

ЛЕКЦИЯ 11

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Микробные популяции как объект моделирования и управления. Непрерывная культура микроорганизмов. Модель Моно. Микроэволюционные процессы в микробных популяциях. Возрастные распределения. Двухвозрастная модель. Непрерывные возрастные распределения.

Микробиология является одной из немногих областей современной биологии, где математическое моделирование стало действенным средством научного исследования. Более того, математические модели прочно вошли в практику биотехнологического производства микроорганизмов как инструмент управления биотехнологическими процессами.

Мы остановимся на моделях, которые не только лежат в основе моделей микробиологических систем, но являются базовыми моделями всей математической биологии, в том числе используются в популяционной динамике, при моделировании иммунных процессов и проч.

В большинстве своем микроорганизмы - одноклеточные организмы, они имеют высокое отношение поверхности к объему и поэтому высокие интенсивности обмена с окружающей средой. С этим связаны:

- высокие скорости размножения микроорганизмов,
- большой прирост биомассы,
- высокая скорость роста микробных популяций
- высокая скорость микроэволюционных процессов в микробных сообществах.

Все это делает микробные популяции чрезвычайно привлекательными как в практическом отношении для биотехнологии, так и в качестве научного объекта для изучения популяционных и эволюционных процессов.

Для математического описания микробных популяций обычно используют аппарат обыкновенных дифференциальных уравнений. В отношении микробиологических систем такое описание гораздо более обосновано, чем применительно к наземным и водным высшим организмам. Из-за многочисленности микробных популяций к ним применимо понятие концентрации.

Действительно, даже в лабораторных исследованиях, *in vitro* приходится иметь дело с количеством особей порядка 10^{10} и выше. В большом промышленном ферментере могут одновременно жить 10^{16} - 10^{17} дрожжевых клеток.

Напомним, что отклонение численности от средних значений, вызванное случайными обстоятельствами, пропорционально $1/\sqrt{N}$, где N - численность популяции. Таким образом, для многочисленных популяций можно строить модель в терминах средних численностей, или концентраций.

Второй фактор - относительная однородность культуры микроорганизмов в объеме культиватора. Это позволяет пренебречь пространственными эффектами.

Для управления биотехнологическим процессом необходимо:

- сформулировать модель, описывающую рост управляемой культуры микроорганизмов,
- указать параметры, по которым производится управление,
- определить цель, которая при этом преследуется.

Например, целью может быть максимальная скорость роста культуры, или получение максимальной биомассы в течение всего срока выращивания, или минимизация времени выхода культиватора на стационарный режим работы. В зависимости от этого должна быть математически сформулирована соответствующая целевая функция. Нахождение значений управляющих параметров, которые позволяют достичь экстремума этой целевой функции, и составляют задачу управления.

Непрерывные культуры микроорганизмов.

Характерная кривая роста микроорганизмов приведена на рис. 11.1

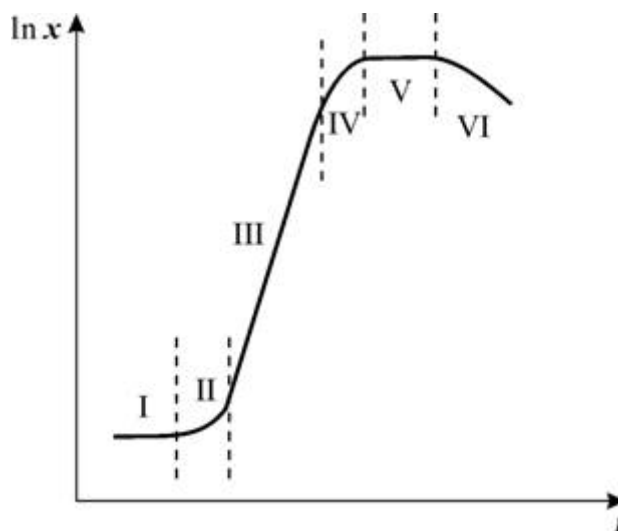
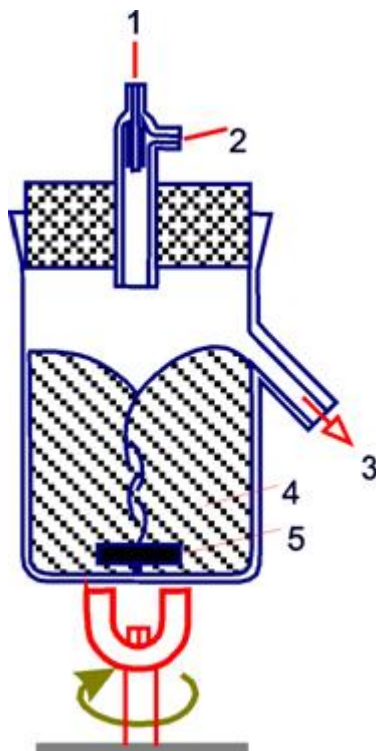


Рис. 11.1. Кривая роста микроорганизмов при периодическом культивировании. I – лаг-фаза; II – фаза ускорения роста; III – фаза экспоненциального роста; IV – фаза замедления роста; V – фаза стационарная; VI – фаза отмирания культуры

Процессы культивирования разделяют на *периодические* и *непрерывные*. При периодическом режиме в культиватор одновременно закладывают все необходимое для роста микроорганизмов (субстраты) и некоторую “затравку” биомассы, после чего популяция микроорганизмов растет и развивается по своим законам. В некоторый момент времени производится изъятие биомассы. Затем процесс повторяется. Таким образом, снятие урожая производится периодически, и каждый раз популяция проходит через все стадии роста.

Непрерывные культуры микроорганизмов - это культуры, в которые все время добавляется питательная среда, а часть содержимого, в том числе живые организмы - биомасса - постоянно удаляется. Эти условия имитируют естественные проточные системы. Однако в отличие от естественных систем, условия среды и развития микроорганизмов в установках непрерывного культивирования в лабораториях и на промышленных предприятиях находятся под контролем и могут быть стабилизированы. Это позволяет проводить эксперименты с культурами микроорганизмов по изучению популяционных законов развития видов и их сообществ, наблюдать процессы микроэволюции.

Для микроорганизмов, особенно автотрофных бактерий и дрожжей, условия выращивания довольно просты. Их выращивают в жидкой среде, представляющей собой раствор солей и простых органических соединений. Культуру содержат при постоянной температуре и перемешивают, причем из резервуара в нее постоянно поступает стерильная среда. (Рис.11.2)

**Рис.11.2.**

- 1 – регулятор
 2 – поступление субстрата,
 3 – отток (вымывание) смеси
 субстрата и биомассы,
 4 – культура внутри культиватора,
 5 – мешалка

При построении моделей в микробиологии в качестве равноправных переменных используют как концентрации микроорганизмов, так и концентрации различных растворимых органических и неорганических веществ: субстратов, ферментов, продуктов. В микробиологии общепринят эмпирический подход к построению моделей. Из всех факторов, влияющих на рост клетки, выбирают лимитирующий, и опытным путем находят зависимость скорости роста от его концентрации. Особый класс составляют задачи, где в процессе роста происходит смена лимитирования.

В общем виде кинетика концентрации клеток в непрерывной культуре описывается уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - \nu) \quad (11.1)$$

Здесь x – концентрация клеток в культиваторе; μ – функция, описывающая размножение популяции. Она может зависеть от концентрации клеток x , концентрации субстрата (обычно обозначается S), температуры, pH среды и прочих факторов; ν – скорость вымывания.

В хорошо перемешиваемой культуре скорость вымывания зависит только от скорости протока. Если объем культиватора равен V , а скорость притока f , то величина, называемая разбавлением, определяется как $D = f/V$ и тогда скорость вымывания микроорганизмов из культиватора

$$\nu = D \quad (11.2)$$

Без учета вымывания клеток рост биомассы описывается уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu) \quad (11.3)$$

При неограниченных ресурсах питательных веществ величина μ постоянна, и уравнение (11.2) описывает экспоненциальный рост популяции клеток. Если же какие-либо причины начинают лимитировать рост, величина μ будет уменьшаться. Для микробиологических систем обычно величина, лимитирующая рост, это – концентрация субстрата. Наиболее распространенная форма записи, учитывающая насыщение скорости роста культуры по питательному субстрату, предложена Моно:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_s + S} x \quad (11.4)$$

Здесь μ_m - максимальная скорость роста микроорганизмов при данных условиях; K_S - константа, численно равная концентрации субстрата, при которой скорость роста культуры равна половине максимальной. График функции величины скорости роста от концентрации субстрата приведен на рис. 11.3

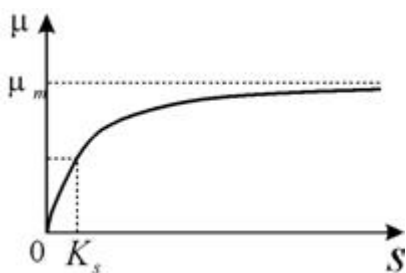


Рис. 11.3. График зависимости скорости роста от концентрации субстрата в соответствии с формулой Моно (11.4)

Вид уравнения Моно аналогичен формуле Михаэлиса-Ментен из ферментативной кинетики. И это не только формальное сходство. В основе жизнедеятельности любой клетки лежат ферментативные процессы. Скорость роста биомассы в конечном счете определяется скоростью переработки лимитирующего субстрата ферментом узкого места в метаболической сети. Пусть концентрация фермента на единицу биомассы равна E_0 . Тогда по закону Михаэлиса, скорость переработки субстрата единицей биомассы определяется формулой:

$$\frac{1}{x} \frac{dS}{dt} = - \frac{kE_0 S}{K_m + S} \quad (11.5)$$

Здесь K_m - константа Михаэлиса, k - константа скорости реакции. Вся биомасса концентрации x обладает количеством фермента $E_0 x$. Следовательно, суммарная скорость убыли субстрата равна

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{kE_0 S x}{K_m + S} \quad (11.6)$$

Предположим, что прирост биомассы пропорционален убыли субстрата:

$$\frac{dx}{dt} = - \frac{1}{\alpha} \frac{dS}{dt} \quad (11.7)$$

Обозначив $K_0 = K_m$ и $\mu_m = kE_0/\alpha$, получим формулу (11.4).

В формулах (11.4) и (11.6) имеются важные различия. Формула Михаэлиса-Ментен (11.6) относится к отдельной ферментативной реакции, все входящие в нее константы выражаются через скорости соответствующих биохимических реакций. В формуле Моно (11.4) константы скоростей K_S и μ_m являются эффективными величинами и определяются по эмпирической зависимости скорости роста культуры от концентрации питательного субстрата.

При моделировании конкретной культуры микроорганизмов часто нелегко выделить лимитирующий фактор. Здесь может играть роль соотношение коэффициентов растворимости различных веществ или проницаемости мембран клеток по отношению к этим веществам. Только специально поставленные эксперименты могут выделить управляющее звено - лимитирующий субстрат, который входит в формулу (11.4)

В стационарном состоянии процессы размножения популяции и вымывания должны быть уравновешены. При непрерывном культивировании подбором скорости потока можно стабилизировать скорость роста популяции в любой точке на восходящей ветви кривой роста популяции. Для этого применяются различные способы управления скоростью потока. Основное их свойство - обратная связь между приростом концентрации биомассы и удалением части популяции из ферментера. В различных культурах применяются разные физико-химические методы поддержания плотности культуры на разном уровне: турбидостатный, основанный на регулировании оптической плотности культуры, рН-статный для процессов, в которых имеется

связь между приростом биомассы и изменениями pH, оксигенный - для аэробных микроорганизмов. Эти способы управления дают возможность поддерживать культуру в условиях нелимитированного роста, когда скорость прироста биомассы определяется лишь собственной генетически обусловленной способностью популяции к размножению. При этом достигаются очень высокие скорости, которые особенно важны при изучении микроэволюционных процессов. Например, бактерии могут размножаться в турбидостате со скоростью, соответствующей средней продолжительности поколения - около 5 мин.

Для поддержания культуры в области нелимитированного роста требуются внешние регуляторы. В случае лимитирования роста внешним фактором, например, недостатком субстрата, стационарный режим работы культиватора устанавливается путем саморегуляции. Это имеет место в природных проточных системах и в наиболее распространенном типе непрерывных культиваторов - *хемостате*, где задается скорость разбавления культуры, или скорость протока.

Наиболее устойчиво работает хемостат в пределах скорости протока, малых по сравнению с максимальной удельной скоростью роста культуры. В области сравнимых значений этих величин система становится неустойчивой: малые колебания скорости протока могут приводить к заметным изменениям концентрации биомассы и даже к вымыванию культуры из культиватора. Теория хемостата впервые была разработана Моно (1950) и Гербертом (1956) и с той поры постоянно совершенствуется. Однако, основы ее остались незыблемыми. На них мы и сосредоточим свое внимание.

Модель Моно

При непрерывном перемешивании можно считать весь объем культиватора однородно заполненным, концентрации субстрата и клеток в каждой точке культиватора одинаковыми, и описывать поведение этих концентраций во времени с помощью системы обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \mu(S)x - D(x), \\ \frac{dS}{dt} &= DS_0 - \alpha\mu(S)x - DS, \\ \mu(S) &= \frac{\mu_m S}{K_m + S}\end{aligned}\quad (11.8)$$

Здесь S - концентрация субстрата

x - концентрация клеток в культиваторе

S_0 - концентрация субстрата, поступившего в культиватор

D - скорость протока (разбавления) культуры

α^{-1} - "экономический коэффициент, показывающий, какая часть поглощенного субстрата идет на приращение биомассы.

Поясним смысл членов, входящих в правые части уравнений. В первом уравнении: $\mu(S)x$ - прирост биомассы за счет поглощения субстрата, $-Dx$ - отток биомассы из культиватора.

Во втором уравнении: $-\alpha\mu(S)x$ - количество субстрата, поглощенного клетками культуры, DS_0 - приток субстрата в культиватор, $-DS$ - отток неиспользованного субстрата из культиватора.

Скорость роста биомассы предполагается зависящей только от концентрации субстрата в соответствии с формулой Моно (третье уравнение).

Исследуем тип стационарных режимов и переходных процессов в культиваторе, используя методы, изученные в лекциях (3-5).

Введем безразмерные концентрации, время и скорость протока

$$\begin{aligned}x' &= \alpha x / K_S, \quad y = S / K_S, \quad y_0 = S_0 / K_S \\ t' &= t\mu_m, \quad D' = D / \mu_m\end{aligned}$$

Штрихи у новых переменных опустим. В новых переменных система имеет вид:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \mu(y)x - Dx, \\ \frac{dy}{dt} &= -\mu(y)x + D(y_0 - y) \\ \mu(y) &= \frac{y}{1+y}\end{aligned}\quad (11.9)$$

Найдем стационарные концентрации биомассы и субстрата. Приравняем правые части уравнений нулю

$$\begin{aligned}\left(\frac{\bar{y}}{1+\bar{y}} - D\right)\bar{x} &= 0 \\ -\frac{\bar{y}}{1+\bar{y}}\bar{x} + D(y_0 - \bar{y}) &= 0\end{aligned}\quad (11.10)$$

Система алгебраических уравнений (11.10) имеет два решения, следовательно, система дифференциальных уравнений (11.9) имеет два стационарных состояния

$$\bar{x}_1 = 0, \bar{y}_1 = y_0; \quad (11.11)$$

$$\bar{x}_2 = y_0 - \frac{D}{1-D}, \bar{y}_2 = \frac{D}{1-D} \quad (11.12)$$

Примем во внимание, что безразмерная концентрация клеток x имеет смысл только при значениях $x > 0$, а безразмерная концентрация субстрата y ограничена сверху значением $y_0 = S_0/K$ - концентрацией притекающего субстрата. Легко видеть, что ненулевое стационарное значение биомассы (11.12) имеет смысл только в случае, когда безразмерная скорость протока D меньше определенной величины

$$D \leq \frac{y_0}{1+y_0} = D_0 \quad (11.13)$$

Граничное значение скорости протока называется скоростью вымывания. В размерном виде его величина равна:

$$D_u = \frac{\mu_m y_0}{K_s + y_0} \quad (11.14)$$

При скоростях протока, больших D_0 , прирост биомассы не может компенсировать ее отток, и культура полностью вымывается из культиватора.

Определим характер устойчивости стационарных состояний системы, используя метод линеаризации системы в окрестности стационарного состояния, рассмотренный в лекции 4.

Характеристический определитель системы (11.9) имеет вид.

$$\begin{vmatrix} \mu(\bar{y}) - D - \lambda & \frac{\bar{x}}{(1+\bar{y})^2} \\ -\mu(\bar{y}) & \frac{\bar{x}}{(1+\bar{y})^2} - D - \lambda \end{vmatrix}. \quad (11.15)$$

Исследуем характер устойчивости режима вымывания - особой точки с координатами (11.11). В этом случае

$$\mu(y_0) = \frac{y_0}{1+y_0} = D_0. \quad (11.16)$$

и характеристический определитель принимает вид

$$\begin{vmatrix} D_s - D - \lambda & 0 \\ -D_s & -D - \lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (11.17)$$

Корни характеристического уравнения (11.17)

$$\lambda_1 = -D,$$

$$\lambda_2 = D_B - D \quad (11.18)$$

действительны и имеют различные знаки при $D < D_B$, то есть при скоростях разбавления, меньших скоростей вымывания. При этом точка $(0, y_0)$ неустойчива - седло.

Если же $D > D_B$ - оба корня отрицательны, и особая точка (11.11) является устойчивым узлом. Этот режим называется режимом вымывания.

Концентрация субстрата в культиваторе равна при этом концентрации поступающего субстрата S_0 , а концентрация биомассы равна нулю. Если в такой культиватор заложить “затравку”, микроорганизмы будут вымыты из культиватора, не успев размножиться.

Для второй особой точки с координатами (11.12) корни характеристического уравнения равны

$$\lambda_1 = -D$$

$$\lambda_2 = -(D_B - D)(1 + y_0)(1 - D) \quad (11.19)$$

Напомним, что это ненулевое по биомассе состояние равновесия существует в положительном квадранте фазовой плоскости лишь при значениях скорости разбавления $D < D_B$. Так как

$$D_B = \frac{y_0}{1 + y_0} < 1,$$

то все три сомножителя, входящие в выражение для λ_2 в (11.19) положительны. Следовательно, $\lambda_2 < 0$, и точка (11.12) - устойчивый узел. Это и есть рабочее состояние проточного культиватора.

Фазовые портреты системы для двух значений скоростей потока $D < D_B$ и $D > D_B$ приведены на рис.11.4 (а,б)

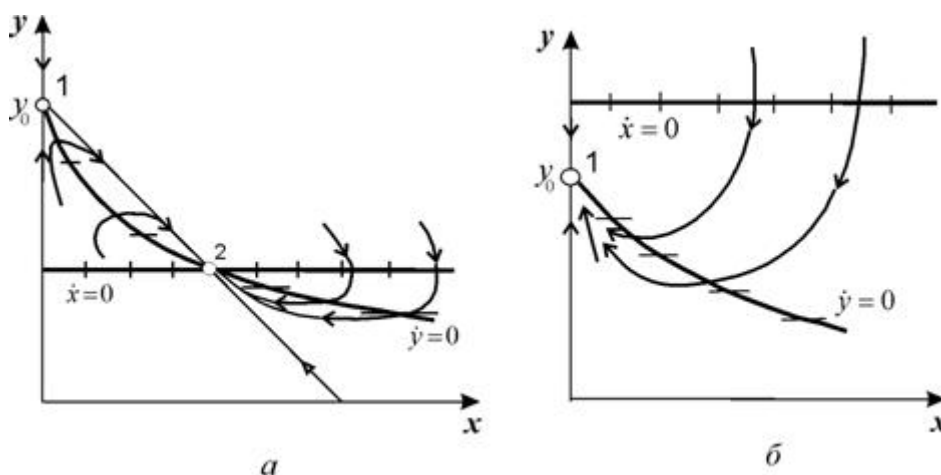


Рис. 11.4. Фазовые портреты системы 11.9.

а – стационарный режим работы, б – режим вымывания.

Пояснения в тексте

Уравнение изоклины горизонтальных касательных получим, приравняв правую часть второго уравнения (11.9) нулю

$$x = \frac{D(y_0 - y)(1 + y)}{y} \quad (9.20)$$

Изоклины вертикальных касательных на рисунках 11.4: ось $x=0$ и прямая

$$y = \frac{D}{1 - D} \quad (11.21)$$

В случае, когда $D < D_B$ главные изоклины (11.20) и (11.21) пересекаются в положительном квадранте, и точка их пересечения является устойчивым узлом, а точка пересечения кривой (9.20) с осью $x = 0$ – седлом (рис.11.4 а)

В случае $D > D_B$ главные изоклины (11.20) и (11.21) пересекаются вне положительного квадранта, и устойчивым узлом будет особая точка (11.11), соответствующая режиму вымывания (рис.11.4б).

Рассмотренная модель является упрощенной и для описания реальных процессов требует дополнений. Например, при больших концентрациях субстрата может оказывать ингибирующее действие, и тогда формулу для скорости роста следует записывать в виде:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{к}} S}{K_{\text{к}} + S + AS^2} \quad (11.22)$$

В системе, где существует такая зависимость скорости роста от субстрата, возможны триггерные режимы - наличие двух устойчивых стационарных состояний и зависимость стационарных значений концентраций субстрата и биомассы от начальных условий (от величины затравки и начальной концентрации биомассы).

На скорость роста биомассы может оказывать влияние концентрация продуктов метаболизма в среде, окружающей клетку. Тогда к двум уравнениям, описывающим динамику концентрации биомассы и субстрата в непрерывном процессе культивирования, следует добавить третье уравнение, выражающее динамику концентрации продуктов метаболизма. При этом скорость роста биомассы будет зависеть как от концентрации субстрата. Так и от концентрации продукта. Наиболее известную формулу такой зависимости предложил Иерусалимский:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{к}} S}{(K_{\text{к}} + S) + (K_p + P)} \quad (11.23)$$

Формула (11.23) известна как формула Моно-Иерусалимского.

Исследование модели, учитывающей ингибирующее действие продукта показывает, что значение скорости вымывания в такой системе совпадает с величиной D_B , полученной выше для модели Моно. В то же время ингибирующее влияние продукта ведет к значительному уменьшению стационарных концентраций биомассы.

Микроэволюционные процессы в микробных популяциях

Быстрота смены поколений делает микробные популяции чрезвычайно удобным объектом для изучения процессов микроэволюции. Пусть требуется изучить микроэволюционный процесс в популяции, протекающий в течение 100 генераций, например, проследить последствия повышения фона радиации. В популяции однолетних организмов (например, сельскохозяйственных культур) для проведения такого исследования не хватит всей жизни одного исследователя. Для человеческой популяции на сто поколений приходится период времени более 2000 лет. А для микробной популяции с временем генерации $g=20$ мин. наблюдение 100 генераций займет около полутора суток.

Рассмотрим процесс восстановления популяции после воздействия неблагоприятного фактора. Пусть процесс происходит в условиях непрерывного культивирования. Предположим, что в микробной популяции в результате воздействия неблагоприятного внешнего воздействия погибает значительная часть клеток. После снятия неблагоприятного фактора в популяции будет происходить процесс восстановления. В результате действия протока количество мертвых клеток будет уменьшаться, а количество живых будет определяться двумя процессами - вымыванием и размножением. Со временем доля живых клеток увеличивается, и популяция возвращается к активному состоянию.

Рассмотрим простейшую модель такой системы (Н.С.Печуркин). Разделим все клетки на два типа. Первый тип - потерявшие способность к размножению в результате воздействия неблагоприятного фактора неживые клетки. Второй тип - сохранившие способность к размножению клетки. Динамика живых и неживых клеток может быть описана системой уравнений.

$$\begin{aligned}
\frac{dx_{\text{ж}}}{dt} &= \mu(S)x_{\text{ж}} - Dx_{\text{ж}} \\
\frac{dx_{\text{н}}}{dt} &= -Dx_{\text{н}} \\
\frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) - \alpha \mu(S)x_{\text{ж}} \\
x_{\text{ж}} + x_{\text{н}} &= x
\end{aligned}
\tag{11.24}$$

Здесь $x_{\text{ж}}$ - концентрация живых клеток,

$x_{\text{н}}$ - концентрация неживых клеток

x - общая концентрация клеток в популяции

S - концентрация лимитирующего субстрата.

Функция $\mu(S)$, характеризующая зависимость скорости роста живых клеток от концентрации лимитирующего субстрата может быть представлена в форме Моно, или в виде более сложной функции.

Если воздействие неблагоприятного фактора было сильным, и погибла значительная часть популяции, потребление субстрата в начальные моменты процесса восстановления будет незначительным. Концентрация субстрата в среде значительно повысится за счет его постоянного поступления. При этом можно считать, что $\mu = \mu_{\text{max}} = \text{const}$.

Тогда уравнение для субстрата можно исключить из рассмотрения. Анализ кинетики восстановления сведется к рассмотрению простой системы первых двух уравнений и алгебраического соотношения для количества клеток. Решив систему уравнений, получим соотношение, определяющее долю живых клеток в популяции в любой момент времени t

$$\frac{x_{\text{ж}}}{x} = \frac{a_0 e^{\mu_{\text{max}} t}}{1 + a_0 e^{\mu_{\text{max}} t}}
\tag{11.25}$$

где a_0 - отношение количества живых и неживых клеток в начальный момент времени.

Можно оценить время, которое необходимо популяции для устранения последствий неблагоприятного фактора. Будем считать процесс восстановления законченным, если в популяции на сто живых осталась одна неживая клетка. Пусть в результате неблагоприятного воздействия в популяции отношение живых клеток к неживым составляло 1:100. Оценки (Печуркин, 1978) показывают, что для изменения соотношения числа живых и неживых клеток в 10^4 раз необходимо примерно тринадцать с половиной поколений культуры. Даже при очень сильном неблагоприятном воздействии, например при $a_0 = 10^{-7}$, время восстановления до 90% уровня живых клеток составляет 27 генераций. Это объясняется логарифмической зависимостью времени восстановления от отношения живых и неживых клеток.

На сходных моделях можно анализировать конкуренцию мутантных форм в микробных культурах. Несмотря на то, что частота мутаций, приводящих к улучшению некоторого признака чрезвычайно низка, именно такие мутанты вытесняют исходную форму за счет действия естественного отбора. Анализ экспериментального материала на основе таких моделей позволил сделать определенные выводы о совместном действии мутаций и отбора. А именно, преимущества имеют следующие мутанты.

- Мутанты, способные более полно утилизировать имеющийся субстрат, то есть имеющие отличную от исходной форму зависимость $\mu = f(S)$.

- “Экономичные” мутанты, способные более полно использовать субстрат.
- Более “резистентные” мутанты, менее чувствительные к воздействию внешнего фактора.
- Мутанты с пониженными скоростями отмирания.
- Менее “мутабельные” мутанты.
- Быстро растущие и быстро отмирающие мутанты
- Мутанты с увеличенной максимальной скоростью роста

- Мутанты, выделяющиеся в неоднородных средах, например, способные противостоять вымыванию из ферментера: прилипать к стенкам или слипаться в комки и выпадать на дно.

- Оценка времени замены исходной формы мутантной при воздействии неблагоприятного фактора (например, антибиотика), показывает, как быстро распространяются нечувствительные к ингибиторам мутанты в открытых системах.

Возрастные распределения микроорганизмов

Однородность клеток в микробной популяции всегда относительна. Большую роль в процессах роста микробной популяции играет возрастная структура. Делиться, т.е. увеличивать численность популяции, способны только клетки, достигшие определенного возраста (или определенного размера). Возрастная гетерогенность популяции может служить причиной сложной немонотонной динамики ее численности.

Рассмотрим простейшую двухвозрастную модель клеточной популяции (Степанова, 1985). Популяция разбита на две группы клеток: молодые и старые.

Понятие “молодые” и “старые” применительно к разным видам микроорганизмов можно трактовать по-разному. В клетках эукариотов молодыми можно считать клетки G_1 , в которой синтезируется белок, а старыми - все остальные, начиная с S -фазы синтеза ДНК. Именно на этих поздних стадиях существуют ингибирующие кейлоны, угнетающе действующие на скорость деления.

Будем считать, что клетки первой группы интенсивно растут, но не достигли физиологической зрелости и неспособны делиться. Члены второй группы способны к делению. Процесс деления может быть задержан при помощи различных ингибиторов. Уравнения для численностей молодых (N_1) и старых (N_2) клеток имеют вид:

$$\begin{aligned}\frac{dN_1}{dt} &= \frac{2}{T_2} N_2 - \frac{1}{T_1} N_1 - DN_1, \\ \frac{dN_2}{dt} &= \frac{1}{T_1} N_1 - \frac{1}{T_2} N_2 - DN_2\end{aligned}\quad (11.27)$$

Здесь T_1 - среднее время созревания молодой клетки,

T_2 - среднее время пребывания старой клетки в репродуктивном периоде, D - скорость протока.

Удельная скорость деления клеток $\omega = T_2^{-1}$. Множитель 2 в первом уравнении отражает тот факт, что старая клетка делится на две молодые.

При отсутствии лимитирования субстратом продолжительность первой фазы T_1 постоянна, продолжительность второй фазы T_2 зависит от взаимного влияния клеток, которое осуществляется с помощью метаболитов (кейлонов), выделяемых клетками в среду. Если скорость выделения и распада кейлонов много больше скорости протока и скорости деления клеток, концентрация кейлонов пропорциональна числу клеток, их выделяющих.

Обозначим концентрацию ингибирующего метаболита I . Его влияние на удельную скорость деления клеток можно записать в виде:

$$T_2^{-1} = \omega = \omega_0 \left[1 + \left(\frac{I}{k_1} \right)^n \right]^{-1}$$

Здесь n - порядок ингибирования, k_1 - константа ингибирования.

Были рассмотрены три ситуации: 1) ингибиторы выделяются только молодыми клетками, 2) ингибиторы выделяются только старыми клетками, 3) независимо от возраста. Исследование модели показало, что только предположение о выделении ингибиторов старыми клетками позволяет описать колебательные режимы в системе. В рамках модели это означает, что скорость деления зависит от N_2 :

$$\omega = \omega_0 \left[1 + \left(\frac{N_2}{N_1} \right)^n \right]^{-1}$$

Введем безразмерные переменные:

$$x = \frac{N_1}{N_0}, \quad y = \frac{N_2}{N_0}, \quad t' = \frac{t}{T_1}, \quad \sigma = \omega_0 T_1, \quad \delta = DT_1$$

В безразмерных переменных система имеет вид:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -\frac{2\sigma y}{1+y^n} - (\delta+1)x, \\ \frac{dy}{dt} &= x - \delta y - \frac{\sigma y}{1+y^n} \end{aligned} \quad (11.28)$$

Штрих у времени опущен.

Кроме тривиальной особой точки система (11.28) имеет еще одну особую точку:

$$\bar{x} = 2\sigma \bar{y} \frac{1}{1-\delta}, \quad \bar{y} = \frac{(1-\delta)\sigma}{(1+\delta)\sigma} - 1,$$

тип которой может быть различным в зависимости от параметров. Ширина области неустойчивости в пространстве параметров зависит от порядка ингибирования: чем больше n , тем она шире. Области неустойчивости на плоскости параметров (σ, δ) для второго и третьего порядка ингибирования изображены на рис. 11.5.

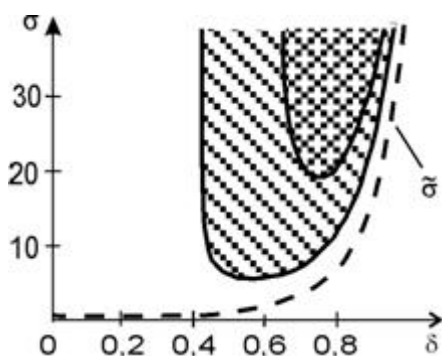


Рис. 11.5. Параметрические области неустойчивости стационарного ненулевого решения при $n=2$ (двойная штриховка) и $n=3$ (простая штриховка)

Фазовый портрет системы в области неустойчивости содержит предельный цикл (рис. 11.6).

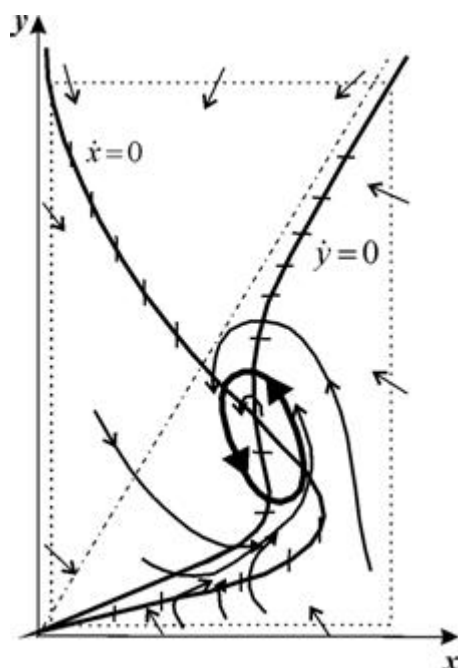


Рис. 11.6. Фазовый портрет системы (11.28) в области неустойчивости ненулевого стационарного решения. Жирная линия – предельный цикл

Динамика переменных изображена на рис. 11.7.

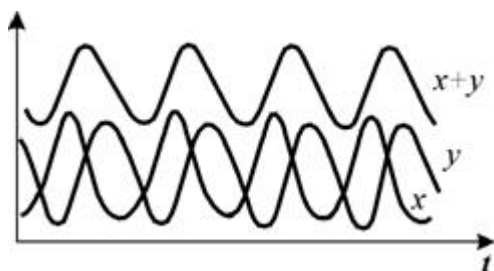


Рис.11.7 Динамика переменных в модели 11.28

Непрерывные модели возрастной структуры микроорганизмов.

Такие модели оперируют не с численностями отдельных групп, а с непрерывной функцией распределения организмов по возрастам. Уравнение для плотности функции распределения было впервые получено Мак-Кендриком в 1926 г., а затем “переоткрыто” фон Ферстером в 1959 г. и носит его имя.

Это уравнение представляет собой дифференциальную форму закона сохранения числа особей. В уравнении две независимые переменные - время t и возраст τ , который отсчитывается с момента рождения особи.

$n(t, \tau)d\tau$ - количество особей, имеющих возраст в интервале $[\tau, \tau+d\tau]$.

Общее число особей всех возрастов в момент времени t определяется интегралом

$$N(t) = \int_0^{\infty} n(t, \tau) d\tau$$

Уравнение Ферстера имеет вид:

$$\frac{\partial n(t, \tau)}{\partial t} + \frac{\partial n(t, \tau)}{\partial \tau} = -[D(t) + \omega(t, \tau)n(t, \tau)] \quad (11.29)$$

с начальным условием

$$n(0, \tau) = g(\tau) \quad (11.30)$$

В уравнении (11.29) слева стоит полная производная dn/dt , при этом учтено, что $d\tau/dt=1$. В правой части - члены, которые описывают процессы, приводящие к изменению числа клеток данного возраста. Убыль клеток может быть вызвана разными причинами - смертностью, миграцией. Для проточной культуры всеми этими процессами можно пренебречь по сравнению с протоком клеток через культиватор. Скорость протока $D(t)$ не зависит от возраста клеток, но может зависеть от времени.

Член $-\omega(t, \tau)n(t, \tau)$ описывает убыль клеток из данного интервала возрастов при делении на дочерние со скоростью ω . Прирост численности в результате размножения происходит в нулевой возраст и войдет в граничное условие при $\tau=0$.

$$n(t, 0) = k \int_0^{\infty} n(t, \tau') W(t, \tau') d\tau' \quad (11.31)$$

Здесь k - число потомков в одном акте размножения, $W(t, \tau')d\tau'$ - вероятность размножения родителя в возрастном интервале $[\tau', \tau'+d\tau']$, равная удельной скорости размножения;

$$W(t, \tau)d\tau = \omega(t, \tau)dt, \quad \omega = W \frac{d\tau}{dt} = W \quad (11.32)$$

Если родители остаются в популяции после размножения (дрожжи), то $W(t, \tau)$ - плотность безусловной вероятности деления в возрасте τ (функция распределения возрастов деления). Если же клетки выбывают из своей возрастной группы после деления (водоросли, бактерии), то $W(t, \tau)$ -

плотность условной вероятности разделиться в возрасте τ , если клетка дожила до этого возраста, не разделившись.

Существуют модели, описывающие распределение клеток по размерам и массам. Их легче сопоставлять с экспериментальными данными, так как имеются экспериментальные методы определения размеров клеток. Активно разрабатываются методы микроизмерений, позволяющие определить и другие параметры отдельных клеток (например, фотосинтетическую активность, содержание хлорофилла в водорослях, внутриклеточное pH и др.)

Все большее распространение получают методы проточной микрофлуорометрии, позволяющие регистрировать спектральные характеристики сотен и тысяч микроорганизмов и строить соответствующие распределения признаков отдельных особей. Информация об эволюции этих распределений дает новые возможности оценки состояния популяций микроорганизмов, например, состояний популяций планктона в морях, почвенных микроорганизмов, клеток крови. Здесь предстоит большая работа по решению как математических так и методических вопросов.