

УДК 663.14.001.573:576.53.015.3

ВЛИЯНИЕ ФАЗОВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРОКАРИОТ НА КИНЕТИКУ РОСТА ИХ ПОПУЛЯЦИЙ. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

© А.А. Арзамасцев, А.А. Андреев, Е.В. Вязовова, И.Н. Лисицына, М.А. Суспицына

Arzamastsev A.A., Andreyev A.A., Vyazovova E.V., Licitsina I.N., Suspitsina M.A. Influence of phase heterogenous of cellular cycle of prokaryotes on its population growth kinetics. Results of computer simulation.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что кинетика роста популяций микроорганизмов отличается недостаточной воспроизводимостью в эксперименте, а макрокинетические зависимости – математические модели – низкой адекватностью [1, 2]. Возможными причинами этого могут являться: наличие ненаблюдаемых в эксперименте факторов; недостаточно точное измерение начальных условий; неполное соответствие физико-химических механизмов, используемых в математических моделях, реальным явлениям, что приводит к зависимости их коэффициентов от различных параметров процесса.

По нашему мнению, одной из важнейших причин, обуславливающих низкую воспроизводимость кинетических экспериментов, является фазовая гетерогенность популяции в начальный момент времени [3–6]. Этот фактор является практически ненаблюдаемым из-за сложной технологии определения распределений клеток по фазам клеточного цикла. По нашим предварительным данным, не принятие во внимание этого фактора может приводить к различиям кинетических зависимостей порядка 20–30 % [3–6].

Целью данной работы является проведение вычислительных экспериментов, позволяющих выполнить оценки существенности влияния фазовой гетерогенности на кинетику роста популяций прокариот, и необходимость проследить изменения распределений клеток по фазам их цикла в процессе роста популяции.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Для решения указанной проблемы авторами была разработана новая математическая модель, учитывающая гетерогенность культуры по фазам клеточного цикла [5–8]. Модель построена таким образом, что количество клеток, находящихся в каждой из фаз, описывается отдельным дифференциальным уравнением. Данная модель позволяет адекватно описывать различный характер кинетики роста как асинхронных, так и синхронизированных культур эукариотических и прокариотических микроорганизмов, оценивать количест-

во клеток, находящихся в каждой из фаз клеточного цикла, и среднее время генерации клеток.

Так, в процессе роста прокариот можно выделить либо три, либо две фазы клеточного цикла. Поэтому кинетику роста такой популяции можно описать одной из следующих систем уравнений:

а) для случая трех фаз:

$$\frac{dN_1}{dt} = 2k_{N_3} \cdot \min_{t-t_{N_3} \leq \tau \leq t} N_3(\tau) - k_{N_1} \cdot \min_{t-t_{N_1} \leq \tau \leq t} N_1(\tau) - \tilde{k}_{N_1} \cdot N_1(t);$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{N_1} \cdot \min_{t-t_{N_1} \leq \tau \leq t} N_1(\tau) - k_{N_2} \cdot \min_{t-t_{N_2} \leq \tau \leq t} N_2(\tau) - \tilde{k}_{N_2} \cdot N_2(t);$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{N_2} \cdot \min_{t-t_{N_2} \leq \tau \leq t} N_2(\tau) - k_{N_3} \cdot \min_{t-t_{N_3} \leq \tau \leq t} N_3(\tau) - \tilde{k}_{N_3} \cdot N_3(t);$$

б) для случая двух фаз:

$$\frac{dN_1}{dt} = 2k_{N_2} \cdot \min_{t-t_{N_2} \leq \tau \leq t} N_2(\tau) - k_{N_1} \cdot \min_{t-t_{N_1} \leq \tau \leq t} N_1(\tau) - \tilde{k}_{N_1} \cdot N_1(t);$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{N_1} \cdot \min_{t-t_{N_1} \leq \tau \leq t} N_1(\tau) - k_{N_2} \cdot \min_{t-t_{N_2} \leq \tau \leq t} N_2(\tau) - \tilde{k}_{N_2} \cdot N_2(t),$$

где k_{N_i} – коэффициенты пропорциональности при изменении численности фазы N_i за счет развития, а \tilde{k}_{N_i} – коэффициенты смертности в соответствующей фазе; T – продолжительность клеточного цикла (среднее время генерации). Длительности фаз клеточного цикла t_{N_i} определяются для каждого случая отдельно.

Функция $\min_{t-t_{N_i} \leq \tau \leq t} N_i(\tau)$ (наименьшее значение функции $N_i(t)$ на отрезке $(t - t_{N_i}; t)$) показывает количество клеток, потенциально готовых перейти в следующую фазу клеточного цикла.

Для решения полученных систем уравнений их необходимо дополнить соответствующими начальными условиями:

$$f(t) = \begin{cases} 0, & t < 0; \\ \frac{1}{T}, & 0 < t < T; \\ 0, & t > T. \end{cases}$$

a. $t - t_{N_1} \leq 0:$

$$N_1(t - t_{N_1}) = N_0 \cdot \int_{-(t-t_{N_1})}^{t_{N_1}} f(t) dt$$

b. $t - t_{N_2} \leq 0:$

$$N_2(t - t_{N_2}) = N_0 \cdot \int_{t_{N_1} - (t - t_{N_2})}^{t_{N_1} + t_{N_2}} f(t) dt ;$$

c. $t - t_{N_3} \leq 0:$

$$N_3(t - t_{N_3}) = N_0 \cdot \int_{t_{N_1} + t_{N_2} - (t - t_{N_3})}^T f(t) dt$$

Для случая двух фаз начальные условия аналогичны. Общее количество клеток вычисляется как сумма чисел клеток, находящихся в каждой из фаз.

ОБЪЕКТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

В качестве объектов моделирования и для идентификации параметров математической модели исполь-

зовали принципиально отличающиеся кинетики роста прокариотических клеток, полученные различными авторами: *Escherichia coli* штамм *M-17* (экспоненциальный рост) [9], *Anabaena sphaerica* штамм *TB-082* (отмирание микроорганизмов) [10, рис. 2а], *Bacillus brevic var. G.-B.* (синхронный рост) [11, рис. 5]. Для компьютерного моделирования роста микроорганизмов и последующей обработки полученных результатов использовался комплекс программ, написанных авторами на языке *Turbo Pascal 7.0* и в среде *Delphi 7* фирмы *Borland*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Первоначально была проведена идентификация параметров модели фазовой гетерогенности прокариот для различных объектов [5–7, 9–11] в предположении, что количество клеток, находящихся в каждой из фаз в начальный момент времени, пропорционально длительности соответствующей фазы [12–13]. Результаты параметрической идентификации приведены в табл. 1, а на рис. 1 показано, что модель с указанными значениями параметров хорошо соответствует экспериментальным данным, что указывает на ее адекватность.

На основе разработанной математической модели проводили исследование влияния начального распределения клеток по фазам на кинетику роста популяции. Важность такого исследования обусловлена необходимостью объяснения низкой воспроизводимости результатов реальных кинетических экспериментов.

Полученные значения параметров (табл. 1) использовались для моделирования кинетики роста популяций и отдельных фаз при случайном начальном распределении клеток по фазам клеточного цикла. Вычислительные эксперименты проводили, используя параметры

Таблица 1

Параметры модели фазовой гетерогенности прокариот [5–7]

| № п/п | Объект исследования | Модель фазовой гетерогенности* |
|-------|--|---|
| 1 | Культура <i>Escherichia coli</i> штамм <i>M-17</i> [9] | $k_B = 6,32023; \tilde{k}_B = 1,41459; k_C = 6,20372;$ $\tilde{k}_C = 0; k_D = 5,96332; \tilde{k}_D = 0,23422;$ $T = 1,00551 \text{ ч}; \Delta = 0,8 \%$ |
| 2 | Культура <i>Anabaena sphaerica</i> штамм <i>TB-082</i> [10, рис. 2а] | $k_B = 2,00155; \tilde{k}_B = 0; k_C = 1,7652;$ $\tilde{k}_C = 0; k_D = 0,95204; \tilde{k}_D = 2,62457;$ $T = 3,86793 \text{ сут}; \Delta = 4,4 \%$ |
| 3 | Культура <i>Bacillus brevic var. G.-B.</i> [11, рис. 5] | $k_B = 0,95769; \tilde{k}_B = 0,01348; k_C = 2,74435;$ $\tilde{k}_C = 0,47406; k_D = 1,3178; \tilde{k}_D = 0;$ $T = 5 \text{ ч}; \Delta = 3,5 \%$ (расчеты проведены с предположением, что все клетки находятся в фазе репликации ДНК) |

* – $k_{N_i}, \tilde{k}_{N_i}, T$ – параметры модели (T – среднее время генерации (продолжительность клеточного цикла)); Δ – относительная приведенная погрешность.

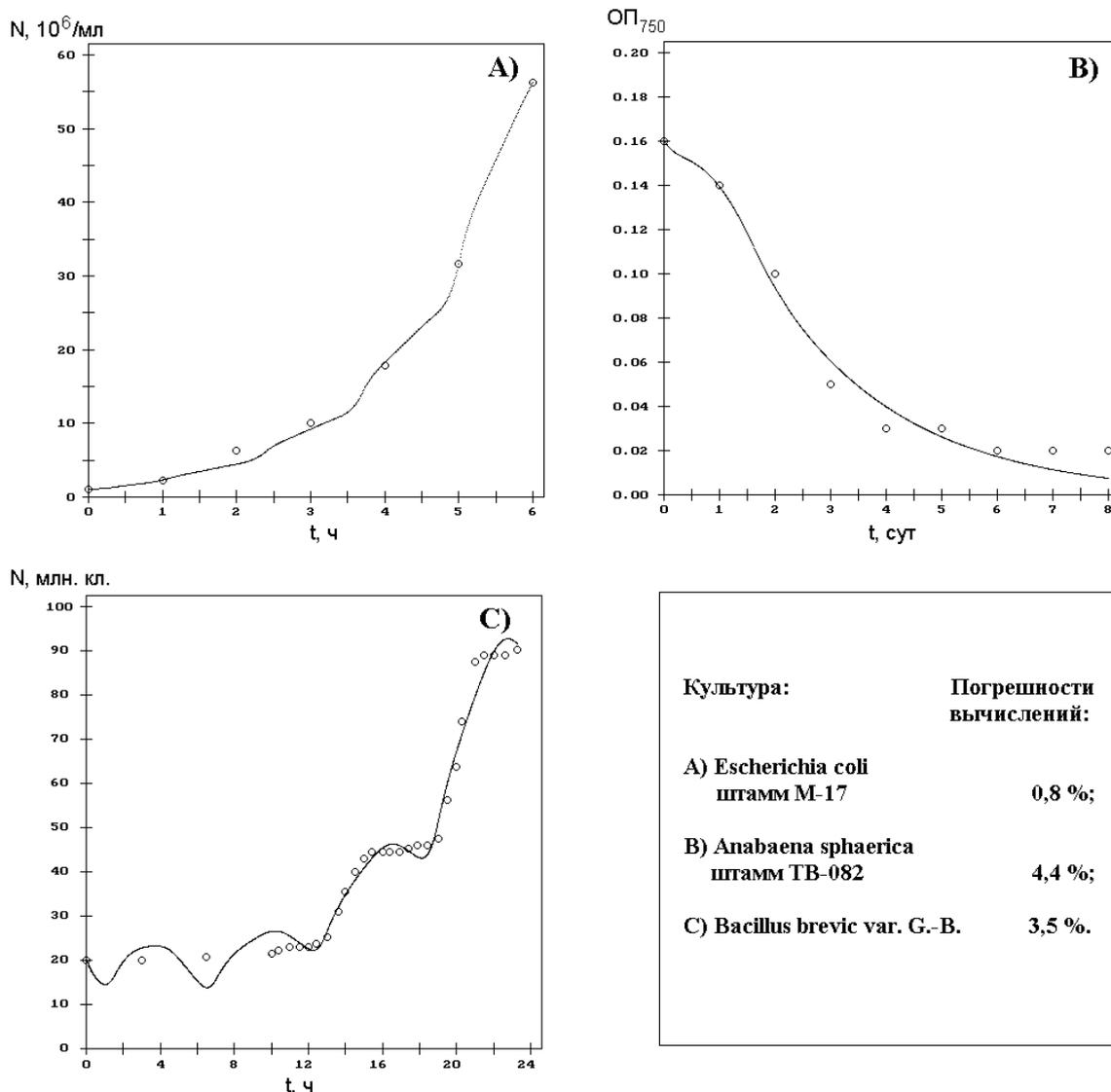


Рис. 1. Описание роста различных микроорганизмов моделью фазовой гетерогенности прокариот (○ – экспериментальные данные работ [9–11], непрерывная линия – расчеты по модели)

модели для двух культур – *Escherichia coli* (экспоненциальный рост) и *Bacillus brevic* var. G.-B. (синхронный рост). Для каждой из указанных культур проводили по десять тысяч вычислительных экспериментов при различных начальных распределениях, задаваемых случайным образом. На всем интервале времени роста популяции (при шаге 0,01 ч) определяли общее число клеток популяции, количество клеток в каждой из фаз и относительные доли каждой фазы. Кинетические кривые во всех случаях имели значительный разброс. Границы диапазона полученных значений представлены на рис. 2, 3 в виде графиков минимальных, максимальных и средних значений количеств клеток в процессе роста популяций в текущий момент времени, а в табл. 2 приведены средние значения квадратного корня из дисперсии.

Анализ рис. 2, 3 и табл. 2 позволяет сделать следующие выводы. Среднеквадратичное отклонение ки-

нетических зависимостей для общего числа клеток может достигать существенных величин и составляет в нашем случае от 16 до 21 %. Принимая во внимание тот факт, что невозпроизводимость в реальных кинетических экспериментах обычно имеет тот же порядок, можно предположить, что причиной этого явления вполне может быть неучтенное начальное распределение клеток по фазам – фактор, обычно ненаблюдаемый. Необходимо отметить, что для числа клеток, находящихся в различных фазах, величина среднеквадратичного отклонения может быть еще больше и составляет от 20 до 30 %.

Таким образом, мы показали, что при проведении реальных кинетических экспериментов в условиях, когда не учитывается реальное распределение микроорганизмов по фазам клеточного цикла, исследователи не вправе ожидать лучшую воспроизводимость экспериментальных данных, чем 20–30 %.

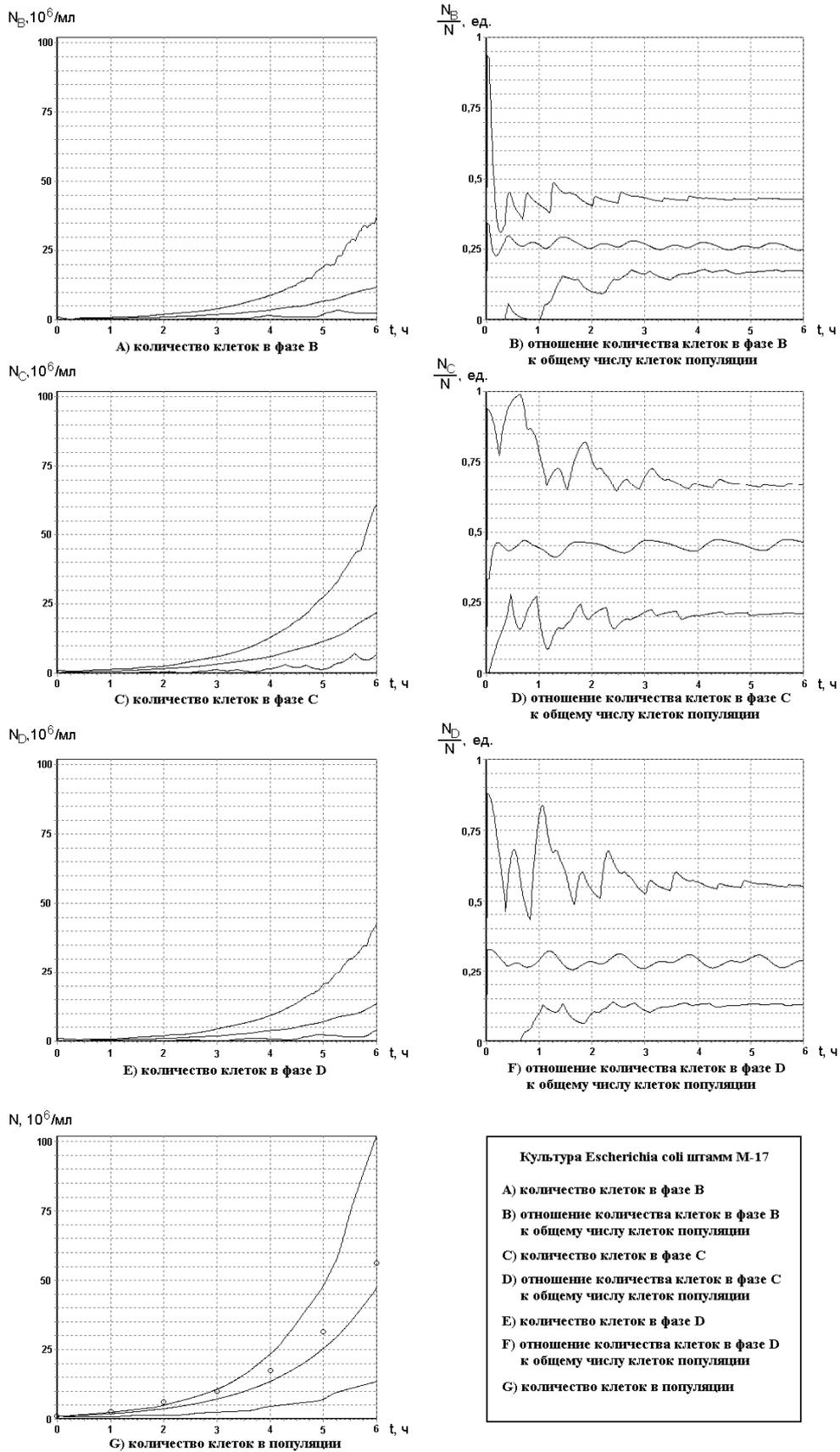
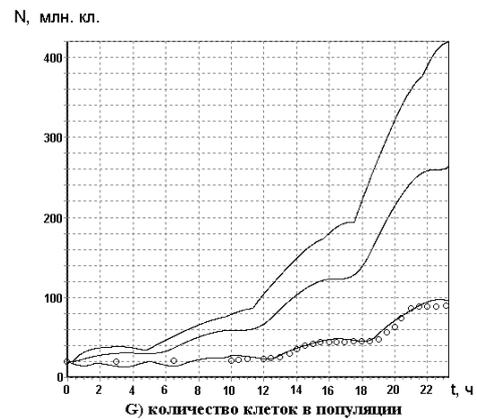
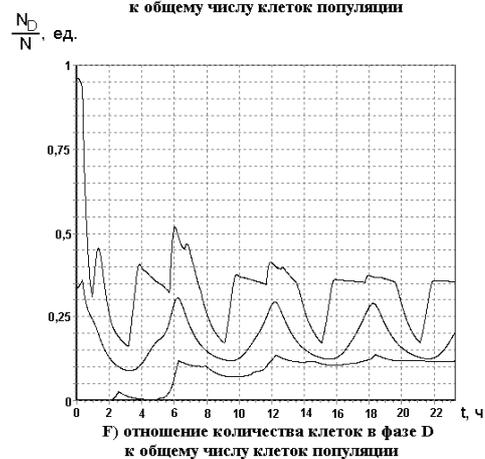
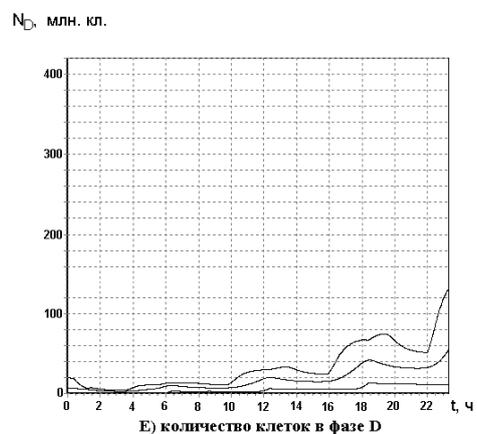
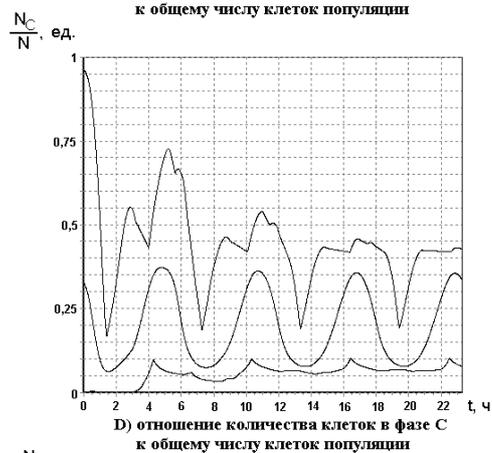
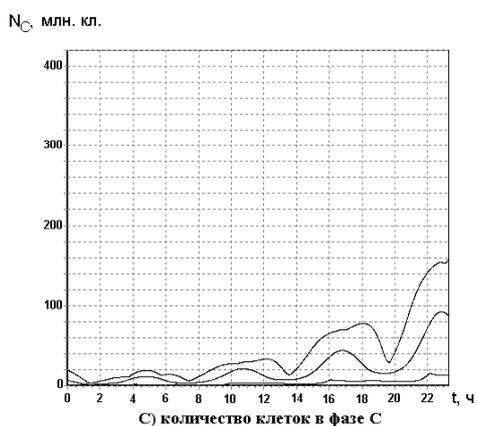
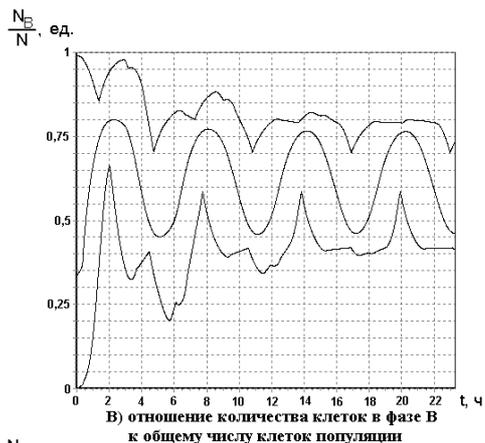
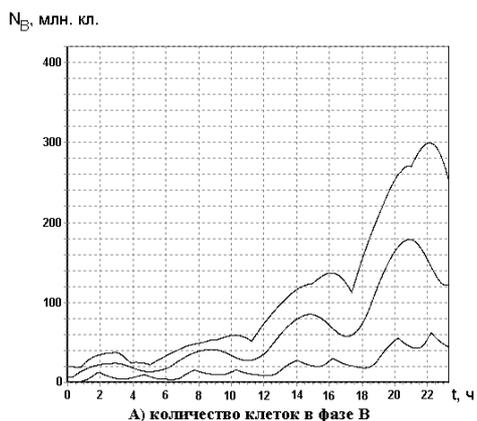


Рис. 2. Вычислительный эксперимент на основании модели фазовой гетерогенности прокариот для культуры *Escherichia coli* (o – экспериментальные данные работы [9], непрерывная линия – расчеты по модели)



Культура *Bacillus brevis* var. G.-B.

А) количество клеток в фазе В
 В) отношение количества клеток в фазе В к общему числу клеток популяции
 С) количество клеток в фазе С
 Д) отношение количества клеток в фазе С к общему числу клеток популяции
 Е) количество клеток в фазе D
 Ф) отношение количества клеток в фазе D к общему числу клеток популяции
 Г) количество клеток в популяции

Рис. 3. Вычислительный эксперимент на основании модели фазовой гетерогенности прокариот для культуры *Bacillus brevic var. G.-B.*
(0 – экспериментальные данные работы [11], непрерывная линия – расчеты по модели)

Таблица 2

Средние значения квадратного корня из дисперсии
для проведенных вычислительных экспериментов, %

| Культура | Общее количество клеток в популяции | Фаза В | | Фаза С | | Фаза D | |
|---|--|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| | | Количество клеток | Доля клеток в популяции | Количество клеток | Доля клеток в популяции | Количество клеток | Доля клеток в популяции |
| <i>Escherichia coli</i> штамм <i>M-17</i> [8] | 15,85 | 17,62 | 25,33 | 21,58 | 28,72 | 21,16 | 28,41 |
| <i>Bacillus brevic var. G.-B.</i> [10, рис. 5] | 20,41 | 19,64 | 19,71 | 20,95 | 20,45 | 21,16 | 19,34 |

Следующим этапом нашего исследования было изучение динамики распределений чисел клеток в модельном кинетическом эксперименте. Для этого в различные моменты времени (с шагом в 0,1 ч) были построены гистограммы распределения количества клеток на отрезке $[X_{min}, X_{max}]$, где X – количество клеток, находящихся в фазах *B*, *C*, *D*, или общее число клеток в выбранный момент времени. Аналогичные вычисления проводили и для долей клеток, находящихся в фазах *B*, *C*, *D* в выбранный момент времени. Результаты данных вычислительных экспериментов показаны на рис. 4 и 5. Из рис. 4 видно, что в процессе роста культуры вид этих зависимостей претерпевает значительные изменения. Имеет место тенденция смещения гистограммы в сторону больших значений. Никакой периодичности не наблюдается. Из рис. 5 видно, что в процессе роста синхронной культуры вид этих зависимостей также претерпевает значительные изменения. Однако, в отличие от данных рис. 4, имеет место определенная периодичность, выраженная в смене гистограмм с малой и значительной дисперсией значений.

В ходе вычислительных экспериментов нами были также получены среднестатистические распределения

клеток по фазам клеточного цикла в различные моменты времени (рис. 6 и 7). Анализ полученных результатов показывает, что для культуры *Escherichia coli* (экспоненциальный рост) распределения (взятые для средних долей клеток в фазах *B*, *C*, *D*) относительно стабильны в течение всего процесса роста популяции (рис. 6). Для культуры *Bacillus brevic var. G.-B.* (синхронный рост) имеют место два вида распределений (рис. 7), которые чередуются, согласно с участками возрастания и убывания средних кривых *B*, *D*) и *F*) рис. 3.

Так как для культуры *Bacillus brevic var. G.-B.* (синхронный рост) для графиков долей фаз (рис. 3 *B*, *D*) и *F*) имеет место периодический характер кривых, нами была предпринята попытка аппроксимировать их функцией $y = k_1 \cdot \sin(k_2 \cdot x + k_3) + k_4$ по методу наименьших квадратов (рис. 8 и табл. 3). При этом получена хорошая корреляция аппроксимирующих и модельных кривых. Интересно отметить, что период полученных аппроксимирующих функций отличается от продолжительности клеточного цикла, полученного в результате идентификации параметров модели в среднем на 19 %.

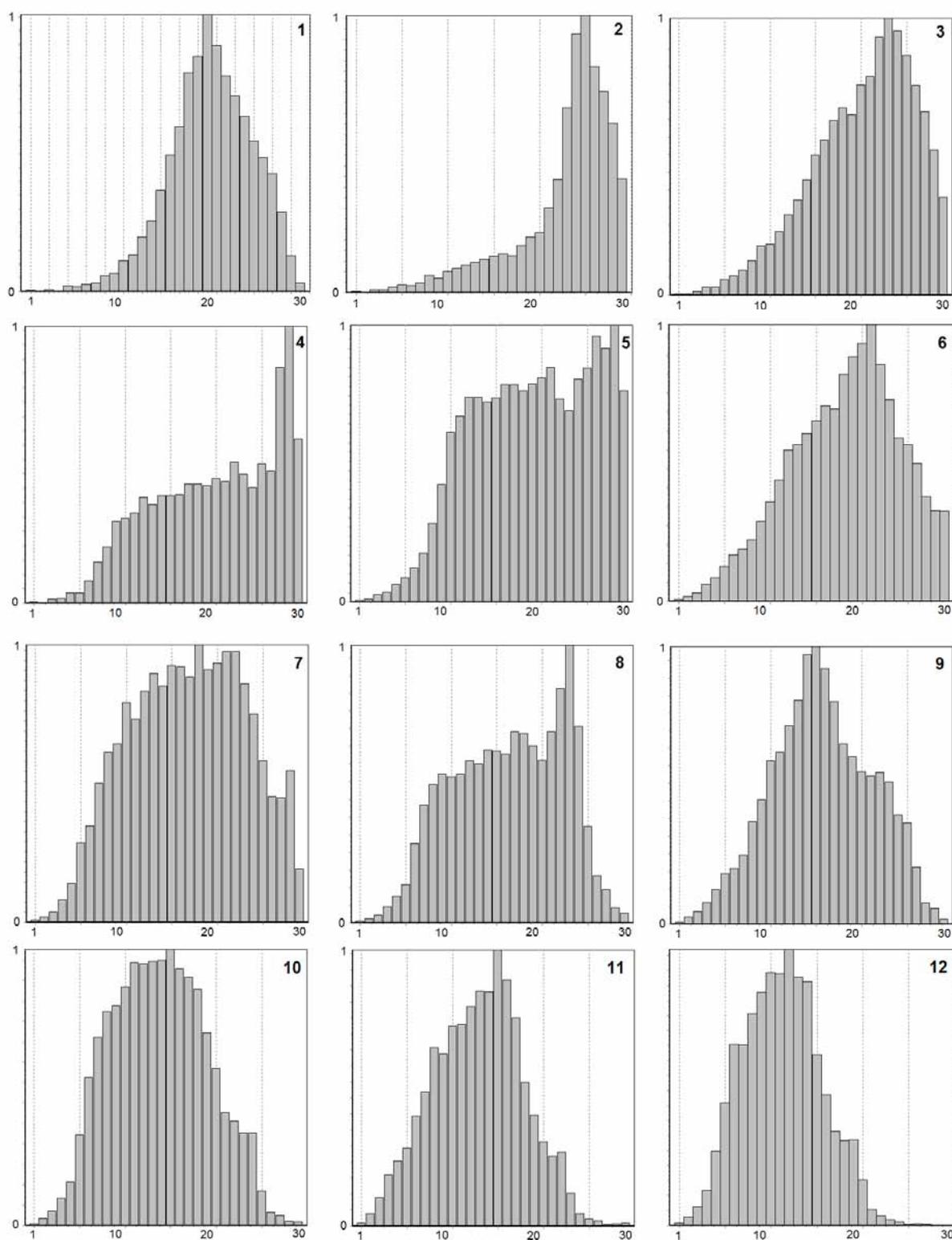


Рис. 4. Изменение распределений относительных чисел клеток кинетических зависимостей, соответствующих экспоненциальному росту *Escherichia coli* во времени. Моменты времени соответствуют: 1 – 0,1; 2 – 0,3; 3 – 1; 4 – 1,9; 5 – 2; 6 – 2,3; 7 – 2,6; 8 – 3,2; 9 – 3,5; 10 – 4; 11 – 5; 12 – 5,4 ч

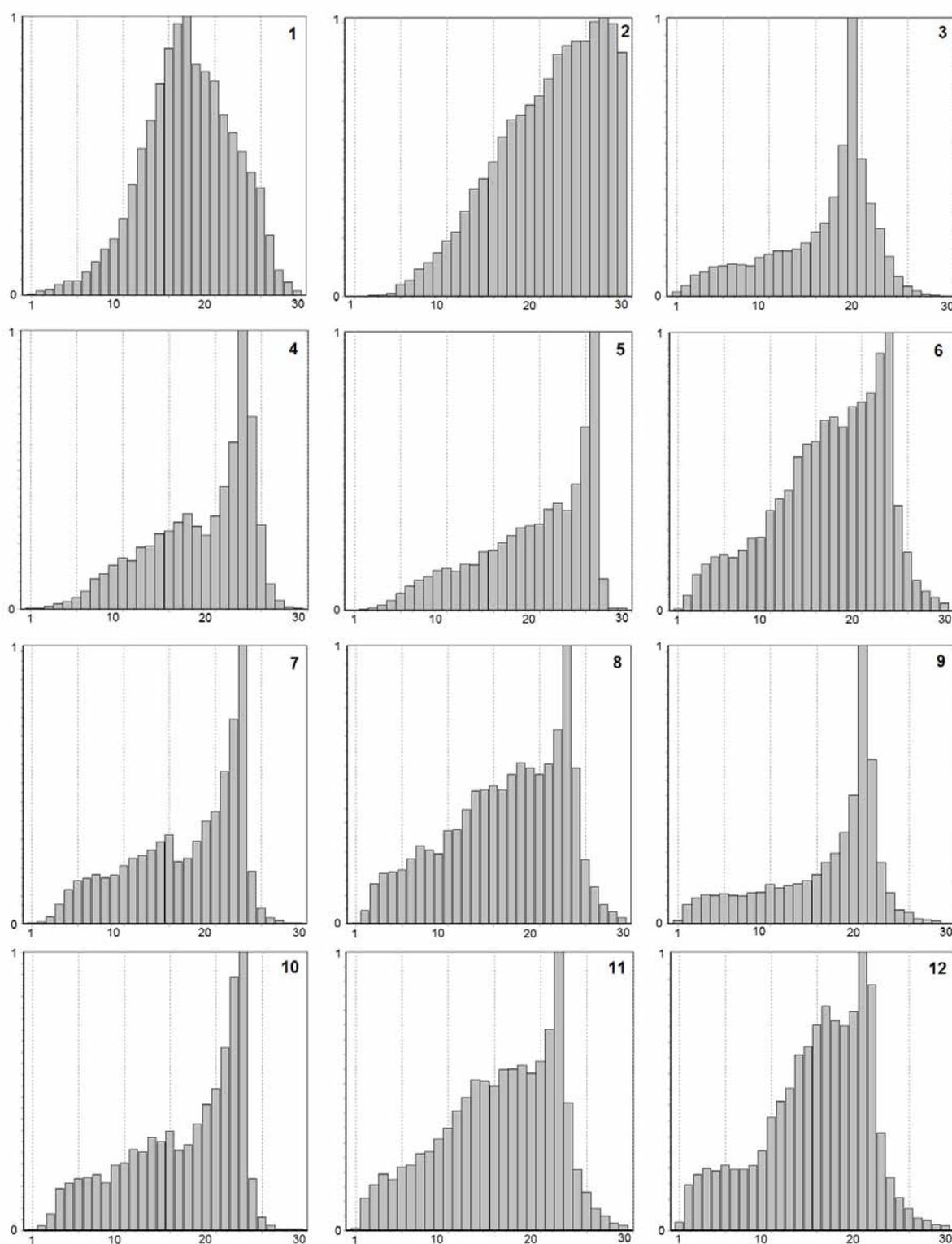


Рис. 5. Изменение распределений относительных чисел клеток кинетических зависимостей, соответствующих синхронному росту *Bacillus brevis* var. *G.-B.* во времени. Моменты времени соответствуют: 1 – 0,1; 2 – 4,7; 3 – 5,7; 4 – 6,8; 5 – 8,9; 6 – 10,7; 7 – 12,8; 8 – 16,1; 9 – 17,6; 10 – 19,1; 11 – 22,4; 12 – 23 ч

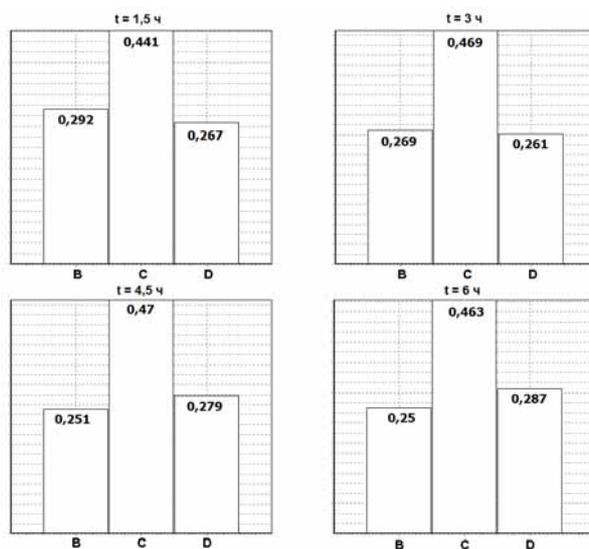


Рис. 6. Среднестатистические распределения клеток по фазам клеточного цикла в различные моменты времени для культуры *Escherichia coli* штамм M-17

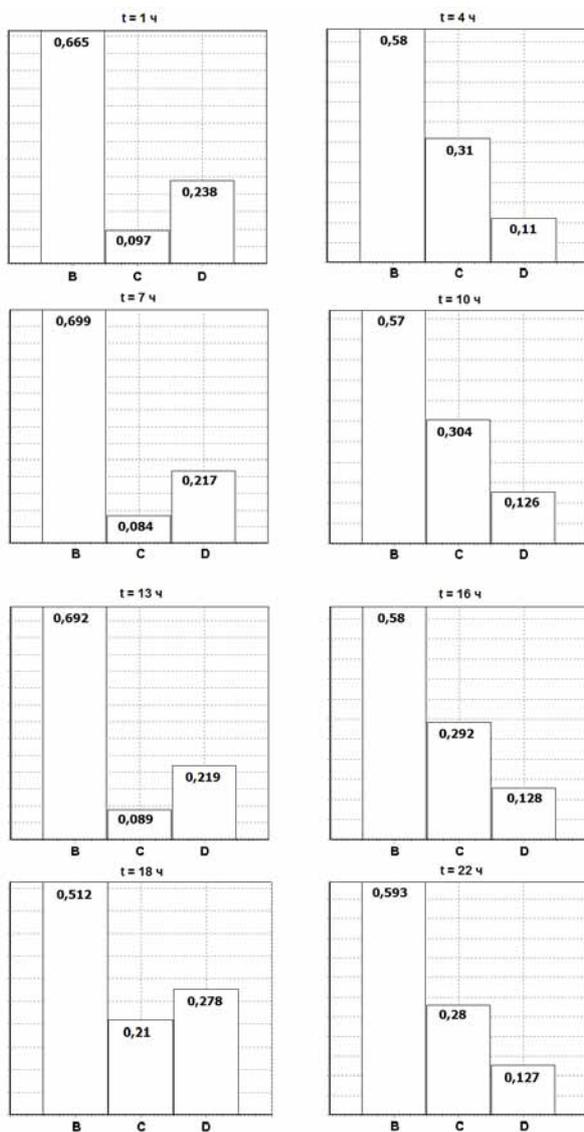


Рис. 7. Среднестатистические распределения клеток по фазам клеточного цикла в различные моменты времени для культуры *Bacillus brevic* var. G.-B

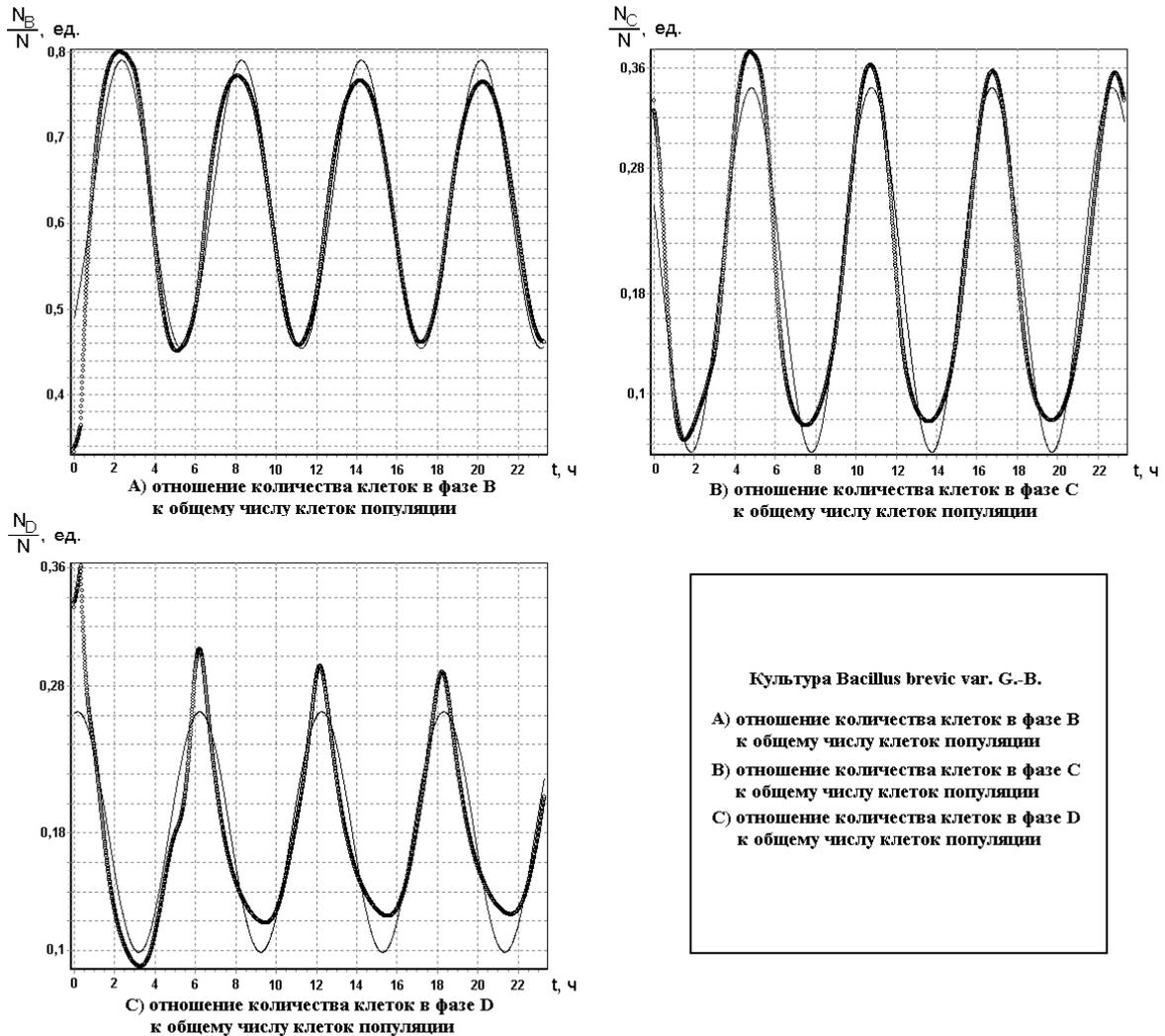


Рис. 8. Результаты аппроксимации средних кривых долей фаз клеточного цикла функцией $y = k_1 \cdot \sin(k_2 \cdot x + k_3) + k_4$ для культуры *Bacillus brevic* var. G.-B

Таблица 3

Результаты аппроксимации средних кривых долей фаз клеточного цикла функцией $y = k_1 \cdot \sin(k_2 \cdot x + k_3) + k_4$ для культуры *Bacillus brevic* var. G.-B

| Параметры | Фаза В | Фаза С | Фаза D |
|------------------------|---------|---------|--------|
| k_1 | 0,168 | 0,1451 | 0,817 |
| k_2 | 1,0579 | 1,0535 | 1,0385 |
| k_3 | -0,9054 | -3,5009 | 1,404 |
| k_4 | 0,6221 | 0,1989 | 0,1805 |
| T (период) | 5,939 | 5,964 | 6,05 |
| коэффициент корреляции | 0,971 | 0,973 | 0,935 |

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенных вычислительных экспериментов установлено следующее.

1. Начальное распределение клеток по фазам клеточного цикла существенно влияет на кинетику роста

популяции. 2. При проведении реальных кинетических экспериментов в условиях, когда не учитывается реальное распределение микроорганизмов по фазам клеточного цикла, исследователи не вправе ожидать лучшую воспроизводимость экспериментальных данных, чем 20–30 %. 3. Для экспоненциального роста

популяции среднестатистическое распределение (взятое для средних долей клеток в фазах *B*, *C*, *D*) относительно стабильно в течение всего процесса роста популяции; этот факт позволяет использовать полученные распределения в качестве базовых в дальнейших вычислительных экспериментах. 4. Для синхронного роста популяции выявлены два характерных вида распределений, связанных с колебаниями долей клеток в различных фазах клеточного цикла.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арзамасцев А.А., Андреев А.А.* О возможности использования различных моделей кинетики биосинтеза // *Биофизика*. 2001. Т. 46. Вып. 6. С. 1048-1061.
2. *Арзамасцев А.А., Андреев А.А.* Математические модели кинетики микробиологического синтеза: возможности использования и новые подходы к разработке // *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. Тамбов, 2000. Т. 5. Вып. 1. С. 111-123.
3. *Андреев А.А.* К вопросу о моделировании процессов биосинтеза // *Актуальные проблемы информатики и информационных технологий: матер. Тамб. межвуз. науч. конф. (сентябрь, 2000 г.)*. Тамбов: Изд-во ТГУ им. Г.Р. Державина, 2000. С. 4-5.
4. *Андреев А.А.* Использование компьютерных технологий при разработке математических моделей в биологии // *Компьютерные технологии в науке, производстве, социальных и экономических процессах: матер. междунар. науч.-практич. конф. 25 ноября 2000 г., г. Новочеркасск: в 8 ч. / Юж.-Рос. гос. техн. ун-т. Новочеркасск: НАБЛА, 2000. Ч. 4. С. 24-25.*
5. *Андреев А.А.* Моделирование и оптимизация производства дрожжей с учетом фазовой гетерогенности культуры: дис. ... канд. техн. наук. М., 2002.
6. *Арзамасцев А.А., Андреев А.А.* Математическое моделирование и оптимизация процесса роста микробной популяции на основе фазовой гетерогенности клеточного цикла // *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. Тамбов, 2002. Т. 7. Вып. 2. С. 303-307.
7. *Андреев А.А.* Моделирование фазовой гетерогенности роста микробных популяций // VII Державинские чтения: матер. науч. конф. преподавателей и аспирантов (февраль 2002 года). *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. Тамбов, 2002. Т. 7. Вып. 1. С. 74.
8. *Андреев А.А.* Моделирование фазовой гетерогенности роста популяции эукариот // *Математические методы в технике и технологиях: сб. тр. XV Междунар. науч. конф.: в 10 т. Т. 10*. Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. С. 120-121.
9. *Ждан-Пушкина С.М., Вербицкая Н.Б., Кондратьева Л.Д.* Сукцинатдегидрогеназная активность клеток *Escherichia coli* после теплового стресса и в процессе репарации // *Микробиология*. 1986. Т. 55. Вып. 3. С. 357-361.
10. *Чан Ван Ни, Якунин А.Ф., Гоготов И.Н.* Влияние фруктозы на рост и синтез нитрогеназы гетероцистной цианобактерии *Anabaena sphaerica* // *Микробиология*. 1990. Т. 59. Вып. 2. С. 245-248.
11. *Лыков В.П., Боднар И.В., Ховрычев М.П., Полин А.Н.* Биосинтез антибиотика грамицидина S культурой *Bacillus brevis* в связи с изменением кинетики роста // *Микробиология*. 1986. Т. 55. Вып. 5. С. 792-795.
12. *Иванов Г.Н., Угодчиков Г.А.* Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. Киев: Наукова Думка, 1984. 280 с.
13. *Франкфурт О.С.* Клеточный цикл в опухолях. М.: Медицина, 1975. 172 с.

Поступила в редакцию 8 октября 2005 г.