

## Разпознаване на инфектирано с бактерии мляко чрез спектрален анализ в близката инфрачервена област

Петя Велева – Донева, Цветелина Драганова, Стефка Атанасова, Георги Беев

**Detection of infected with staphylococcus and streptococcus milk samples by spectral analysis:** *New approach for detection of milk samples infected with Staphylococcus and Streptococcus, based on analysis of spectral characteristics of diffuse reflectance in near-infrared region is proposed in the paper. Mathematical and statistical methods are used for data processing. The specific wavelengths about the chemical structure of milk samples are determined. Index for Staphylococcus and Streptococcus infected milk samples detection was created. Wavelet coefficients were used for recognition of infected milk samples.*

**Key words:** *Staphylococcus and Streptococcus, milk samples, NIR spectroscopy, Wavelet*

### ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години качеството и годността на хранителните продукти се превърна във въпрос от все по-голяма важност. Съставът на млякото, както и неговата годност са от съществено значение за млекопреработващата индустрия и за управлението на млекодобиващите ферми. Идентификацията на причинителите на бактериалните инфекции сред животните е от първостепенно значение за диагностицирането им и навременно лечение на редица болести.

Производството на млечни продукти зависи пряко от качеството на непреработеното мляко дефинирано в международен стандарт ISO 8420. Бактериалните инфекции при животните водят както до намаляване на млечния добив, така и до промени в млечния състав. Това от своя страна води до рязко влошаване на продуктивността и качеството на произведените млечни продукти. Млякото от крави, боледуващи от мастит, се характеризира с намалено съдържание на лактоза и промяна в състава на белтъчните фракции.

Класическият микробиологичен анализ на мляко и млечни продукти се основава на култивиране на микроорганизмите и изисква различни консумативи, химикали и висококвалифицирани специалисти. Резултатите, получени чрез този метод са обективни, точни и съпоставими. Недостатък е продължителността на анализите, трудоемкостта им и в повечето случаи - разрушаване на анализиранияте проби. Органолептичните методи за диагностициране на болестни състояния в резултат на бактериални инфекции при животните са субективни и зависят от квалификацията и опита на оценяващия. Това налага разработването на нови методи за експресно, неразрушително и обективно диагностициране.

Спектралните методи могат да бъдат алтернатива на класическите химически и микробиологични методи за анализ на мляко и млечни продукти. Инфрачервена спектроскопия се използва в микробиологията от около 15 години за идентификация и класификация на различни бактериални видове. При тези изследвания са използвани чисти бактериални култури и инфрачервените им спектри са получени чрез измерване на изсушени на пластинка от ZnSe или върху микробиологичен филтър бактериални суспензии. Същевременно чрез класическа инфрачервена спектроскопия не е възможно да се анализират проби с високо съдържание на вода като мляко и други биофлуиди, тъй като водата има много силна абсорбция в този диапазон. Проблемът може да бъде разрешен с използване на близката инфрачервена област (NIR). В този спектрален диапазон (от 700 до 2500nm) абсорбцията на водата е значително по-слаба и това дава възможност да се изследват силно абсорбиращи материали и проби с високо съдържание на вода като биофлуиди. Съществена разлика на този метод в сравнение с останалите спектрални методи е, че при него пробите се анализират без предварителна химична обработка, разтваряне, разделяне на компонентите и т.н. Анализът е

недеструктивен и пробите при анализа не се променят и могат да се анализират впоследствие чрез други методи. Съществено предимство на NIR метода е, че различни съставни части на една проба (вода, мазнини, захари, бактериален статус) могат да бъдат определяни едновременно [1]. Този метод не предизвиква вредни влияния върху продуктите и обслужващия персонал, което го прави много подходящ за контрол на процесите и следене на качеството.

В [3] са описани първите опити за използването на NIR спектроскопия за идентификация на бактериални видове. Анализират се бактерии от следните видове *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* и различни щамове от *Escherichia coli*. Използването на втора производна на NIR спектрите и анализ на главните компоненти (PCA) показва добро групиране на спектрите на бактериите от един и същи вид.

В [4] се изследват възможностите на спектралния анализ във близката инфрачервена област за едновременно определяне на електропроводимост (AEC) и соматични клетки (SCC) на нехомогенизирано мляко, както се прави и идентификация на основните патогени, по-специално *Staphylococcus aureus*, *Coagulate Negative Staphylococcus (CNS)* и *Streptococcus agalactiae*. Тези патогени причиняват бактериални инфекции (мастит) при животни. За класификация са използвани PLS регресия за количествен анализ и SIMCA метод, базирани на метода на главните компоненти.

В областта на обработката на сигнали уейвлит преобразуванията дават нови ефективни способы на обработка [2]. Те биха могли да се използват и за описание на някои недотам явни, скрити локални участъци, характеризиращи наличието на трудно различими детайли в изменението на сигнала.

Целта на статията е да се предложи подход за откриване на патогенни микроорганизми в проби от краве мляко чрез използване на спектроскопия в близката инфрачервена област, посредством индекс за наличие на бактерии и уейвлит преобразувания, на базата на абсорбцията на млечни проби на различни дължини на вълните.

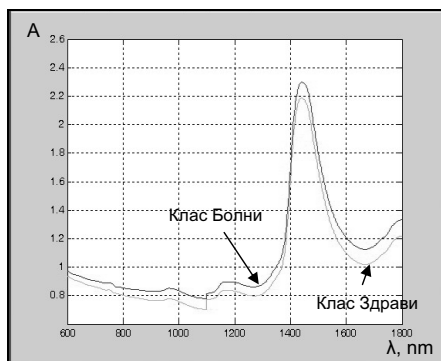
## ИЗЛОЖЕНИЕ

Изследвани са 400 на брой четвъртинкови проби от краве мляко. Те са анализирани за бактериален статус, като за изолиране и идентифициране на маститните патогени са използвани класическите микробиологични методи [5].

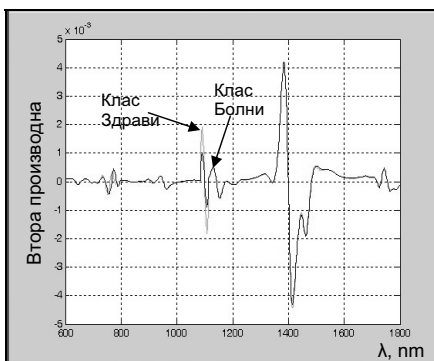
В 72 от пробите са открити *Staphylococcus aureus*, в 91 *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus uberis*, в 63 CNS и 174 проби са отрицателни за бактерии. Всички проби са анализирани непосредствено след получаването им със спектрофотометър NIRSystem 6500 чрез измерване на пропускане през слой мляко с дебелина 1 mm. Този апарат позволява да се получат спектралните данни в диапазона 400-2500 nm, като в настоящето изследване са използвани данни от 600 до 1800 nm. Спектралните данни са обработени с програмата Pirouette 3.1 (Infometrics, Inc., Woodinville, WA, USA), която по-нататък се използва за създаване на модели за класификация на данните.

Пробите, в които са изолирани бактерии са групирани в един клас. Отрицателните проби формират втори клас. Средните спектри за двата класа от обучаващата извадка са представени на фиг. 1. За тези спектри са получени вторите производни, представени на фиг. 2. Те показват кои са характерните абсорбционни максимуми за двата класа, както и на какво отговарят (водна абсорбция, протеини, лактоза и др.).

Описанието на дължините на вълните, които могат да бъдат полезни при определянето на здрави и болни проби е представено в табл. 1.



Фиг. 1 Средни стойности на абсорбцията на здрави и заразени проби



Фиг. 2 Втора производна на средните стойности на абсорбцията за двата класа

Таблица 1. Дължини на вълните и тяхната връзка с хим. групи

λ, nm	Описание
718	O-H
752	O-H
762	C-H
778	N-H
1084	C-H
1090	C-H
1108	O-H
1114	O-H

Тези дължини на вълните са свързани с присъствието и дейността на бактериите в него. Известно е, че наличието на мастит води до намаляване на съдържанието на основната въглехидратна фракция в млякото – лактозата. Хидролизира се част от казеина и се увеличават пониско молекулните протеинови фракции. Наблюдаваните промени в спектрите на дължини на вълните, свързани с абсорбция на O-H, C-H и N-H групи потвърждават наличието на такива изменения в млякото и са показател за инфектирано мляко. Поради това използваме индекс, по който бихме

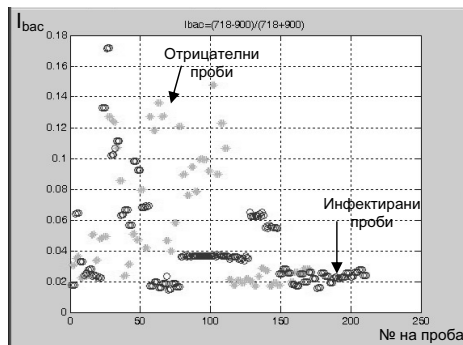
могли да съставим критерии за разпознаване на инфектирани проби мляко. Индексът се основава на абсорбцията на химичните групи, присъстващи в компонентите на млякото. За базова се приема абсорбцията на 900 nm - дължина на вълната, при която няма разлики между спектралните стойности за здрави и за заразени проби. Индексът за наличие на бактерии се изчислява с израза:

$$I_{bac} = \frac{A_{\lambda_i, ХИМ.ГР., nm} - A_{\lambda=900, nm}}{A_{\lambda_i, ХИМ.ГР., nm} + A_{\lambda=900, nm}}, \quad (1)$$

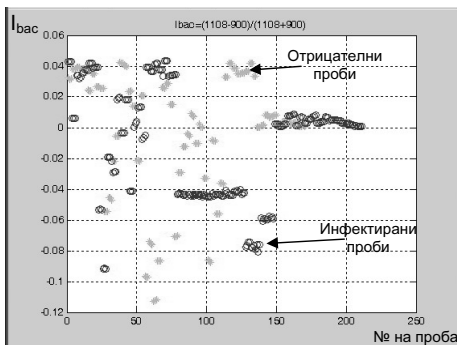
където  $A_{\lambda_i, ХИМ.ГР., nm}$  е абсорбцията за дължините на вълните, характеризиращи наличието на химични групи от състава на клетките на бактериите;  $A_{\lambda=900, nm}$  - абсорбцията за  $\lambda = 900 nm$ .

За пробите мляко от двете извадки са изчислени индексите по формула (1). На фиг. 3 и фиг. 4 са представени стойностите на индекса, изчислени за дължини на вълните съответно 718 и 1108 nm. От фигурите се вижда, че стойностите на индекса се припокриват и трудно би могло да се постигне точно разпознаване. Използването на спектралните данни за останалите дължини на вълните от таблица 1 при пресмятането на индекса за двата класа също показва припокриване и тези индекси не биха могли да се използват за разпознаване на инфектирано мляко. Резултатите показват, че различните бактерии променят по различен начин спектъра, защото имат различен метаболизъм, и тези промени не могат да се опишат чрез измененията на спектъра само на 2 дължини на вълните. Затова е необходимо да се направят по-сложни модели с включване на спектралните данни на повече дължини

на вълните или да се разглежда поотделно влиянието на различните бактерии върху състава на млякото.



Фиг. 3. Стойности на индекс за наличие на бактерии за клас здрави и клас заразени проби за дължина на вълната 718 nm



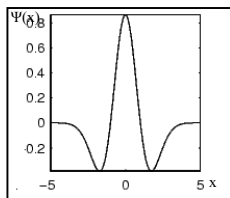
Фиг. 4. Стойности на индекс за наличие на бактерии за клас здрави и клас заразени проби за дължина на вълната 1108 nm

За реализиране на уейвлит преобразуванията при обработка на спектралните характеристики се използват функции от Wavelet Toolbox в програмната среда на MATLAB. Обработката се изразява в едномерна трансформация на характеристиките и изчисление на коефициентите на сигнала:

$$C_{a,b} = \int s(t) \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad (2)$$

където:  $s(t)$  е спектралната характеристика;  $\psi$  - уейвлит функцията на преобразуване;  $a$  и  $b$  – коефициенти, получени след преобразуването.

Уейвлит функцията на преобразуване е представена на фиг. 5, а математическия израз, с който се получава, е представен с формула (3).



Фиг. 5. Уейвлит функция

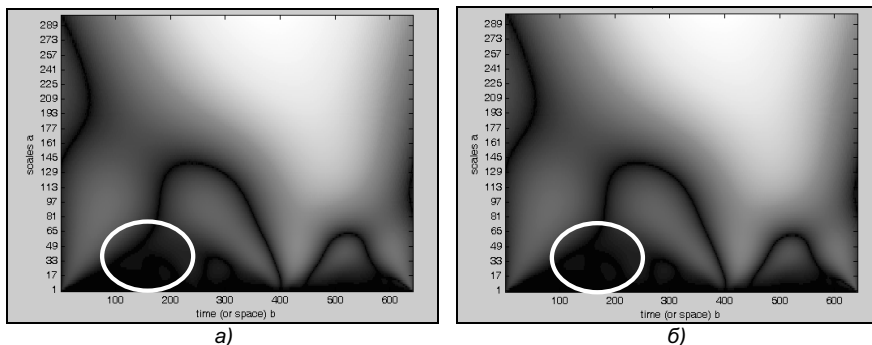
$$\psi(x) = \left(\frac{2}{\sqrt{3}} \pi^{-1/4}\right) (1-x^2) e^{-x^2} / 2. \quad (3)$$

За двата класа проби мляко (здрав и инфектиран) са получени коефициентите на уейвлит преобразуването. Получените резултати са представени на фиг. 6. Коефициентите, представени в двумерното пространство, формират различни области за здрав и инфектиран мляко. Тази разлика, представена на фиг. 6, би могло да се използват като критерий за разпознаване на инфектирани с бактерии проби мляко.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен е подход за разпознаване на инфектирани с бактерии проби мляко, базиран на абсорбцията им, получена чрез измерване на дифузното им отражение в близката инфрачервена област. Създаден е индекс (на базата на спектралните данни на различни дължини на вълните, при които се наблюдават разлики абсорбцията на здрави и инфектирани проби), по който да се извършва разпознаването на инфектирано мляко. Използването му не позволява отчетливо разделяне на здрави и инфектирани проби, поради това, че видимите разлики между спектралните характеристики са минимални. За разпознаване на инфектирано мляко биха могли да се използват коефициенти, получени при едномерно уейвлит

преобразуване на характеристиките. Предвижда се да се проведат допълнителни изследвания с цел да се дефинират критерии за разпознаване на инфектирано мляко и да се установи каква е точността на разпознаване на предложения подход.



Фиг. 6. Уейвлет коефициенти за: а) проби здраво мляко и б) за проби инфектирано мляко

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите благодарят на проф. Румяна Ценкова от Biomeasurement technology laboratory, Dept. of Agricultural and Environmental Engineering, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe, Japan за предоставените спектрални данни на млечните проби.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bokobza L., Near infrared spectroscopy, J. Near Infrared Spectroscopy, 6(1-4), 3-17, 1998.
- [2] David F. Walnut, An Introduction to Wavelet Analysis, Birkhäuser, 2002.
- [3] Rodriguez-Saona LE, Khambaty FM, Fry FS, Dubois J, Calvey EM. 2004. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. JOURNAL OF FOOD PROTECTION, 67 (11), 2555-2559.
- [4] Tsenkova R., Atanassova S., Morita H., Ikura K., Toyoda K., Iordanova I., and Hakogi E. Near infrared spectra of cows' milk for milk quality evaluation: disease diagnosis and pathogen identification, 2006, J. Near Infrared Spectrosc., 14, 363 – 370.
- [5] Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. K., Carter, G. R. 1999. Clinical Veterinary Microbiology, Mastitis, 327-344.

### За контакти:

инж. Петя Велева – Донева, катедра „Информатика и математика“, Тракийски университет, Стара Загора, тел.: 042-699-439, e-mail: pveleva@uni-sz.bg;

гл. ас. инж. д-р. Цветелина Драганова, катедра „Автоматика, информационна и управляваща техника“, Русенски университет „А. Кънчев“, Русе, тел.: 082-888-668, e-mail: cgeorgieva@ru.acad.bg

доц. д-р. Стефка Атанасова, катедра „Биохимия, микробиология и физика“, Тракийски университет, Стара Загора, тел.: 042-699-458, e-mail: atanassova@uni-sz.bg

ст. ас. Георги Беев, катедра „Биохимия, микробиология и физика“, Тракийски университет, Стара Загора, тел.: 042-699-314, e-mail: gbеев@abv.bg

**Докладът е рецензиран.**