



Od obrazu mikroskopowego mikroorganizmu do modelu matematycznego jego wzrostu

Marcin Bizukojć, Stanisław Ledakowicz

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Politechnika Łódzka, Łódź

From a microscopic image of a microorganism to the mathematical model of its growth

Summary

The examples of the application of the data obtained from digital processing and analysis of bacteria, yeasts and filamentous fungi microscopic images for the purpose of formulating of segregated (morphologically structured) and population models of their growth are presented in this article. In case of non- or insignificantly differentiating microorganisms, such as bacteria or yeasts, the digital analysis of their images is relatively simple and the application of the obtained data is not very troublesome. In this case, the complicated, from the point of view of morphology, mathematical models are rarely formulated. But in case of filamentous microorganisms, due to complicated structures which are developed in their cultivation, the mathematical description of their growth without data which are obtained from image analysis, is at least not full, unless false.

Key words:

digital image analysis, structured model, microbial growth kinetics.

Adres do korespondencji

Marcin Bizukojć,
Katedra Inżynierii
Bioprocessowej,
Politechnika Łódzka,
ul. Wólczańska 213/215,
93-005 Łódź;
e-mail:
marcinbz@mail.p.lodz.pl

1. Wstęp

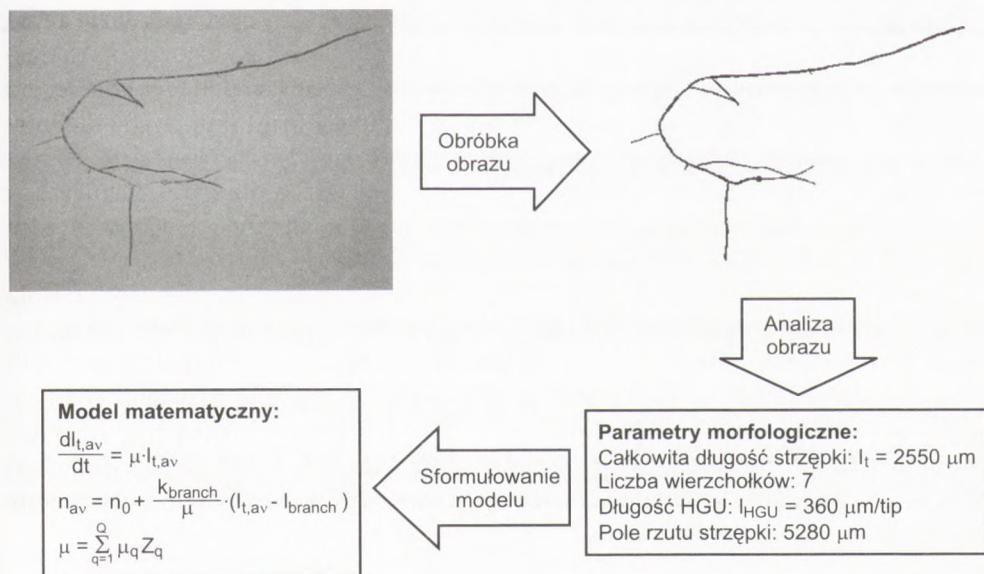
Cyfrowa analiza obrazu jest nowoczesnym narzędziem wykorzystywanym w różnych dziedzinach współczesnej nauki. W mikrobiologii i biotechnologii ma się na co dzień do czynienia z obrazem mikroskopowym badanego organizmu. Cyfrowa obróbka i analiza takich obrazów niesie zupełnie nowe możliwości badania właściwości obserwowanego mikroorganizmu. Zautoma-

tyzowana cyfrowa analiza obrazu jest szczególnie pożyteczna, jeżeli chcemy uzyskać duże ilości danych, które później będą służyły do modelowania matematycznego wzrostu mikroorganizmu.

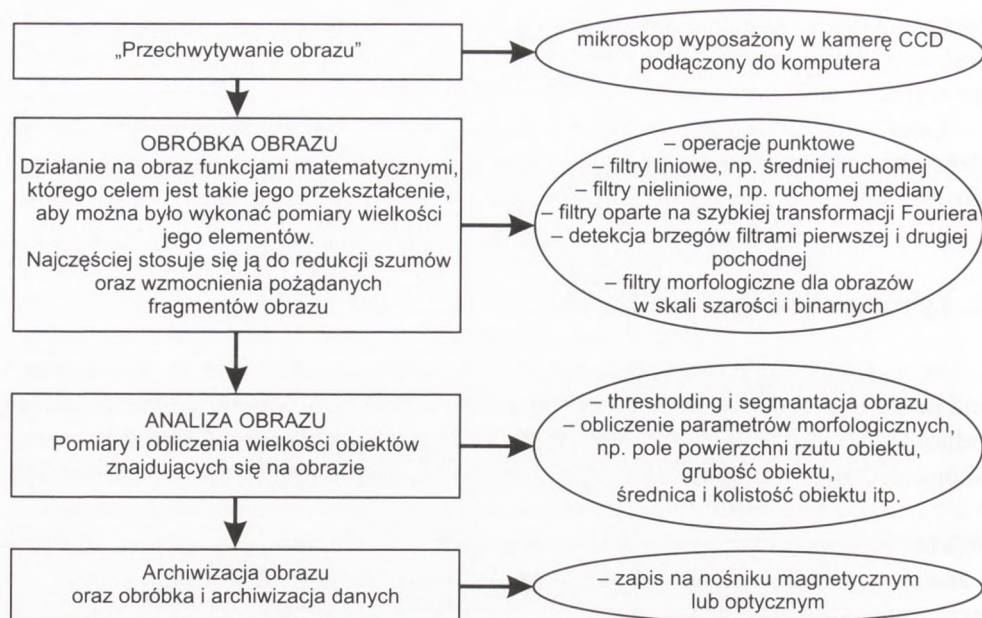
Celem rozważań jest przedstawienie możliwości wykorzystania danych pochodzących z cyfrowej obróbki i analizy obrazów mikroskopowych mikroorganizmów do formułowania i weryfikacji strukturalnych modeli wzrostu mikroorganizmów.

2. Cyfrowa obróbka i analiza obrazu

W największym skrócie przebieg procesu od uzyskania obrazu do sformułowania modelu matematycznego przedstawia się następująco. Najpierw uzyskać należy odpowiedni obraz mikroskopowy. Obraz może pochodzić z dowolnego typu mikroskopu. Jedyńm warunkiem, jaki dany obraz powinien spełniać, jest odpowiednia jakość i oczywiście możliwość jego skalowania tzn. znana liczba pikseli obrazu odpowiada określonej rzeczywistej długości. Kolejnym etapem jest cyfrowa obróbka i analiza uzyskanego obrazu. Celem obróbki obrazu jest usunięcie szumów, zakłóceń oraz zwiększenie kontrastu pożądaných obiektów. W wyniku analizy obrazu uzyskujemy pewne parametry morfologiczne, charakteryzujące wielkość obiektu, jego kształt lub kolor. Dla grzybów nitkowych są to najczęściej całkowita długość strzępki, liczba wierzchołków (*tips*), pole rzutu obiektu [1]. Zmiany wielkości parametrów morfologicznych w czasie odzwierciedlają zwykle kinetykę wzrostu mikroorgani-



Rys. 1. Od obrazu mikroskopowego mikroorganizmu do modelu matematycznego jego wzrostu.



Rys. 2. Schematyczny przebieg cyfrowej obróbki (*image processing*) i analizy obrazu (*image analysis*).

zmu i dzięki temu służą następnie do sformułowania modelu wzrostu mikroorganizmu. Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie przebieg procesu od obrazu mikroskopowego do modelu wzrostu mikroorganizmu.

Szczegółowy przebieg cyfrowej obróbki i analizy obrazu oraz narzędzia temu służące były już omawiane [1]. W tym miejscu przypomnieć należy tylko schematycznie kolejne etapy tego procesu (rys. 2). Obraz zapisany w pamięci komputera jest w pierwszym etapie poddawany obróbce za pomocą filtrów liniowych i nieliniowych oraz detektorów brzegów, a także filtrów morfologicznych. Następnie, co najważniejsze, dokonuje się segmentacji obrazu i pomiarów obiektów. Zmierzona wielkość charakteryzuje dany mikroorganizm i niesie cenne informacje dotyczące jego budowy i/lub stanu fizjologicznego.

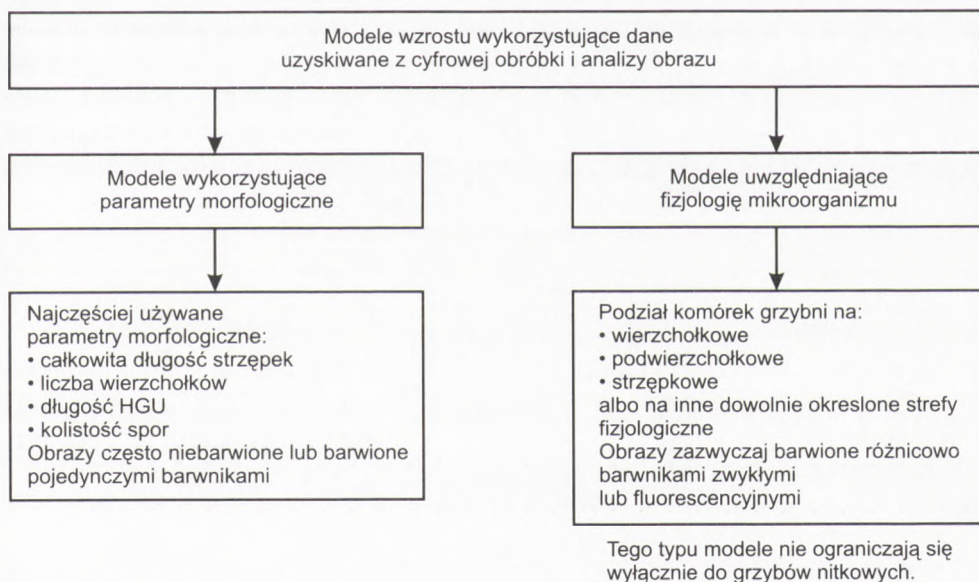
Przy modelowaniu wzrostu grzybów nitkowych szczególne znaczenie odgrywają takie parametry morfologiczne, jak całkowita długość strzępki, liczba wierzchołków, długość rozgałęzień, długość jednostki wzrostu strzępki HGU (*hyphal growth unit*) oraz pole powierzchni rzutu strzępki. W przypadku stosowania barwienia różnicowego zarówno w świetle widzialnym, jak przy fluorescencji istotną rolę odgrywa również zabarwienie strzępek mówiące o właściwościach fizjologicznych danego mikroorganizmu [1]. Pełny spis stosowanych parametrów morfologicznych można znaleźć w literaturze przedmiotu [1,2].

3. Modele morfologicznie strukturalne wzrostu mikroorganizmów

Modele morfologicznie strukturalne wzrostu mikroorganizmów, a szczególnie grzybów nitkowych, dotyczą tych mikroorganizmów, które są wykorzystywane na skalę przemysłową do biosyntezy metabolitów wtórnych takich, jak enzymy, czy też antybiotyki. Czasem również biosynteza metabolitów pierwotnych, niezwiązana bezpośrednio ze wzrostem biomasy, zależy od stanu morfologicznego i fizjologicznego grzybni [3].

Zależnie od rodzaju danych wykorzystywanych do sformułowania strukturalnego modelu matematycznego wzrostu mikroorganizmu, dostępne w literaturze modele można podzielić na modele wykorzystujące wyłącznie parametry morfologiczne oraz takie, które uwzględniają fizjologię mikroorganizmu. Na rysunku 3 przedstawiony jest schematycznie podział morfologicznie strukturalnych modeli wzrostu mikroorganizmów.

W 1995 r. Nielsen i Krabben zaproponowali ogólny, strukturalny model populacyjny dla grzybów nitkowych [4]. Model ten definiuje funkcję rozkładu elementów strzępek $f(y,t)$, gdzie y jest pewną właściwością morfologiczną strzępki, np. jej całkowitą długością, na różnych etapach rozwoju od kiełkujących spor aż do elementów porozrywanych na skutek działania naprężeń ścinających w bioreaktorze.



Rys. 3. Podział segregowanych modeli morfologicznie strukturalnych wzrostu mikroorganizmów.

Równanie bilansowe tego modelu przedstawia się następująco:

$$\frac{\partial f(l_t, n, t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial l_t} (q_{tip}(l_t, n, z) \cdot n \cdot f(l_t, n, t)) + \frac{\partial}{\partial n} (q_{branch}(l_t, n, z) \cdot f(l_t, n, z)) =$$

$$= h(l_t, n, z, t) - D \cdot f(l_t, n, t) \quad (1)$$

gdzie $q_{tip}(l_t, n, z)$ jest szybkością wydłużania strzępek, a $q_{branch}(l_t, n, z)$ szybkością tworzenia rozgałęzień, natomiast $h(l_t, n, z, t)$ – jest szybkością tworzenia nowych elementów strzępek. Jest ona sumą szybkości kiełkowania spor $h_g(l_t, n, z, t)$ oraz szybkości fragmentacji grzybni $h_f(l_t, n, z, t)$.

$$h(l_t, n, z, t) = h_g(l_t, n, z, t) + h_f(l_t, n, z, t) \quad (2)$$

W przytoczonych równaniach \mathbf{z} jest wektorem warunków środowiskowych, w jakich badany jest wzrost danych grzybów nitkowych.

3.1. Model kiełkowania spor

Opierając się na ogólnym modelu, Nielsen i Krabben [4] oraz Paul i wsp. [5] zaproponowali prosty model procesu kiełkowania spor. Proces kiełkowania spor jest najwcześniejszym etapem rozwoju grzybni: najpierw spora pęcznieje wchłaniając wodę, a następnie pojawia się kiełek. Przy zastosowaniu cyfrowej analizy obrazu zbadanie tego procesu jest względnie proste. Należy obliczyć, ile spor wykiełkowało, a ile pozostało niezmienionych. Znając te wielkości, można znaleźć funkcję rozkładu analizowanych spor. Wyznacznikiem tego, czy dana spora jest aktywna, czyli czy wykiełkowała, jest parametr morfologiczny zwany kolistością obiektu. Większość spor grzybów nitkowych jest okrągła, zatem rzut spory na płaszczyznę ma kształt koła. Dla koła zaś kolistość wynosi 1. Jeżeli kolistość analizowanego obiektu przekroczy 1,2, to daną sporę można uznać za wykiełkowaną [5].

Zmiana liczby spor w czasie opisywana jest funkcją ich rozkładu:

$$\frac{de}{dt} = g(\mathbf{z}, t) \quad (3)$$

Wprowadzając kolejne parametry modelu, jak ułamek żywych spor, y_{viable} , czas rozpoczęcia kiełkowania, t_s , czas, po którym żadna spora już nie kiełkuje, t_f oraz stężenie spor po inokulacji e_{spore} i korzystając z rozkładu statystycznego beta, proces kiełkowania spor można opisać równaniem:

$$\bar{g}(t) = \frac{g(\mathbf{z}, t)}{e_{spore} \cdot y_{viable}(\mathbf{z})} \cdot \begin{cases} \frac{1}{B(\alpha, \beta)} \cdot t^{-\alpha-1} \cdot (1-t)^{\beta-1} & \text{jeżeli } t_s \leq t \leq t_f \\ 0 & \text{po zakończeniu kiełkowania} \end{cases} \quad (4)$$

gdzie znormalizowany czas kiełkowania wyraża się równaniem:

$$\bar{t} = \frac{t - t_s}{t_f - t_s} \quad (5)$$

Z równań (4) i (5) wynika że, proces kiełkowania spor jest ograniczony w ramach czasowych. Jeżeli czas procesu jest większy od czasu zakończenia kiełkowania spor, to w układzie nie przybywa już nowych obiektów, a zatem człon modelu ogólnego $h_g(l_t, n, z, t)$ jest równy zeru.

3.2. Model wydłużania strzępek

Po zakończeniu kiełkowania w badanym układzie nie przybywa już nowych elementów ($t > t_f$), jednakże każdy obiekt ulega zmianom, w wyniku wzrostu biomasy. Przyjmijmy zatem, że miarą wzrostu biomasy jest zmiana całkowitej długości strzępek $l_{t,av}$ w czasie. Jest ona proporcjonalna do szybkości wydłużania się strzępek oraz ilości rozgałęzień n_{av} .

$$\frac{dl_{t,av}}{dt} = n_{av} \cdot q_{tip}(l_{t,av}, z) \quad (6)$$

Wyznaczając szybkość wydłużania strzępek z równania (6) otrzymujemy:

$$q_{tip}(l_{t,av}, z) = \frac{dl_{t,av}}{dt} \cdot \frac{1}{n_{av}} \quad (7)$$

Wiadomo również, że zmiana całkowitej długości strzępek w czasie jest proporcjonalna do ich całkowitej długości, a współczynnikiem tej proporcjonalności poprzez analogię równania wzrostu biomasy jest $\mu(z)$.

$$\frac{dl_{t,av}}{dt} = \mu(z) \cdot l_{t,av} \quad (8)$$

Łącząc równania (7) i (8) i uwzględniając definicję długości jednostki wzrostu strzępki HGU (9):

$$l_{HGU} = \frac{l_{t,av}}{n_{av}} \quad (9)$$

uzyskujemy zależność:

$$q_{tip}(l_{t,av}, z) = \mu(z) \cdot \frac{l_{t,av}}{n_{av}} = \mu(z) \cdot l_{HGU} \quad (10)$$

Obserwacje mikroskopowe i analiza danych również wykazały, że szybkość wydłużania strzępek jest limitowana ich całkowitą długością:

$$q_{\text{tip}}(l_{t,\text{av}}, \mathbf{z}) = k_{\text{tip,av}}(\mathbf{z}) \cdot \frac{l_{t,\text{av}}}{l_{t,\text{av}} + K_t} \quad (11)$$

Nielsen i Krabben podają wartości parametrów równania (11) wyznaczone dla *Penicillium chrysogenum*: $k_{\text{tip,av}} = 10 \mu\text{m}/\text{tip}/\text{h}$ oraz $K_t = 60 \mu\text{m}$ [4].

3.3. Model rozgałęziania się strzępek

Szybkość rozgałęziania się strzępek można określić jako zmianę liczby wierzchołków strzępek w czasie:

$$\frac{dn_{\text{av}}}{dt} = q_{\text{branch}}(l_t, \mathbf{z}) \quad (12)$$

Dany fragment strzęпки można traktować jako odgałęzienie, jeśli jest on krótszy od całej strzęпки:

$$q_{\text{branch}}(l_t, \mathbf{z}) = \frac{dn_{\text{av}}}{dt} = \begin{cases} 0 & \text{jeżeli } l_t < l_{\text{branch}} \\ k_{\text{branch}}(\mathbf{z}) \cdot l_t & \text{jeżeli } l_t \geq l_{\text{branch}} \end{cases} \quad (13)$$

Ponieważ wzrost całkowitej długości strzęпки l_t jest wykładniczy, całkowanie równania (13) w granicach od długości rozgałęzienia l_{branch} do całkowitej długości strzęпки $l_{t,\text{av}}$ i od początkowej liczby wierzchołków n_0 do średniej liczby wierzchołków n_{av} daje:

$$n_{\text{av}} = n_0 + \frac{k_{\text{branch}}(\mathbf{z})}{\mu(\mathbf{z})} \cdot (l_{t,\text{av}} - l_{\text{branch}}) \quad (14)$$

W rozważaniach tych należy zwrócić szczególną uwagę na dwa istotne zagadnienia. Po pierwsze, parametry morfologiczne wykorzystywane w równaniach modelowych są wartościami średnimi liczonymi zgodnie z odpowiednimi zasadami statystycznymi z całego zbioru obiektów [1]. Dzieje się tak, gdyż zazwyczaj wzrost grzybów nitkowych bada się w różnego typu bioreaktorach i nie ma tu możliwości obserwacji pojedynczych strzępek *on-line*. Problem używania średnich wartości parametrów morfologicznych można ominąć i zastosować bezpośrednio wartości parametrów morfologicznych dla dokładnie pojedynczej strzęпки, jeżeli badanie kinetyki wzrostu prowadzi się w mikrokomorze przepływowej umieszczonej na stoliku mikroskopu [6]. Niestety w przypadku takich badań traci się możliwość prowadzenia procesu w realnych warunkach. Po drugie, wartości szybkości poszczególnych zmian są funkcją wektora \mathbf{z} , czyli warunków środowiskowych. Zatem zależności te pozostają prawdziwe tylko i wyłącznie w niezmiennych warunkach środowiskowych. Dlatego weryfikację tego typu modelu należy prowadzić w chemostacie [7].

Jeżeli warunki środowiskowe się zmieniają, np. stężenie substratu, to należy poszukać odpowiednich zależności między parametrami morfologicznymi, a stężeniem substratu.

3.4. Wpływ stężenia substratu na parametry morfologiczne

Używając w swoich badaniach mikrokomory przepływowej sprzężonej z mikroskopem i kamerą Spohr i wsp. [6] znaleźli następujące zależności pomiędzy szybkością wzrostu strzępki a stężeniem substratu s :

– właściwa szybkość wzrostu biomasy liczoną dla pojedynczej strzępki

$$\mu_h = \mu_{\max} \cdot \frac{s}{s + K_s} \quad (15)$$

– stała szybkości wydłużania strzępki

$$k_{\text{tip}}(s) = k_{\text{tip},s,\max} \frac{s}{K_{\text{tip},s} + s} \quad (16)$$

– stała szybkości rozgałęziania strzępki

$$k_{\text{branch}}(s) = k_{\text{branch},s,\max} \cdot \frac{s}{K_{\text{branch},s} + s} \quad (17)$$

i wyznaczyli parametry kinetyczne przytoczonych równań dla *Aspergillus oryzae* w procesie biosyntezy α -amylazy na podłożu zawierającym glukozę jako źródło węgla. Parametry te wynosiły odpowiednio: maksymalna właściwa szybkość wzrostu pojedynczej strzępki $\mu_{\max} = 0,348 \text{ h}^{-1}$, stała szybkości wydłużania strzępki $k_{\text{tip},s,\max} = 75 (\mu\text{m h})^{-1}$, stała szybkości rozgałęziania $k_{\text{branch},s,\max} = 0,0016 \text{ tip } (\mu\text{m h})^{-1}$ oraz stałe nasycenia $K_s = K_{\text{tip},s} = K_{\text{branch},s} = 3 \text{ mg L}^{-1}$ [6].

4. Model stref fizjologicznych

Nielsen i Villadsen przedstawili podstawy teoretyczne modelu wzrostu mikroorganizmu, uwzględniające jego podział na pewne strefy fizjologiczne [7]. Przyjęte zostało podstawowe założenie, że strefy są wyrażone w postaci ich ułamka Z_q (macierzowo \mathbf{Z}), zatem prawdziwe jest równanie:

$$e^T \mathbf{Z} = 1 \quad (18)$$

Bilans Q przedziałów morfologicznych (fizjologicznych) ulegających wzajemnym przemianom w K reakcjach metamorfozy przedstawia się wówczas następująco:

$$\sum_{q=1}^Q \delta_{kq} Z_q = 0 \quad \text{dla } k = 1, \dots, K \quad (19)$$

gdzie δ_{kq} jest współczynnikiem stechiometrycznym reakcji metamorfozy. W postaci macierzowej bilans ten przyjmuje postać:

$$\Delta \cdot Z = 0 \quad (20)$$

gdzie wymiary macierzy $\Delta - [K \times Q]$

Właściwa szybkość wzrostu biomasy w tych rozważaniach przyjmuje postać:

$$\mu = \sum_{q=1}^Q \mu_q Z_q \quad (21)$$

czyli jest sumą cząstkowych właściwych szybkości wzrostu poszczególnych stref. Dodać tutaj należy, że szybkość wzrostu danej strefy q jest funkcją warunków środowiska. Przechodząc do bilansu szybkości reakcji metamorfozy u :

$$\sum_{k=1}^K \delta_{kq} u_k = \Delta_q^T u \quad \text{dla } q = 1, \dots, Q \quad (22)$$

Sumarycznie uzyskujemy bilans dla pojedynczej strefy:

$$U_q = \Delta_q^T u + \mu_q Z_q - \mu Z_q \quad (23)$$

gdzie μZ_q jest iloczynem uwzględniającym zmniejszenie stężenia danej strefy ze względu na przyrost biomasy.

Wreszcie dla całego mikroorganizmu równanie w postaci macierzowej przedstawia się następująco:

$$U = \Delta^T u + MZ - \mu Z \quad (24)$$

Przy tym podejściu do modelowania cyfrowa analiza obrazu może również dostarczyć potrzebnych informacji. Wyznaczenie stref fizjologicznych na bazie obrazów strzępek o różnym zabarwieniu jest względnie proste. Tutaj wystarczy obliczenie pola powierzchni rzutu strzępki o danym zabarwieniu.

Jednocześnie należy w tym miejscu podkreślić, że model ten nie dotyczy wyłącznie grzybów nitkowych. Ułamek strefy może być z powodzeniem interpretowany jako część populacji mikroorganizmów jednokomórkowych o pewnej właściwości fizjologicznej. Stąd możliwość zastosowania tego podejścia do modelowania wzrostu bakterii lub drożdży.

4.1. Modele segregacji dla drożdży

Drożdże, chociaż są organizmami jednokomórkowymi, to w czasie wzrostu znacznie się różnicują ze względu na proces pączkowania. W wyniku pączkowania drożdży powstaje komórka potomna, która nie jest identyczna z komórką rodzicielską pod względem morfologicznym.

Cazzador i Mariani w 1990 r. [8] zaproponowali model dla kultury oscylujących drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Całą populację drożdży podzielili oni na pącz-

kujące Z_b i niepączkujące Z_u . Jako parametr charakteryzujący to, czy dana komórka się podzieli, czy też nie, uznali oni krytyczną masę komórki i znaleźli empiryczną zależność:

$$m_{\text{div}}(a_g, s) = \left[m_{\text{div, min}} + (m_{\text{div, max}} - m_{\text{div, min}}) \frac{s^3}{s^3 + K^3} \right] \left(1 + k_1 \frac{1 - k_2^{a_g}}{1 - k_2} \right) \quad (25)$$

gdzie a_g jest wiekiem genealogicznym komórki.

Reakcje metamorfozy poszczególnych form morfologicznych drożdży przedstawić można zestawem równań:

$$-Z_b + Z_u = 0; \quad u_b = k_b Z_b \quad (26)$$

$$-Z_u + Z_b = 0; \quad u_u = k_u Z_u \quad (27)$$

Równania (26) odpowiadają podziałowi komórek, a równanie (27) tworzeniu pączka. Stałe szybkości reakcji metamorfozy zostały określone za pomocą równań:

$$k_b = \mu \frac{h - 1}{h \ln(h)} \quad (28)$$

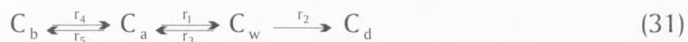
$$k_u = \mu \frac{1}{\ln(1 / (h - 1))} \quad (29)$$

gdzie: $h = m_{\text{div}}/m_{\text{bud}}$, czyli jest stosunkiem masy krytycznej komórki dzielącej się do pączkującej.

Prosty podział całej populacji komórek drożdży na cztery kategorie, którego celem było oszacowanie stężenia biomasy w bioreaktorze pracującym w układzie dolewowym, zaproponowali Popova i Patarinska [9]. Komórki drożdży zostały podzielona na komórki aktywne C_a , pączkujące C_b , osłabione C_w i martwe C_d :

$$C = C_a + C_b + C_w + C_d \quad (30)$$

Pomiędzy nimi zachodziło pięć reakcji metamorfozy zgodnie ze schematem:



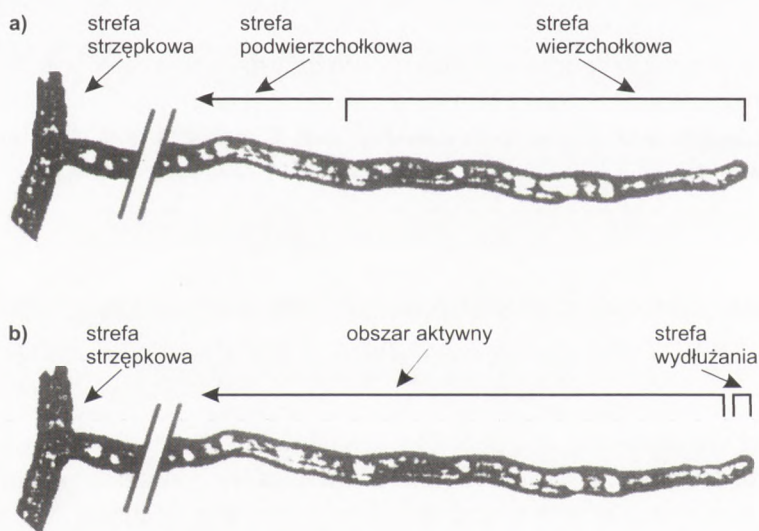
Chociaż ten model nie uwzględniał wielu istotnych czynników wpływających na wzrost drożdży, jakim jest chociażby skład podłoża, to dobrze on oddaje ideę podziału całej populacji komórek na grupy charakteryzujące się pewnym stanem fizjologicznym.

4.2. Modele stref fizjologicznych dla grzybów nitkowych

Najstarszym podziałem strzępki na strefy fizjologiczne jest, proponowany przez Nielsena i Villadsena i opierający się na wcześniejszych założeniach Megee i wsp., podział na komórki wierzchołkowe (*apical cells*), podwierzchołkowe (*subapical cells*) i strzępkowe (*hyphal cells*). Pokazane jest to na rysunku 4a.

Przykładem takiego podejścia jest morfologicznie strukturalny model wzrostu i różnicowania się strzępek grzybni *Aspergillus oryzae* wytwarzającej α -amylazę sformułowany przez Aggera i wsp. [11]. Wykorzystali oni dwa barwniki fluorescencyjne Calcofluor White oraz 3,3'-diheksylokarbocyjaninę, aby uzyskać nieco inny niż tradycyjny podział stref: na strefę wydłużania, obszar aktywny i strefę strzępkową (rys. 4b). Było to możliwe dzięki detekcji aktywnych mitochondriów w najbardziej aktywnych strefach za pomocą zastosowanych barwników fluorescencyjnych. Zgodnie z wspomnianym bilansem sformułowany został model matematyczny (w zapisie zamiast Z jako udział strefy pozostaje x, jak zapisali to autorzy):

$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_e \\ x_a \\ x_h \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (32)$$



Rys. 4. Różny podział strzępek grzybów nitkowych (na podstawie propozycji Nielsena i Villadsena oraz Aggera i wsp., zmienione [7,11]).

Szybkość rozgałęziania wyraża się następującym równaniem:

$$q_1 = \begin{cases} 0 & \text{jeżeli } \frac{x_a}{c_n} < \left(\frac{x_a}{c_n}\right)_0 \\ \frac{k_1 s}{a(s + K_{s1})} \cdot X_a & \text{jeżeli } \frac{x_a}{c_n} \geq \left(\frac{x_a}{c_n}\right)_0 \end{cases} \quad (33)$$

gdzie a – jest współczynnikiem, a c_n – całkowitym stężeniem strzępek.

Szybkość różnicowania się grzybni jest wprost proporcjonalna do stężenia obszaru aktywnego:

$$q_2 = k_2 x_a \quad (34)$$

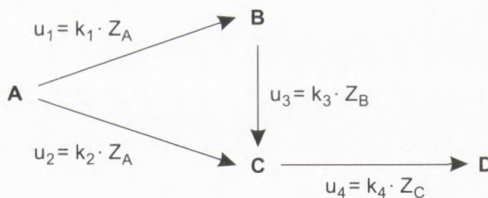
natomiast szybkość wzrostu obszaru aktywnego to:

$$q_3 = \frac{k_3 s}{s + K_{s3}} \frac{x_a / c_n}{x_a / c_n + K_3} a x_e \quad (35)$$

Właściwa szybkość wzrostu biomasy jest zależna od udziałów wszystkich stref fizjologicznych:

$$\mu = \frac{q_s}{x_e + x_a + x_h} \quad (36)$$

Innym tego rodzaju modelem wzrostu i różnicowania się biomasy jest model dla *Aspergillus niger*, w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego [12]. W tym modelu wykorzystana została metoda barwienia różnicowego strzępek grzybni za pomocą błękitu metylenowego i fuksyny zasadowej wg Ziehla [13]. Uzyskane zostały cztery strefy fizjologiczne o różnym zabarwieniu: strefa aktywna rosnąca „A”, strefa zwakuolizowana „B” oraz dwie strefy mało aktywne, strefa przejściowa „C” i strefa właściwie nieaktywnych komórek „D”. Poszczególne strefy ulegały reakcjom metamorfozy zgodnie ze schematem na rysunku 5 [1,12].



Rys. 5. Schemat reakcji metamorfozy grzybni *Aspergillus niger* w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego [12].

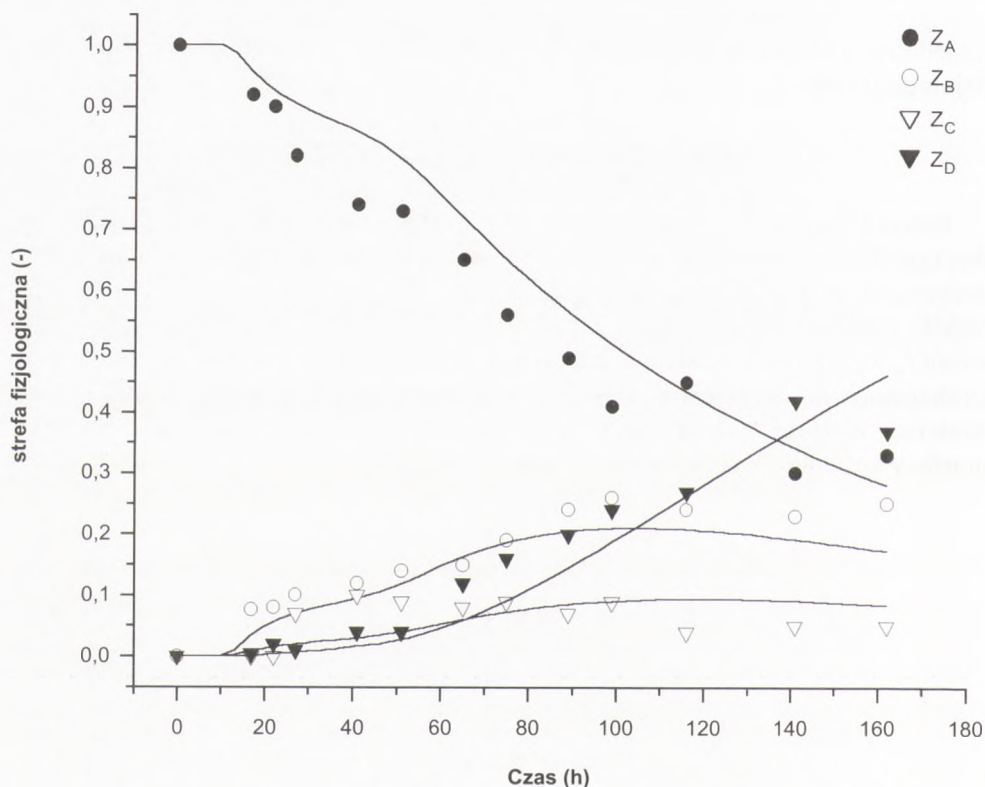
Bilans stref fizjologicznych w postaci macierzowej przedstawiał się następująco:

$$\frac{dZ}{dt} = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \mu_A & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} Z_A \\ Z_B \\ Z_C \\ Z_D \end{pmatrix} - \mu \cdot \begin{pmatrix} Z_A \\ Z_B \\ Z_C \\ Z_D \end{pmatrix} \quad (37)$$

co w efekcie dawało układ równań bilansowych:

$$\frac{dZ_A}{dt} = -u_1 - u_2 + Z_A \cdot (\mu_A - \mu) \quad (38)$$

$$\frac{dZ_B}{dt} = u_1 - u_3 - Z_B \cdot \mu \quad (39)$$



Rys. 6. Porównanie danych eksperymentalnych i krzywych symulowanych w modelu stref fizjologicznych dla *Aspergillus niger* w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego [12].

$$\frac{dZ_C}{dt} = u_2 + u_3 - u_4 - Z_C \cdot \mu \quad (40)$$

$$\frac{dZ_D}{dt} = u_4 - Z_D \cdot \mu \quad (41)$$

Właściwa szybkość wzrostu biomasy wyrażała się równaniem:

$$\mu = \mu_a \cdot Z_A \quad (42)$$

Oczywiście równania te muszą być uzupełnione o równania bilansujące skład podłoża, czyli substraty, biomasę oraz kwas cytrynowy (tu nie pokazywane), gdyż μ_a jest funkcją tych wielkości. Porównanie danych eksperymentalnych dla poszczególnych stref fizjologicznych z krzywymi symulowanymi przedstawione jest na rysunku 6 [12].

5. Podsumowanie

Cyfrowa analiza obrazu pozwala na ilościowe określanie właściwości mikroorganizmów poprzez pomiar ich wielkości, kształtu oraz koloru odzwierciedlających odpowiednio zmiany morfologiczne i fizjologiczne. Uzyskawszy te dane, możliwe jest ich wykorzystanie do formułowania i weryfikacji morfologicznie strukturalnych modeli matematycznych wzrostu mikroorganizmów. Najczęstszym obiektem w tego rodzaju badaniach są grzyby nitkowe, ale również można wykorzystywać omówione techniki do modelowania wzrostu drożdży, a także bakterii.

Literatura

1. Bizukojć M., Ledakowicz S., (2003), *Biotechnologia*, 3(62), 207-232.
2. Paul G. C., Thomas C. R., (1998), *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 60, 2-59.
3. Bizukojć M., (2002), *Modelowanie wzrostu Aspergillus niger z wykorzystaniem cyfrowej analizy obrazu* – praca doktorska, Politechnika Łódzka.
4. Nielsen J., Krabben P., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 588-598.
5. Paul G. C., Kent C. A., Thomas C. R., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 11-23.
6. Spohr A., Dam-Mikkelsen C., Carlsen M., Nielsen J., Villadsen J., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 541-553.
7. Nielsen J., Villadsen J., (1994), *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, London.
8. Cazzador L., Mariani L., (1990), *European Congress on Biotechnology*, 5, 342, materiały konferencyjne, Copenhagen.
9. Popova S., Patarinska T., (1998), *Bioproc. Eng.*, 19, 313-315.
10. Megee R. D., Kinoshita S., Frederickson A. G., Tsuchiya H. M., (1970), *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 771-801.
11. Agger T., Spohr A., Carlsen M., Nielsen J., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 321-329.
12. Bizukojć M., Ledakowicz S., (2003), *Enz. Microb. Technol.*, 32, 268-281.
13. Vanhoutte B., Pons M. N., Thomas C. R., Louvel L., Vivier H., (1995), *Biotechn. Bioeng.*, 48, 1-11.