

УДК 531/524:[57+61]

Д.Г. Некрасов¹, Д.А. Дзюба², М.С. Куюкина^{1,3}, И.Б. Ившина^{1,3}, М.А. Осипенко¹

D.G. Nekrasov¹, D.A. Dzyuba², M.S. Kuyukina^{1,3}, I.B. Ivshina^{1,3}, M.A. Osipenko¹

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет

²Пермский государственный национальный исследовательский университет

³Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

¹Perm National Research Polytechnic University

²Perm State National Research University

³Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Perm

СОСТАВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ АКТИНОБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

HYDROCARBON ACTINOBACTERIA ASSOCIATIONS COMPILING BASED ON MATHEMATICAL MODELING

Рассматривается математический подход к исследованию взаимодействия актинобактерий в искусственных микробных сообществах. Получены и проанализированы экспериментальные данные по взаимодействию бактерий рода *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*. Предложена новая математическая модель, описывающая взаимодействие штаммов в различных ассоциациях. Без использования специальных биологических законов была построена схема взаимодействия бактерий. Полученная схема в общих чертах не противоречит биологическим представлениям.

Ключевые слова: бактериальные клетки, искусственные микробные сообщества, математическое моделирование, взаимодействия между микроорганизмами.

The mathematical approach for investigation of interaction between actinobacteria in synthetic microbial communities is studied. The experimental dates of interactions between *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia* cells were obtained and studied. The new mathematical model describing interactions between strains in different associations was suggested. Without using special biological laws the scheme of interaction between batteries were plotted. The received scheme is not at variance with the conceptions of biology.

Keywords: bacterial cells, synthetic microbial communities, mathematical modeling, microbial interactions.

Широко известно, что биологический метод является наиболее эффективным в ликвидации нефтяных загрязнений. Он основан на широком использовании деятельности нефте- и углеводородокисляющих микроорганизмов (НиУОМ). Популяции данной группы микроорганизмов как живые экосистемы обладают уникальной адаптационной способностью к неблагоприятным условиям окружающей среды. При этом удается создать управляемое биологиче-

ское окисление многих ксенобиотиков, включая нефть и нефтепродукты. Приобретение НиУОМ способности окислять углеводороды указывает на наличие у них значительного биологического потенциала. Это важно в регуляции процессов биодegradации нефти и ее производных специально подобранными или отселектированными для этой цели штаммами микроорганизмов. Однако не существует ни одного вида микроорганизмов, способного деградировать все компоненты сырой нефти, и ее полное разложение требует участия консорциума микроорганизмов-деструкторов различных таксономических групп. Таким образом, задача состоит в том, что культуры нефте- и углеводородокисляющих микроорганизмов должны подбираться с учетом их совместимости между собой в ассоциациях, а главное, в достижении совокупного эффекта в биодegradации загрязнений [1].

Для преодоления трудностей в изучении естественных микробных сообществ многие исследователи предлагают использовать искусственные, или синтетические, микробные сообщества (СМС), проявляющие ключевые свойства их естественных аналогов. Такие синтетические микробные сообщества могут служить модельными системами, позволяющими оценить ключевые экологические, структурные и функциональные свойства микробных сообществ в контролируемых условиях.

Один из подходов к изучению синтетических микробных сообществ основан на изучении межвидовых взаимодействий. Он предусматривает выявление прежде всего общих схем взаимодействий между видами [1–4].

Эффект, оказываемый одним микроорганизмом на другой, может быть качественно оценен как нейтральный (0), позитивный (+) или негативный (-). Следовательно, возможные взаимодействия между организмами имеют следующий вид: (0, 0) – нейтральность; (0, +) – комменсализм; (0, -) – аменсализм; (+, +) – сотрудничество; (-, -) – конкуренция; (+, -) – хищничество [2].

Эти качественные оценки могут быть превращены в количественные, если ввести метаболическую активность микроорганизмов, коэффициенты их взаимодействия и сформулировать соотношения между этими величинами.

Целями данной работы являются построение соответствующей математической модели и сравнение ее теоретических результатов с экспериментом.

В лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН на протяжении многих лет ведутся исследования алканотрофных актинобактерий для создания эффективных нефтеокисляющих биопрепаратов.

Исследовались штаммы пяти нефтеокисляющих актинобактерий из региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов [3]. Им были присвоены следующие коды: *Gordonia rubropertincta* ИЭГМ 124 – 1; *Rhodococcus opacus* ИЭГМ 249 – 2; *Dietzia maris* ИЭГМ 302 – 3; *Rhodococcus ru-*

ber ИЭГМ 615 – 4; *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 767 – 5. Исследованные ассоциации представляли собой все возможные сочетания данных штаммов. Устойчивость актинобактерий к модельной нефти изучались в 96-луночных микропланшетах методом микроразведения в минеральной среде RS.

Эмульсию углеводородов в среде RS с добавлением 0,1 % твина-80 обрабатывали 1 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Soniprep 150 (Sanyo, Япония). Отмытую биомассу выращенных на МПА клеток суспендировали в 0,5 % NaCl (ОП₆₀₀ – 0,3). Далее готовились ассоциации исследуемых штаммов, взятые в равном соотношении. Бактериальные суспензии вносили в 96-луночные микропланшеты с нефтяной эмульсией. Абиотическим контролем служили неинокулированные планшеты, а биотическим – инокулированные без внесения модельной нефти. Микропланшеты инкубировали на шейкере-инкубаторе Titramax-1000 при 28 °C, 740 об/мин в течение 7 суток. Затем в лунки вносили 50 мкл 0,2%-го йоднитротетразолия фиолетового. Для восстановления красителя планшеты инкубировали при $T_{ком}$ в течение 1 сут. С помощью микропланшетного спектрофотометра определяли показатели оптической плотности (ОП₆₀₀). Действие модельной нефти на бактерии оценивали по разнице ОП окрашенных культур в опыте и на контроле.

Для полученных величин ОП вводились определенные обозначения.

Пусть a_p – ОП культур бактерий, содержащих по одному виду бактерий; a_{pq} – ОП ассоциаций культур, содержащих по два вида бактерий; аналогично вводятся a_{pqr} , a_{pqrs} и a_{12345} (пятерка культур только одна). Примем теоретическое предположение о справедливости соотношений

$$a_{pq} = a_p(1 + k_{qp}) / 2 + a_q(1 + k_{pq}) / 2, \quad (1)$$

$$a_{pqr} = a_p(1 + k_{qp} + k_{rp}) / 3 + a_q(1 + k_{pq} + k_{rq}) / 3 + a_r(1 + k_{pr} + k_{qr}) / 3 \quad (2)$$

и аналогичных соотношений для четверок и пятерок. Тогда k_{ij} есть (безразмерный) коэффициент влияния i -го вида на j -й вид.

Требовалось найти коэффициенты k (20 коэффициентов). Величин a больше, чем коэффициентов k , но a известны с ошибками, поэтому для нахождения k следует применить метод наименьших квадратов. Можно составить функцию

$$S(k_{12}, k_{21}, k_{13}, k_{31}, \dots, k_{45}, k_{54}) = \\ = \sum_{pq} (a_{pq} - a_{pq}^*)^2 + \sum_{pqr} (a_{pqr} - a_{pqr}^*)^2 + \sum_{pqrs} (a_{pqrs} - a_{pqrs}^*)^2 + (a_{12345} - a_{12345}^*)^2. \quad (3)$$

Искомые значения k соответствуют точке минимума функции S .

Функция S – квадратичная и положительно определенная. Она может быть записана в виде

$$S = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{20} D_{ij} x_i x_j - \sum_{i=1}^{20} B_i x_i + C, \quad (4)$$

где $(x_1, x_2, \dots, x_{20}) = (k_{12}, k_{21}, k_{13}, k_{31}, \dots, k_{45}, k_{54})$, $D_{ji} = D_{ij}$. Следовательно, точка минимума этой функции, определяемая из условия $\partial S / \partial x_i = 0$, находится как решение системы линейных алгебраических уравнений:

$$\sum_{j=1}^{20} D_{ij} x_j = B_i \quad (1 \leq i \leq 20). \quad (5)$$

Для решения системы (5) следует численно найти D_{ij} и B_i , сопоставляя формулу (3), по которой S можно найти численно, и представление (4).

Аналитические вычисления (с использованием пакета программ Maple) показывают, что уравнения системы (5) с четными номерами являются следствием уравнений с нечетными номерами (поэтому $\det D = 0$); последние же линейно независимы и совместны относительно неизвестных с нечетными номерами. Это означает, что система (5) имеет бесконечное множество решений, которые могут быть получены следующим образом: отбрасываем в системе (5) уравнения с четными номерами, полагаем x_2, x_4, \dots, x_{20} равными произвольным значениям и затем находим (единственное) решение x_1, x_3, \dots, x_{19} оставшихся 10 уравнений.

Таким образом, условие минимума функции S не позволяет однозначно найти коэффициенты k .

В связи с этим примем еще одно теоретическое предположение: коэффициенты k удовлетворяют (кроме условия $S = \min$, из которого следует система (5)) условию

$$R = k_{12}^2 + k_{21}^2 + k_{13}^2 + k_{31}^2 + \dots + k_{45}^2 + k_{54}^2 = \min.$$

Такое решение системы (5) называется нормальным.

Практически для отыскания нормального решения системы (5) можно предложить следующий алгоритм.

Прежде всего удобно перенумеровать переменные x_i так, чтобы

$$(x_1, x_2, \dots, x_{20}) = (k_{12}, k_{13}, k_{14}, \dots, k_{45}, k_{21}, k_{31}, k_{41}, \dots, k_{54}).$$

Тогда в записанной заново системе (5) нужно сохранить первые 10 уравнений.

Далее следует найти точку минимума функции

$$R(x_1, x_2, \dots, x_{20}) = \sum_{j=1}^{20} x_j^2 \quad (6)$$

при 10 условиях выражения (5) ($1 \leq i \leq 10$).

Для поиска этого условного минимума составим функцию Лагранжа:

$$L(x_1, x_2, \dots, x_{20}) = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{20} x_j^2 - \sum_{i=1}^{10} \lambda_i \left(\sum_{j=1}^{20} D_{ij} x_j - B_i \right), \quad (7)$$

где λ_i – множители Лагранжа. Соотношение $\partial L / \partial x_j = 0$ дает

$$x_j = \sum_{i=1}^{10} \lambda_i D_{ij} \quad (1 \leq j \leq 20). \quad (8)$$

Переименовав в формуле (8) индекс i в индекс m , подставим выражение (8) в (7) и получим:

$$\sum_{m=1}^{10} \left(\sum_{j=1}^{20} D_{ij} D_{mj} \right) \lambda_m = B_i, \quad 1 \leq i \leq 10. \quad (9)$$

Это – система 10 линейных уравнений относительно 10 неизвестных λ_m с матрицей $\tilde{D}_{im} = \sum_{j=1}^{20} D_{ij} D_{mj}$. Найдем из этой системы λ_m и затем x_j (т.е. коэффициенты k) по формуле (8).

После нахождения коэффициентов k также находились ошибки их определения.

Сначала нужно найти ошибку каждой a^* :

$$\sigma_{a^*} = \sqrt{\frac{1}{15} ((a^{*(1)} - \bar{a}^*)^2 + \dots + (a^{*(16)} - \bar{a}^*)^2)}. \quad (10)$$

Тогда ошибка определения k_{ij} вычисляется как

$$\sigma_{k_{ij}} = \sqrt{\left(\frac{\partial k_{ij}}{\partial a_1^*}\right)^2 \sigma_{a_1^*}^2 + \dots + \left(\frac{\partial k_{ij}}{\partial a_{31}^*}\right)^2 \sigma_{a_{31}^*}^2}, \quad (11)$$

где частные производные $\frac{\partial k_{ij}}{\partial a_m^*}$ считаются численно, с использованием формулы

$$\frac{\partial k_{ij}}{\partial a_m^*} = \frac{k_{ij}(\dots a_m^* + h \dots) - k_{ij}(\dots a_m^* - h \dots)}{2h}. \quad (12)$$

Коэффициенты взаимодействия представлены в таблице.

Коэффициенты взаимодействия

Коэффициент	Значение	Вид взаимодействия
k_{12}	0,012 + -0,055	Нейтральность
k_{21}	0,061 + -0,269	
k_{13}	-0,337 + -0,103	Конкуренция
k_{31}	-0,262 + -0,104	
k_{14}	-0,144 + -0,087	Конкуренция
k_{41}	-0,231 + -0,155	
k_{15}	-0,149 + -0,102	Конкуренция
k_{51}	-0,208 + -0,155	
k_{23}	-0,145 + -0,147	Аменсализм
k_{32}	-0,022 + -0,021	
k_{24}	0,347 + -0,270	Сотрудничество
k_{42}	0,109 + -0,095	
k_{25}	0,039 + -0,304	Нейтральность
k_{52}	0,011 + -0,084	
k_{34}	-0,19 + -0,061	Конкуренция
k_{43}	-0,391 + -0,098	
k_{35}	-0,188 + -0,079	Конкуренция
k_{53}	-0,337 + -0,129	
k_{45}	-0,395 + -0,115	Конкуренция
k_{54}	-0,344 + -0,105	

Знаки величин k , полученных в результате выполнения описанного алгоритма, показаны на рисунке в виде схемы взаимодействий штаммов.

Если $|k| < |k|_{\text{средн}} / 2 \simeq 0,1$, то считалось, что взаимодействие отсутствует.

Результаты математического моделирования свидетельствуют о том, что основным типом взаимоотношений в ассоциациях актинобактерий является конкуренция. Это может быть обусловлено лимитированием гидрофобным углеводородным субстратом и его высокой токсичностью [3].

Конкретные механизмы выявленных экологических взаимосвязей между представителями различных видов актинобактерий требуют продолжения изучения.

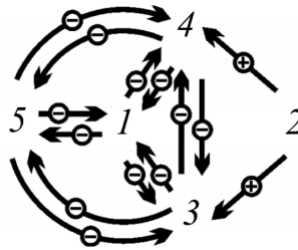


Рис. Схема взаимодействия штаммов

Дальнейшее исследование рассмотренной модели должно состоять в сравнении данного формального подхода к взаимодействиям актинобактерий с функциональным подходом, предусматривающим первоначальное выяснение функционального назначения сообщества с последующим описанием его структуры и динамики.

Список литературы

1. Mitri S., Foster K.R. The genotypic view of social interactions in microbial communities // *Annu. Rev. Genet.* – 2013. – Vol. 47. – P. 247–273.
2. Großkopf T., Soyer O.S. Synthetic microbial communities // *Curr. Opinion in Microbiol.* – 2014. – Vol. 18. – P. 72–77.
3. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities / S. Freilich [et al.] // *Nat. Commun.* – 2011. – Vol. 2. – P. 589.
4. Жукова О.В., Морозов Н.В. Исследование взаимоотношений углеводородокисляющих микроорганизмов в ассоциациях, используемых для управляемой очистки природных и сточных вод от нефтяных загрязнений // *Вестник Татар. гос. гум.-пед. ун-та.* – 2007. – № 2–3, вып. 9–10. – С. 100–107.
5. Варден Б.Л. ван дер. Математическая статистика. – М.: Иностранная литература, 1960. – 434 с.
6. Калиткин Н.Н. Численные методы. – М.: Наука, 1978. – 512 с.

Получено 16.09.2016

Некрасов Данила Геннадьевич – магистрант, факультет прикладной математики и механики, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: danielnekrasov@yandex.ru.

Дзюба Денис Андреевич – магистрант кафедры «Микробиология и иммунология», Пермский государственный научный исследовательский университет, e-mail: denintrop1@gmail.com.

Куюкина Мария Станиславовна – доктор биологических наук, профессор, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: kuyukina@iegm.ru.

Ившина Ирина Борисовна – академик РАН, доктор биологических наук, профессор, Пермский государственный национальный исследовательский университет, заведующий лабораторией Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: ivshina@iegm.ru.

Осипенко Михаил Анатольевич – кандидат физико-математических наук, доцент, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: oma@theormech.pstu.ac.ru.