

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Математическое моделирование динамики кворум-эффекта в накопительной культуре люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* 1889

С.И. Барцев^{1, 2}✉, А.Б. Сарангова²

¹ Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия
✉ bartsev@yandex.ru

Аннотация. В начале статьи обсуждается уровень необходимой феноменологичности сложных моделей. При работе со сложными системами, к которым, безусловно, относятся живые организмы и экологические системы, с необходимостью приходится использовать феноменологическое описание. Приведена иллюстрация феноменологического подхода, который ухватывает наиболее существенные даже не закономерности, а общие принципы или паттерны взаимодействий, причем конкретные значения параметров не могут быть вычислены из первых принципов, а определяются эмпирически. Также эмпирически и прагматически выбирается соответствующая интерпретация. Однако для моделирования более широкого круга ситуаций возникает необходимость понижать уровень феноменологии, переходить на более детальное описание системы, вводя взаимодействие между выделенными элементами системы. Формулируются требования к модели системы, совмещающей экологический, метаболический и генетический уровни описания клеточной культуры. Разработана математическая модель динамики кворум-эффекта в процессе роста накопительной культуры люминесцентных бактерий при разных концентрациях питательного субстрата. Модель содержит четыре блока, описывающие экологический, энергетический, кворумный и люминесцентный аспекты развития культуры. Модель продемонстрировала хорошее соответствие экспериментальным данным, полученным в ходе выполнения работы. При анализе модели отмечены три странности в поведении культуры, которые, предположительно, могут изменить представление о некоторых процессах, имеющих место при развитии культуры люминесцентных бактерий. Полученные результаты позволяют предположить наличие некоторой дополнительной системы контроля люминесцентной реакции через пути синтеза ФМН·Н₂ или алифатического альдегида. В этом случае обобщенное описание вклада энергетического метаболизма в люминесценцию только через АТФ является слишком сильным упрощением. В результате анализа результатов сопоставления модельной динамики с экспериментом возникло расхождение между измеряемой в эксперименте концентрацией субстрата (пептона) и его эффективным действием на рост популяции бактерий. Это расхождение, по-видимому, указывает на то, что пептон не является ведущим субстратом и рост лимитируют биогены, содержащиеся в дрожжевом экстракте, концентрация которого в этих экспериментах не изменялась. Отмеченные расхождения между ожиданиями и результатами обработки экспериментальных данных вместе с предположениями о причинах этих расхождений задают направление дальнейших экспериментальных и теоретических исследований механизмов кворум-эффекта в культуре люминесцентных бактерий.
Ключевые слова: кворум-эффект; математическая модель; люминесцентные бактерии.

Для цитирования: Барцев С.И., Сарангова А.Б. Математическое моделирование динамики кворум-эффекта в накопительной культуре люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* 1889. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):869-877. DOI 10.18699/VJGB-23-100

Mathematical modeling of quorum sensing dynamics in batch culture of luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* 1889

S.I. Bartsev^{1, 2}✉, A.B. Sarangova²

¹ Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
✉ bartsev@yandex.ru

Abstract. At the beginning of the paper, the level of necessary phenomenology of complex models is discussed. When working with complex systems, which of course include living organisms and ecological systems, it is necessary to use a phenomenological description. An illustration of the phenomenological approach is given, which captures the most significant general principles or patterns of interactions; the specific values of the parameters cannot be calculated

from the first principles, but are determined empirically. An appropriate interpretation is also chosen empirically and pragmatically. However, in order to simulate a wider range of situations, it becomes necessary to lower the level of phenomenology, switch to a more detailed description of the system, introducing interaction between selected elements of the system. The requirements for a system model combining ecological, metabolic and genetic levels of cell culture description are formulated. A mathematical model of quorum sensing dynamics during the growth of batch culture of luminescent bacteria at different concentrations of the nutrient substrate has been developed. The model contains four blocks describing ecological, energy, quorum and luminescent aspects of bacterial culture growth. The model demonstrated good agreement with the experimental data obtained. When analyzing the model, three oddities in the behavior of the culture were noted, which presumably can change the idea of some processes taking place during the development of a culture of luminescent bacteria. The results obtained suggest the presence of some additional control system for the luminescent reaction via the synthesis pathways of $FMN \cdot H_2$ or aliphatic aldehyde. In this case, the generalized description of the contribution of energy metabolism to luminescence only through ATP is too strong a simplification. As a result of comparing the model dynamics with the experiment, a discrepancy arose between the concentration of the substrate (peptone) measured in the experiment and its effective influence on the bacterial population growth. This discrepancy seems to indicate peptone is not the leading substrate, and growth is limited by nutrients contained in the yeast extract, the concentration of which did not change in these experiments. The discrepancies noted between the expectations and the results of experimental data processing, together with the assumptions about the causes of these discrepancies, set the direction for further experimental and theoretical studies of quorum sensing mechanisms in a culture of luminescent bacteria

Key words: quorum sensing; mathematical model; luminescent bacteria.

For citation: Bartsev S.I., Sarangova A.B. Mathematical modeling of quorum sensing dynamics in batch culture of luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* 1889. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):869-877. DOI 10.18699/VJGB-23-100

Введение

При работе со сложными системами, к которым, безусловно, относятся живые организмы и экологические системы, с необходимостью приходится использовать феноменологическое описание. Одним из примеров феноменологического описания популяции является уравнение Ферхюльста. Несмотря на то что формально уравнения на численность можно использовать лишь вблизи порога выживания популяции (Горбань и др., 1982), это уравнение достаточно хорошо описывает динамику различных процессов: накопительной культуры микроорганизмов, развития эпидемии в фиксированных условиях, развития популяции после инвазии и динамики продаж в условиях ограниченной емкости рынка. По-видимому, это связано с тем, что на завершающей стадии развития процесса, когда величина переменной приближается к значению предельной емкости среды, удельная скорость роста приближается к 0, что, по сути, соответствует приближению к порогу выживания.

Уравнение Ферхюльста можно записать несколькими вариантами, которым соответствуют разные интерпретации. Рассмотрим для примера два из них:

$$\dot{N} = \mu_0(N_{\max} - N)N, \quad (1a)$$

$$\dot{N} = \mu_0 N - \alpha N^2. \quad (1b)$$

В первом варианте N_{\max} называют емкостью среды, понимаемой как предельная численность популяции, которая может существовать в данных условиях, а произведение $\mu_0 N_{\max}$ представляет собой удельную скорость роста популяции при близкой к нулю ее численности. Емкость среды феноменологически включает всевозможные факторы, ограничивающие рост популяции: ограниченность субстрата, ингибирование метаболитами, фиксированную поверхность светосбора для растений. Этот вариант хорошо соответствует интерпретации роста растительной или микробной популяции.

Во втором варианте μ_0 – удельная скорость роста, α – коэффициент, описывающий внутривидовую конкуренцию, которая может реализоваться разными механизмами: конкуренцией за пищу и/или вытеснением с охотничьей территории и прямыми столкновениями особей. Такая интерпретация представляется более подходящей для животного мира.

Эти примеры приведены для иллюстрации феноменологического подхода, который ухватывает наиболее существенные даже не закономерности, а общие принципы или паттерны взаимодействий, причем конкретные значения параметров не могут быть вычислены из первых принципов, а определяются эмпирически. Эмпирически и прагматически выбирается также соответствующая интерпретация.

Однако для моделирования более широкого круга ситуаций возникает необходимость понижать уровень феноменологии, переходить на более детальное описание системы, вводя взаимодействие между выделенными элементами системы. Так, встречаются случаи, когда уравнение Ферхюльста описывает динамику накопительной культуры недостаточно точно. В этом случае приходится, например, учитывать динамику субстрата и вводить, допустим, субстратное ингибирование роста культуры. При этом мы все равно остаемся на очень высоком уровне феноменологии, продолжая описывать зависимость роста культуры формулой Моно и ее различными модификациями и усложнениями, сводя весь метаболизм клетки или многоклеточного организма к одной ключевой ферментативной реакции.

Потребность в понижении уровня феноменологии возникает, когда исследователь встречается с явлениями, которые не укладываются в имеющуюся модель. При этом часто приходится переходить на уровень генетической и/или метаболической регуляции клеточных процессов. Один из примеров, требующих понижения феноменоло-

гичности используемых моделей, – кворум-эффект (КЭ) (Miller, Bassler, 2001). Примечательно и символично, что кворум-эффект (quorum sensing), представляющий собой проявление событий молекулярного уровня на уровне популяции, был открыт на люминесцентных бактериях, чье свечение служит естественным индикатором текущего состояния клеточного метаболизма (Nealson et al., 1970).

Кворум-эффект заключается в том, что экспрессия некоторых генов запускается при достижении определенной пороговой плотности популяции. На уровне бактерий этот эффект основан на синтезе и выделении во внешнюю среду сигнальных молекул (аутоиндукторов), концентрация которых изменяется в зависимости от количества окружающих клеток, и при превышении некоторой пороговой концентрации запускается экспрессия определенных генов. Поскольку кворум-эффект встречается у широкого круга организмов (например, у насекомых (Anstey et al., 2009) и рыб (Makris et al., 2009)), то его изучение само по себе представляется важным. Кроме того, выявление закономерностей проявления кворум-эффекта и его прогноз важны для микробиологического синтеза продуктов, запускаемого этим эффектом. Примером такого продукта является бактериальная люцифераза, препараты которой используются для лабораторных и токсикологических экспресс-биотестов. При этом люминесцентные бактерии являются удобным инструментом исследования кворум-эффекта, поскольку люминесценция представляет собой естественную функцию клеток, что дает возможность изучать процесс на нативных клетках без внедрения специальных флуоресцентных красителей и без стимулирующего флуоресценцию излучения. Эволюционный смысл кворум-эффекта у люминесцентных бактерий находит объяснение в рамках гипотезы, что механизм отбора связан с рассеиванием и размножением бактерий (Nealson, Hastings, 1979). Являясь морскими энтеробактериями, светящиеся бактерии, растущие на субстрате (поверхность мертвых организмов или фекальные шарики), при достаточной плотности культуры могут производить свечение, способное привлечь организмы к их поглощению, обеспечивая тем самым круговорот бактерий по кишечным трактам морских животных.

Целью настоящей работы была разработка математической модели и ее программной реализации для анализа экспериментальных данных по кворум-эффекту в накопительной культуре люминесцентных бактерий. Для конкретизации требований к модели сформулируем своеобразное техническое задание (ТЗ). Во-первых, модель должна описывать динамику роста бактерий в накопительной культуре, во-вторых, она должна описывать динамику свечения бактериальной культуры, которая регулируется кворум-эффектом, т.е. событиями на молекулярном уровне, и, в-третьих, модель должна быть максимально простой. Сложная модель содержит большое количество параметров, значения которых неизвестны, т.е. мы следуем парадигме, что чем меньше подгоночных параметров в модели, описывающей сложные процессы, тем больше она отображает сущность моделируемых процессов.

В третьем пункте нашего условного ТЗ упоминается сложность модели, и поскольку этот пункт взыскует к про-

стоте создаваемой модели, то требуется хотя бы краткое обсуждение этого термина. К сожалению, универсального определения сложности нет, об этом говорит огромное (более сорока) количество существующих определений сложности (Edmonds, 1999). Особенности применения этого термина к описанию живых эволюционирующих систем позволяют сузить набор возможных определений (Барцев, Барцева, 2010). В случае математических моделей, построенных в виде систем обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), часто используемых для описания химической (биохимической) кинетики и динамики экологических систем, естественным (или по крайней мере широко используемым) показателем сложности является количество дифференциальных уравнений в системе. По-видимому, не зря методы, позволяющие понизить размерность системы ОДУ, например, за счет выделения подсистемы быстрых движений и применения теоремы Тихонова (Романовский и др., 1984), называются методами упрощения систем кинетических уравнений.

Правда остается вопрос о сложности самих уравнений, вернее, их правых частей. Очевидно, что функции, включающие большее число (если так можно выразиться) нелинейностей, например слагаемых с большими степенями в дробно-рациональной функции, могут обеспечить более разнообразное поведение. Количественный подход к оценке сложности систем ОДУ с учетом степени нелинейности правых частей может быть основан на теореме Корзухина (Жаботинский, 1974), которая утверждает, что для системы с нелинейными правыми частями можно построить систему уравнений химической кинетики (содержащую члены, которые описывают реакции не выше второго порядка) такую, что поведение некоторых из переменных новой системы будет совпадать с поведением переменных исходной системы. Количество уравнений второй, развернутой системы могло бы служить мерой сложности модели с учетом степени нелинейности используемых правых частей. Поскольку наша задача состоит не в получении точной оценки сложности разрабатываемой модели, а лишь в построении максимально простой модели, обеспечивающей адекватное описание реальной системы, то мы будем минимизировать количество дифференциальных уравнений модели и одновременно использовать минимальные степени переменных в правых частях уравнений.

Методы и материалы

Экспериментальная часть. Объектом исследования являются светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* 1889 из коллекции Института биофизики СО РАН. Рост бактерий оценивали путем измерения оптической плотности при 660 нм на спектрофотометре Agilent Cary 60. Для измерения биолюминесценции реакционной смеси использовали люминометр (Promega GloMax 20/20 Lumipometer, США). Выращивание бактерий было проведено на жидкой среде для морских бактерий (г/л): NaCl – 28.5, KCl – 0.5, CaCl₂ – 0.5, MgCl₂ – 4.5, дрожжевой экстракт – 1, пептон – 10; pH 7.6.

Математическая модель. Биолюминесцентная система бактерий к настоящему времени очень хорошо изучена (Brodli et al., 2018). Известны ферменты, экспрессируемые

совместно при срабатывании КЭ, достаточно хорошо изучены пути синтеза субстратов люминесцентной реакции. Для нас, чтобы не погружаться в детали кинетики полиферментной системы, важно следующее: непосредственными субстратами люминесцентной реакции являются: восстановленный флавиномононуклеотид (ФМН·Н₂), длинноцепочечный алифатический альдегид – тетрадеканаль и молекулярный кислород. Флавин восстанавливается ферментом НАДН:ФМН-оксидоредуктазой, а альдегид синтезируется с помощью ферментного комплекса редуктазы жирной кислоты с потреблением АТФ. Тем самым люминесцентная реакция непосредственно связана с энергетическим метаболизмом клетки, и ее свечение зависит не только от количества люциферазы в клетке, но и от состояния ее энергетического метаболизма.

Следовательно, уже на уровне описания роста культуры в модель нужно закладывать оценку состояния ее энергетического метаболизма. Подробно свойства полиферментной системы энергетического метаболизма исследовались в почти забытой (если судить по статистике цитирования из ResearchGate) работе Е.Е. Селькова, составляющей часть коллективной монографии (Иваницкий и др., 1978). Одним из важнейших свойств энергетического метаболизма является поддержание в достаточно широких пределах постоянства внутриклеточной концентрации АТФ, чтобы обеспечить развязку (относительную независимость) внутриклеточных потребителей энергии. В упомянутой работе рассматривался случай постоянства скорости поступления субстрата при варьировании нагрузки (активности обобщенной АТФ-азы). В этой модели нужно учитывать и изменение скорости поступления субстрата (в нашем случае будем рассматривать его концентрацию в среде), и изменения АТФ-азной активности, связанные с разными фазами роста культуры. В нашей модели вся модель Селькова, в соответствии с ТЗ3, не будет воспроизведена, но некоторые его идеи будут использованы.

При написании модели, которая, с одной стороны, описывает переменные, характеризующие бактериальную культуру (концентрацию субстрата и плотность биомассы в колбе), а с другой – должна описывать среднюю внутриклеточную концентрацию АТФ, необходимо согласовать скорости процессов. Если обозначить объем колбы за V_c , а суммарный объем бактериальных клеток за V_b , то между скоростями процессов, выраженными в концентрациях за единицу времени, v_c и v_b соответственно, вследствие закона сохранения должно выполняться следующее соотношение: $v_c \cdot V_c = v_b \cdot V_b$, где правая и левая части равенства описывают скорость изменения массы реагента. Отсюда следует, что скорости внутриклеточных процессов должны превышать (концентрационные) скорости тех же процессов в V_c/V_b раз, и мы будем иметь систему с различными характерными временами изменения переменных. Обозначим отношение V_b/V_c как малый параметр ε_0 .

С учетом вышесказанного «экологическая часть» модели может быть записана в следующем виде:

$$\begin{cases} \dot{S} = -[f_G(S, a) + f_E(S, a)]N, \\ \dot{N} = [f_G(S, a) - M_N(a)]N, \\ \varepsilon_0 \dot{a} = f_E(S, a) \cdot \frac{N}{\varepsilon_1 + N} - f_G(S, a) - \frac{k_d a}{\varepsilon_2 + a}, \end{cases} \quad (2)$$

где S – концентрация питательного субстрата; N – биомасса бактерий; a – усредненная внутриклеточная концентрация АТФ в клетках бактериальной культуры.

При этом функция $f_G(S, a) = \frac{V_G S}{K_G + S} \cdot \frac{a}{K_{aG} + a}$ описывает АТФ-зависимый синтез биомассы, функция $f_E(S, a) = \frac{V_E S}{K_E + S} \cdot \frac{a}{K_{aE} + a^2}$ – производство АТФ, выражение $\frac{k_d a}{\varepsilon_2 + a}$ описывает активность обобщенной АТФ-азы, а функция $M_N(a) = \frac{m}{1 + A_N a}$ – интенсивность отмирания бактерий, зависящую от внутриклеточной концентрации АТФ.

Как можно видеть, в данной модели обобщенные активности анаболитных и катаболитных путей описываются отдельными функциями, поэтому вводить специально так называемый экономический коэффициент нет необходимости, более того, соотношение скоростей синтеза биомассы и окисления органики может меняться в ходе развития культуры. Вид функции $f_E(S, a)$, точнее ее часть, описывающая зависимость активности синтеза АТФ от ее концентрации, выбран в соответствии с моделью Селькова (Иваницкий и др., 1978). Последнее слагаемое в уравнении, описывающем концентрацию АТФ, представляет вклад обобщенной АТФ-азы, т. е. совокупность всех базовых процессов в клетке. При малых значениях коэффициента ε_2 активность АТФ-азы будет слабо меняться в широком диапазоне концентраций АТФ, и только при низких значениях будет наблюдаться падение АТФ-азной активности, что представляется естественным.

Наличие малого параметра в третьем уравнении делает концентрацию АТФ быстрой переменной и позволяет исследовать свойства этого уравнения отдельно от остальных переменных, полагая остальные (экологические) переменные константами (Романовский и др., 1984). Мы не будем делать полный анализ устойчивости этого уравнения вследствие его громоздкости, нам достаточно проверить возможность существования устойчивого квазистационарного состояния этого уравнения данной динамической системы и оценить зависимость его устойчивости от значений экологических переменных.

Из рис. 1 можно видеть, что в зависимости от набора параметров уравнение системы может иметь: А) одно устойчивое нулевое стационарное состояние либо три стационарных состояния в зависимости от концентрации субстрата S ; Б) одно неустойчивое нулевое и одно устойчивое стационарные состояния при любых значениях концентрации S . Поскольку на данном этапе мы не озабочены точным соответствием параметров модели энергетической системы клетки реальным данным, то, следуя подходу Селькова и заявленному ТЗ, выберем вариант, с одной стороны, обеспечивающий клетке стабильное удовлетворение ее энергетических потребностей, а с другой – делающий это наиболее простым способом. Этому требованию удовлетворяет набор параметров, порождающий зависимости, представленные на рис. 1, Б.

При определенных значениях параметров существует интервал изменения концентрации АТФ, в котором скорость синтеза АТФ положительна, что приводит к росту ее концентрации до тех пор, пока концентрация не попадет в область с отрицательным значением скорости, что и

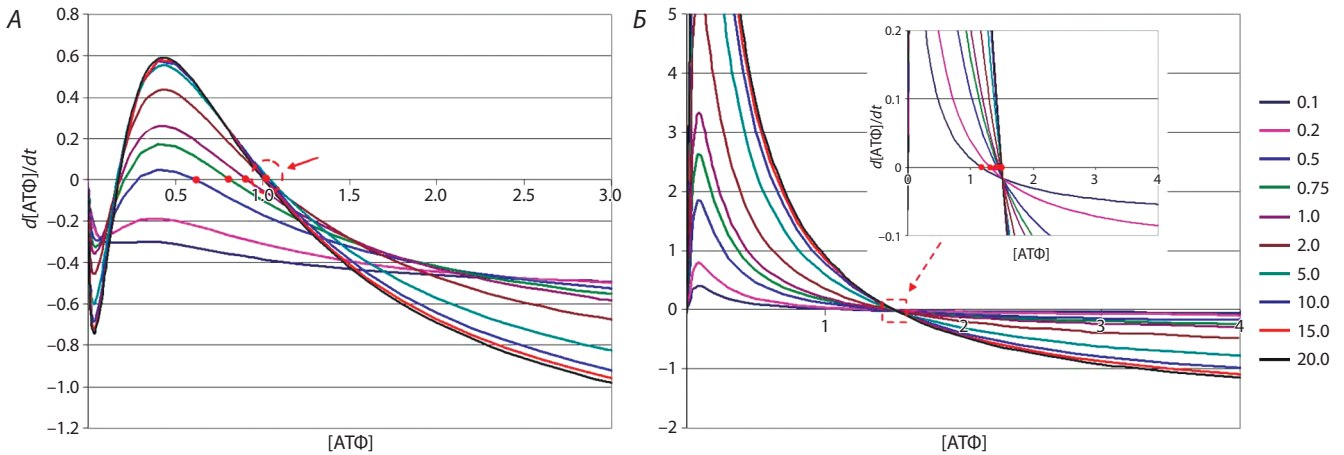


Рис. 1. Зависимость скорости изменения концентрации АТФ от ее концентрации при различных концентрациях субстрата (показаны справа), при различных значениях параметра.

Случай А: в системе при $S > S_{\min}$ могут существовать три стационарных состояния, из которых одно неустойчивое, а одно соответствует нулевой концентрации АТФ. Штриховый овал выделяет группу малоразличимых стационарных состояний при различных значениях S . Случай Б: в системе существуют одно устойчивое и одно неустойчивое нулевые стационарные состояния. Красными кружками показаны устойчивые стационарные состояния при различных концентрациях субстрата. Соответствующие наборы параметров для случая А: $V_g = 1.22, K_g = 1.94, K_a = 0.01, V_e = 2, K_e = 1, K_{ae} = 0.2, k_d = 0.5, \varepsilon_2 = 0.05$; для случая Б: $V_g = 2.18, K_g = 4, K_a = 0.004, V_e = 3.299, K_e = 4, K_{ae} = 0.008, k_d = 0.026, \varepsilon_2 = 0.85$.

обеспечивает существование устойчивого стационарного состояния (см. рис. 1).

Обеспечив, условно говоря, жизнедеятельность клетки, можно перейти к построению модели кворум-эффекта. Рассмотрим модель КЭ (Williams et al., 2008), которая впоследствии была использована в ряде работ других авторов (Melke et al., 2010; Djezzar et al., 2019). Согласно этой модели, аутоиндуктор AHL (A) и рецептор $LuxR$ (R) образуют димеризованный комплекс, который регулирует выработку как R , так и A . Кроме того, существует ненулевой, базовый, независимый от концентрации индуктора синтез $LuxR$. Модель имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \dot{R} = C_R + \frac{V_R D}{K_R + D} - k_3 R - k_1 R A + k_2 C, \\ \dot{C} = k_1 R A - k_2 C - 2k_4 C^2 + 2k_5 D, \\ \dot{D} = k_4 C^2 - k_5 D. \end{cases} \quad (3)$$

В этой системе первое уравнение описывает скорость изменения концентрации $LuxR$, которая положительно зависит от суммы базовой (C_R) и аутоиндуцированной скорости синтеза, причем последняя пропорциональна вероятности инициации транскрипции, контролируемой связыванием комплекса $(LuxR-A)_2$ (D) с соответствующим сайтом связывания в регуляторной последовательности оперона. Второе и третье уравнения описывают образование комплекса $LuxR-A$ (C) с последующим образованием димерного комплекса $(LuxR-A)_2$ (D).

Следуя (Williams et al., 2008) и ТЗЗ, будем предполагать существование квазистационарного состояния для переменных C и D . Тогда уравнение, описывающее поведение $LuxR$ при концентрации аутоиндуктора, рассматриваемой как внешний параметр, имеет вид:

$$\dot{R} = C_R + \frac{V_R \gamma R^2 A^2}{K_R + \gamma R^2 A^2} - k_3 R, \quad (4)$$

$$\text{где } \gamma = \frac{k_4 k_1^2}{k_5 k_2^2}.$$

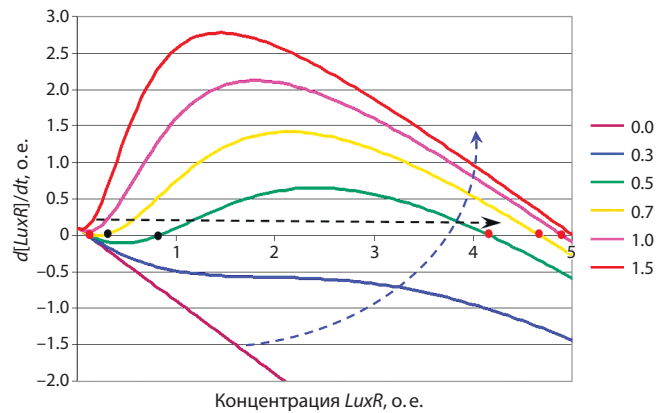


Рис. 2. Зависимость скорости изменения концентрации $LuxR$ от его концентрации при различных концентрациях аутоиндуктора, показанных справа.

Красными кружками показаны устойчивые стационарные состояния при различных концентрациях аутоиндуктора, черными – неустойчивые состояния. Изогнутая штриховая стрелка указывает направление изменения концентрации аутоиндуктора, прямая – направление переключения в новое состояние.

Для анализа свойств этого уравнения можно применить прием, использованный для третьего уравнения системы (2), т.е. рассмотреть его в координатах $(R, dR/dt)$ при разных концентрациях аутоиндуктора, что является несложным делом (рис. 2). Из рисунка видно, что при нулевой и низких концентрациях субстрата может существовать только одно устойчивое стационарное состояние, соответствующее низкой концентрации $LuxR$. По мере повышения концентрации аутоиндуктора появляются еще два стационарных состояния – устойчивое и неустойчивое, однако система произвольно не может перейти в состояние с высоким уровнем экспрессии $LuxR$. При дальнейшем росте концентрации аутоиндуктора левое колено кривой выходит из отрицательной полуплоскости,

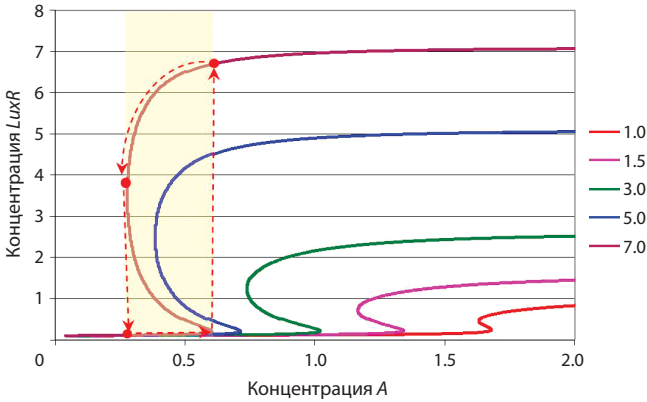


Рис. 3. Стационарные кривые, показывающие зависимость стационарной концентрации *LuxR* от концентрации аутоиндуктора при $\alpha = 0.1$, $\sigma = 1$ и разных значениях параметра β (справа).

что приводит к исчезновению неустойчивого и устойчивого состояний, и система быстро переходит в состояние с высокой концентрацией *LuxR*.

Более наглядно процесс переключения можно показать, если предположить, что реализуется квазистационарное состояние системы, описываемой уравнением (4). В этом случае можно либо применить построение графиков неявно заданных функций в системах компьютерной алгебры типа *Math*, либо, приравняв правую часть к 0, получить выражение для явной функции

$$A = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{\sigma(R-\alpha)}{(\alpha+\beta)-R}}, \quad (5)$$

где $\sigma = K_R \gamma$; $\alpha = C_R/k_3$; $\beta = V_R/k_3$. При этом должно выполняться условие $\alpha < R < \alpha + \beta$.

Для наглядности можно протабулировать (5) как обычную функцию в Excel, а потом перевернуть координаты – сделать (*A*, *R*) (рис. 3). Наглядно видно, что при превышении некоторой пороговой концентрации $A(\beta)$ происходит резкий переход в состояние высокого уровня экспрессии *LuxR*, причем в системе наблюдается гистерезис, который в природных условиях может наблюдаться при угнетении роста бактерий и постепенном разрушении аутоиндуктора.

После обкатки модели КЭ и ориентировочной оценки значений параметров, которые необходимы для реализации КЭ, вернемся к построению модели. Несколько модифицируем рассмотренную выше известную модель, чтобы обеспечить ее концептуальное единство, а именно сделаем интенсивный синтез *LuxR* энергозависимым. При этом фоновый синтез аутоиндуктора и *LuxR* оставим условно энергонезависимым, считая, что расходы на их синтез входят в активность обобщенной АТФ-азы (2):

$$\begin{cases} \dot{A} = C_A - k_0 A, \\ \dot{R} = C_R + \frac{V_R \gamma R^2 A^2}{K_R + \gamma R^2 A^2} \cdot \frac{a}{\varepsilon_3 + a} - k_3 R. \end{cases} \quad (6)$$

Забегая вперед, можно сказать, что использование более сложного уравнения, предполагающего, что одновременно с синтезом *LuxR* интенсифицируется синтез ауто-

индуктора, как это сделано в модели (Melke et al., 2010), оказалось не обязательным, чтобы описать экспериментальные данные. Кроме того, для простоты предполагается, что концентрация аутоиндуктора в среде и в клетке совпадает, что позволяет обойтись без выделения малого параметра. В итоге наша модель, объединяющая экологические и внутриклеточные молекулярные процессы, выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \dot{S} = -[f_G(S, a) + f_E(S, a)]N, \\ \dot{N} = [f_G(S, a) - M_N(a)]N, \\ \varepsilon_0 \dot{a} = f_E(S, a) \cdot \frac{N}{\varepsilon_1 + N} - f_G(S, a) - \frac{k_d a}{\varepsilon_2 + a}, \\ \dot{A} = C_A - k_0 A, \\ \dot{R} = C_R + \frac{V_R \gamma R^2 A^2}{K_R + \gamma R^2 A^2} \cdot \frac{a}{\varepsilon_3 + a} - k_3 R. \end{cases} \quad (7)$$

Займемся конструированием завершающего люминесцентного блока модели. Во-первых, предположим, что синтез люциферазы идет параллельно с синтезом *LuxR* и тоже является энергозависимым. Кроме того, учтем энергонезависимый процесс инактивации люциферазы. Однако в данном эксперименте мы регистрируем не количество люциферазы в культуре, а интенсивность люминесценции. Как сказано выше, для обеспечения свечения от клетки должны поступать НАДН и АТФ. Учитывать эти потоки отдельно возможно, но вряд ли имеет смысл, так как от наличия НАДН зависит активность цитохромной цепи, производящей АТФ. Поскольку эти процессы тесно связаны и наличие АТФ означает наличие НАДН, будем в модели (следуя ТЗЗ) рассматривать зависимость свечения только от АТФ. В результате получаем общую модель рассматриваемой системы, где наблюдаемый показатель – свет, описывается функцией *Light*(*t*):

$$\begin{cases} \dot{S} = -[f_G(S, a) + f_E(S, a)]N, \\ \dot{N} = f_G(S, a)N, \\ \varepsilon_0 \dot{a} = f_E(S, a) \cdot \frac{N}{\varepsilon_1 + N} - f_G(S, a) - \frac{k_d a}{\varepsilon_2 + a}, \\ \dot{A} = C_A - k_0 A, \\ \dot{R} = C_R + \frac{V_R \gamma R^2 A^2}{K_R + \gamma R^2 A^2} \cdot \frac{a}{\varepsilon_3 + a} - k_3 R, \\ \dot{L} = \frac{V_L R}{K_L + R} \cdot \frac{a}{\varepsilon_3 + a} - k_{dL} L, \\ \text{Light}(t) = L(t) \cdot \frac{a(t)}{\varepsilon_4 + a(t)}. \end{cases} \quad (8)$$

Отличие экологической части этой модели от (2) заключается в том, что поскольку в эксперименте рассматривается накопительная культура от инокуляции до логарифмической фазы роста включительно, без рассмотрения стационарной фазы и фазы отмирания, то смертность бактерий можно в данном эксперименте не учитывать.

Математическая модель была реализована в среде открытого ПО SciLab 6.1. Для определения параметров математической модели по экспериментальным данным использовался метод Нелдера–Мида, код которого присутствует среди сопровождающих примеров программного обеспечения.

Результаты

Проведенные пробные эксперименты на рекомендованной по прописям богатой (10 г/л пептона) и бедной (0.1 г/л пептона) средах показали наличие кворум-эффекта в обоих случаях. Кривые динамики биомассы и свечения приведены на рис. 4.

Уже рассматривая полученные кривые, без всякой модели, можно видеть (см. рис. 4, а), что до начала КЭ (в течение 6 часов культивирования) наблюдается постепенное снижение интенсивности люминесценции, осуществляемой люциферазой, принесенной с инокулятом. После достижения максимума свечения (~11 часов) происходит резкий спад интенсивности свечения. Почти очевидно, что такой спад не может быть связан с инактивацией люциферазы, что потребовало бы предположить существование специальной системы, разрушающей люциферазу сразу после синтеза, да еще в условиях энергетического голода. По-видимому, именно падение концентраций НАДН и АТФ на заключительной стадии логарифмической фазы роста культуры и обусловило это падение свечения. Тогда как медленное падение интенсивности свечения, проходившее в условиях избытка субстрата и интенсивной работы энергетического метаболизма, демонстрирует процесс инактивации люциферазы, точнее всего комплекса ферментов, обслуживающих свечение бактерий.

В то же время динамика свечения культуры в условиях бедной среды (см. рис. 4, б) ставит интересные вопросы. Видно, что за 7 часов культивирования биомасса бактерий достигла примерно трети от биомассы, достигнутой бактериями за это же время в богатой среде. При этом темпы роста культуры были хоть и не очень большими, но примерно постоянными на всем рассмотренном периоде, чего нельзя сказать о другом эксперименте. Очевидное ускорение роста культуры в богатой среде после 4-часового роста может указывать на субстратное угнетение при данных концентрациях субстрата.

Интересно, что при этом на бедной среде КЭ начался на 2 часа раньше, чем на богатой. Не исключено, что так влияет субстратное ингибирование, но этот вопрос требует дальнейшего исследования и большего количества экспериментального материала. На текущем этапе исследований наша задача состоит в разработке адекватной модели, удовлетворяющей заявленному в начале статьи ТЗ, и предварительной проверке адекватности этой модели на имеющихся экспериментальных данных.

Результаты вычислительного моделирования приведены на рис. 5 и 6. Подстройка параметров модели проходила в два этапа. Сначала подстраивалась экологическая часть, описывающая динамику биомассы бактериальной культуры, концентрации субстрата и средней по культуре внутриклеточной концентрации АТФ. Результаты приведены на трех верхних графиках представленных рисунков. Надо отметить достаточно хорошее соответствие между модельной кривой, описывающей динамику биомассы, и экспериментальными точками. Как показали дополнительные расчеты, ни модель Ферхюльста, ни введение в модель фактора субстратного ингибирования не дают улучшенного описания. Возможны два варианта: либо наблюдаемое расхождение имеет статистическую природу, либо в системе действует механизм, ускоряющий рост

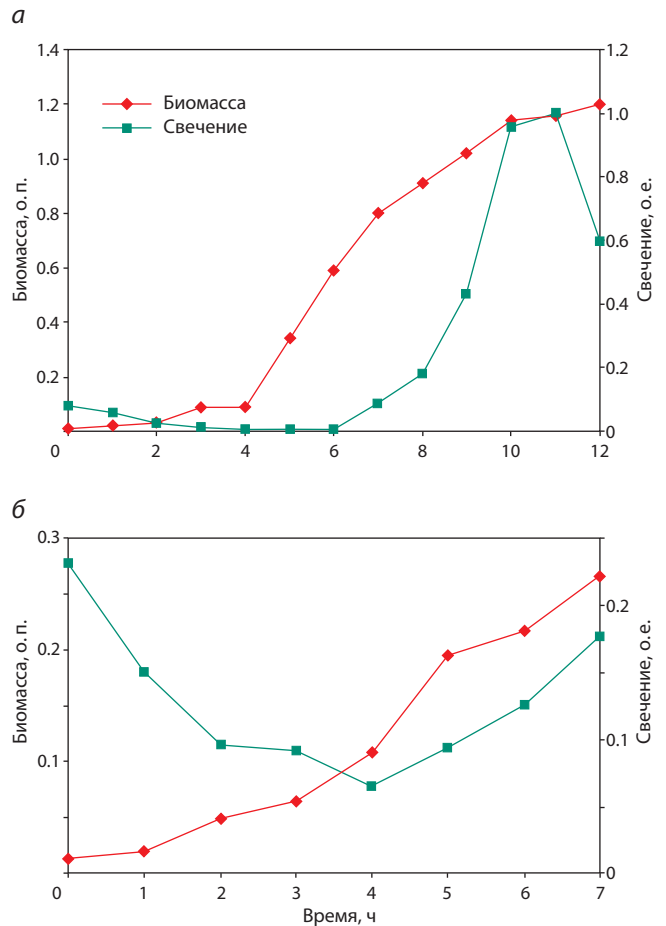


Рис. 4. Динамика роста биомассы и люминесценции культуры *Phobacterium phosphoreum* 1889 на стандартной (а) и бедной (б) среде.

после достижения некоторого порога. Для дальнейшего анализа потребуются дополнительные эксперименты, которые планируются.

Следует отметить ожидаемое поведение концентрации АТФ, которая, как видно из рис. 1, должна претерпевать незначительные изменения при варьировании концентрации субстрата в определенном интервале и достаточно резко меняться при выходе из этого интервала.

На втором этапе подстраивалась часть модели, описывающая КЭ и люминесценцию, причем в качестве опорных данных использовались уже данные по динамике люминесценции. При этом «эколого-энергетические» параметры модели не менялись.

Рисунок 5 демонстрирует модельную динамику аутоиндуктора и *LuxR*, а также динамику количества люциферазы, которая повторяет динамику экспрессии *LuxR*. Важно отметить, что модель хорошо описывает медленное падение свечения на начальном этапе развития культуры и быстрое ее уменьшение на завершающей стадии, отличающееся по темпам от уменьшения количества люциферазы, что отражает энергетическое состояние клетки.

В случае моделирования поведения культуры на бедной среде (см. рис. 6) отметим следующий момент. Модель, содержащая большое количество подстраиваемых параметров, способна описывать разнообразные варианты ди-

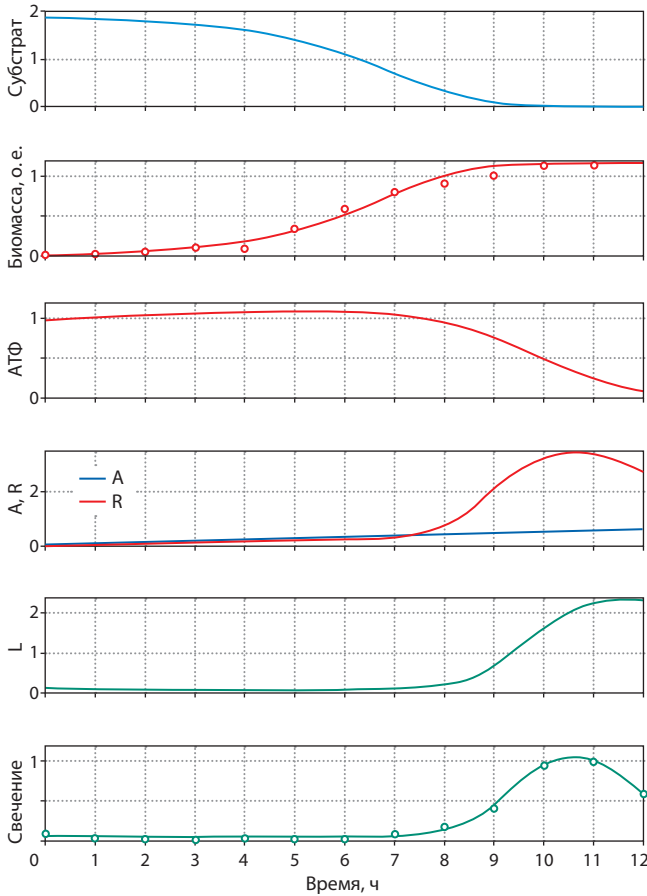


Рис. 5. Модельная и реальная динамика переменных в культуре люминесцентных бактерий.

Кружки – экспериментальные данные.

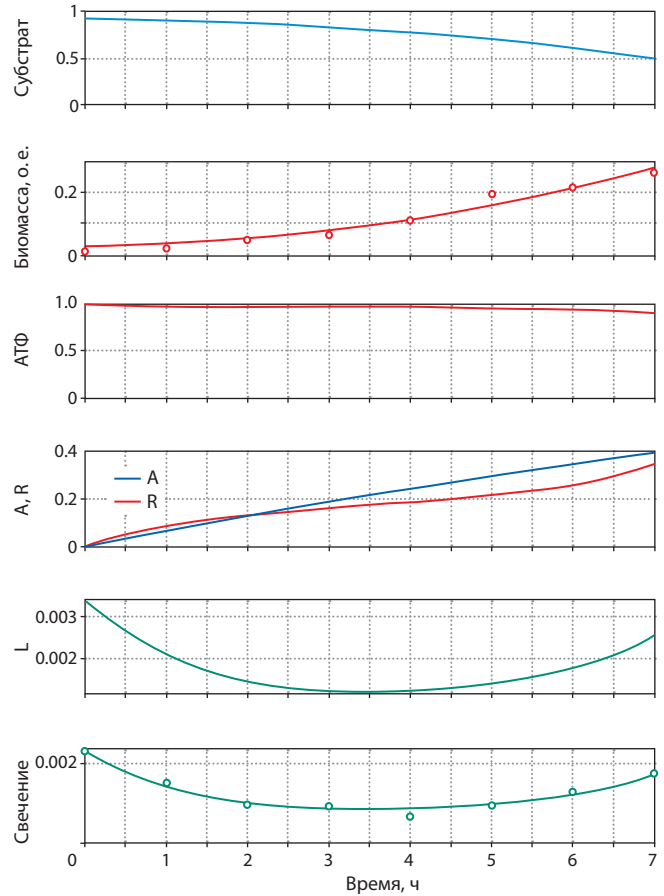


Рис. 6. Модельная и реальная динамика переменных в культуре люминесцентных бактерий на бедной среде.

Кружки – экспериментальные данные.

намики, и вопрос состоит в том, насколько эти параметры соответствуют биологическим представлениям об исследуемой системе. Модельные кривые хорошо соответствуют экспериментальным данным (см. рис. 6). Сопоставим в разделе «Обсуждение» изменения в константах, которые произвела система подстройки параметров при описании роста культуры на бедной среде. При этом общие для двух случаев значения параметров модели следующие: $V_g = 2.18$, $K_g = 3.99$, $K_a = 0.0033$, $V_e = 3.30$, $K_e = 4.02$, $K_{ae} = 0.008$, $a_0 = 1.40$, $k_d = 0.0315$, $k_0 = 0.082$, $V_R = 1.50$, $C_A = 0.14$, $C_R = 0.011$, $k_3 = 0.057$, $\gamma = 0.331$, $K_R = 0.06$, $K_L = 0.17$, $\varepsilon_0 = 0.01$, $\varepsilon_1 = 0.001$, $\varepsilon_2 = 1.54$, $\varepsilon_3 = 0.39$, $\varepsilon_4 = 3.34$.

Обсуждение

Чтобы получить хорошее описание динамики культуры в обоих экспериментах, потребовалось изменить не очень большое количество параметров (см. таблицу). Отметим, что изменение S_0 является ожидаемым, другое дело, что почти двукратное уменьшение S_0 в модели плохо согласуется со стократным уменьшением концентрации пептона в среде. Это расхождение можно предварительно объяснить тем, что, по-видимому, пептон не является ведущим субстратом и рост лимитируют биогены, содержащиеся в дрожжевом экстракте, концентрация которого в этих экспериментах не изменялась.

Сопоставление параметров модели для двух видов питательных сред

Среда	S_0	k_{dL}	V_L
Богатая	1.84	0.75	9.02
Бедная	1.06	0.41	0.15

В отношении изменений двух других параметров возникают вопросы. Столь существенное (60 раз!) падение константы V_L можно объяснить только наличием некоторой дополнительной системы контроля люминесцентной реакции через пути синтеза ФМН · Н₂ или алифатического альдегида. В этом случае обобщенное описание вклада энергетического метаболизма только через АТФ является слишком сильным упрощением.

Почти двукратное уменьшение константы k_{dL} при росте на бедной среде тоже трудно объяснить. Гипотезы по этому поводу строить преждевременно, к вопросу можно вернуться после получения дополнительных экспериментальных данных.

Отмеченные расхождения между ожиданиями и результатами обработки экспериментальных данных вместе с

предположениями о причинах этих расхождений задают направление дальнейших экспериментальных и теоретических исследований механизмов кворум-эффекта в культуре люминесцентных бактерий.

Заключение

Результаты сопоставления модели, построенной в рамках представленной логики, и экспериментальных данных показывают, что предложенная модель в целом удовлетворяет условному техническому заданию, которое было сформулировано во введении. Действительно, модель вполне удовлетворительно описывает динамику биомассы бактерий в накопительной культуре и хорошо описывает динамику свечения бактериальной культуры, которая регулируется кворум-эффектом.

А вот третьему требованию ТЗ о максимальной простоте модели трудно дать окончательную оценку. С одной стороны, не исключено, что данная модель может быть упрощена, чтобы описывать поведение культур бактерий в условиях, приближенных к условиям рассмотренных экспериментов. С другой стороны, работа с моделью (подбор параметров) сформировала ощущение, что данная модель недостаточно робастна (недостаточно груба) в отношении вариации параметров. Это проявлялось, в частности, в том, что метод Нелдера–Мида, как и любой метод локального поиска, достаточно часто находит ближайший минимум целевой функции, который соответствует значениям параметров, имеющих отдаленное отношение к биологическому смыслу, например устремление константы Моно к 0. Не исключено, что модель, в которой смысловые блоки (экологический, энергетический, кворумный, люминесцентный) более артикулированы, более автономны в русле идей Е.Е. Селькова, будет по своей устойчивости к внешним и внутренним возмущениям больше похожа на живое существо.

Список литературы / References

Барцев С.И., Барцева О.Д. Эвристические нейросетевые модели в биофизике: приложение к проблеме структурно-функционального соответствия. Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2010 [Bartsev S.I., Bartseva O.D. Heuristic Neural Network Models in Biophysics: Application to the problem of structure–function mapping. Krasnoyarsk: Siberian Federal University Publ., 2010 (in Russian)]

- Горбань А.Н., Охонин В.А., Садовский М.Г., Хлебопрос Р.Г. Простейшее уравнение математической экологии. Препр. ИЛИД СО АН СССР, 1982 [Gorban A.N., Okhonin V.A., Sadovskiy M.G., Khlebopros R.G. The simplest equation of mathematical ecology. Preprint of the Sukachev Forest and Timber Institute, Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, 1982 (in Russian)]
- Жаботинский А.М. Концентрационные колебания. М.: Наука, 1974 [Jabotinsky A.M. Concentration Oscillations. Moscow: Nauka Publ., 1974 (in Russian)]
- Иваницкий Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е. Математическая биофизика клетки. М.: Наука, 1978 [Ivanitsky G.R., Krinsky V.I., Selkov E.E. Mathematical Biophysics of the Cell. Moscow: Nauka Publ., 1978 (in Russian)]
- Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическая биофизика. М.: Наука, 1984 [Romanovsky Yu.M., Stepanova N.V., Chernavsky D.S. Mathematical Biophysics. Moscow: Nauka Publ., 1984 (in Russian)]
- Anstey M.L., Rogers S.M., Ott S.R., Burrows M., Simpson S.J. Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science*. 2009;323(5914):627-630. DOI 10.1126/science.1165939
- Brodli E., Winkler A., Macheroux P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2018;16:551-564. DOI 10.1016/j.csbj.2018.11.003
- Djezzar N., Pérez I.F., Djedi N., Duthen Y. A computational multiagent model of bioluminescent bacteria for the emergence of self-sustainable and self-maintaining artificial wireless networks. *Informatica*. 2019;43(3):395-408. DOI 10.31449/inf.v43i3.2381
- Edmonds B. Syntactic Measures of Complexity. Doctoral Thesis. Manchester, UK: Univ. of Manchester, 1999.
- Makris N.C., Ratilal P., Jagannathan S., Gong Z., Andrews M., Bertatos I., Godø O.R., Nero R.W., Jech J.M. Critical population density triggers rapid formation of vast oceanic fish shoals. *Science*. 2009;323(5922):1734-1737. DOI 10.1126/science.1169441
- Melke P., Sahlin P., Levchenko A., Jönsson H. A cell-based model for quorum sensing in heterogeneous bacterial colonies. *PLoS Comput. Biol.* 2010;6(6):e1000819. DOI 10.1371/journal.pcbi.1000819
- Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55(1):165-199. DOI 10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Nealson K.H., Hastings J.W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 1979;43(4):496-518. DOI 10.1128/mr.43.4.496-518.1979
- Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 1970;104(1):313-322. DOI 10.1128/jb.104.1.313-322.1970
- Williams J.W., Cui X., Levchenko A., Stevens A.M. Robust and sensitive control of a quorum-sensing circuit by two interlocked feedback loops. *Mol. Syst. Biol.* 2008;4:234. DOI 10.1038/msb.2008.70

ORCID ID

S.I. Bartsev orcid.org/0000-0003-0140-4894

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, проект № 0287-2021-0018.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.07.2023. После доработки 16.09.2023. Принята к публикации 16.09.2023.