκύψουν οι κατανομές που τα περιγράφουν καλύτερα. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, οι δύο παράγοντες αυτοί επηρεάζουν σημαντικά το συνολικό μέγεθος του πληθυσμού σε συνάρτηση με το χρόνο, άρα κακώς δεν λαμβάνονταν υπ' όψιν στα προϋπάρχοντα στοχαστικά μοντέλα.

Αντίστοιχα, προτάθηκε ένα μακροσκοπικό μοντέλο ανάπτυξης μικροοργανισμών, στηριζόμενο στο ντετερμινιστικό μοντέλο των Baranyi και Kutalik, μία ενέργεια που δεν είχε πραγματοποιηθεί από κάποιον πρωτίτερα. Το μοντέλο αυτό περιγράφει την κατανομή του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το μέγεθος του κυττάρου σε συνάρτηση με το χρόνο. Σε θεωρητικό επίπεδο, το μακροσκοπικό

μοντέλο εμφανίζει μικρότερη ακρίβεια από το μικροσκοπικό, αλλά απαιτεί αντίστοιχα δέκα φορές μικρότερο χρόνο επίλυσης, άρα καθίσταται χρήσιμο στη βιομηχανία, για τον έλεγχο της αλλοίωσης των τροφίμων.

Πραγματοποιήθηκε η σύγκριση του νέου μακροσκοπικού μοντέλου με το αντίστοιχο μικροσκοπικό, ως προς τη μεταβολή της κατανομής του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το μέγεθος του κυττάρου με το πέρας του χρόνου, αλλά και σε σταθερή κατάσταση. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, το νέο μακροσκοπικό μοντέλο που προτάθηκε εμφανίζει μικρές, αλλά δικαιολογημένες αποκλίσεις από το αντίστοιχο μικροσκοπικό. Άρα η εξαγωγή του μοντέλου από το αντίστοιχο των Baranyi και Kutalik ήταν επιτυχής.

Όμως, για να μπορέσει να δώσει το νέο μακροσκοπικό μοντέλο αποτελέσματα τα οποία να ανταποκρίνονται καλύτερα στην πραγματικότητα, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες μετατροπές στην μερική διαφορική εξίσωση, έτσι ώστε το μοντέλο να λαμβάνει υπ' όψιν του και τη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, καθώς στηριζόμενο μόνο στην εκθετική, θα οδηγεί σε υπερεκτιμήσεις για το μέγεθος του πληθυσμού.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κ. Τζιά, Π. Ταούκης, Β. Ωραιοπούλου, *ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΡΕΟΛΟΓΙΑ-ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ- ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ*, Ε. Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα 2010
2. Baranyi J., Roberts, 1994, *Mathematics of predictive food microbiology*, International Journal of Food Microbiology 26. 199-218
3. Baranyi J., Roberts, 1994, *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*, International Journal of Food Microbiology 23. 277-294
4. Baranyi J., 1998, *Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag*, J. Theor. Biol. 192. 403-408
5. Baranyi J., George S.M., Kotalik Z., 2009, *Parameter estimation for the distribution of single cell lag times*, J. Theor. Biol. 259. 24-30
6. Basse B., Wake G.C., Walls D.J.N. (2004), *On a cell-growth model for plankton*. Mathematical Medicine and Biology. 21 49-61
7. Baty F., 2004, *Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?*, International Journal of Food Microbiology 91 (2004) 261– 277
8. Binder B.J., Landman K.A., 2009, *Exclusion processes on a growing domain*, J. Theor. Biol. 259: 541-5
9. Brunt B., Wake G.C., 2011, *A Mellin transform solution to a second order pantograph equation with linear dispersion arising in a cell growth model*, Euro. J. of Appl. Math. 220. 151-168
10. Francois K., Devlieghere F., Uyttendaele M., Standaert A.R., Geeraerd A.H., Nadal P., Van Impe J.F., Debevere J., 2006, *Single cell variability of L. monocytogenes grown on liver paté and cooked ham at 7°C: comparing challenge test data to predictive simulations*, J. Appl. Microb. 100: 800-812
11. Geysen S., Escalona V.H., Verlinden B.E., Aertsen A., Geeraerd A.H., Michiels C.W., Van Impe J.F., Nicolai B.M., 2006, *Validation of predictive growth models describing superatmospheric oxygen effects on Pseudomonas fluorescens and Listeria innocua on fresh-cut lettuce*, Int. J. Food Microb. 111: 48-58

12. Kotalik Z., Razaz M., Baranyi J., *Stochastic modelling of individual cell growth using flow chamber microscopy images*, 2005a, *Int. J. Food Microb.* 105. 177-190
13. Kotalik Z., Razaz M., Baranyi J., *Supplementary mathematical proof and experimental results*, 2005b, <http://www.cmp.uea.ac.uk>.
14. Membre JM., Leporq B., Vialette M., Mettler E., Perrier L., Thuault D., Zwietering M., 2005, *Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food*, *Int. J. Food Microb.* 100: 179-186
15. Pin C., Baranyi J., 2006, *Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process*, *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2163–2169
16. Poschet F., Geeraerd A.H., Scheerlinck N., Nicolai B.M., Van Impe J.F., 2003, *Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology*, *Food Microbiol.* 20, 285-295
17. Press W.H., *Numerical Recipes*, p. 199.
18. Schiesser W. E., *The Numerical Method Of Lines*, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1991, p. 97-145

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζεται η μετατροπή των εξισώσεων (2) και (3) στην εξίσωση (4) του κειμένου:

$$\frac{dq}{dt} = v \times q(t) \quad (2)$$

$$a(t) = \frac{q(t)}{1 + q(t)} \quad (3) \leftrightarrow q(t) = \frac{\alpha(t)}{1 - \alpha(t)}$$

$$\rightarrow 1 + q(t) = \frac{1}{1 - \alpha(t)} \leftrightarrow 1 - \alpha(t) = \frac{1}{1 + q(t)} \quad (10)$$

$$\frac{da}{dt} = \frac{\theta a}{\theta q} \times \frac{\theta q}{\theta t} = \frac{\theta}{\theta q} \left( \frac{q(t)}{1 + q(t)} \right) \times v \times q(t)$$

$$\rightarrow \frac{da}{dt} = \frac{v \times q(t)}{(1 + q(t))^2} = v \times \frac{q(t)}{(1 + q(t))} \times \frac{1}{(1 + q(t))}$$

Από (3),(10) έχω:

$$\frac{da}{dt} = v \times \alpha(t) \times (1 - \alpha(t))$$

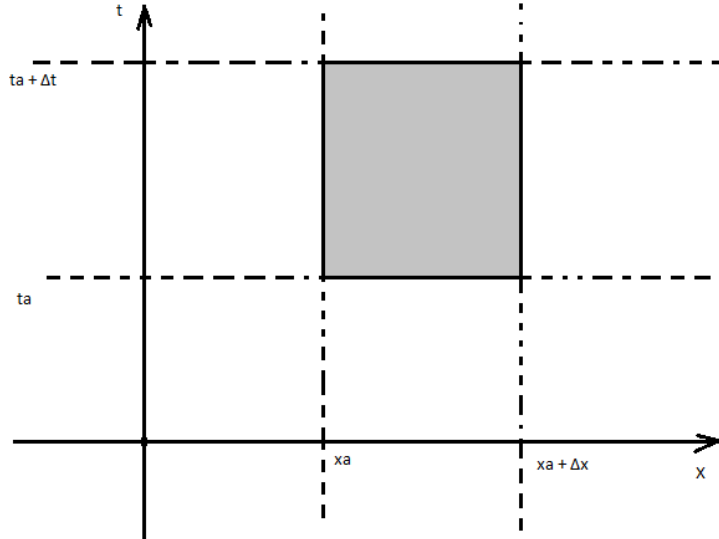
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζεται η απόδειξη της εξίσωσης (9) του κειμένου:

Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο στηρίζεται στην αρχική εξίσωση των Baranyi και Kuttalics, με τη διαφορά όμως ότι σε αυτό το μοντέλο θεωρείται ότι όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε εκθετική φάση, δηλαδή δεν λαμβάνεται υπ' όψιν η λανθάνουσα φάση του μικροοργανισμού, άρα ο όρος  $\alpha(t)$  είναι ίσος με τη μονάδα, δηλαδή:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \times x(t)) [= V(x, t) \text{ στην απόδειξη}] + \xi(t) \quad (8)$$

Ας θεωρήσουμε έναν δισδιάστατο χώρο όπου ο άξονας  $x$  αντιπροσωπεύει το μέγεθος του μικροοργανισμού και ο άξονας  $t$  αντιπροσωπεύει το χρόνο, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Εικόνα 1: Χώρος ολοκλήρωσης της μεταβολής του μεγέθους ενός πληθυσμού κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο

Ολοκληρώνοντας τη ροή στον γκριζο χώρο που εμφανίζεται στην εικόνα 1, δηλαδή το χώρο που ορίζεται από μία μεταβολή  $\Delta x$  στον άξονα των  $x$  και  $\Delta t$  στο άξονα του χρόνου, και με βάση την εξίσωση 8, καθώς και την παραδοχή ότι το μέγεθος ενός κυττάρου δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερο των 16 pixels και αντίστοιχα δεν μπορεί να είναι μικρότερο των 8 pixels, προκύπτει η ακόλουθη εξίσωση:

$$\begin{aligned} \Delta x \times [n(x, t + \Delta t) - n(x, t)] \\ = V(x, t) \times n(x, t) \times \Delta t - V(x + \Delta x, t) \times n(x + \Delta x, t) \times \Delta t + B(t) \\ \times \Delta x \times \Delta t + D \times \frac{\partial^2 n(x, t)}{\partial x^2} \times \Delta x \times \Delta t \end{aligned} \quad (11)$$

,όπου  $B$  ο όρος που αντιστοιχεί στη γέννηση των κυττάρων και θα αναλυθεί στη συνέχεια,  $n$  ο πληθυσμός των κυττάρων με συγκεκριμένο μέγεθος, και  $D \times \frac{\partial^2 n}{\partial x^2}$  ο όρος διάχυσης που αντιστοιχεί στο στοχαστικό όρο της εξίσωσης 8, και ισχύουν:

$$\begin{aligned} V(x + \Delta x, t) \times n(x + \Delta x, t) \times \Delta t \\ = V(x, t) \times n(x, t) \times \Delta t + \frac{\partial [V(x, t) \times n(x, t)]}{\partial x} \times \Delta x \end{aligned} \quad (12)$$

$$n(x, t + \Delta t) = n(x, t) + \frac{\partial [n(x, t)]}{\partial t} \times \Delta t \quad (13)$$

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις 12 και 13 στην εξίσωση 11 προκύπτει:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial[V(x,t) \times n(x,t)]}{\partial x} = B(t) + D \times \frac{\partial^2[n(x,t)]}{\partial x^2} \quad (14)$$

Ο συνολικός πληθυσμός των κυττάρων είναι:

$$N(t) = \frac{n(x,t)}{y(x,t)} \rightarrow n(x,t) = N(t) \times y(x,t)$$

,όπου  $y(x,t)$  το ποσοστό του πληθυσμού που έχει συγκεκριμένο μέγεθος σε συγκεκριμένο χρόνο. Αντικαθιστώντας στην εξίσωση 14 παίρνουμε:

$$\begin{aligned} \frac{\partial[N(t) \times y(x,t)]}{\partial t} + \frac{\partial[V(x,t) \times N(t) \times y(x,t)]}{\partial x} &= B(t) + D \times \frac{\partial^2[N(t) \times y(x,t)]}{\partial x^2} \\ \rightarrow N(t) \times \frac{\partial y(x,t)}{\partial t} + y(x,t) \times \frac{\partial N(t)}{\partial t} + N(t) \times \frac{\partial[V(x,t) \times y(x,t)]}{\partial x} \\ &= D \times N(t) \times \frac{\partial^2[y(x,t)]}{\partial x^2} + B(t) \\ \rightarrow \frac{\partial y(x,t)}{\partial t} + y(x,t) \times \frac{1}{N(t)} \times \frac{\partial N(t)}{\partial t} + \frac{\partial[V(x,t) \times y(x,t)]}{\partial x} \\ &= D \times \frac{\partial^2[y(x,t)]}{\partial x^2} + \left[\frac{B}{N}\right](t) \end{aligned} \quad (15)$$

Εξ' ορισμού, ισχύει ότι η μεταβολή στον πληθυσμό των κυττάρων, ισούται με τη ροή στο αριστερό όριο του πεδίου, δηλαδή με τη ροή των κυττάρων στα 8 pixels, δηλαδή:

$$\frac{\partial N(t)}{\partial t} = \mu \times x_{in} \times n_{in} \rightarrow \frac{1}{N(t)} \times \frac{\partial N(t)}{\partial t} = \mu \times x_{in} \times y_{in}$$

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση 15 παίρνουμε την τελική εξίσωση, δηλαδή:

$$\frac{\partial y}{\partial t} + \frac{\partial(\mu \times x \times y)}{\partial x} = D \times \frac{\partial^2 y}{\partial x^2} + \left[\frac{B}{N}\right] - y \times \mu \times x_{in} \times y_{in} \quad (9)$$

Ο πίνακας  $\left[\frac{B}{N}\right]$  περιγράφει την γέννηση των κυττάρων, το οποίο σε αντιστοιχία με τη μερική διαφορική εξίσωση σημαίνει ότι η ροή εισόδου στο αριστερό άκρο του πεδίου, δηλαδή τα 8 pixels, είναι διπλάσια και αντίθετη της ροής εξόδου στο δεξιό

άκρο του πεδίου, δηλαδή τα 16 pixels, άρα προκύπτει ότι ο πίνακας  $\begin{bmatrix} B \\ N \end{bmatrix}$  παίρνει τιμές:

$$\begin{bmatrix} B \\ N \end{bmatrix} = +2 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 8 \text{ pixels})$$

$$\begin{bmatrix} B \\ N \end{bmatrix} = -1 \times \mu \times x_{out} \times y_{out} \quad (x = 16 \text{ pixels})$$

$$\begin{bmatrix} B \\ N \end{bmatrix} = 0 \quad (8 < x < 16 \text{ pixels})$$

,όπου και  $x_{out}$ ,  $y_{out}$  ονομάζονται το μέγεθος κάθε κυττάρου αμέσως πριν το διπλασιασμό, δηλαδή 16 pixels, και το ποσοστό του πληθυσμού που έχει αυτό το μέγεθος αντίστοιχα.