

УДК 531/534: [57+61]

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЦИКЛА БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

**М.А. Осипенко¹, М.С. Куюкина^{2,3}, Т.Н. Каменских², И.Б. Ившина^{2,3}, Ю.И. Няшин¹,
О.В. Любивая¹**

¹ Кафедра теоретической механики Пермского государственного технического университета, Россия, 614990, Пермь, Комсомольский проспект, 29, e-mail: oma@theormech.pstu.ac.ru

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: kuyukina@iegm.ru

³ Кафедра микробиологии и иммунологии Пермского государственного университета, Россия, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15, 13, e-mail: ivshina@iegm.ru

Аннотация. Построена вероятностная математическая (компьютерная) модель морфогенетического цикла актинобактерий рода *Rhodococcus*, учитывающая рост, искривление, деление и ветвление клеток. Результаты расчетов по этой модели, в частности, имитации микрофотографий клеточных колоний, сопоставлены с экспериментальными данными, при этом имеется хорошее совпадение теории и эксперимента.

Ключевые слова: актинобактерии рода *Rhodococcus*, морфогенетический цикл, математическое моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Непатогенные актинобактерии рода *Rhodococcus* широко распространены в природе. Их способность усваивать многие труднодоступные для большинства других микроорганизмов субстраты, такие как углеводороды нефти, озокериты, смолы, фенольные соединения, гумусовые вещества, воск, смоляные кислоты и др., а также способность развиваться на средах в очень широком диапазоне концентраций органических веществ позволяет им обитать в разнообразных водных бассейнах, илах водоемов, сточных водах, почвах и биотопах, связанных с месторождениями нефти, газа и озокеритов. Наличие у родококков липофильной клеточной стенки, содержащей миколовые кислоты и обеспечивающей поглощение углеводов пассивным путем, обуславливает способность их выполнять основную работу по окислению парафиновых углеводородов в случае массивного нефтяного загрязнения водных экосистем. Данные актинобактерии способны осуществлять азотфиксацию [2]. Родококки имеют широкий диапазон толерантности к таким абиотическим факторам, как температура, влажность, pH. Отдельные виды актинобактерий приурочены к контуру нефтеносных субстратов и характеризуются нефтегазопроисковой информативностью [3].

© Осипенко М.А., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Ившина И.Б., Няшин Ю.И., Любивая О.В., 2010
Осипенко Михаил Анатольевич, к.ф.-м.н., доцент кафедры теоретической механики, Пермь
Куюкина Мария Станиславовна, д.б.н., в.н.с. лаборатории алканотрофных микроорганизмов, Пермь
Каменских Татьяна Никодимовна, к.б.н., с.н.с. лаборатории алканотрофных микроорганизмов, Пермь
Ившина Ирина Борисовна, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, завлабораторией алканотрофных микроорганизмов, Пермь
Няшин Юрий Иванович, д.т.н., профессор, завкафедрой теоретической механики, Пермь
Любивая Оксана Владимировна, магистрант кафедры теоретической механики, Пермь

Родококки – это уникальная эколого-трофическая группа, проявляющая характерный комплекс стратегических приёмов выживания [4]. Популяциям *Rhodococcus* свойственны циклический характер развития и наличие морфогенетических переходов, устойчивость к голоданию, высушиванию, экстремальным значениям концентрации водородных ионов, солей, механическому и ультразвуковому разрушению, токсическим агентам и антисептикам. С помощью родококков, выращиваемых на *n*-алканах, можно получать аминокислоты, органические кислоты, сахара, полисахариды. Их можно применять как специфический индикатор фекального загрязнения (животного происхождения) воды рек, питьевой воды и молочных продуктов. Родококки также способны продуцировать поверхностно-активные вещества, применяемые для очистки нефтезагрязнённых почв [5, 8, 9, 10].

Таким образом, родококки обнаруживают перспективу практического их использования в различных областях биотехнологии и охраны окружающей среды – от биоиндикации углеводородных залежей до интенсификации процессов биodeградации нефтяных загрязнений, от синтеза кормового белка до биокатализа в тонком органическом синтезе. Благодаря этому биология алканотрофных родококков в последнее время находится в центре внимания исследователей.

Род *Rhodococcus* включает бактерии, которые распределяются на три морфологические группы, характеризующиеся следующими признаками. Первая группа – палочковидные организмы с очень короткими овальными неветвящимися клетками, размножающимися только путем бинарного деления. В первые часы (6; 9–12 ч) образуется нестабильный мицелий, не имеющий перегородок и представляющий собой одну клетку. Вторая группа – первичный мицелий не выражен, рудиментарен вследствие быстрой (через 12–14 ч роста) фрагментации клеток, часто до появления веток. Через 16–24–72 ч инкубации он распадается на палочковидные фрагменты различной длины. Третья группа – первичный мицелий хорошо развит, фрагментируется через 18–24 ч роста. В возрасте 2–5 сут. заметно существенное преобладание кокковидных (0,5–0,8 мкм) клеток.

Колонии чаще всего окрашены (розовые, палевые, жёлтые, оранжевые, красные). Размер колоний на различных средах варьируется в довольно широком диапазоне от 0,5 до 3,0, иногда 5,0–8,0 мм в диаметре (рис. 1). Клетки у основания колоний, выросших на мясопептонном агаре и пропане, имеют форму удлинённых (6–15 мкм), слегка изогнутых палочек (см. рис. 1). В промежуточной зоне преобладают ветвящиеся формы с латерально расположенными отростками, а в центре неупорядоченно располагаются короткие эллипсоидальные или сферические особи.

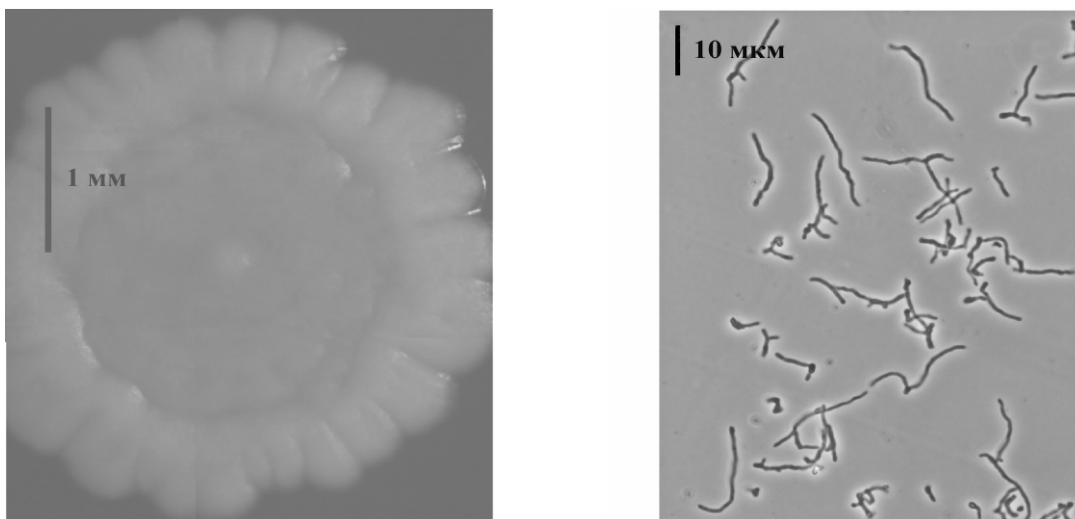


Рис. 1. Макроколонии (слева) и клетки (справа) *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231

Морфология клеток *Rhodococcus* на протяжении жизненного цикла претерпевает характерные изменения, которые достаточно четко прослеживаются. Они имеют трехстадийный цикл развития (кокки – ветвящиеся нитевидные клетки – кокки). При росте на различных средах в первые часы (6; 9–12 ч) образуется нестабильный мицелий (1-я стадия), не имеющий перегородок и представляющий собой одну клетку. Через 16–24–72 ч инкубации он распадается на палочковидные фрагменты различной длины (2-я стадия). В возрасте 2–5 сут. заметно преобладание кокковидных (в виде шара, 0,5–0,8 мкм) клеток (3-я стадия).

В молодой культуре клетки родококков палочковидные, иногда нитевидные, большей частью слабо ветвящиеся или с тенденцией к истинному ветвлению. Длина клеток колеблется от 2–5 до 7–12, иногда достигает 16 мкм, ширина 0,7–0,9 мкм. Жгутиков не обнаружено, споры отсутствуют. Характерно V-образное и палисадовидное расположение клеток, отмечается наличие плеоморфизма [2].

На начальной стадии роста прорастание и ветвление исходных кокковидных и коротких палочковидных клеток начинается с формирования одной–трех ростовых трубок, диаметр которых меньше такового у родоначальных клеток. В экспоненциальной стадии развития (8–12 ч) выявляются клетки длиной 6,0–12,0 × 0,6–0,9 мкм с обильно ветвящимся мицелием, который фрагментируется на укороченные неравномерные палочковидные и кокковидные элементы. В возрасте 12–16 ч клетки палочковидные, короткие или длинные, прямые или искривленные, нередко ветвящиеся, часто располагаются V-образно и палисадовидно, их первичный мицелий может быть хорошо развит. Обычно через 16–24 ч роста клетки фрагментируются на укороченные палочковидные и кокковидные элементы. В 28–40-часовых культурах присутствуют ветвящиеся клетки длиной 4,0–5,0 мкм с характерной «полосатостью» цитоплазмы и небольшое количество более коротких фрагментов.

Важной морфологической характеристикой родококков является наличие у них определенных способов разъединения клеток. Под способом разъединения клеток понимается соответствующее перемещение дочерних особей, приводящее к их обособлению, после образования перегородки в материнской клетке. Известно три основных способа разъединения клеток: простой путем внезапного раскалывания (*snapping*) и путем сгибания (*bending*). Клетки *Rhodococcus* обособляются с помощью *snapping*-движения, в результате чего образуются V-формы. На поверхности клеток часто обнаруживаются шишковидные выросты от 40 нм и более в диаметре. Назначение подобных выростов, по-видимому, заключается в обеспечении контакта клеток друг с другом и удерживании их в колониях [1].

Следует отметить, что кинетические параметры и закономерности морфогенетического цикла клеток родококков исследованы в настоящее время неполно, в частности, не использованы возможности метода математического моделирования.

В данной работе предложена математическая модель морфогенетического цикла родококков. Модель является вероятностной и учитывает экспоненциальный рост клеток, их искривление, образование выростов и деление. На основе построенной модели производится компьютерная имитация микрофотографий клеточных колоний и вычисляется теоретическая зависимость средней длины клетки от времени. Эти результаты сопоставлены с соответствующими результатами, полученными в натурном эксперименте в лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН.

ОПИСАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Основные теоретические предположения модели заключаются в следующем.

В начальный момент времени ($t = 0$) клетки случайным образом размещаются на плоскости и имеют случайные длины (рис. 2). Количество клеток в кадре соответствует экспериментальной фотографии. Центр клетки имеет равномерное распределение [7] по площади кадра. Угол поворота клетки имеет равномерное распределение в интервале $(0; 2\pi)$. Длина L_0 клетки имеет нормальное распределение [7]; среднее значение ML_0 и среднеквадратичное отклонение σL_0 соответствуют экспериментальной фотографии.

При $t > 0$ клетки начинают расти. Рост каждой клетки происходит по закону

$$dL/dt = L/T_1,$$

где L – длина клетки, T_1 – случайная величина, имеющая нормальное распределение. Данный закон был выбран из следующих соображений. При отсутствии деления он приводит к экспоненциальному возрастанию длины клетки, а именно на это и указывают первые четыре экспериментальные точки на рис. 3 (см. ниже). Среднее значение MT_1 и среднеквадратичное отклонение σT_1 подбирались исходя из экспериментальных точек рис. 3.

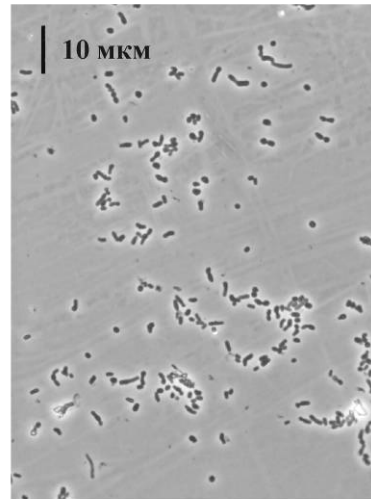
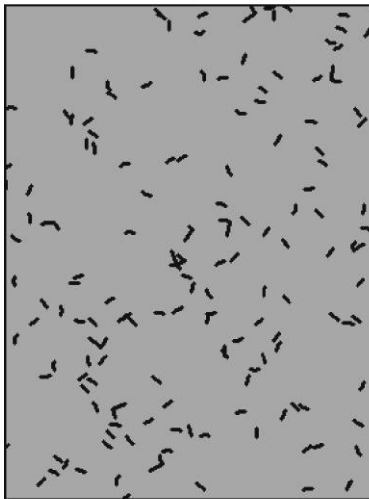
В процессе роста клетка может искривляться. Угол $\varphi(t)$ относительного поворота нарастающей части клетки как функция времени является случайным процессом с независимыми приращениями [7]; при этом $M\varphi(t) = 0$, $\sigma\varphi(t) = \text{const}$ и подбирались исходя из экспериментальных фотографий.

В процессе роста клетка может образовывать боковые ответвления. Вероятность P возникновения в единицу времени ответвления на единице длины клетки подбирались исходя из экспериментальных фотографий.

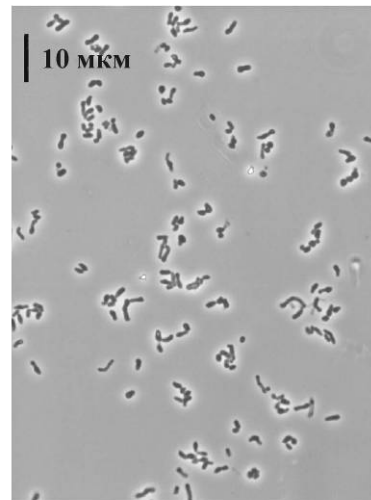
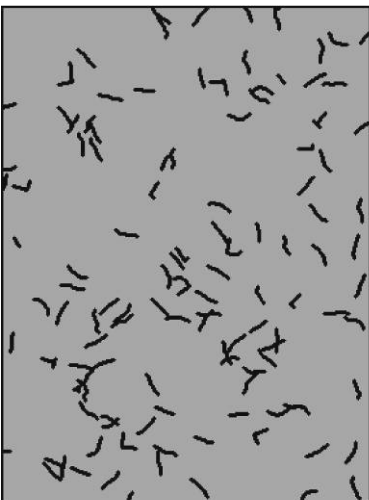
В процессе роста клетка может разделиться. Вероятность деления клетки за промежутки времени Δt

$$p = 1 - \exp(-\Delta t/T_2),$$

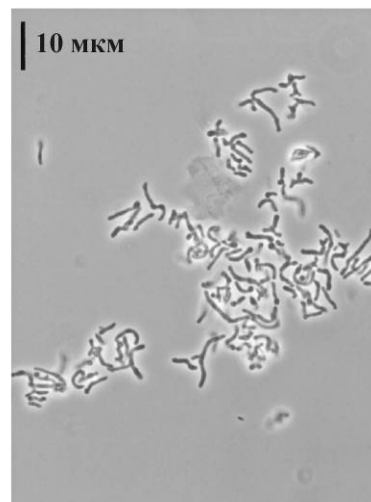
где $T_2 = T_3 L_3 / L$, L – текущая (случайная) длина клетки, T_3 , L_3 – (неслучайные) характерные время и длина деления. Выражение для вероятности p можно получить следующим образом. Пусть $q(\Delta t)$ – вероятность того, что клетка не разделится за время Δt . Если $\Delta t = \Delta t_1 + \Delta t_2$, то из теоремы умножения вероятностей [7] следует, что $q(\Delta t) = q(\Delta t_1)q(\Delta t_2)$ или $q(\Delta t_1 + \Delta t_2) = q(\Delta t_1)q(\Delta t_2)$. Последнее соотношение можно рассматривать как функциональное уравнение относительно функции $q(\Delta t)$. Как известно [6], (непрерывное) решение этого уравнения имеет вид $q(\Delta t) = \exp(k \Delta t)$. Учитывая, что $p = 1 - q$, и обозначая $k = -1/T_2$, приходим к выписанному выше выражению для p . Величина T_2 положительна, так как $\lim_{\Delta t \rightarrow \infty} p(\Delta t) = 1$. Далее p и, следовательно, T_2 возрастают с ростом L (чем длиннее клетка, тем вероятнее, что она разделится). Для зависимости T_2 от L была выбрана (простейшая) обратно пропорциональная связь параметров. Из соображений размерности $T_2 = T_3 L_3 / L$. Величины T_3 , L_3 подбирались исходя из экспериментальных точек рис. 3.



Время роста = 0 ч



Время роста = 3 ч

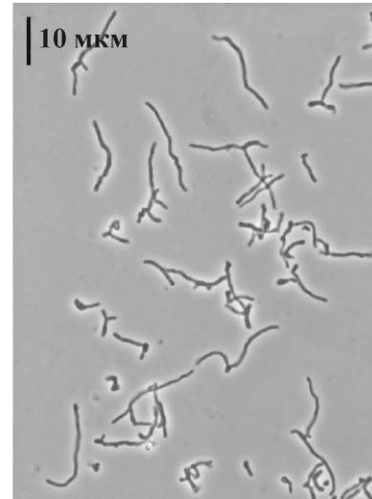
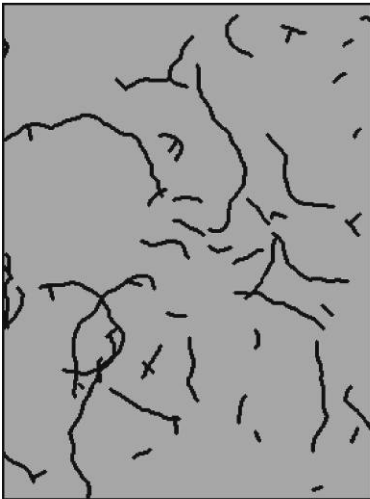


Время роста = 6 ч

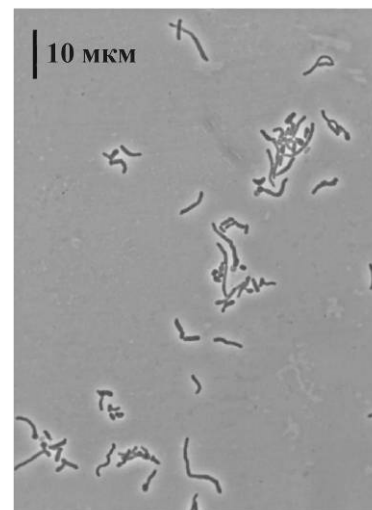
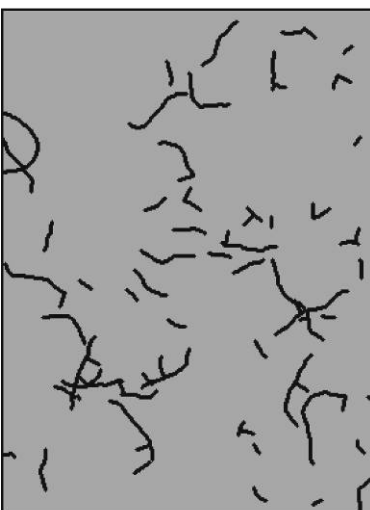
Рис. 2. Сымитированные (слева) и натурные (справа) микрофотографии клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 на разных этапах морфогенетического цикла развития



Время роста = 9 ч

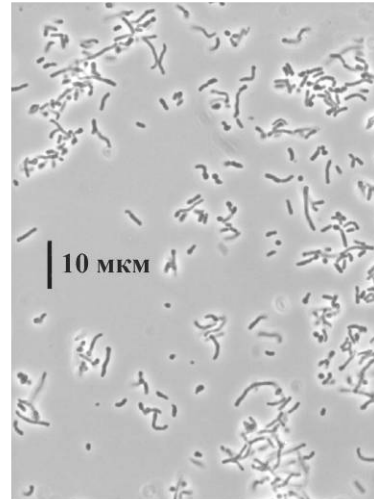


Время роста = 15 ч

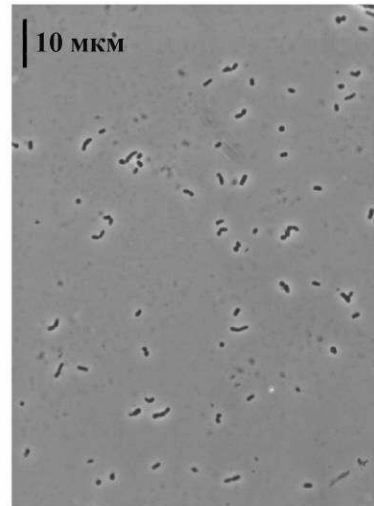


Время роста = 21 ч

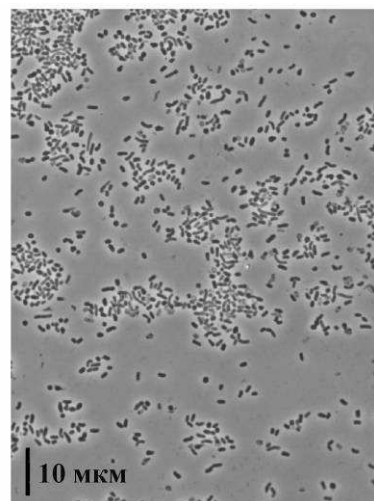
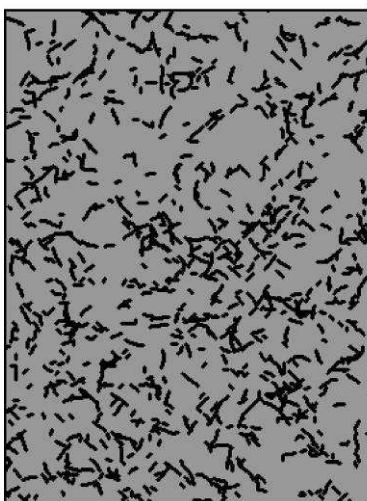
Рис. 2. Продолжение



Время роста = 24 ч



Время роста = 48 ч



Время роста = 96 ч

Рис. 2. Окончание

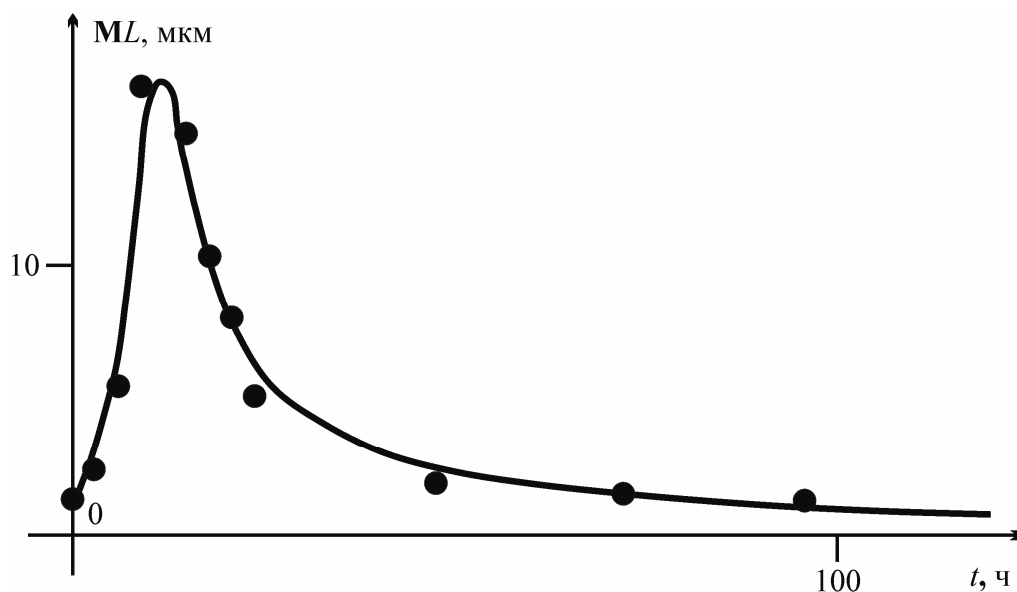


Рис. 3. Теоретическая (линия) и экспериментальная (точки) зависимости средней длины клетки от времени

Число частей, на которые делится клетка, является случайной величиной. Фактически использовались только два значения числа частей: 2 и 3, принимаемые с вероятностями p_2 и $p_3 = 1 - p_2$. Значение p_2 подбиралось исходя из экспериментальных точек рис. 3.

После деления клетка не растет. На это указывает убывающий (после единственного максимума) характер экспериментальной зависимости на рис. 3. Если бы после деления клетка снова росла, а затем снова делилась, то экспериментальная зависимость на рис. 3 имела бы осциллирующий характер.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ НА ОСНОВЕ ОПИСАННОЙ МОДЕЛИ

На основе описанной модели была проведена компьютерная имитация микрофотографий клеточных колоний на разных этапах морфогенетического цикла, а также вычислена зависимость средней длины клетки от времени. Были приняты следующие численные значения упомянутых выше параметров морфогенетического цикла: $ML_0 = 1,33$ мкм; $\sigma L_0 = 0,05$ мкм; $MT_1 = 2,8$ ч; $\sigma T_1 = 0,2$ ч; $\sigma \varphi(t) = 0,3$; $P = 0,008$ 1/(мкм·ч); $T_3 = 10,1$ ч; $L_3 = 17,0$ мкм; $p_2 = 0,3$.

На рис. 2 симитированные микрофотографии сопоставлены с натурными. На рис. 3 сопоставлены теоретическая и экспериментальная зависимости средней длины клетки от времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты компьютерного моделирования морфогенетического цикла родококков. Сопоставление модельных и натурных результатов показывает, что предложенная модель в целом верно (качественно и количественно) описывает процессы роста, деления, искривления и ветвления клеток. Имеется хорошее совпадение теоретической и экспериментальной зависимостей средней длины клетки от времени. Визуально в математическом эксперименте при больших временах роста наблюдается некоторый избыток клеток большой длины по сравнению с натурным экспериментом. Этот факт следует учесть при дальнейшем развитии и модификациях модели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования поддержаны грантами Президента РФ для поддержки Ведущих научных школ (НШ-64403.2010.4) и Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Биологическое разнообразие».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазачева Л.Е., Ившина И.Б., Оборин А.А. Клеточные приспособления *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus ruber*, усваивающих пропан и *n*-бутан // Микробиология. – 1990. – Т. 59. – С. 301–306.
2. Ившина И.Б., Пшеничнов Р.А., Оборин А.А. Пропаноокисляющие родококки. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. – 125 с.
3. Ившина И.Б., Оборин А.А., Нестеренко О.А., Касумова С.А. Бактерии рода *Rhodococcus* грунтовых вод района нефтяных месторождений Пермского Предуралья // Микробиология. – 1981. – Т. 50. – С. 709–717.
4. Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: биоразнообразие, детекция, иммунодиагностика: дис. ... д-ра биол. наук. – Пермь, 1997. – 197 с.
5. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костарев С.М. Применение экологически безопасной экспресс-технологии очистки нефтезагрязненных почв и грунтов // Нефтяное хозяйство. – 2003. – № 9. – С. 116–118.
6. Ильин В.А., Позняк Э.Г. Основы математического анализа. Ч. 1. – М.: Наука, 1998. – 616 с.
7. Пытьев Ю.П., Шишмарев И.А. Курс теории вероятностей и математической статистики для физиков. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 256 с.
8. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 14. – P. 711–717.
9. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Makarov S.O., Litvinenko L.V., Cunningham C.J., Philp J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system // Environment International. – 2005. – Vol. 31. – P. 155–161.
10. Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 59. – P. 318–324.

MATHEMATICAL MODEL OF THE *RHODOCOCCUS* ACTINOBACTERIA MORPHOGENETIC CYCLE

M.A. Osipenko, M.S. Kuyukina, T.N. Kamenskikh, I.B. Ivshina, Y.I. Nyashin, O.V. Lubivaya (Perm, Russia)

A probabilistic mathematical (computing) model of the morphogenetic cycle of the *Rhodococcus* actinobacteria based on the cell growth, bending, division, and branching was developed. There was a good correlation of theoretical modelling results, particularly simulations of cell colony micrographs using this model with experimental data.

Key words: genus *Rhodococcus* actinobacteria, morphogenetic cycle, mathematical modelling.

Получено 01 декабря 2010