

Baktériumos biopreparátumok tanulmányozása és jellemzése a biomassza megközelítő növekedési görbéje alapján

Study and Characterization of Bacterial Bio-preparates Using the Approximated Biomass Growth Curves

Studiul și caracterizarea biopreparatelor bacteriene folosind curbe de aproximare a creșterii biomasei

MÉSZÁROS Sándor¹, LASLO Éva¹, SZILÁGYI József², LÁNYI Szabolcs¹

¹Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem,
Műszaki és Társadalomtudományok Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda,
²Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományok Kar,
Élelmiszermérnöki Tanszék, Csíkszereda,
Szabadság tér 1. sz, tel: 0266317121, fax: 0266372099,
meszarossandor@sapientia.siculorum.ro, www.csik.sapientia.ro

ABSTRACT

In our study we examined at laboratory stage the growth of the biomass of bacterial strains, individually or in the presence of each other, on various media in order to improve the fields of agricultural production, since this strains constitute the basis of agricultural biopreparates. To process the experimental data we used a computational method based on a function with six coefficients, determined by nonlinear regression analysis.

ÖSSZEFOGLALÓ

Tanulmányunkban laboratóriumi fázisban vizsgáltuk a mezőgazdasági termelési hozamok növelését elősegíteni hivatott biopreparátumok előállításához felhasználandó baktériumtörzsek biomasszájának növekedését különböző táptalajokon, egyenként, vagy egymás jelenlétében. A kísérleti eredmények feldolgozásához egy hat együtthatós, regressziós számítással meghatározott egyenletet használtunk fel.

1. Bevezető

A mezőgazdasági termelési hozamok növelését elősegíteni hivatott biopreparátumokat már az előkészítési fázisban, közvetlenül a megtervezést követően laboratóriumi teszteknek indokolt alávetni. E preparátumok aktív komponensei általában talajokból izolált baktériumok, melyek valamilyen módon elősegítik a kultúrnövények növekedését, a tápanyagfelvételt pl. nitrogén, foszfor, megfelelő táptalajban, valamilyen inert hordozón rögzítve.

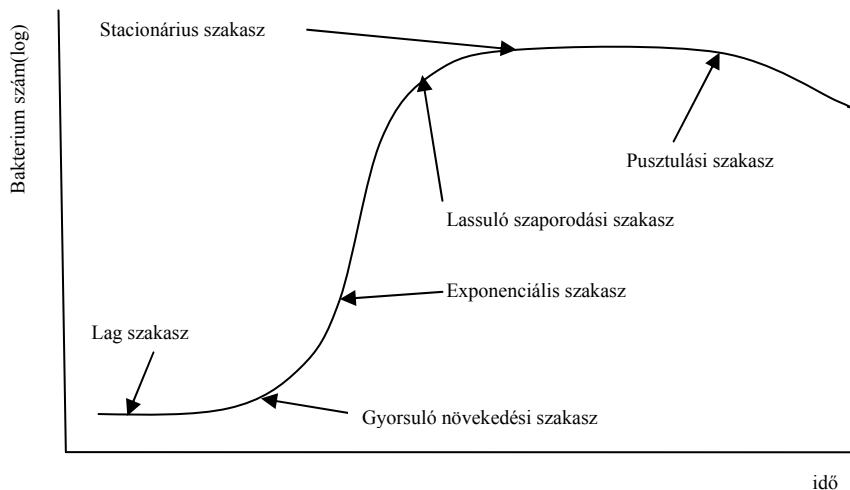
A tanulmány célja laboratóriumi fázisban vizsgálni e biopreparátumok előállításához felhasználandó baktériumtörzsek biomasszájának növekedését különböző táptalajokon, egyenként, vagy egymás jelenlétében.

A biopreparátumokkal kapcsolatosan a következő kérdésekre keresünk válaszokat:

- A.** A mikroorganizmusok életképességét illetően:
- Életképes-e a megfigyelt baktérium az adott táptalajon?
 - Milyen maximális növekedési sebességet ér el a baktériumtenyészet?
 - Az adott körülmények között mekkora a populáció elérhető nagysága?
- B.** A mikroorganizmusok kompatibilitását illetően:
- Hogyan változik a tenyészet növekedési sebessége más mikroorganizmusok jelenlétében?
- A feltett kérdések megválaszolására a mikroorganizmusok növekedésének kinetikájáról szerzett elméleti eredmények és gyakorlati tapasztalatok felhasználását tartottuk célszerűnek.

Egy megfelelő környezetbe juttatott baktériumsejt bizonyos adaptációs idő elteltével osztódni, szaporodni kezd. Az így keletkező biomassza növekedése, a sejtek számát értve, egyre gyorsul, egy maximális sebességet elérve, majd lassulni kezd, majd növekedése megáll. A biomassza mennyiségének időbeni függvénye

ábrázolását nevezzük a továbbiakban növekedési görbének (1. ábra). A növekedési görbe különböző szakasza- it a Monod-féle kinetikai modell nomenklatúrája szerint neveztük meg. Így a következő szakaszokat külön- böztetjük meg: lag vagy lappangási, gyorsuló növekedési, exponenciális, lassuló szaporodási, stacionárius és pusztulási szakaszokat. A baktérium-populáció nagy egyedszáma miatt a gyakorlatban célszerűbb az egyedek számának logaritmusát ábrázolni az abszcisszán. Így egy fél logaritmikus koordináta rendszerben való ábrázo- lást használunk.



1. ábra
Mikroorganizmusok szaporodási görbéje

A baktériumtenyészet viselkedésének leírására alkalmazott különböző modellek legtöbbször a mikroor- ganizmus tenyészetet jellemző növekedési sebességet, vagy az ezzel összefüggő osztódási rátát, generációs időt írják le, adott körülmények között, kisebb-nagyobb sikerrel. A lag fázis modellezésében gyengébb sikere- ket értek el (Bárányi, J., 2002).

Az 1. ábrán leírt növekedési dinamika egy idealizált eset, amely megközelítőleg matematikailag model- lezhető egy módosított Gompertz logisztikai függvénnyel.

Kiindulva a populációk növekedésének kinetikai egyenletéből, a növekedési sebesség dN/dt kifejezhető egy differenciál egyenlet segítségével:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (1)$$

ahol N az egyedek száma adott időpontban, r a sebességállandó, vagyis a maximális növekedési sebesség, N_{max} az egyedek elérhető maximális száma a stacionárius szakaszban.

Az N_{max} paramétert gyakran a tenyészet külső körülményeinek eltartó képességéhez kötik. N értéke aszimptotikusan közeledik az N_{max} paraméter értékéhez, így a logisztikai függvény ebben a formában nem tudja leírni a hanyatlási vagy pusztulási szakaszt.

Hutchinson (1948) és később Gibson (1984) egy négy paraméteres egyenletet javasolnak:

$$\log N = A + \frac{C}{1 + e^{-B(t-M)}} \quad (2)$$

Ahol A , B , C , M , az egyenlet paraméterei, t pedig az idő, mint független változó. A (2) egyenletben már az egyedek számának logaritmusa, valamint $t-M$ módosított idő szerepel, ami a fél logaritmikus ábrázolást engedi meg (Fujikawa et al, 2004).

A Monod-féle kinetikai modelltől kiindulva különböző egyszerűsítő feltételek mellett – pl. állandó külső paraméterek megtartása – több modell-formát dolgoztak ki, pl. Hills–Wright, vagy Bárányi–Roberts, melyek több-kevesebb sikerrel használhatóak a prediktív mikrobiológiában (Bárányi et al. 1995; López, et al. 2004).

A tenyészet maximális növekedési sebességének meghatározására a növekedési görbe inflexiós pontjának koordinátáit használják, a lag fázis tartamára pedig az inflexiós ponton átmenő érintő és a $t=0$ pontban érintő vízszintes vonal metszéspontjából lehet következtetni (Perni et al. 2005).

Az (1) egyenletből kiindulva, egy inflexiós pont van, melynek koordinátái:

$$\frac{N_i}{N_\infty} = \left(\frac{1}{1+\theta}\right)^{1/\theta}, \text{ és } t_i = \frac{1}{\lambda\theta} \ln \left(\frac{(N_\infty/N_0)^\theta - 1}{(N_\infty/N_i)^\theta - 1}\right)$$

Mivel a rendelkezésre álló kísérleti eredmények szerint az inflexiós pont koordinátái eltérnek a fenti értékektől, egy nyílt végű logisztikai egyenletet javasoltak, ahol az N_{max} paramétert már változónak tekintik. Így a logisztikai egyenlet a következő formájú lesz:

$$\frac{dN}{dt} = \lambda N \left[1 - \left(\frac{N}{N_\infty}\right)^\theta\right] \quad (3)$$

A (3) egyenletben a következő változások történtek az (1) egyenlethez képest:

Bevezetődött egy növekedést határoló tényezőt f_{limD} :

$$\lambda = r \cdot f_{limD}$$

Valamint az θ exponenciális tényező és a N_∞ egyedek számának aszimptotikus értéke. Így az inflexiós pont koordinátái a következők lesznek (Thornley et al, 2007):

$$\frac{N_i}{N_\infty} = \left(\frac{1}{1+\theta}\right)^{1/\theta}, \text{ és } t_i = \frac{1}{\lambda\theta} \ln \left(\frac{(N_\infty/N_0)^\theta - 1}{(N_\infty/N_i)^\theta - 1}\right)$$

Ebben az esetben is 4 paraméterre van szükség az inflexiós pont meghatározásához.

Mivel a determinisztikus modellek nem voltak alkalmasak a tenyészetek növekedési dinamikájának leírására, biotechnológiai alkalmazásokra inkább a sztochasztikus modellek különböző formáját használják. (Bárányi, J., 2002; Kutalik et al, 2005).

A neoklasszikus modellek számba veszik a nagyon bonyolult metabolikus folyamatokat és a sejtek kölcsönhatását a környezetükkel. Ebben az esetben a kvadratikus illesztés módszerének alkalmazása gyakorlati szempontból ajánlott. Ezek a modellek az exponenciális vagy logaritmikusság inflexiós pontjának helyzetét és a lag szakaszt az exponenciális szakasszal összekötő gyorsuló növekedési szakasz illesztésére helyezik a hangsúlyt. A felépített modell egy másodrendű differenciál egyenletrendszer, mely lebontható bizonyos egyszerűsítő körülmények között egy első rendű egyenletrendszerre. Két peremfeltételre van szükség az egyenletrendszer megoldásához: a kezdeti sejt-koncentrációra valamint a tenyészet kezdeti növekedési sebességére (Vadasz et Vadasz, 2005).

Ha a mikroorganizmus tenyészetek modellezésénél a környezet terhelésbíró képessége is beszámítódik, akkor többlépcsős, lassan változó együtthatós egyenlettel modellezhető a stacionárius és az ezt követő fázis, amely hanyatlás után oszcilláló tendenciát mutat (Grozdanovski et al, 2009; Idlango et al, 2012).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Három baktériumtörzs, *Pseudomonas brassicacearum*, *Variovorax paradoxus* és *Ensifer sp.* és két táptalaj segítségével végeztünk kísérleteket. A *Pseudomonas brassicacearum*, *Variovorax paradoxus* és *Ensifer adherens* baktérium törzsek növekedési görbéjének felvételéhez a törzsek 24 órás tenyészeitől fiziológias oldatba 0.3 turbiditású inokulumot készítettünk. Az optikai sűrűséget Biolog Turbidiméterrel állítottuk be. Majd 5 mL Nutrient (pepton 5g/L, húskivonat 1g/L, élesztőkivonat 2g/L, NaCl 5g/L illetve komplex (pepton 10 g/L, glükóz 40 g/L, élesztőkivonat 10 g/L) tápleveseket 25 µL inokulummal oltottuk be, majd mikrotitráló lemezre pipetáztunk 250 µL-t 5-szörös ismétlésbe. 48 órán keresztül 15 perces időközönként mértük 584 nm hullámhosszon az abszorbanciát FluostarOptima fluoriméter segítségével. Az abszorbanciát mint optikai sűrűséget is tekinthetjük.

A Lambert-Buguer-Beer törvényt alkalmazva, az abszorbancia:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

Ahol A az abszorbancia értéke, ε a fajlagos abszorbancia, c a fényt elnyelő komponens töménysége, l az optikai út hossza. Tekintve, hogy a fényt elnyelő komponens a mikroorganizmusok alkotják, ezeknek a koncentrációját vesszük számításba:

$$c = \frac{N}{V} = \frac{4N}{\pi \cdot d^2 \cdot l} \quad (5)$$

Ahol V a minta térfogata, d a minta átmérője, l pedig ennek a magassága. Behelyettesítve:

$$A = \frac{4\varepsilon}{\pi \cdot d^2} \cdot N = K \cdot N \quad (6)$$

Itt K a módszer állandójának tekinthető. Ennek értéke meghatározható, ha ismert N_0 yedszámú tenyészetnek az A_0 abszorbanciáját meghatározzuk:

$$K = \frac{A_0}{N_0} \quad (7)$$

A mikroorganizmusok szaporodási sebességét (egyedszám/óra) meghatározhatjuk, ha az optikai sűrűség növekedési sebességét megszorozzuk a K állandóval.

A mikroorganizmus tenyészeteket két értékkel jellemeztük: a maximális növekedési sebességgel (h^{-1}) és a tenyészet maximális sejtszámával. A lag fázis hosszát nem tekinthettük a tenyészet jellemzőjének, mivel a kísérletek során ebben a fázisban a párhuzamosan meghatározott értékek között számottevő eltérések voltak.

A mért abszorbancia értékek segítségével egy 6 együtthatós függvény együtthatóit határoztunk meg, nemlineáris regresszióval, MATLAB környezetben:

$$A = \frac{b_1 + b_2 \cdot e^{b_3 \cdot t}}{b_4/t + b_5 \cdot e^{b_6 \cdot t}} \quad (8)$$

Ahol A az optikai sűrűség (abszorbancia), b_1, \dots, b_6 a regressziós függvény együtthatói, t a táptalajra való leoltástól eltelt idő, órában mérve.

A (8) függvény segítségével, numerikus deriválással meghatároztuk az optikai sűrűség növekedési sebességét (dA/dt), meghatároztuk az optikai sűrűség maximális növekedési sebességét, majd ebből kiszámítottuk a maximális sejtszám-növekedési sebességet (h^{-1}).

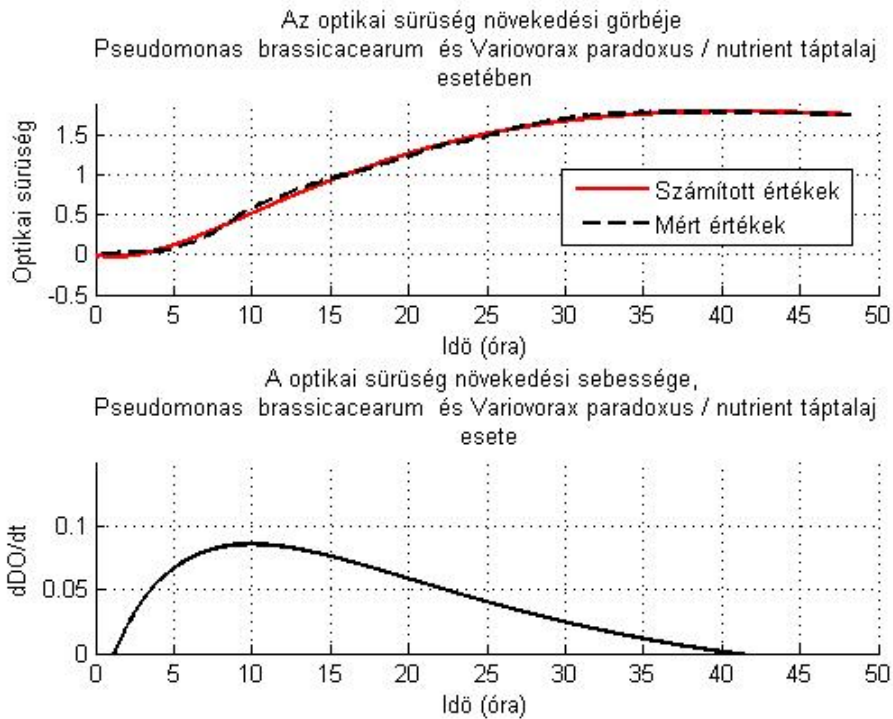
1. Eredmények

A különböző esetekre meghatározott együtthatókat az 1.sz. táblázat tartalmazza:

1. sz. táblázat: A (8) regressziós függvény kísérleti eredmények alapján kiszámított együtthatói

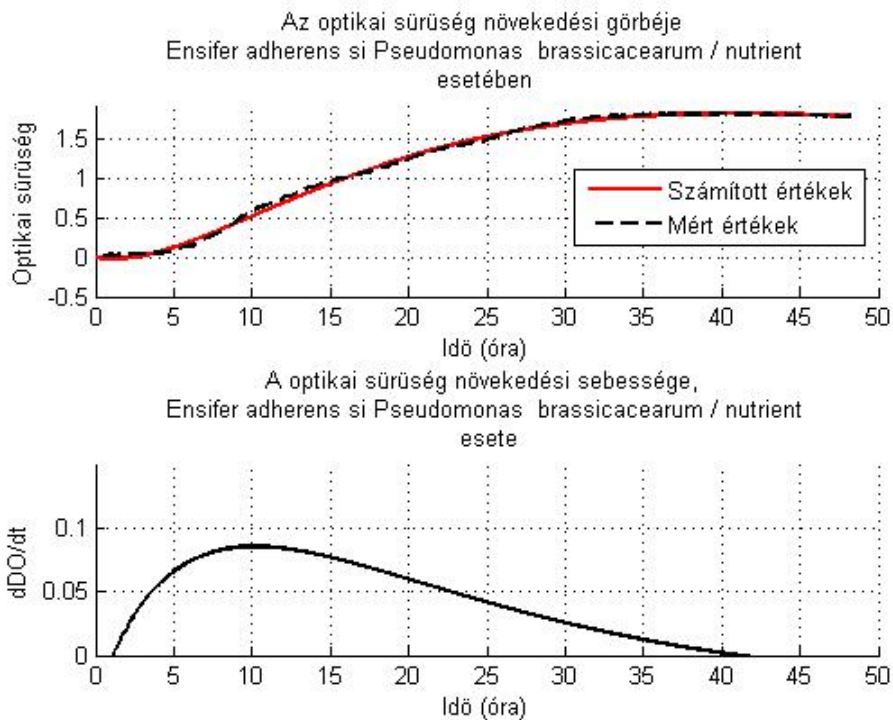
Tenyészet megnevezése	b1	b2	b3	b4	b5	b6
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	-2.182E+00	2.228E+00	-8.410E-03	-1.188E+00	-1.023E-01	2.667E-02
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	-2.190E+00	2.235E+00	-8.878E-03	-1.345E+00	-1.064E-01	2.644E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	-2.169E+00	2.169E+00	4.787E-06	3.438E-04	6.388E-05	2.881E-02
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	1.186E+03	3.890E-01	4.029E-01	5.387E+04	3.798E-01	3.893E-01
<i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	2.169E+03	6.098E-01	4.197E-01	1.253E+05	5.498E-01	4.090E-01
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	1.582E+00	8.296E-01	1.313E-01	1.339E+02	4.238E-01	1.275E-01
<i>Ensifer adherens</i> / nutrient	-1.112E+00	4.912E-01	1.717E-01	1.488E+02	8.875E-01	1.600E-01
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	-4.562E-01	1.229E+00	9.041E-02	8.535E+01	4.519E-01	9.352E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	-2.029E+00	1.640E+00	5.590E-02	2.588E+01	4.095E-01	6.460E-02
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	1.714E+07	1.893E-05	1.298E+00	2.557E+09	1.405E-04	1.248E+00
<i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	-3.977E-01	1.155E-01	1.135E-01	1.545E+01	1.705E+00	4.733E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	-1.544E+00	8.240E-01	1.876E-01	2.883E+01	6.560E-01	1.787E-01
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	4.020E-01	1.099E+00	1.009E-01	1.234E+02	4.270E-01	1.029E-01

A regressziós függvényeket és a mért eredményeket valamint a regressziós függvények numerikus deriválásával számított optikai sűrűség növekedési sebességét a 2-14. ábrákon mutatjuk be.



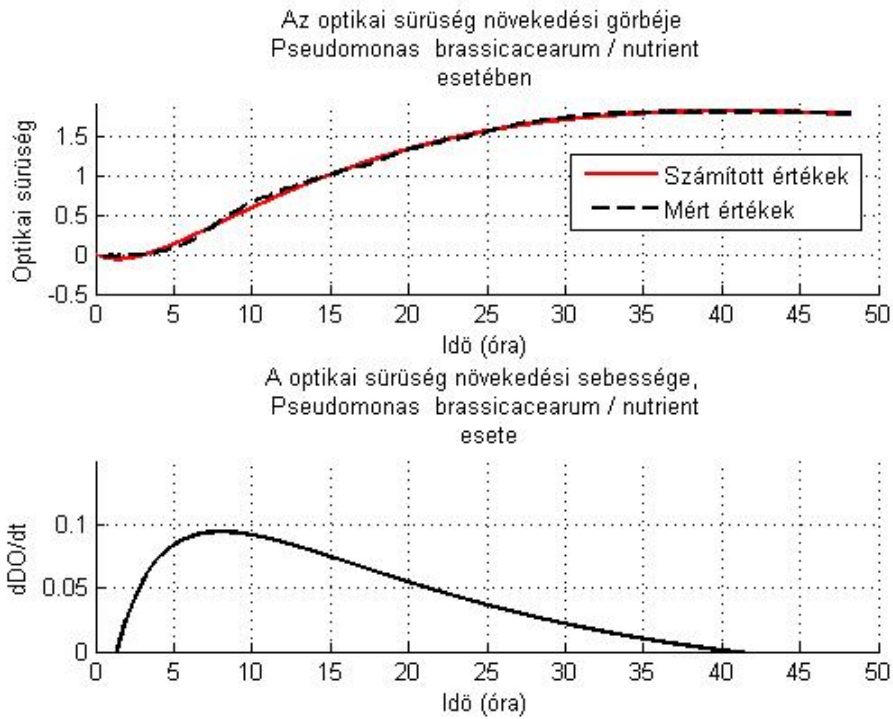
2. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai növekedési sűrűség sebessége
Pseudomonas brassicacearum és Variovorax paradoxus nutrient táptalajon*



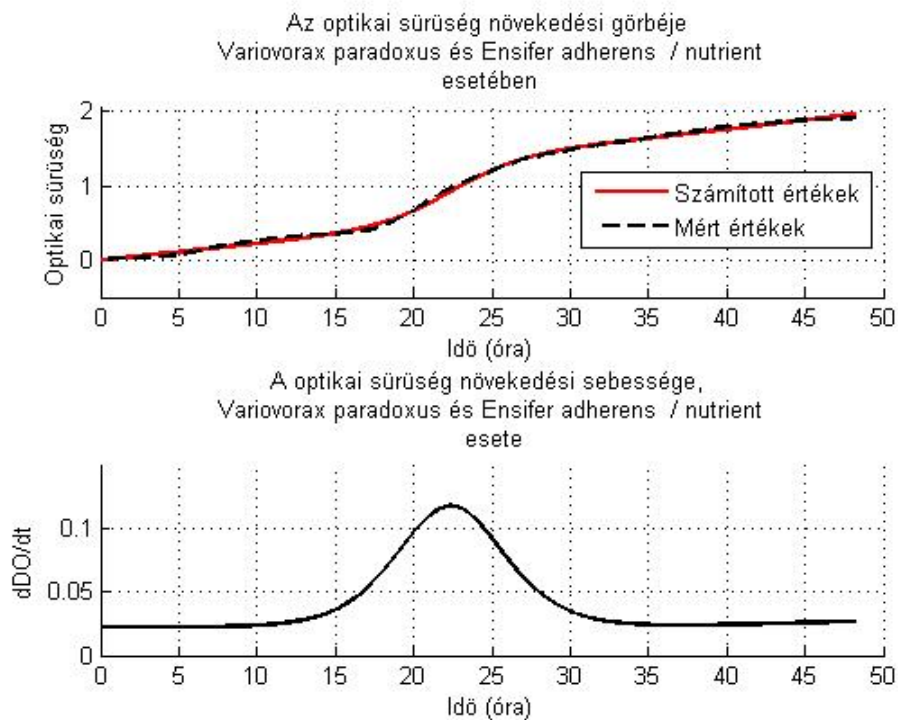
3. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens és Pseudomonas brassicacearum nutrient táptalajon*



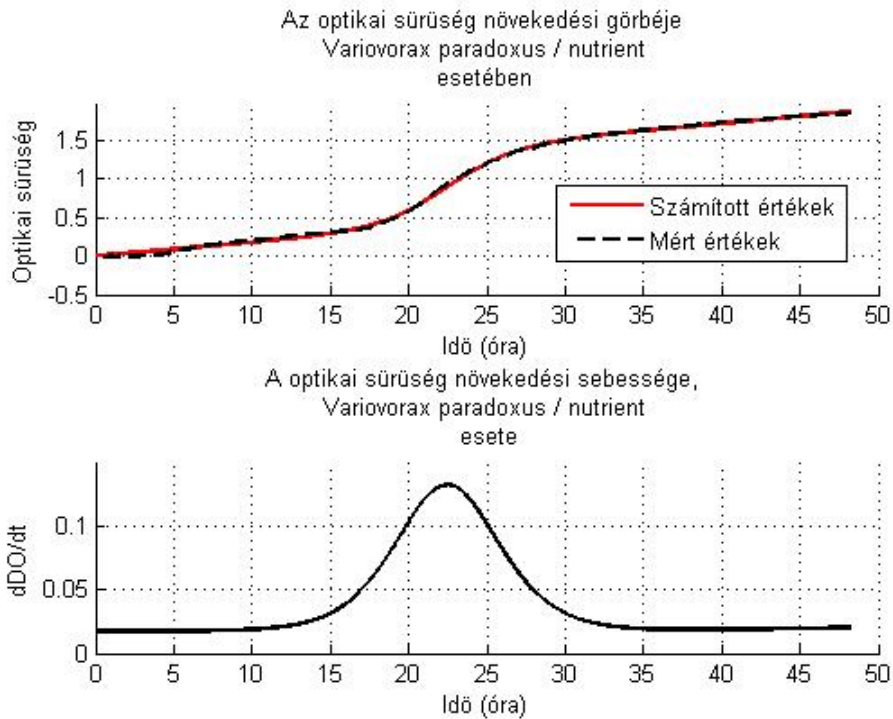
4. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum nutrient táptalajon*



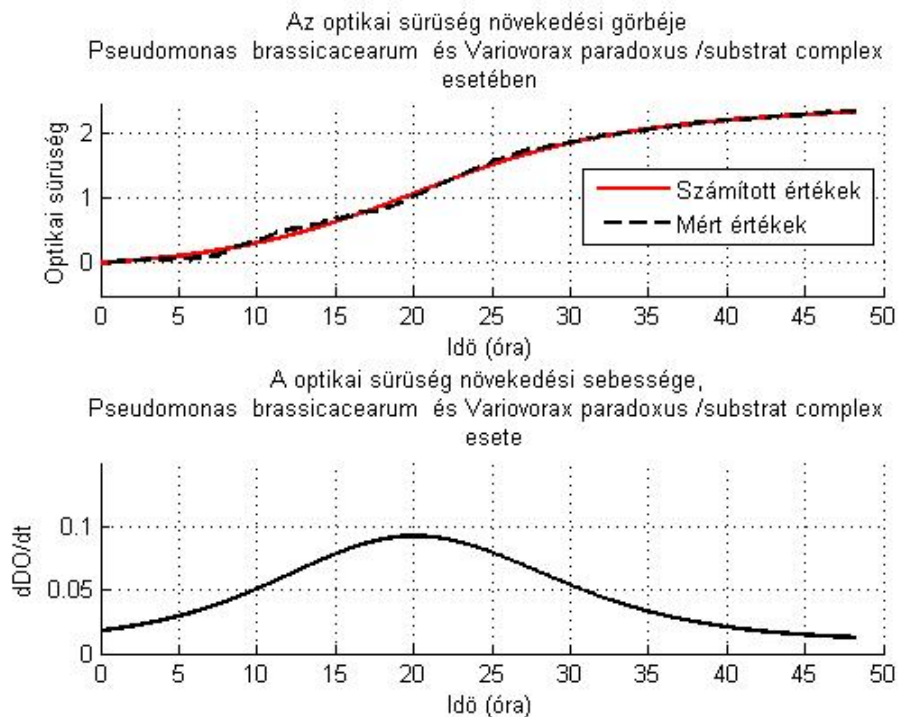
5. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus és Ensifer adherens nutrient táptalajon*



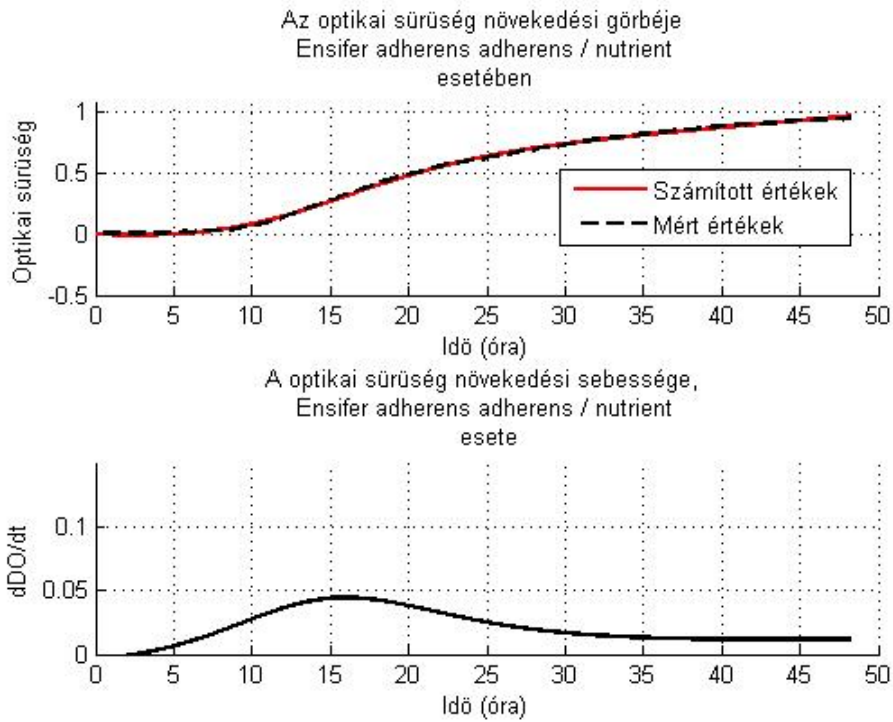
6. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus nutrient táptalajon*



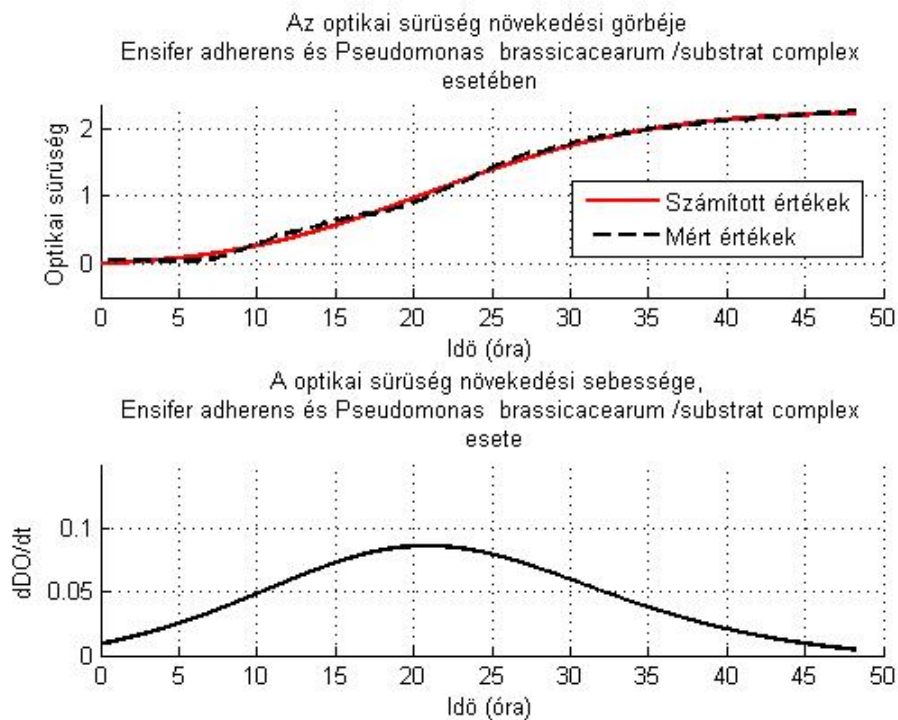
7. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum és Variovorax paradoxus komplex táptalajon*



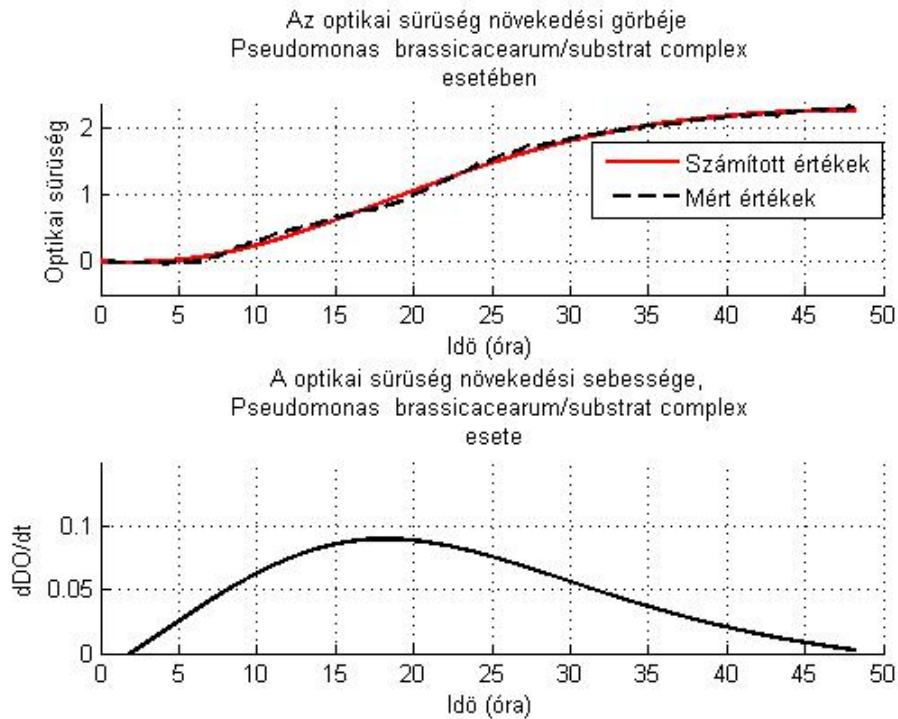
8. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens nutrient táptalajon*



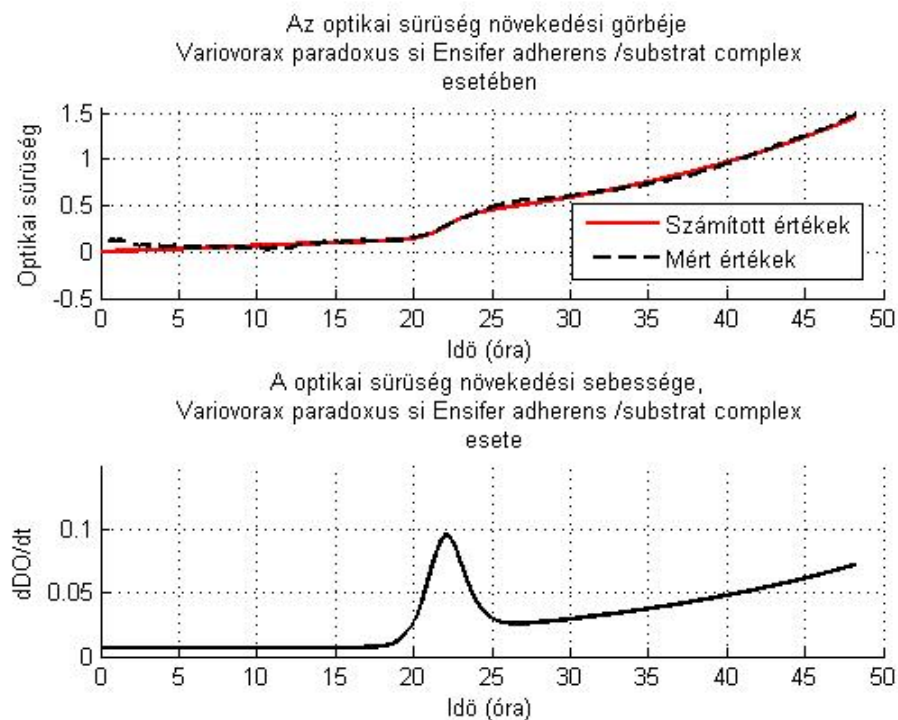
9. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens és Pseudomonas brassicacearum komplex táptalajon*



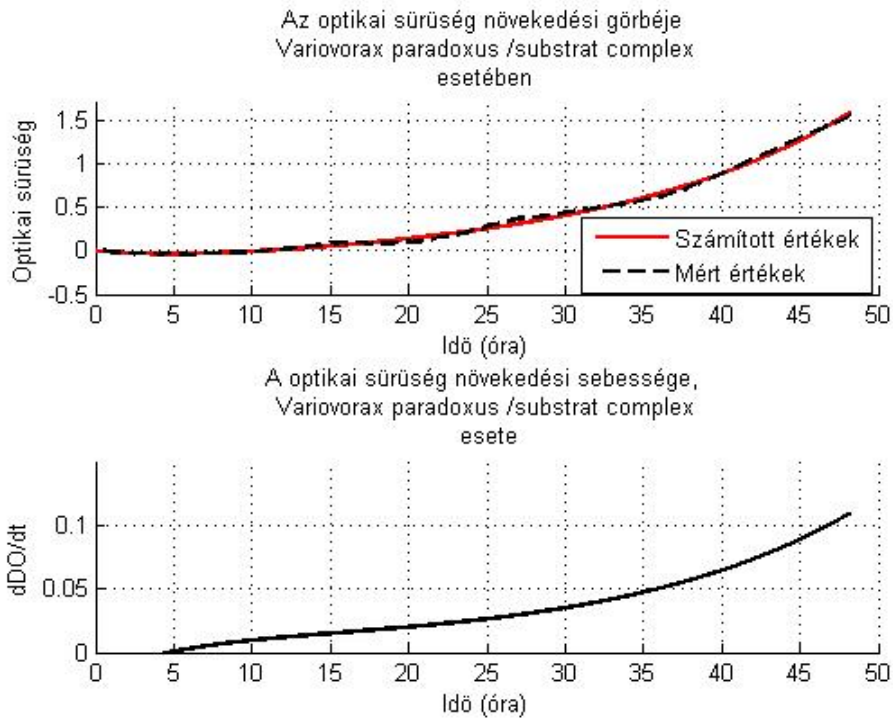
10. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum komplex táptalajon*



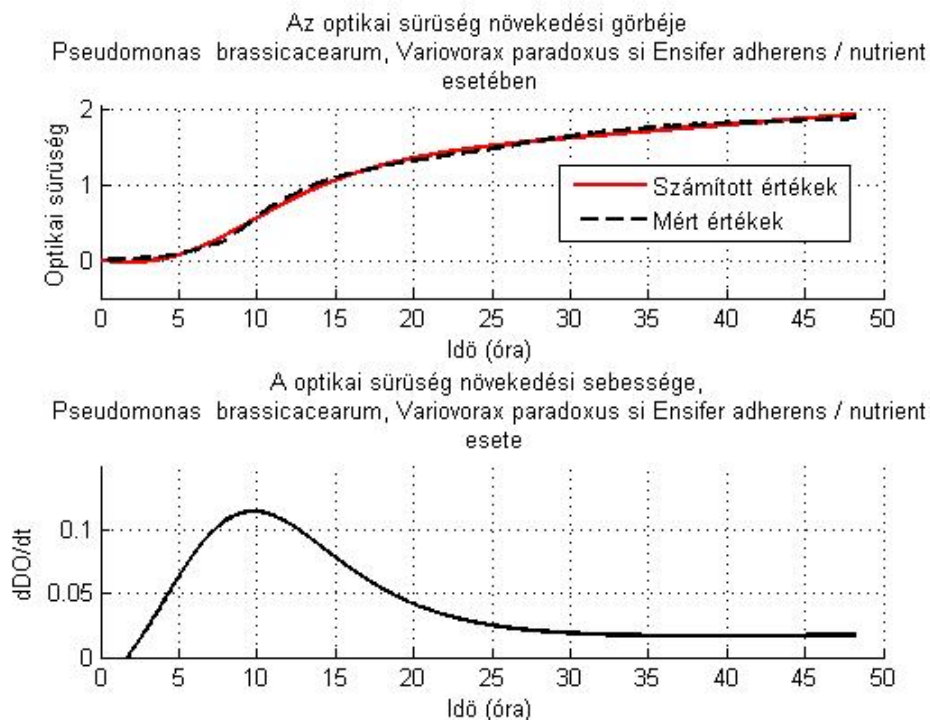
11. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus és Ensifer adherens komplex táptalajon*



12. ábra

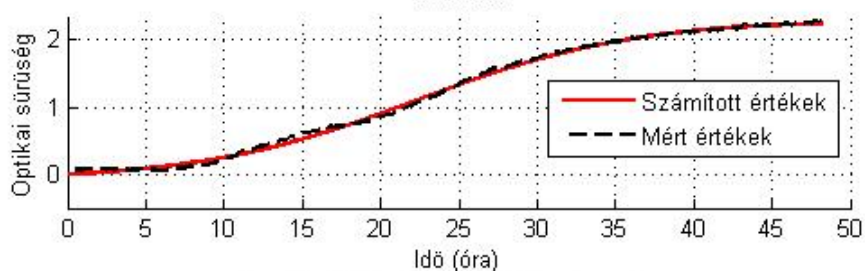
*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus komplex táptalajon*



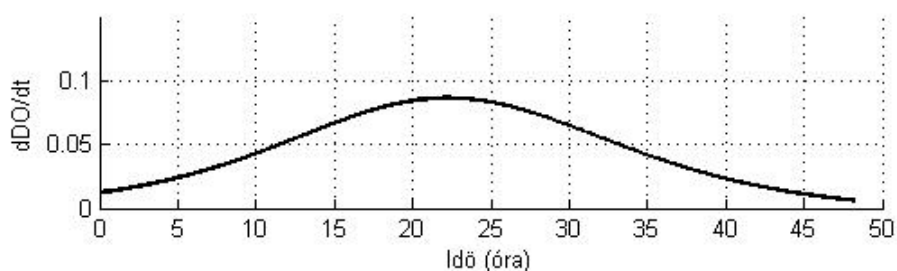
13. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum, Variovorax paradoxus és Ensifer adherens nutrient táptalajon*

Az optikai sűrűség növekedési görbéje
Pseudomonas brassicacearum, *Variovorax paradoxus* si *Ensifer adherens* /substrat complex
 esetében



A optikai sűrűség növekedési sebessége,
Pseudomonas brassicacearum, *Variovorax paradoxus* si *Ensifer adherens* /substrat complex
 esete



14. ábra

Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum, *Variovorax paradoxus* és *Ensifer adherens* komplex táptalajon

A tenyészetekre jellemző maximális sejtszám-növekedési sebességeket valamint a tenyészetekben elért maximális sejtszámokat, mint a tenyészeteket jellemző paramétereket, a 2. sz. táblázatban foglaltuk össze.

2. sz. táblázat: A mikroorganizmus tenyészetek maximális növekedési sebessége és a tenyészetenként elért maximális sejtszámok

Tenyészet megnevezése	Maximális növekedési sebesség (h ⁻¹)	Maximális sejtszám
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	3.598E+08	7.579E+09
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	2.710E+08	5.811E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	2.618E+09	5.043E+10
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	4.136E+08	6.938E+09
<i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	1.998E+09	2.816E+10
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	3.467E+08	8.727E+09
<i>Ensifer adherens</i> / nutrient	9.668E+07	2.121E+09
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	1.860E+08	4.824E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	4.624E+08	1.175E+10
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	9.793E+07	1.503E+09
<i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	3.382E+08	4.898E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	6.956E+08	1.174E+10
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	1.119E+08	2.914E+09

KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleti növekedési görbék (2-14. ábrák) nagyban eltérnek a Monod-elmélet által leírtaktól (1. ábra), így az egyszerűbb, 3-4 együtthatós egyenletek segítségével nem lehetett elfogadhatóan megközelíteni ezeket. Annak ellenére, hogy jelen tanulmányban alkalmazott regressziós egyenlet hat együtthatójának kiszámítása nehezebb, a számítással kapott növekedési görbék jól megközelítik a kísérleti eredmények segítségével felrajzolt növekedési görbéket.

A tenyészeteket jellemző maximális növekedési sebességekből következtetünk arra, hogy az *Ensifer adherens* lassan fejlődik a Nutrient táptalajon. Ugyanakkor észrevehető az *Ensifer adherens* és a *Variovorax paradoxus* kölcsönös inhibíciója. Ez a kölcsönös inhibíció nem volt észlelhető az *Ensifer adherens* és a *Pseudomonas brassicacearum* esetében. A legnagyobb életképességet a *Pseudomonas brassicacearum* esetében észleltük, mindkét típusú táptalajon, az *Ensifer adherens* és a *Variovorax paradoxus* jelenlétében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat elkészítéséhez anyagi támogatást nyújtott a Gazdasági versenyképesség növelése és a tudásalapú gazdaság fejlesztése program keretében támogatott POS-CEE 469/11817 „Mikrobiális oltóanyagok előállítása a haszonnövények védelme és produktivitásának növelése érdekében – BIOPREP” pályázat. (The laboratory experiments were prepared with the financial support from the “BIOPREP – Microbial biopreparates for increasing the productivity and crop protection” research funded by Sectorial Operational Programme, Increase of Economic Competitiveness Operation 2.1.1. of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection, through financial agreement POSCEE No. 469/11817.)

IRODALOM

- Bárányi, J., Roberts, T., A., Mathematics of predictive food microbiology, International Journal of Food Microbiology, 26(1995) p.199-218
- Bárányi, J., Stochastic modelling of bacterial lag phase, International Journal of Food Microbiology, 73(2002) p. 203-206
- Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures, Food Microbiology, 21(2004) p. 201-209
- Grozdanovski, T., Shepherd, J., J., Stacey, A., Multi-scaling analysis of a logistic model with slowly varying coefficients, Applied Mathematics Letters, 22(2009) p. 1091-1095
- Idlango, M., A., Shepherd, J., J., Nguyen L., Gear, J., A., Harvesting a logistic population in a slowly varying environment, Applied Mathematics Letters, 25(2012) p.81-87
- Kutalik, Zsófia Razaz, M., Bárányi, J., Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth, Journal of Theoretical Biology, 232(2005) p. 285-299
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M., S., France, J., Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth, International Journal of Food Microbiology, 96(2004) p. 289-300
- Perni, S., Andrew, P., W., Shama, G., Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything, Food Microbiology, 22(2005) p. 491-495
- Thornley, J., H., M., Shepherd, J., J., France, J., An open-ended logistic-based growth function: Analytical solutions and the power-law logistic model, Ecological Modelling 204(2007) p. 531-534
- Vadasz, P., Vadasz, A., S., Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth, International Journal of Food Microbiology, 102(2005) p. 257-275