

LOG-KONKAVNI KARAKTER MIKROBNE RASTNE KRIVULJE BREZ LAG-FAZE

Anton CEDILNIK^{a)} in Eva C. GORUP^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Večna pot 83, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, izr. prof., dr.,
e-pošta: anton.cedilnik@uni-lj.si.

^{b)} Klinični center Ljubljana, Zaloška 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: eva.gorup@email.si.

Delo je prispelo 15. februarja 2003, sprejeto 10. novembra 2003.

Received February 15, 2003, accepted November 10, 2003.

IZVLEČEK

Minotov zakon, po katerem je relativna stopnja rasti padajoča na vsem območju, kjer je mikrobnna rastna krivulja naraščajoča, razširimo še na območje, kjer opazovana kultura umira. Pokažemo, da je rastna krivulja, za katero velja ta zakon, logaritmično konkavna in da ima zato vselej obliko $N(t) = N(a) \cdot \exp\left(\int_a^t R(x)dx\right)$, kjer je $R(t)$ padajoča funkcija. Konec lag-faze definiramo kot začetek logaritmične konkavnosti rastne krivulje. V nadaljevanju naštejemo ostale splošne lastnosti takih rastnih krivulj, utemeljimo osnovni princip aproksimacije konkretnih podatkov in predlagamo preprost model.

Ključne besede: mikrobnna rast / zaprt sistem / rastna krivulja / log-konkavnost / lag-faza / aproksimacija / model rasti

LOG-CONCAVE CHARACTER OF MICROBIAL GROWTH FUNCTION WITHOUT LAG PHASE

ABSTRACT

Minot's law, that the relative growth rate is decreasing everywhere on the domain of increasing microbial growth function, we extend also to the domain where the observed culture decays. We show that the growth function which fulfils this law is logarithmically concave and is always of the form $N(t) = N(a) \cdot \exp\left(\int_a^t R(x)dx\right)$ where $R(t)$ is a decreasing function. The end of lag phase is defined as the beginning of log-concavity of growth function. We describe other general mathematical characteristics of such growth functions and derive the basic principle of approximation of concrete data. At the end we suggest a simple model as an example.

Key words: microbial growth / batch culture / growth function / log-concave / lag phase / approximation / growth model

UVOD

V tem sestavku je *zaprta kultura* taka kultura prilagojenih mikroorganizmov, ki je od časa z (začetka opazovanja) dalje izolirana od okolice (torej ni izmenjave snovi in energije z okolico), ima konstantno prostornino, njena sestava pa se spreminja le pod vplivom mikrobov v njej.

Mikrobi imajo v zaprti kulturi poleg omejene prostornine, ki že vnaprej preprečuje razmnoževanje preko vseh mej, tri omejujoče dejavnike:

- količina hrane se zmanjšuje ali se vsaj ne povečuje,
- strupeni metaboliti zmanjšujejo vitalnost mikrobov,
- celice so podvržene genetskimi napakam in staranju.

Vpliv vseh treh dejavnikov se s časom kvečjemu krepi. Njihov učinek na rast števila ali skupne mase celic se v splošnem le povečuje. Sklepamo torej, da postaja okolje od konca lag-faze dalje vse manj ugodno za življenje v njem.

Recimo, da v nekem trenutku t_1 število ali skupna masa mikrobov – označimo to količino z $N(t)$ – še narašča. Če je poprečni generacijski čas celic γ , bi pri konstantnih pogojih od t_1 dalje potekala rast po eksponentnem zakonu, ki pri cepljivkah zgleda takole:

$$\tilde{N}(t) = N(t_1) \cdot 2^{(t-t_1)/\gamma} = \alpha \cdot e^{\beta t}, \quad [1]$$

kjer je $\alpha = N(t_1) \cdot 2^{-t_1/\gamma}$, $\beta = \ln(2)/\gamma > 0$. Resnica pa je zaradi zaviralnih dejavnikov taka, da samo kratek čas funkcija $N(t)$ raste približno tako kot $\tilde{N}(t)$, dejansko pa vse bolj in bolj zaostaja za njo. To pomeni, da veljajo naslednje tri trditve:

$$\begin{aligned} N(t_1) &= \tilde{N}(t_1), \\ N'_+(t_1) &= \tilde{N}'_+(t_1), \\ t > t_1 &\Rightarrow N(t) \leq \tilde{N}(t). \end{aligned} \quad [2]$$

Pri tem naj simbol $f'_+(x)$ označuje desni odvod funkcije $f(x)$ v točki x .

Če se število mikrobov že zmanjšuje, pa lahko, kot kažejo poskusi (Pirt, 1975; Whiting in Cygnarowicz, 1992), pojav obravnavamo podobno kot radioaktivni razpad: verjetnost, da bo na slepo izbrani osebek umrl, je konstantna, če se okoljski pogoji ne spreminjajo. Število mikrobov se potemtakem manjša eksponentno:

$$\tilde{N}(t) = N(t_2) \cdot e^{-k(t-t_2)} = \alpha \cdot e^{\beta t}, \quad [3]$$

kjer je t_2 čas začetka opazovanja in $k > 0$ primeren parameter; $\alpha = N(t_2) \cdot e^{kt_2}$, $\beta = -k < 0$. Ker pa se pogoji v splošnem tudi v tej fazi še vedno slabšajo, spet veljajo zahteve [2] (s t_2 namesto t_1). Seveda pa je tak zaključek pravilen le do tedaj, ko začnejo mikrobi prehajati v latentno obliko; latentnih osebkov ne smemo več imeti za del populacije, saj ne interagirajo z okolico.

Ugovor zoper to razmišljanje je, da se delež hrane na posamezni organizem z zmanjševanjem števila osebkov povečuje. Pri sistemih z osebki, ki si sami iščejo hrano, je ta ugovor na mestu. Pri mikroorganizmih ali pri pritrjenih življenjskih oblikah pa je važna le koncentracija hranil in ta se ne povečuje.

Pri zaprtem sistemu mikroorganizmov torej lahko naredimo naslednji zaključek:

(M) Naj se rastna krivulja mikroorganizmov $N = N(t)$ v točki t_0 z desne dotika neke eksponentne krivulje: $N(t_0) = \alpha \cdot \exp(\beta t_0)$, $N'_+(t_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta t_0)$. Potem velja sklep:
 $t \geq t_0 \Rightarrow N(t) \leq \alpha \cdot \exp(\beta t)$.

Postulat (M) je, kot bomo pokazali, razširitev **Minotovega zakona** (Charles Minot, ameriški anatom: »The relative growth rate is always decreasing.«, (Medawar in Medawar, 1983; Zeide, 1993) na zaprt sistem od konca lag-faze naprej, torej tudi na fazo umiranja kulture. S tem bomo

postavili splošno definicijo mikrobne rastne krivulje in, posledično, bolj utemeljeno definicijo konca lag-faze. Cilj sestavka je predvsem pokazati, kaj je možno sklepati in izvajati zgolj iz matematične oblike Minotovega zakona, brez sklicevanja na dodatna mikrobiološka dejstva. Razume pa se, da zaključki veljajo le za tako velike sisteme, da je zanje zvezni opis bistveno bolj smiseln kot pa bi bil diskretni.

DEFINICIJA MIKROBNE RASTNE KRIVULJE

Funkcija $f(x)$ je na intervalu $I \subset \mathbf{R}$ **logaritmično konkavna** (krajše **log-konkavna**), če je tam strogo pozitivna in je njen logaritem $\ln f(x)$ konkavna funkcija. V pomožnem izreku v Dodatku bomo pokazali, da je pogoj (M) ekvivalenten ravno log-konkavnosti rastne krivulje, da je ocena $N(t) \leq \alpha \cdot \exp(\beta t)$ v (M) veljavna tudi za $t < t_0$, poleg tega pa je $N(t)$ zvezna funkcija na danem intervalu $I = [a, b)$. Zveznost je treba omeniti seveda le zaradi krajišča a , saj sicer že sledi iz log-konkavnosti. Potem sklepamo (Roberts in Varberg, 1973), da je

$$\ln N(t) = \ln N(a) + \int_a^t \frac{N'_+(x)}{N(x)} dx.$$

Desni odvod $N'_+(t)/N(t)$ konkavne funkcije $\ln N(t)$ je padajoča funkcija in v točkah njene nezveznosti smemo zato privzeti, da je z desne zvezna.

Povzemimo povedano v naslednji definiciji.

DEFINICIJA 1. Dan naj bo časovni interval $I = [a, b)$ ($a < b \leq \infty$). Krivulja $N = N(t)$ ($t \in I$) je **mikrobna rastna krivulja po lag-fazi**, če je

$$N(t) = N(a) \cdot \exp\left(\int_a^t R(x) dx\right), \quad [4]$$

kjer je $N(a) > 0$ in $R(t)$ na I padajoča z desne zvezna funkcija. $N(a)$ je **začetna vrednost**, $R(t)$ je **relativna hitrost rasti** in produkt $P(t) = N(t) \cdot R(t)$ je **tekoči prirastek**. Družino vseh mikrobnih rastnih krivulj [4] na intervalu I pa bomo označevali z $\text{MGC}[a, b)$.

Integral v [4] je seveda kar Riemannov, ker je integrand monotona funkcija.

V naslednjem izreku bomo nanizali tiste lastnosti krivulje [4], ki sledijo bolj ali manj neposredno iz definicije. Simbola $f(x_0 \leftarrow)$ in $f(\rightarrow x_0)$ naj pomenita desno oz. levo limito funkcije $f(x)$ v točki x_0 .

IZREK 2. Naj bojo I , $N(t)$, $R(t)$ in $P(t)$ kot v Definiciji 1 in še $I^0 = (a, b)$.

$$(i) \quad \forall t \in I^0: \left[R(t) = R(t \leftarrow) \leq R(\rightarrow t) \wedge P(t) = P(t \leftarrow) \leq P(\rightarrow t) \right]$$

$$R(a) = R(a \leftarrow), \quad P(a) = P(a \leftarrow).$$

(ii) Za $a \leq t_1 \leq t_2 < b$ je

$$\frac{N(t_2)}{N(t_1)} = \exp(r(t_2 - t_1)),$$

pri čemer je $R(\rightarrow t_2) \leq r \leq R(t_1)$.

- (iii) $N(t)$ je zvezna funkcija na I^0 in v točki a je še zvezna z desne.
 (iv) Na poljubnem intervalu $[c, d] \subset I$ je $N(t)$
 – Lipschitzova,
 – absolutno zvezna,
 – enakomerno zvezna,
 – z omejeno totalno variacijo.
 (v) Za poljuben $c \in I^0$ in za tak r , da je $R(c) \leq r \leq R(\rightarrow c)$, velja za vsak $t \in I$ ocena

$$N(t) \leq N(c) \cdot \exp(r(t - c)). \quad [5]$$

Dodatno še velja za vsak $t \in I$:

$$N(t) \leq N(a) \cdot \exp(R(a)(t - a)).$$

- (vi) Za poljubne $t_1, t_2 \in I$ in $\varepsilon \in [0, 1]$ je:

$$N(\varepsilon t_1 + (1 - \varepsilon)t_2) \geq N(t_1)^\varepsilon N(t_2)^{1 - \varepsilon};$$

v posebnem je:

$$N\left(\frac{1}{2}(t_1 + t_2)\right) \geq \sqrt{N(t_1)N(t_2)}.$$

- (vii) Za vsak $t \in I$ obstaja desni odvod

$$N'_+(t) = N(t)R(t) = P(t); \quad [6]$$

za vsak $t \in I^0$ obstaja levi odvod

$$N'_-(t) = N(t)R(\rightarrow t) = P(\rightarrow t). \quad [7]$$

- (viii) [Množica točk nezveznosti funkcije $R(t)$] = [Množica točk nezveznosti funkcije $P(t)$]
 = [Množica točk neodvedljivosti funkcije $N(t)$]

Ta množica je števna. Povsod drugod je $N(t)$ zvezno odvedljiva in velja:

$$N'(t) = P(t).$$

- (ix) Na poljubnem podintervalu $[c, d] \subset I$ ima funkcija $P(t)$ omejeno totalno variacijo. Za vsak $t \in I$ velja:

$$N(t) = N(a) + \int_a^t P(x)dx$$

(integral je Riemannov). Funkcija $N(t)$ se da zapisati kot razlika dveh funkcij:

$$N(t) = N_1(t) - N_2(t), \text{ ki sta na } I \text{ zvezni, pozitivni, naraščajoči in konveksni.}$$

- (x) Funkcija $N(t)$ se da zapisati kot razlika dveh funkcij $N(t) = N_1(t) - N_2(t)$, ki sta na I zvezni, pozitivni in naraščajoči ter je $N_1(t) \in \text{MGC}[a, b]$.

DOKAZ.

- (i) Po definiciji.

- (ii) Po izreku o poprečni vrednosti.
- (iii) Očitno.
- (iv) Netrivialno je le dokazati, da je Lipschitzova, torej da obstaja taka konstanta K , da je za vsaka $t_1, t_2 \in [c, d]$:

$$|N(t_1) - N(t_2)| \leq K|t_1 - t_2|.$$

To se da storiti s pomočjo ocene:

$$u \leq v \Rightarrow e^v - e^u \leq e^v(v - u), \text{ izreka o poprečni vrednosti in nekaj rutinskega ocenjevanja.}$$

- (v) Sledi iz Dodatka.
- (vi) To je samo zapis dejstva, da je $N(t)$ log-konkavna funkcija.
- (vii) Po definiciji levega in desnega odvoda.
- (viii) Množica točk nezveznosti monotone funkcije je števna.
- (ix) Funkcija $P(t)$ je produkt dveh funkcij z omejeno totalno variacijo in je zato tudi sama taka. $N(t)$ pa je absolutno zvezna funkcija, zato je integral svojega odvoda. Drugi del trditve sledi od tod, da lahko vsako funkcijo z omejeno totalno variacijo zapišemo kot razliko dveh pozitivnih naraščajočih funkcij.
- (x) Dokaz s primerom: $N_1(t) = \lambda \cdot \exp(\mu(t - a))$, $\lambda \geq N(a)$, $\mu \geq \max\{0, R(a)\}$.

Nekatere od trditev v Izreku 2 zaslužijo komentar.

(ii) pove, kakšna je poprečna stopnja rasti na katerem koli končnem časovnem intervalu.

(v) trdi, da rast (oz. upadanje) kulture ni nikoli hitrejše od eksponentne rasti (oz. nikoli počasnejše od eksponentnega upadanja) z istimi začetnimi pogoji, ne glede na to, kje je ta začetek.

(vi) pove, da je geometrična sredina števil mikroorganizmov na začetku in koncu danega časovnega intervala največ tolikšna kot je število mikroorganizmov na sredini intervala. Bolj splošno: za poljubne tri trenutke $(a \leq) t_1 < t_0 < t_2 (< b)$ velja ocena:

$$N(t_0) \geq N(t_1)^\alpha N(t_2)^\beta, \text{ kjer sta } \alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_2 - t_1}, \beta = \frac{t_0 - t_1}{t_2 - t_1}.$$

(vii) z enačbama (6) in (7) pove, da je tekoči prirastek $P(t)$ dobro definiran, zaradi česar je kvocient $R(t) = P(t)/N(t)$ tudi nekakšna mera za *vitalnost* kulture v trenutku t .

(x) da razcepu $N(t) = N_1(t) - N_2(t)$ za $N_1(t) = N(a) \cdot \exp(\mu(t - a))$, kjer je $\mu = \max\{0, R(a)\}$, naslednjo interpretacijo: $N_1(t)$ je idealna, torej neovirana, rast kulture v razmerah v času a , $N_2(t)$ pa je smrtnost v kulturi zaradi dejanskih razmer.

IZREK 3.

- (i) $\text{MGC}[a, b]$ je družina natanko tistih log-konkavnih funkcij na $[a, b]$, ki so v a zvezne z desne.
- (ii) Če sta $N_1(t)$ in $N_2(t)$ iz $\text{MGC}[a, b]$ in je $\lambda > 0$, so tudi vsota $N_1(t) + N_2(t)$ ter produkta $\lambda \cdot N_1(t)$ in $N_1(t) \cdot N_2(t)$ v $\text{MGC}[a, b]$.
- (iii) Naj bo $\{N_n(t)\}$ zaporedje funkcij iz $\text{MGC}[a, b]$ in naj pri vsakem $t \in [a, b]$ obstaja končna pozitivna limita $N(t) := \lim_{n \rightarrow \infty} N_n(t)$. Če je limitna funkcija $N(t)$ v točki a z

desne zvezna, je spet $N(t) \in \text{MGC}[a, b)$, konvergenca pa je celo enakomerna na vsakem kompaktnem podintervalu.

- (iv) Če je $[c, d) \subset [a, b)$ in je neka funkcija $N(t)$ v $\text{MGC}[a, b)$, je $N(t)$ tudi v $\text{MGC}[c, d)$.
 (v) Če je funkcija $N(t)$ v $\text{MGC}[a, b)$ in sta λ pozitivno ter μ poljubno realno število, je

$$N(\lambda t + \mu) \in \text{MGC}\left[\frac{a - \mu}{\lambda}, \frac{b - \mu}{\lambda}\right).$$

DOKAZ.

(i) sledi iz Dodatka.

(ii) in (iii) dobimo v Roberts in Varberg (1973). Pri tem je treba dokaz za vsoto prirediti s pomočjo dejstva, da sta $N_1(t)^{-1}$ in $N_2(t)^{-1}$ log-konveksni funkciji.

(iv) in (v) sta preprosto preverljivi trditvi.

Spet kratek komentar!

(ii) glede vsote zagotavlja, da se mešana kultura brez interakcije podreja istemu osnovnemu principu (M). (ii) glede produkta s konstanto še pove, da enota, s katero merimo količino mikrobov, ni pomembna.

Predpostavka o odsotnosti interakcije je pomembna, saj lahko en tip celic v določeni fazi zavira ali pospešuje rast drugih tipov. Vseeno pa si lahko mislimo, da je pri mnogoceličnem organizmu interakcija zelo enosmerna, torej da je rastna funkcija, ki opisuje neovirano rast enega osebk, recimo drevesa, spet pretežno log-konkavna.

(v) pove, da lahko brez škode spremenimo časovno enoto ali pa časovno izhodišče. Če je na primer $N(t) \in \text{MGC}[a, b)$, je $N\left(\frac{b-a}{d-c}t + \frac{ad-bc}{d-c}\right) \in \text{MGC}[c, d)$ (za $b, d \neq \infty$); če je $N(t) \in \text{MGC}[a, \infty)$, je $N(\lambda t - \lambda c + a) \in \text{MGC}[c, \infty)$ za vsak $\lambda > 0$.

Nekaj preprostih primerov funkcij iz $\text{MGC}[0, \infty)$:

- (i) $N(t) = \lambda t + \mu$; $\lambda \geq 0$, $\mu > 0$.
 (ii) $N(t) = \lambda \cdot e^{\mu t}$ (eksponentna rast); $\lambda > 0$.
 (iii) $N(t) = \exp(\mu + \lambda t - \kappa t^2)$; $\kappa \geq 0$.
 (iv) $N(t) = (\lambda + \mu e^{-\kappa t})^{-1}$ (logistična krivulja); $\kappa \neq 0$, $\lambda \geq 0$, $\mu \geq 0$, $\lambda + \mu > 0$.
 (v) $N(t) = \lambda \cdot \exp(-\mu \cdot e^{-\kappa t})$ (Gompertzova krivulja); $\kappa \neq 0$, $\lambda > 0$, $\mu \geq 0$.

NEKATERE KARAKTERISTIKE MIKROBNE RASTI

Podvojitveni (generacijski) čas $G(c)$ v trenutku c je čas podvojitve, če bi kultura od c dalje rasla v konstantnih razmerah, torej eksponentno; $N(t)$ v tem primeru nadomestimo s [5], kjer pa je $r = R(c)$. Od tod sledi:

$$G(c) := \frac{\ln 2}{R(c)}.$$

Seveda ima $G(c)$ smisel le, če je $R(c) > 0$, ko kultura še raste.

Podobno definiramo **razpolovni čas** $H(c)$ kot čas razpolovitve kulture, če bi le-ta od trenutka c dalje upadala v konstantnih (slabih) razmerah:

$$H(c) := -\frac{\ln 2}{R(c)} = \frac{\ln 2}{|R(c)|}.$$

$H(c)$ pa ima smisel le, če je $R(c) < 0$, ko kultura že umira.

Dejanski čas podvojitve od trenutka c dalje je kvečjemu daljši od $G(c)$, dejanski razpolovni čas pa kvečjemu krajši od $H(c)$. Zato $G(c)$ z naraščajočim c raste, $H(c)$ pa pada.

Faze rasti bomo definirali na podlagi naslednje ugotovitve.

IZREK 4. Naj bo $N(t) \in \text{MGC}[a, b]$. Glede monotonosti te funkcije so samo tri možnosti:

- (i) $N(t)$ je na $[a, b]$ strogo naraščajoča; v tem primeru je $\min_{[a, b]} N(t) = N(a)$ in za vsak $t \in [a, b]$ je $R(t) > 0$ in $P(t) > 0$.
- (ii) $N(t)$ je na $[a, b]$ padajoča; potem je $\max_{[a, b]} N(t) = N(a)$, $\inf_{[a, b]} N(t) = N(\rightarrow b)$ in za vsak $t \in [a, b]$ je $R(t) \leq 0$ in $P(t) \leq 0$.
- (iii) Obstaja tak $m \in (a, b)$, da je $N(t)$ na $[a, m]$ strogo naraščajoča in na $[m, b]$ padajoča; $\max_{[a, b]} N(t) = N(m)$, $\inf_{[a, b]} N(t) = \min\{N(a), N(\rightarrow b)\}$; za vsak $t \in [a, m]$ je $R(t) > 0$ in $P(t) > 0$, za vsak $t \in [m, b]$ je $R(t) \leq 0$ in $P(t) \leq 0$.

DOKAZ je preprost, če upoštevamo, da je $R(t)$ padajoča funkcija.

DEFINICIJA 2. Upoštevajmo situacijo iz Trditve 5. **Faza naraščanja** je v primeru (i) ves interval $[a, b]$, v primeru (iii) je interval $[a, m]$, v primeru (ii) pa je ni. **Faza upadanja** je v primeru (ii) kar $[a, b]$, v primeru (iii) je $[m, b]$, v primeru (i) pa je ni.

Faza naraščanja je torej tam, kjer je $R(t) > 0$, faza upadanja pa tam, kjer je $R(t) \leq 0$. Če je $N(t)$ na nekem intervalu konstantna (v literaturi: *stacionarna faza*), spada po gornji definiciji ta interval v fazo upadanja.

DEFINICIJA 3. Naj bo $[c, d)$ podinterval faze naraščanja. Če je na $[c, d)$ funkcija $N(t)$ strogo konveksna, bomo rekli, da $[c, d)$ spada v **akceleracijsko podfazo**. Če je $N(t)$ na $[c, d)$ konkavna, pa bomo rekli, da $[c, d)$ spada v **retardacijsko podfazo**.

V akceleracijski podfazi je tekoči prirastek $P(t)$ strogo naraščajoč, v retardacijski podfazi pa je padajoč.

Kaj bolj podrobnega v splošnem o teh dveh podfazah niti ni mogoče povedati; celo niti tega ne, da se da vsaka točka uvrstiti v eno od obeh podfaz. Pričakujemo pa, da bo v praktičnih primerih faza naraščanja, označimo jo na primer z U , razpadla na končno disjunktno unijo

$$U = [c_0, c_1) \cup [c_1, c_2) \cup \dots \cup [c_{k-1}, c_k)$$

($c_0 = a$, $c_k = b$ ali m), kjer bojo podintervali $[c_{i-1}, c_i)$ izmenično v akceleracijski in retardacijski podfazi. V večini primerov bosta sploh samo dva taka intervala: $U = [a, p) \cup [p, m)$, kjer sta $[a, p)$ cela akceleracijska in $[p, m)$ cela retardacijska podfaza, p pa je abscisa prevoja. Če pa pride vmes do spremembe metabolizma, je slika dejansko lahko bolj komplicirana. *Escherichia coli* gojimo na peptonskem bujonu z dodatki, med katerimi so tudi sladkorji. Sprva bakterija porablja glukozo; ko pa te začne zmanjkovati, spremeni metabolizem in porablja laktozo. V podobnih razmerah kvasovka *Sacharomyces uarum* najprej porablja glukozo in potem maltozo. V obeh primerih pričakujemo, da bo imela rastna krivulja tri prevoje

z abscisami $p < q < r$; akceleracijsko podfazo bosta sestavljala intervala $[a, p)$ in $[q, r)$, retardacijsko pa $[p, q)$ in $[r, m)$; m je pri tem konec faze naraščanja.

Tako imenovana *eksponentna faza* se večinoma sploh ne pojavi. V tej fazi naj bi bila po definiciji, ki jo je najti v literaturi (Mason in Egli, 1993), funkcija $R(t)$ pozitivna konstanta, kar pa strogo vzeto ni skoraj nikoli res. V praksi pa ima verjetno smisel identificirati eksponentno fazo z akceleracijsko podfazo.

Lag-faza se ne vklaplja v ta model, saj tam Minotov zakon ne velja. Ravno to dejstvo pa omogoča objektivno definirati konec lag-faze kot trenutek, kjer Minotov zakon pride v veljavo. Stara definicija lag-faze je zelo »nenaravna« (McMeekin in sod., 1993). Če vzamemo, da ima rastna krivulja (ali včasih tudi logaritem rastne funkcije) en sam prevoj, seka tangenta v prevoju premico $N = N(0)$ v točki z absciso, ki jo proglasimo za konec lag-faze. Prevoj rastne funkcije, ki je znak staranja kulture, nima nobene zveze s koncem lag-faze, ko je kultura mlada in njena rast neovirana; zato je v tem primeru definicija lag-faze za lase privlečena. Bolj smiselna je ta definicija, če gre za logaritem rastne funkcije, a tudi tu imamo močan ugovor: ker je po naši ugotovitvi rastna funkcija log-konkavna, je omenjeni prevoj čisto na začetku veljavnosti Minotovega zakona in je torej že sam konec lag-faze, tangente sploh ni treba vpletati v to zgodbo. Drugačno definicijo najdemo v Buchanan in Cygnarowicz (1990): konec lag-faze je maksimum drugega odvoda logaritma rastne krivulje; v naši terminologiji je to maksimum funkcije $R'(t)$. Po našem mnenju je definicija zgrešena iz naslednjega razloga. $R'(t)$ ima maksimum tam, kjer $R(t)$ najhitreje narašča, torej tam, kjer se kultura še vedno prilagaja novemu okolju, vsekakor krepko pred začetkom veljavnosti Minotovega zakona. To pa nasprotuje splošno sprejeti definiciji lag-faze kot obdobja prilagajanja. Omenjena definicija pa je slaba tudi iz čisto tehnične plati: uporaba drugega odvoda pri tabelarično podanih funkcijah je problematična, ker je numerično odvajanje zelo slabo pogojena procedura.

Zato bomo tu postavili bolj preprosto definicijo: konec lag-faze je točka, v kateri začne veljati Minotov zakon. Bolj natančno:

DEFINICIJA 4. Naj bo $N(t)$ pozitivna funkcija, ki opisuje neko mikrobnost na intervalu $[z, b)$. **Konec lag-faze** je

$$l := \inf \{ a \in [z, b) \mid N(t) \in \text{MGC}[a, b) \}.$$

Če funkcijo $N(t)$ zapišemo v obliki [4] in je $R(t)$ z desne zvezna funkcija, je

$$l = \min \{ a \in [z, b) \mid R(t) \text{ je na } [a, b) \text{ padajoča funkcija} \}.$$

V preprostih primerih bo to pomenilo, da je $R(t)$ v lag-fazi naraščajoča in doseže v trenutku l (globalni) maksimum; konec lag-faze je torej trenutek največje relativne hitrosti rasti, kar je povsem pričakovano, saj gre za že prilagojeno mlado kulturo.

Za konec razdelka si postavimo naravno vprašanje, ali bi lahko s privzetjem dodatnih predpostavk obogatiti zbirko lastnosti rastnih krivulj. Tako na primer vsi verjamemo, da je rastna funkcija $N(t)$ dovolj gladka (oz. tekoči prirastek vsaj zvezen) in na majhnem številu intervalov izmenično konveksna in konkavna (prim. Definicijo 3). Toda namen tega sestavka je le raziskati posledice predpostavke (M) in nič več.

APROKSIMACIJA

V (Cedilnik in Rogelj, 1992) je utemeljen naslednji kriterij aproksimacije. Za dane meritve $(t_1, N_1), \dots, (t_n, N_n)$ želimo izbrati funkcijo $N(t)$ tako, da je izraz

$$Q = \sum_{i=1}^n \left(\frac{N(t_i) - N_i}{\sqrt{N(t_i) \cdot N_i}} \right)^2 \quad [8]$$

minimalen. Odklone $N(t_i) - N_i$ torej relativiziramo z geometričnimi sredinami med izmerjenimi in teoretičnimi vrednostmi, s čemer dosežemo enakomerno prilagoditev na vsem območju merjenja.

Izraz [8] preuredimo:

$$\begin{aligned} Q &= \sum_{i=1}^n \left(\frac{N(t_i)}{N_i} + \frac{N_i}{N(t_i)} \right) - 2n = \sum_{i=1}^n [\exp(\ln(N(t_i)/N_i)) + \exp(-\ln(N(t_i)/N_i))] - 2n = \\ &= 2 \sum_{i=1}^n \operatorname{ch}(\ln(N(t_i)/N_i)) - 2n. \end{aligned}$$

Recimo, da je prilagoditev kolikor toliko dobra. Potem je za vsak i : $N(t_i)/N_i \approx 1$ in potem $\ln(N(t_i)/N_i) \approx 0$. Ker pa je $\operatorname{ch} x \approx 1 + \frac{1}{2}x^2$ za $x \approx 0$, dobimo:

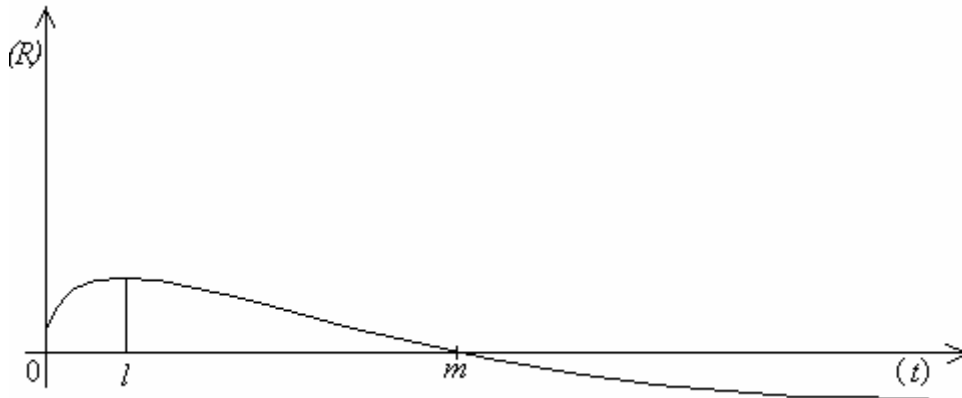
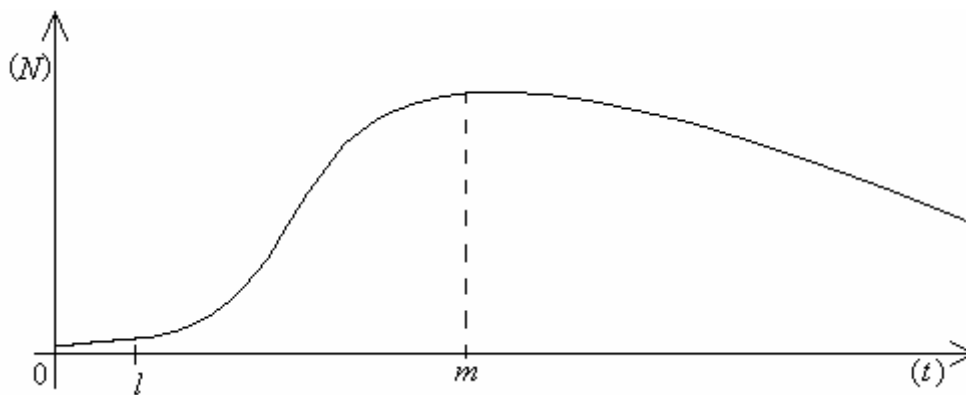
$$Q \approx \sum_{i=1}^n [\ln N(t_i) - \ln N_i]^2. \quad [9]$$

V praksi uporabljamo logaritme izmerkov zato, ker so mnogo manjši od dejanskih vrednosti, če je $N(t)$ število mikroorganizmov. S sodobnimi računalniki ni noben problem več delati z velikimi števili, zato ta vzrok za uporabo logaritmov odpade. Toda gornja izpeljava kaže, da je pri kvalitetnih meritvah vseeno dobro uporabljati logaritme, vendar tokrat zaradi povsem drugačnega razloga, namreč zaradi enakomernosti prilagoditve.

KONKRETNI MODEL

Tipičen razvoj zaprte kulture zglada nekako tako, kot kaže slika 2. Na njej so: začetek $z = 0$, konec lag-faze l in konec faze naraščanja m . Od tod dobimo tipično sliko funkcije $R(t)$ (slika 1). Ena najbolj preprostih funkcij te oblike je $R(t) = (a + bt/s) \cdot e^{-t/s} - c$, kjer so vsi parametri pozitivni, pa še maksimum mora biti na pozitivni strani: $l = s(1 - a/b) > 0$. Potem je

$$\ln N(t) = \ln N(l) + \int_l^t [(a + bx/s)e^{-x/s} - c] dx = \text{konst.} - sc \cdot t/s - s(a+b) \cdot e^{-t/s} - sb \cdot t/s \cdot e^{-t/s}.$$

Slika 1. $R = R(t)$.Slika 2. $N = N(t)$.

Zdaj pa ta model samo še posplošimo:

$$N(t) = \exp\left(A - B \cdot t/s - C \cdot e^{-t/s} - D \cdot t/s \cdot e^{-t/s}\right)$$

(za $t \geq 0$), kjer za parametre s, A, B, C in D velja le: $s > 0$ in $[D > 0$ ali $D = 0 \leq C]$.

Potem se [9] glasi takole:

$$Q \approx \sum_{i=1}^n \left[A - B \cdot t_i / s - C \cdot \exp(-t_i / s) - D \cdot t_i / s \cdot \exp(-t_i / s) - \ln N_i \right]^2.$$

Aproksimacija ni problematična, saj so od petih neznank štiri vgrajene linearno.

Model je tako splošen, da je le malo verjetno, da ga ne bi mogli uporabiti na realnih podatkih. Karakteristike rasti, kot so konec lag-faze, monotonost, konveksnost/konkavnost in prevoji, maksimum ali asimptota, so zelo odvisne od parametrov A, B, C in D in jih zato tu ne bomo skušali izračunati; sploh pa je njihova določitev stvar računske rutine. Parameter s je nekakšna naravna časovna enota in kot tak ne vpliva bistveno na kvalitativne lastnosti krivulje.

Podobnost modela z Gompertzovim zagotovo ni naključje, saj je praksa že pokazala, da daje Gompertzova krivulje kar dobre rezultate.

Seveda pa ne trdimo, da je ta model najboljši možen. Podajamo ga le kot premer dejansko uporabnega modela.

DODATEK

LEMA 8. Funkcija $f(x)$ naj bo zvezna na intervalu $I^0 = (a, b)$ ter strogo pozitivna in z desne odvedljiva na intervalu $I = [a, b)$ ($a < b \leq \infty$). Potem so naslednje izjave ekvivalentne:

- (i) $f(x)$ je na I log-konkavna.
- (ii) $\forall x_0 \in I^0, \forall u \geq 0: [x_0 + u \in I \Rightarrow f(x_0 + u) \leq f(x_0) \cdot \exp(f'_+(x_0)u / f(x_0))]$
- (iii) $\forall x_0 \in I, \forall u \in \mathbf{R}: [x_0 + u \in I \Rightarrow f(x_0 + u) \leq f(x_0) \cdot \exp(f'_+(x_0)u / f(x_0))]$
- (iv) $\forall x_0 \in I^0, \forall u \geq 0, \forall \alpha, \beta \in \mathbf{R}: [f(x_0) = \alpha \cdot \exp(\beta x_0) \wedge f'_+(x_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta x_0) \wedge x_0 + u \in I \Rightarrow f(x_0 + u) \leq \alpha \cdot \exp(\beta(x_0 + u))]$
- (v) $\forall x_0 \in I, \forall u, \alpha, \beta \in \mathbf{R}: [f(x_0) = \alpha \cdot \exp(\beta x_0) \wedge f'_+(x_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta x_0) \wedge x_0 + u \in I \Rightarrow f(x_0 + u) \leq \alpha \cdot \exp(\beta(x_0 + u))]$

DOKAZ.

»(v) \Rightarrow (iv)«. Trivialno.

»(iv) \Rightarrow (ii)«. Iz $f(x_0) = \alpha \cdot \exp(\beta x_0)$ in $f'_+(x_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta x_0)$ sledi: $\alpha = f(x_0) \exp(-f'_+(x_0)x_0 / f(x_0))$, $\beta = f'_+(x_0) / f(x_0)$. Potem pa je $f(x_0 + u) \leq \alpha \cdot \exp(\beta(x_0 + u)) = f(x_0) \exp(f'_+(x_0)u / f(x_0))$.

»(ii) \Rightarrow (i)«. Logaritmirajmo oceno iz (ii):

$$\ln f(x_0 + u) \leq \ln f(x_0) + f'_+(x_0)u / f(x_0). \quad [10]$$

Označimo: $g(x) := \ln f(x)$. Potem iz (10) sledi: $g(x_0 + u) \leq g(x_0) + g'_+(x_0)u$, kar pomeni, da je desna tangenta na graf $y = g(x)$ v kateri koli točki $x_0 + u$ desno od dotikališča nad grafom.

Recimo pa, da $g(x)$ na I^0 ni konkavna. Obstaja torej tetiva T med abscisama $x_1, x_2 \in I^0$, $x_1 < x_2$, ki je vsaj v eni točki x_3 med x_1 in x_2 strogo nad grafom. Zaradi zveznosti funkcije $g(x)$ je tetiva T nad grafom $y = g(x)$ na celem intervalu $[x_3, x_3 + t]$ za nek dovolj majhen pozitiven t . Naj bo $\{[p_i, q_i] \mid i \in \Gamma\}$ družina vseh intervalov, ki vsebujejo x_3 in je na vsakem od njih tetiva T strogo nad grafom $y = g(x)$. Če sta $p := \inf\{p_i\}$ in $q := \sup\{q_i\}$, v abscisah p in q tetiva T seka graf, vmes pa je graf strogo pod tetivo. Po Lagrangeevem izreku obstaja tak $x_0 \in [p, q)$, da je $g'_+(x_0) \leq \frac{g(q) - g(p)}{q - p}$. To pa pomeni, da je za $u = q - x_0$:

$$g(q) = g(x_0 + u) \leq g(x_0) + g'_+(x_0)u \leq g(x_0) + \frac{g(q) - g(p)}{q - p}u. \quad \text{Če v tej oceni člen } g(x_0)$$

nadomestimo z ordinato tetive T v točki x_0 , dobimo protislovje:

$$g(q) < \frac{g(q) - g(p)}{q - p}(x_0 - p) + g(p) + \frac{g(q) - g(p)}{q - p}u = g(q).$$

Končno je zaradi desne zveznosti v točki a (ki je posledica desne odvedljivosti v a) $g(x)$ konkavna tudi na I .

»(i) \Rightarrow (iii)«. Še vedno naj bo $g(x) := \ln f(x)$. Ker je $g(x)$ konkavna funkcija, je (Roberts in Varberg, 1973, str. 6, oceni (4) in (5)):

$$\frac{g(x_0 + u) - g(x_0)}{u} \leq g'_+(x_0) \leq \frac{g(x_0 + v) - g(x_0)}{v}$$

za $u > 0$ in $v < 0$. Za $x_0, x_0 + u \in I^0$ torej v vsakem primeru velja:

$$g(x_0 + u) - g(x_0) \leq g'_+(x_0)u. \quad [11]$$

Zaradi zveznosti z desne v točki a velja ta ocena tudi za $u = a - x$. Naj bo $0 < t < u$. Iz konkavnosti $g(x)$ sledi:

$$\frac{g(a+u) - g(a)}{u} \leq \frac{g(a+t) - g(a)}{t}.$$

Pošljimo $t \rightarrow 0$, pa znova dobimo [11], tokrat za $x_0 = a$. Še antilogaritmirajmo [11] in že sledi ocena v (iii).

»(iii) \Rightarrow (v)«. Če v (iii) vstavimo $f(x_0) = \alpha \cdot \exp(\beta x_0)$ in $f'_+(x_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta x_0)$, sledi ocena v (v).

Dokaz je končan.

SUMMARY

We would like to describe the growth of a well adapted batch culture of microbes. The suitable curve has to have certain properties, basically the property (M):

If the growth curve $N = N(t)$ at the point t_0 touches from the right some exponential curve:

$$N(t_0) = \alpha \cdot \exp(\beta t_0), \quad N'_+(t_0) = \alpha\beta \cdot \exp(\beta t_0), \quad \text{then: } t \geq t_0 \Rightarrow N(t) \leq \alpha \cdot \exp(\beta t).$$

This demand is a consequence of the fact that the conditions in the culture are at any time only getting worse. This is the extension of the well-known Minot's law. We derive then that any microbial growth curve on certain time interval $[a, b)$ ($a < b \leq \infty$) must have the form

$$N(t) = N(a) \cdot \exp\left(\int_a^t R(x)dx\right),$$

where the relative growth rate $R(t)$ is a decreasing right continuous function.

Some consequences:

1. Current increment: $P(t) = N(t) \cdot R(t)$. Naturally it holds: $N(t) = N(a) + \int_a^t P(x)dx$.
2. $N(t)$ is absolutely continuous and left and right differentiable: $N'_+(t) = P(t)$.
3. Logarithmic concavity: for any $t_1, t_2 \in I$ and $\varepsilon \in [0, 1]$ it holds:

$$N(\varepsilon t_1 + (1 - \varepsilon)t_2) \geq N(t_1)^\varepsilon N(t_2)^{1-\varepsilon};$$

in the special case:

$$N\left(\frac{1}{2}(t_1 + t_2)\right) \geq \sqrt{N(t_1)N(t_2)}.$$

4. Any sum, pointwise product, product by a scalar, restriction or pointwise limit of growth functions is again such function.

5. Doubling time: $G(c) = \frac{\ln 2}{R(c)}$. It is an increasing function of c and has its sense only while

$R(c)$ is strictly positive. Half-time: $H(c) = -\frac{\ln 2}{R(c)}$ for the dying culture, $R(t) \leq 0$. It is a decreasing function of c .

6. There are three possibilities for $N(t)$: (1) it is everywhere increasing, (2) it is everywhere decreasing, and (3) it has one maximum, left from which it is increasing and right from which it is decreasing.

A natural new definition of the lag-phase: If $N = N(t)$ is some microbial growth curve, then the end of the lag-phase is the moment further from which this curve is log-concave (1 in the fig. 1 and 2). Hence, the end of the lag-phase is the beginning of the validity of Minot's law (M).

For the best approximation of given data we have the criterion that the quantity Q , defined in the formula [8], is minimal. This Q is almost the same as that in [9] which is commonly used.

At the end we also suggest a simple Gompertz-like model with 5 parameters.

VIRI

Baranyi, J./ Roberts, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23 (1994), 277–294.

Baranyi, J./ Roberts, T.A./ McClure, P. Some properties of a nonautonomous deterministic growth model describing the adjustment of the bacterial population to a new environment. *IMA J. of Math. Appl. Med. Biol.* 10(1993), 293–299.

Buchanan, R.L./ Cygnowicz, M.L. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology* 7(1990), 237–240.

Cedilnik, A./ Rogelj, I. Krivulja rasti mikrobne populacije od eksponentialne faze do faze odmiranja. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. v Ljublj., Kmet. Živin.*, 60(1992), 109–124.

McMeekin, T.A./ Olley, J.N./ Ross, T./ Tatkowsky, A.A. *Predictive microbiology: Theory and application.* Chichester, John Wiley & Sons Inc., 1993.

Medawar, J.S./ Medawar, P.B. *Aristotle to Zoos. A Philosophical Dictionary of Biology.* Cambridge, Harvard University Press, 1983.

Pirt, S.J. *Principles of microbe and cell cultivation.* London, Oxford, Blackwell Sci. Publ., 1975.

Roberts, A.W./ Varberg, D.E. *Convex functions.* New York and London, Academic Press, 1973.

Whiting, R.C./ Cygnowicz-Provost, M. A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology* 9(1992), 269–277.

Zeide, B. Analysis of growth equations. *Forest Science*, Vol. 39, No. 3, 594–616.