

УДК 579.242:579.243:51-76

НЕЛИНЕЙНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АВТОКОЛЕБАНИЙ ЧИСЛЕННОСТИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* В СУБСТРАТ-БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

© 2009 Н.И. Воробьев¹, А.М. Семенов², А.А. Шаталов²,
А.Х.К. Ван Бругген³, О.В. Свиридова¹

¹ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург;
e-mail: vorobyov@arriam.spb.ru

²Московский государственный университет, Москва;
e-mail: amsemenov@list.ru

³Emerging Pathogens Institute and Plant Pathology Department, IFAS, University of Florida, USA;
e-mail: ahcvanbruggen@ufl.edu

Создана математическая модель субстрат бактериальной системы (СБС) в нише с ограниченным питательным ресурсом на примере волнообразной динамики популяции *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* в поздней стационарной фазе. Модель представлена системой нелинейных дифференциальных уравнений и описывает переходы клеток из активного состояния в состояние покоя, лизис с высвобождением субстрата или глубокий анабиоз. Функциональной и параметрической верификацией модели определены кинетические параметры бактериальной популяции. Анализ системы дифференциальных уравнений показал, что модель СБС обладает особой точкой - «неустойчивый фокус», что доказывает возникновение автоколебания в СБС.

Ключевые слова: гетерогенность в моновидовой популяции *Pseudomonas fluorescens*, автоиндукция колебаний численности в условиях голодания, анализ устойчивости субстрат-бактериальной системы на основе математической модели.

ВВЕДЕНИЕ

Твердо установлено, что микробные популяции, как и другие биологические объекты, развиваются волнообразно [1, 2]. При периодическом культивировании такая волнообразная динамика наиболее четко проявляется в поздней стационарной фазе при частом отборе проб и учете в пробах численности клеток. Было высказано предположение о том, что волнообразная динамика является фундаментальным следствием взаимодействия потребителя и субстрата [3-6].

Хотя концепция роста и отмирания микроорганизмов лишь частично объясняет их волнообразную динамику развития, поскольку она не учитывает многие другие процессы, такие как переход части клеток популяции при голодании в состояние покоя или даже анабиоза, реактивацию клеток или их гибель. Такие процессы крайне трудно исследовать на физиолого-популяционном уровне. Однако используя математическое моделирование можно рассчитать потоки углерода и численности клеток, находящихся в разном физиологическом состоянии, тем самым подтверждая или опровергая соответствующие гипотезы, объясняющие волнообразную динамику популяций. С этой целью были созданы многочисленные модели, имитирующие осцилляционную динамику микробных популяций [7-10].

Используются различные подходы при моделировании колебательной динамики организмов

в зависимости от причин вызывающих такие колебания. В системе с двумя или более видами организмов колебания могут быть следствием обратной связи между разными видами, например, между хищником и жертвой или продуцентом и потребителем или разрушителем субстрата [11-15]. Обратная связь может включать также использование одними организмами продуктов метаболизма других микроорганизмов, в результате чего может иметь место волнообразная динамика развития обеих популяций [8, 14].

В генетически однородной культуре бактерий колебания иногда моделируют, используя задержку в метаболических процессах, например, дисбаланс между поглощением субстрата и его метаболизмом [16, 17] или дисбаланс между поглощением субстрата и выделением CO₂ в связи с образованием запасных веществ [18]. Однако даже в моновидовой популяции чистой культуры клетки не гомогенны с точки зрения физиолого-биохимического состояния [19]. При голодании функциональная гетерогенность популяции существенно усиливается [20]. В связи с этим для достижения колебательной динамики при моделировании моновидовой популяции иногда использовали подразделение популяции на две взаимно сменяющихся субпопуляций [16], морфологически меняющиеся [21], получающие энергию путем дыхания либо брожения [22] или растущую и отмирающую популяции следствии отравления собственным метаболитом [23-25].

Целью работы являлось создание и анализ относительно простой нелинейной математической модели субстрат-бактериальной системы (СБС), описывающей следующие изменения функционального состояния бактериальных клеток: переход клеток из активного состояния в покоящееся состояние при голодании, сопровождаемое выделением CO_2 ; возврат части покоящихся клеток в активное состояние после обогащения ниши субстратом; отмирание и лизис части покоящихся клеток и переход активных клеток в состояние глубокого анабиоза. Модель должна учитывать возникновение функциональной гетерогенности в генетически однородной популяции *Pseudomonas fluorescens* и представляться в форме системы дифференциальных уравнений, удобной для математического анализа устойчивости и характера автоколебаний численности бактерий при ограничении питательного ресурса.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Использовали генетически модифицированную бактерию *Pseudomonas fluorescens* шт. 32, синтезирующую зеленый флуоресцирующий белок (*gfp*) и устойчивую к рифамицину и канамицину. Микроорганизм выращивали на среде, содержащей (г/л): K_2HPO_4 - 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,5; пептон - 2; глицерин 15 мл/л; канамицин - 50 мг/л; рифамицин - 50 мг/л. Вода - дистиллированная. pH – 7 – 7,2. Антибиотики стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. При высеве на чашки в жидкую среду добавляли агар в концентрации 18 г/л. Посевной материал выращивали при 25°C в течение 48 ч. Затем в каждую из трех 3-х трехлитровых колб, содержащих по 1 л стерильной жидкой среды, вносили по 1 мл клеток ($1\text{-}2 \cdot 10^9$). Культивирование осуществляли в стационарных условиях (при 25°C) с энергичным перемешиванием в течение минуты раз в сутки перед отбором проб. Пробы из каждой колбы отбирали через день и в них учитывали количество колоний образующих единиц (КОЕ) на агаризованной среде при освещении чашек коротким голубым светом (рис. 2 А), количество клеток под люминесцентным микроскопом (450 – 480 нм) (рис. 2 Б), и количество растворенного органического вещества (РОВ) бихроматным методом после фильтрации суспензии через нейлоновый бактериальный фильтр (рис. 2 В). Длительность эксперимента 60 дней.

Экспериментальные данные были проанализированы методом математического моделирования. При построении математической модели использована система нелинейных дифференци-

альных уравнений. С помощью модели численным методом рассчитывались динамики численностей бактерий и концентрации растворимого в воде углерода. Для функциональной и параметрической верификации математической модели использовали метод «наименьших квадратов» для минимизации отклонений модели от экспериментальных данных.

ОПИСАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ СБС

В результате последовательной функциональной верификации математической модели мы пришли к выводу, что клетки в течение своего жизненного цикла направленно меняют свои физиологические состояния по схеме, представленной на рис. 1.

X-состояние соответствует активным клеткам, характеризующихся тем, что в этом состоянии они активно потребляют питательный субстрат (S) и делятся. На следующей стадии жизненного цикла бактерии переходят в пассивное Z-состояние, которое характеризуется приостановкой программы размножения. В Z-состоянии клетками используются питательные вещества в количестве, достаточном только для поддержания работоспособности жизненно важных систем, а ферментативный аппарат, необходимый для клеточного деления не функционирует и даже деградирует. Среди части Z-клеток на последующей стадии запускаются процессы аутолиза, что приводит к пополнению пула питательных веществ (S) за счет высвободившихся компонентов клетки. Параллельно с изменением этих физиологических состояний часть X-клеток необратимо переходит в Z_0 -состояние – глубокий анабиоз. В глубоком анабиозе у клеток законсервированы все жизненные процессы, а оболочка клетки уплотняется в результате чего клетка становится более устойчивой к внешним воздействиям по сравнению с активной клеткой. Z_0 -клетки не взаимодействуют с остальными клетками и не влияют на протекающие в популяции динамические процессы. Кроме этого предполагается, что часть питательного субстрата (C_H) остается недоступной для клеток и поэтому его количество не меняется со временем.

С переходами клеток из одного состояния в другое связаны два типа потоков углерода (рис. 1). Поток клеточного углерода пропорционален количеству углерода, присутствующего в клеточных структурах перемещающихся клеток, и обратно пропорционален времени перемещения этого количества углерода. Поток субстратного углерода пропорционален количеству углерода, находящегося в составе внеклеточных органичес-

ких молекул и поглощаемого/выделяемого клетками при смене физиологических состояний, и обратно пропорционален времени поглощения/выделения этого количества углерода.

Связь углеродных потоков с численностями бактерий (X, Z, Z_0) и концентрацией питательного субстрата (S) задается логистическим уравнением [26] и формулой Моно [26].

$$J_{Z_0} = \eta_{Z_0} \cdot Z_0 \cdot \left(1 - \frac{Z_0}{d}\right) - \text{поток клеточного}$$

углерода, связанного с переходом активных клеток в состояние глубокого анабиоза. $0 < Z_0 < 1$ – количество клеток (в углеродном эквиваленте), находящихся в глубоком анабиозе и деленное на C_0 . $0 < d < 1$ – доля Z_0 -клеток (в углеродном эквиваленте) в конце переходного процесса. $\eta_{Z_0} > 0$ – постоянная времени перехода клеток в состояние глубокого анабиоза, деленная на τ . τ – постоянная времени размножения активных клеток в фазе экспоненциального роста.

$$J_A = \frac{X \cdot S}{S + k_s/R(v)} - \text{поток субстратного угле}$$

рода, связанный с питанием активных клеток. $0 < s < 1$ – масса субстратного углерода, деленная на начальное количество субстратного углерода (C_0) в колбах. $0 < k < 1$ – количество активных клеток (в углеродном эквиваленте), деленное на C_0 . $k_s > 0$ – константа ингибирования для J_a -потока.

$R(v) = (1-d) \cdot \exp(-\eta_{CO_2} \cdot v)$ – коэффициент, учитывающий потери углерода в системе, связанные с J_{CO_2} -потоком. $h_{CO_2} > 0$ – постоянная времени убывания углеродного ресурса ниши, связанные с J_{CO_2} -потоком, деленная на t . p – время, деленное на t .

$$\begin{cases} \frac{dX}{dv} = \frac{S \cdot X}{S + k_s/R(v)} - \left[\eta_x \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{1-X-S+k_x/R(v)} - \eta_z \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{X+k_z/R(v)} \right] \\ \frac{dS}{dv} = \eta_L \cdot \frac{(1-X-S) \cdot S}{S+k_L/R(v)} + \beta \cdot \left[\eta_x \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{1-X-S+k_x/R(v)} - \eta_z \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{X+k_z/R(v)} \right] - \frac{S \cdot X}{S+k_s/R(v)} \end{cases} \quad (1)$$

где p – время, деленное на t ; $Z = 1 - X - S$ Динамика численности Z_0 -бактерий рассчитывается по формуле: $Z_0 = d \cdot [1 - \exp(-\eta_{Z_0} \cdot v)]$.

Реальные численности активных бактерий ($M_A(t)$), пассивных бактерий ($M_H(t)$), бактерий в глубоком анабиозе ($M_{H'}(t)$) и концентрации субстратного углерода ($C(t)$) вычисляются по следующим формулам:

$$M_A(t) = \frac{C_0}{m_A} \cdot X(v \cdot \tau) \cdot R(v \cdot \tau);$$

$$M_D(t) = \frac{C_0}{m_D} \cdot Z(v \cdot \tau) \cdot R(v \cdot \tau);$$

$$J_{CX} = \eta_x \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{1-X-S+k_x/R(v)} \cdot (1-\beta),$$

$$J_{SX} = \eta_x \cdot \frac{X \cdot (1-X-S)}{1-X-S+k_x/R(v)} \cdot \beta - \text{потоки}$$

клеточного и субстратного углерода, связанные с переходом клеток из активного состояния в пассивное. $0 < Z < 1$ – количество пассивных клеток (в углеродном эквиваленте), деленное на C_0 .

$$\beta = \frac{m_A - m_D}{m_A}, m_A, m_D - \text{углеродные массы } X-$$

и Z -клеток. $k_x > 0$ – константа ингибирования J_{CX} - и J_{SX} -потока. $\eta_x > 0$ – постоянная скорости J_{CX} - и J_{SX} -потока, деленная на τ .

$$J_{CZ} = \eta_z \cdot \frac{(1-X-Z) \cdot X}{X+k_z/R(v)} \cdot (1-\beta),$$

$$J_{SZ} = \eta_z \cdot \frac{(1-X-S) \cdot X}{X+k_z/R(v)} \cdot \beta - \text{потоки клеточ}$$

ного и субстратного углерода, связанные с переходом клеток из пассивного состояния в активное. $k_z > 0$ – константа ингибирования J_{CZ} - и J_{SZ} -потока. $\eta_z > 0$ – постоянная скорости J_{CZ} - и J_{SZ} -потока, деленная на τ .

$$J_L = \eta_L \cdot \frac{(1-X-S) \cdot S}{S+k_L/R(v)} - \text{поток субстратного}$$

углерода, связанный с аутолизисом клеток. $k_L > 0$ – константа ингибирования J_L -потока. $h_L > 0$ – постоянная скорости J_L -потока, деленная на t .

Из условия углеродного баланса системы получаем математическую модель в форме следующей системы нелинейных дифференциальных уравнений:

$$M_H(t) = \frac{C_0}{m_{Z_0}} \cdot Z_0(v \cdot \tau);$$

$$C(t) = C_0 \cdot S(v \cdot \tau) \cdot R(v \cdot \tau) + C_H.$$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЕРИФИКАЦИИ МОДЕЛИ СБС

Функциональная и параметрическая верификация модели СБС позволила определить параметры популяции бактерий (таблица 1).

Таблица 1. Вычисленные параметры математической модели.

$C_0 = 4.42$ мг С / мл	$\eta_{z0} = 0.040$
$C_H = 3.31$ мг С / мл	$k_S = 0.00044$
$m_A = 3.7 \times 10^{-9}$ мг С / клетка	$\eta_X = 11.6$
$m_D = 0.19 \times 10^{-9}$ мг С / клетка	$k_X = 0.60$
$m_{z0} = 4.7 \times 10^{-9}$ мг С / клетка	$\eta_Z = 0.78$
$\tau = 0.309$ сутки (~7 часов)	$k_Z = 0.44$
$d = 0.460$	$\eta_L = 0.173$
$\eta_{CO_2} = 0.0040$	$k_L = 0.675$

С помощью этих параметров можно вычислить любые интегральные характеристики популяции бактерий. Например, константа Михаэлиса рассчитывается следующим образом:

$$K_S = k_S \cdot (1 - d) \cdot C_0 = 0,00044 \cdot (1 - 1,46) \cdot 4,42 \text{ мг С/мл} = 1,05 \text{ мг С/мл.}$$

Анализ системы (1) на устойчивость показал, что она имеет особую точку «неустойчивый фокус», то есть СБС является неустойчивой системой и в ней возможно возникновение автоколебаний численностей бактерий. Координаты особой точки не остаются постоянными. Из-за CO_2 -потерь ее координаты дрейфуют к началу координат. При этом рабочая точка описывает сходящуюся спираль вокруг дрейфующей особой точки (рис. 3). В связи с этим, амплитуда колебания численностей бактерий постепенно убывает.

Автоколебания в СБС вызваны закономерными переходами клеток: активное состояние → покоящееся состояние → лизировавшиеся клетки (субстрат) → активное состояние → и т.д. Параллельно этому циклическому процессу часть активных бактерий, переходит в состояние глубокого анабиоза. Все эти явления демонстрируют высокую приспособленность бактериальных популяций к стрессовым условиям, включая длительное выживание в нишах с ограниченным питательным ресурсом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов АМ (2001) Осцилляции микробных сообществ в почвах. Труды Всероссийской конференции к 100-летию со дня рождения академика Е.Н. Мишустина. Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. 22.02.2001. М. МАКС Пресс. С. 57-72.
2. Семенов АМ (2005). Трофическое группирование и динамика развития микробных сообществ в почве и ризосфере. Автореф. дис. на соискание уч. степени док. биол. наук в виде научн. докл. М.: МГУ. с. 66.
3. Semenov A.M, van Bruggen AHC, Zelenev VV (1999) Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbial Ecology*. V. 37. P. 116-128.
4. Van Bruggen AHC. Semenov AM, Van Diepeningen AD., de Vos OJ., Blok WJ. (2006). Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *Europ. J. Plant Path.* V. 115. P. 105-122.
5. Zelenev VV, van Bruggen AHC, Leffelaar PA, Bloem J, Semenov AM (2006) The simulation model "BACWAVE-WEB" *Soil Biol Biochem* 38: 1690-1711.
6. Я.П.Худяков. Периодичность микробиологических процессов в почве. 1958. Тр. Инст. микробиологии АН СССР. Т.5. С. 150-160.
7. Kennedy CR, Aris R (1980) Traveling waves in a simple population model involving growth and death. *Bull Mathem Biology* 42: 397-429.
8. Ghosh D, Sarkar AK (1998) Stability and oscillations in a resource-based cycling model of two interacting species with nutrient cycling. *Ecol Model* 107: 25-33.
9. Petrovskii SV, Malchow H (2001) Wave of chaos: New mechanism of pattern formation in spatio-temporal population dynamics. *Theoret Populat Biol* 59: 157-174.
10. Hui C, Li Z, Yue D (2004) Metapopulation dynamics and distribution, and environmental heterogeneity induced by niche construction. *Ecol Modelling* 177:107-118
11. De Angelis DL (1982) Dynamics of nutrient cycling and food webs. Chapman and Hall. London.
12. Smith OL (1982) Food webs. Charman and Hall, London. UK.
13. Sarkar AK, Roy AB. (1993) Oscillatory behaviour in a resource-based plant/herbivore model with random herbivore attack. *Ecol. Model.* V. 68. P. 213-226.
14. Sarkar AK, Mitra D, Roy AB (1990) Stability of partially closed producer consumer system via decomposer. *Ganit L. Bangladesh Math. Soc.* V.10. P. 21-27.
15. Sarkar AK, Mitra D, Ray S, Roy AB. (1991). Permanence and oscillatory co-existence of a detritus-based prey-predator model. *Ecol. Model.* V. 53. P. 147-156.
16. Skichko AS., Kol'tsova E.M. 2006. Mathematical model for describing oscillations of bacterial biomass. *Theoret Found Chem Engin* 40: 503-513.
17. Zeng A-P, Menzel K, Deckwer W-D (1996) Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: II. Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions. *Biotechnol Bioeng* 52: 561-571.
18. Cornet JF, Favier L, Dussap CG (2003) Modeling stability of photoheterotrophic continuous cultures in photobioreactors. *Biotechnol Prog* 19: 1216-1227.
19. Davidson CJ, Surette MG (2008) Individuality in bacteria. *Annu Rev Genet* 42: 253-268.

20. Wilhelm R, Heller O, Bohland M, Tomaschewski C, Klein I, Klauth P, Tappe W, Groeneweg J, Soeder CJ, Jansen P, Meyer W (1998) Biometric analysis of physiologically structured pure bacterial cultures recovering from starvation. *Can. J. Microbiol.* V. 44. P. 399-404.
21. Kelly AF, Park F, Bovill R, Mackey BM (2001) Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: Evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 15. P. 53-57.
22. Satroutdinov AD, Kuriyama H, Kobayashi H (1992) Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* 98: 261-268
23. Cornejo OE, Rozen DE, May RM, Levin BR (2009) Oscillations in continuous culture populations of *Streptococcus pneumoniae*: population dynamics and the evolution of clonal suicide. *Proc R Soc B* 276: 999-1008
24. Ghommidh C, Vaija J, Bolarinwa S, Navarro JM (1989) Oscillatory behavior of *Z. mobilis* in continuous cultures: A simple stochastic model. *Biotechnol Lett* 11: 659-664
25. Keulers M, Suzuki T, Satroutdinov AD, Kuriyama H (1996) Autonomous metabolic oscillation in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. *FEMS Microbiol Lett* 142: 253-258
26. П.В.Фурсова, Л.Д.Терлова, Г.Ю.Ризниченко. Математические модели в биологии. Учебное пособие.-М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». 2008. 108 с.

NONLINEAR MODELLING OF SELF-OSCILLATIONS OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* POPULATION IN THE SUBSTRATE-BACTERIAL SYSTEM

© 2009 N.I. Vorobyov¹, A.M. Semenov², A.A. Shatalov², A.H.C. van Bruggen³, O.V. Sviridova¹

¹State Scientific Institute All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg;
e-mail: vorobyov@arriam.spb.ru

²Moscow State University, Moscow; e-mail: amsemenov@list.ru

³Emerging Pathogens Institute and Plant Pathology Department, IFAS, University of Florida, USA;
e-mail: ahcvanbruggen@ufl.edu

The mathematical model a substrate-bacterial system (SBS) in a niche with the limited nutritious resource on an example of wave-like dynamics of *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* population in a late stationary phase is created. The model is presented by system of the nonlinear differential equations and describes transitions of cells from an active condition in dormant state, lyses with release of a substrate or deep anabiosis. By functional and parametrical verification of model kinetic parameters of a bacterial population were calculated. The analysis of the system of the differential equations has shown, that SBS possesses a special point - «unstable focus» due to what self-oscillations in SBS arises.

Keywords: heterogeneity in monospecific population *Pseudomonas fluorescens*, an autoinduction of fluctuations of number in the conditions of starvation, the analysis of stability a substratum-bacterial of system on the basis of mathematical model.