

Лабораторная работа № 9
«МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В БИОЛОГИИ.
ЛИМИТИРОВАННЫЙ РОСТ ПОПУЛЯЦИИ. ХЕМОСТАТ.
ЭКОНОМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ И ТРАТЫ НА
ПОДДЕРЖАНИЕ»

Рассмотренные в работе особенности характерны в основном для микроорганизмов, но при определенных условиях и постоянном воздействии внешних факторов они могут быть применимы и для многоклеточных организмов.

Для описания и сравнения эффективности утилизации питательного субстрата (S) при росте и развитии организмов часто используется *экономический коэффициент*, или *суммарный экономический коэффициент* (Y). Он определяется по следующей зависимости:

$$Y = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (1)$$

Здесь X – это концентрация биомассы, а S – концентрация питательного субстрата, использование которого и изучается. Этот параметр (экономический коэффициент) показывает прирост биомассы на единицу потребляемого питательного субстрата, что является важнейшей характеристикой ростовых процессов в популяции.

В том случае, если питательный субстрат является основным лимитирующим фактором как источник вещества и энергии, то его значение обычно меньше единицы и данный субстрат при потреблении расходуется на два типа процессов:

1) *Рост и размножение*. В этом случае эффективность потребления питательного субстрата определяется *ростовым экономическим коэффициентом* ($Y_{\text{рост}}$).

2) *Затраты на поддержание биомассы организма* (m). То есть определяются расходы на поддержание трансмембранных градиентов, восстановление разрушающихся мембран, полимеров и т.д.

Рассмотренные выше параметры связаны между собой:

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{\text{рост}}} + \frac{m}{r} \quad (2)$$

Здесь r – скорость роста популяции (в данном случае – ее биомассы). Отсюда кинетика первого и второго процессов описывается следующими уравнениями:

$$\frac{\Delta S}{\Delta t_{\text{рост}}} = \frac{r \cdot X}{Y_{\text{рост}}} \quad (3)$$

$$\frac{\Delta S}{\Delta t_{\text{поддерж}}} = m \cdot X \quad (4)$$

Как правило, выделяют два типа процессов лимитированного роста популяций:

1. Питательный субстрат вносится в систему однократно и далее он просто потребляется – *периодическое культивирование*.
2. Питательный субстрат постоянно добавляется в систему и одновременно с этим из системы удаляется избыток биомассы – *непрерывное культивирование, хемотрат*.

1. Периодическое культивирование

Динамика популяции в условиях периодического культивирования описывается приведенной ниже системой уравнений (*модель Моно*):

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = X \cdot \frac{r_{\max} \cdot S}{K_S + S}, \quad (5)$$

$$\frac{\Delta S}{\Delta t} = -\frac{1}{Y} \cdot \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

Здесь X – это концентрация биомассы, а S – концентрация питательного субстрата, t – время, $r_{\max}$ – максимальная удельная скорость роста, K_S – предел емкости среды (коэффициент насыщения), Y – экономический коэффициент.

Решить эту систему можно аналитически следующим способом:

$$\left(1 + \frac{YK_S}{YS_0 + X_0}\right) \cdot \ln \frac{X}{X_0} - \frac{YK_S}{YS_0 + X_0} \cdot \ln \frac{YS_0 + X_0 - X}{YS_0} = r_{\max} \cdot t \quad (6)$$

где S_0 – начальная концентрация питательного субстрата, а X_0 – начальная концентрация биомассы.

В то же время во время экспериментальных расчетов балансового соотношения часто используется первый интеграл системы (5):

$$X - X_0 = Y \cdot (S_0 - S) \quad (7)$$

Задание 1. Штамм бактерии *Streptococcus basilaris* выращивали на минеральной среде совместно с глюкозой, которая в качестве единственного источника азота содержала лишь хлористый аммоний NH_4Cl в предельных лимитирующих концентрациях. В процессе культивирования измеряли как концентрацию биомассы, так и концентрацию хлористого аммония (таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация биомассы и субстрата при культивировании *Streptococcus basilaris*

Концентрация ХА S, г/л	Концентрация биомассы, X, г/л
0,1	0,08
0,25	0,22
0,4	0,32
0,5	0,43
0,6	0,49
0,7	0,59

Определите экономический коэффициент для хлористого аммония у популяции бактерии *Streptococcus basilaris*.

Решение

Решение здесь и далее рассмотрим на примере использования MS Excel 2019. Решение в LO Calc 7.6 выполняется аналогично.

Изначально составляется рабочая электронная таблица. Затем используя формулу (7) добавляем в рабочую таблицу две дополнительные переменные: $S_0 - S$ и $X - X_0$ (соответственно это будет 3-й и 4-й столбцы). Произведя расчеты сверьте полученные данные с рисунком 1.

	A	B	C	D
1	Концентрация ХА S, г/л	Концентрация биомассы, X, г/л	$S_0 - S$, г/л	$X - X_0$, г/л
2	0,1	0,08	0	0
3	0,25	0,22	0,15	0,14
4	0,4	0,32	0,3	0,24
5	0,5	0,43	0,4	0,35
6	0,6	0,49	0,5	0,41
7	0,7	0,59	0,6	0,51

Рисунок 1 – Рабочая электронная таблица с данными

Для того, чтобы получить значение экономического коэффициента необходимо построить диаграмму рассеивания (точечный график) между переменными $S_0 - S$ и $X - X_0$, где по оси абсцисс будут значения третьего столбца, а по оси ординат – четвертого.

После построения графика добавьте на него линию тренда и уравнение. Отредактируйте график и сверьте его с рисунком 2. Коэффициент линейного уравнения и будет искомым значением экономического коэффициента Y .

Таким образом, в нашем случае экономический коэффициент для хлористого аммония у исследованной популяции бактерии *Streptococcus basilaris* составляет 0,8352 г биомассы на 1 г NH_4Cl .

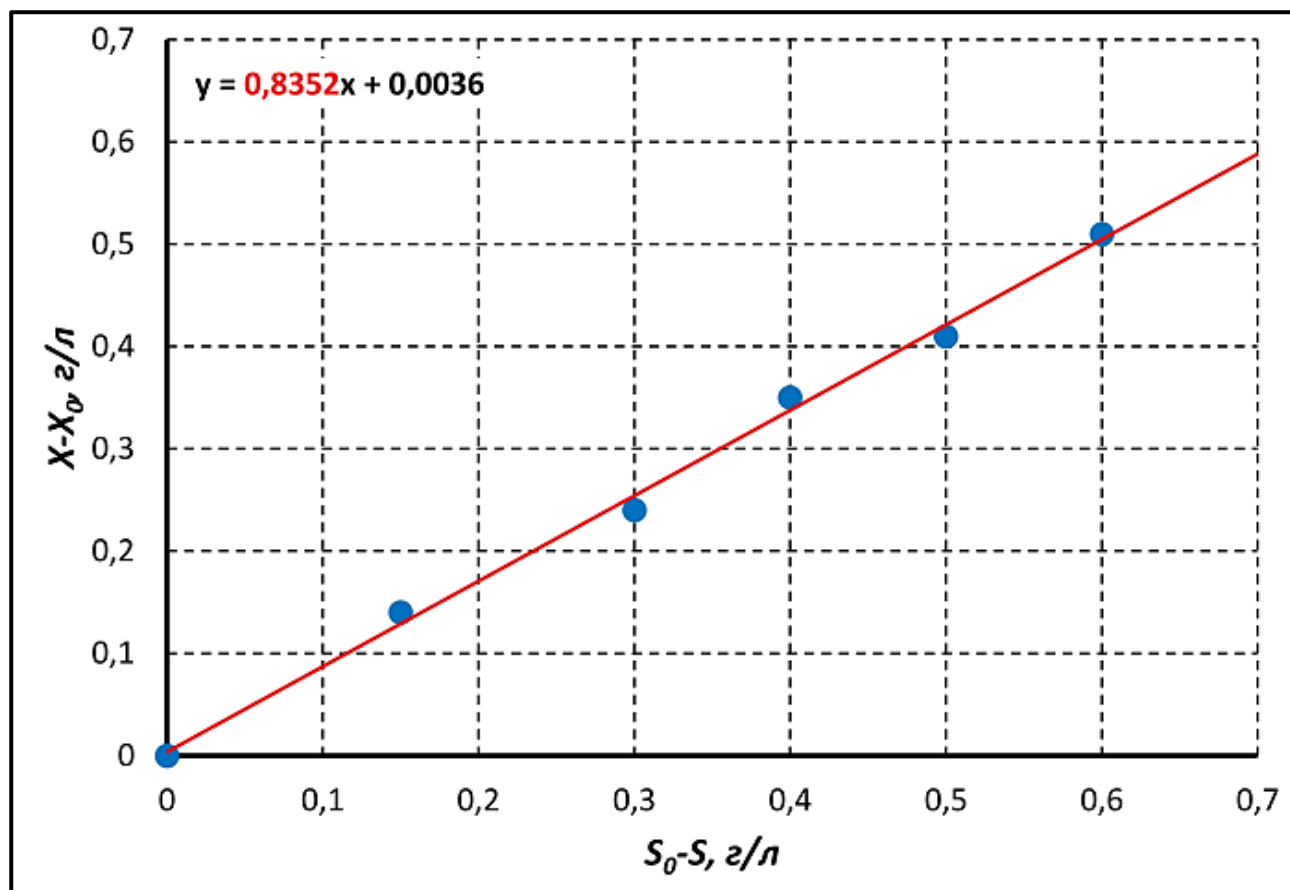


Рисунок 2 – Экономический коэффициент при культивировании бактерии *Streptococcus basilaris*

Задание 2. Другая группа исследователей продолжила изучение штамма бактерии *Streptococcus basilaris* на той же питательной среде, что и предыдущая группа до выхода популяции в стационарную фазу. В процессе культивирования измеряли как концентрацию биомассы клеток бактерии, так и концентрацию глюкозы (таблица 2, рисунок 3).

Таблица 2 – Концентрация биомассы и субстрата при культивировании *Streptococcus basilaris* с глюкозой

Время t, час	Концентрация биомассы, X, г/л	Концентрация глюкозы S, г/л
1	2	3
0	20	2000
0,5	30,52	1976
1	46,6	1940
1,5	71,1	1886
2	108,5	1803
2,5	165,5	1676
3	252,5	1483

Окончание таблицы 2

1	2	3
3,5	385	1188
4	587	740
4,33	773	326
4,5	885	77
4,56	918	4,4
4,564	919	2,2
5	920	0
5,5	920	0

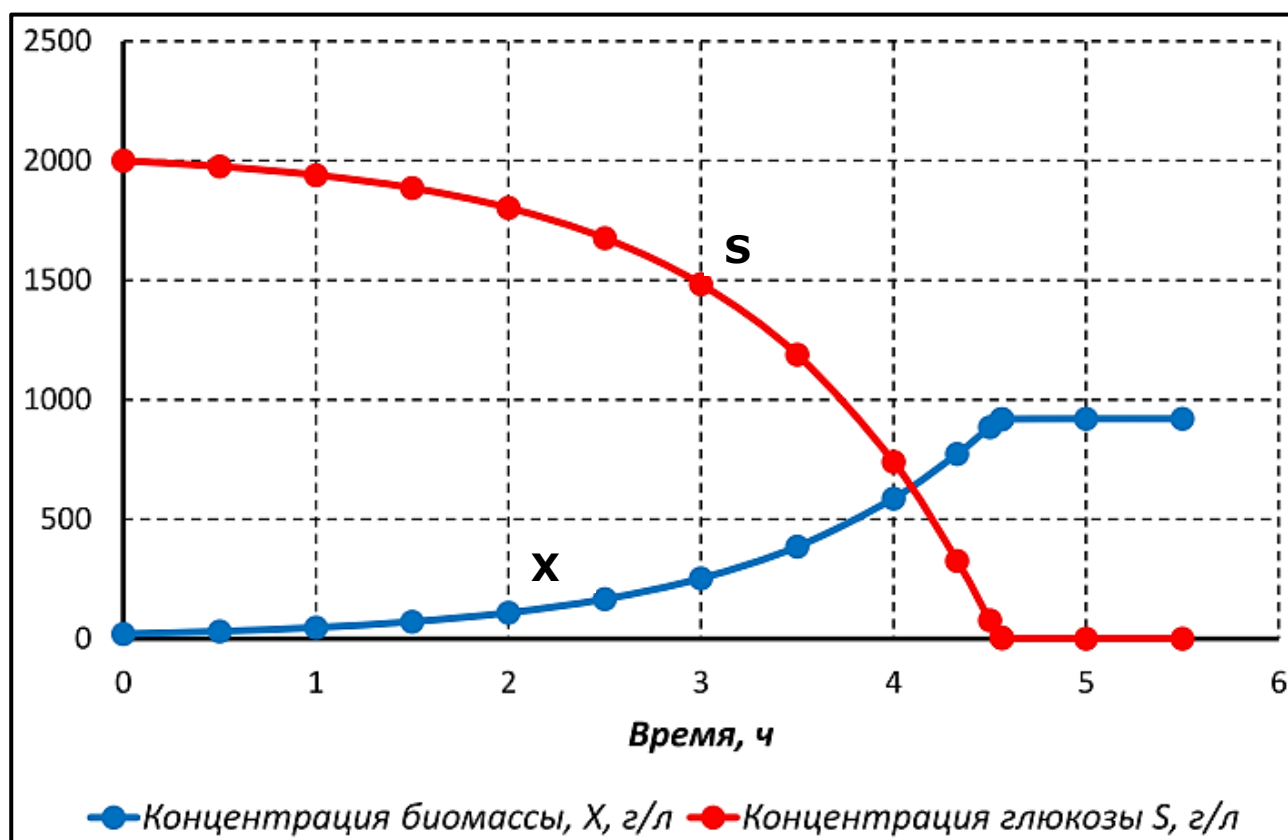


Рисунок 3 – Изменение концентрации биомассы и концентрации глюкозы в ходе периодического культивирования *Streptococcus basilaris*

Необходимо определить кинетические параметры K_S , r_{max} , а также экономический коэффициент Y .

Решение:

Изначально составляется рабочая электронная таблица. Затем используя формулу (7) добавляем в рабочую таблицу две дополнительные переменные: $S_0 - S$ и $X - X_0$ (соответственно это будет 3-й и 4-й столбцы). Затем для получения значения экономического коэффициента необходимо построить диаграмму рассеивания (точечный график) между переменными $S_0 - S$ и X

– X_0 , где по оси абсцисс будут значения третьего столбца, а по оси ординат – четвертого (как в задании 1).

Полученные данные рабочей таблицы и график сравните с рисунками 4 и 5.

	A	B	C	D	E
1	Время t, час	Концентрация биомассы, X, г/л	Концентрация глюкозы S, г/л	$S_0 - S$, г/л	$X - X_0$, г/л
2	0	20	2000	0	0
3	0,5	30,52	1976	24	10,52
4	1	46,6	1940	60	26,6
5	1,5	71,1	1886	114	51,1
6	2	108,5	1803	197	88,5
7	2,5	165,5	1676	324	145,5
8	3	252,5	1483	517	232,5
9	3,5	385	1188	812	365
10	4	587	740	1260	567
11	4,33	773	326	1674	753
12	4,5	885	77	1923	865
13	4,56	918	4,4	1995,6	898
14	4,564	919	2,2	1997,8	899
15	5	920	0	2000	900
16	5,5	920	0	2000	900

Рисунок 4 – Рабочая электронная таблица с данными

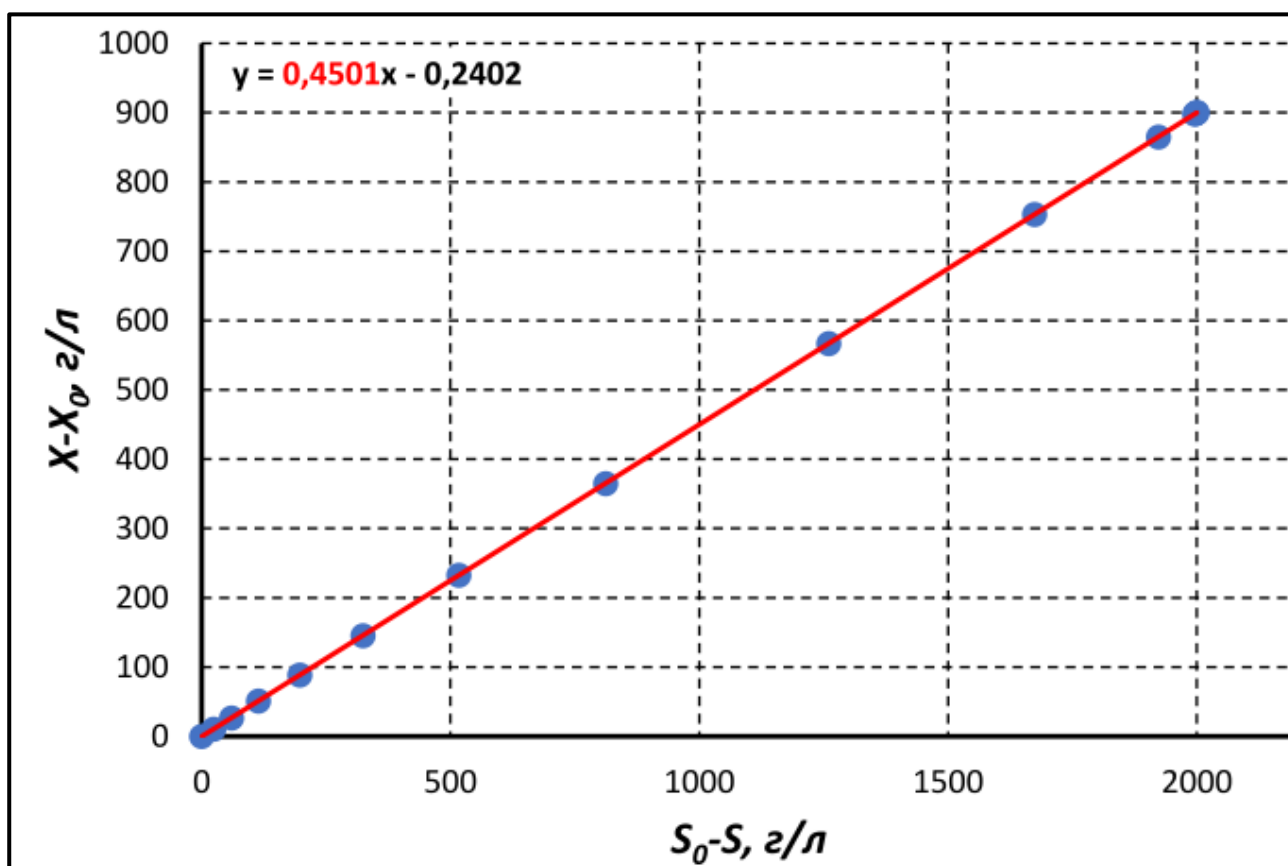


Рисунок 5 – Экономический коэффициент при культивировании бактерии *Streptococcus basilaris*

Таким образом, в нашем случае экономический коэффициент для глюкозы у исследованной популяции бактерии *Streptococcus basilaris* составляет **0,4501** г биомассы на 1 г глюкозы.

Для дальнейших расчетов необходимо определить такой параметр как стационарное состояние концентрации биомассы (X'). Он определяется как соотношение: $X' = YS_0 + X_0$. Согласно рассчитанному экономическому коэффициенту (0,45) и значениям S_0 и X_0 из рабочей таблицы получаем, что $X' = 920$ мг/л.

Далее, для определения кинетических параметров K_S , r_{max} используем преобразованную следующим образом формулу (6):

$$\frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \frac{r_{max} \cdot S_0}{K_S + S_0} + \frac{K_S}{K_S + S_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{X' - X}{X' - X_0} \right) \quad (8)$$

Исходя из неё и на основе столбцов 1 и 2 рабочей таблицы добавим две новые переменные: $\frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{X' - X}{X' - X_0} \right)$ и $\frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{X}{X_0} \right)$ и затем рассчитаем полученные значения, добавив их в 6-й и 7-й столбец таблицы соответственно.

На основании расчетов строим график и сравниваем его с рисунком 6.

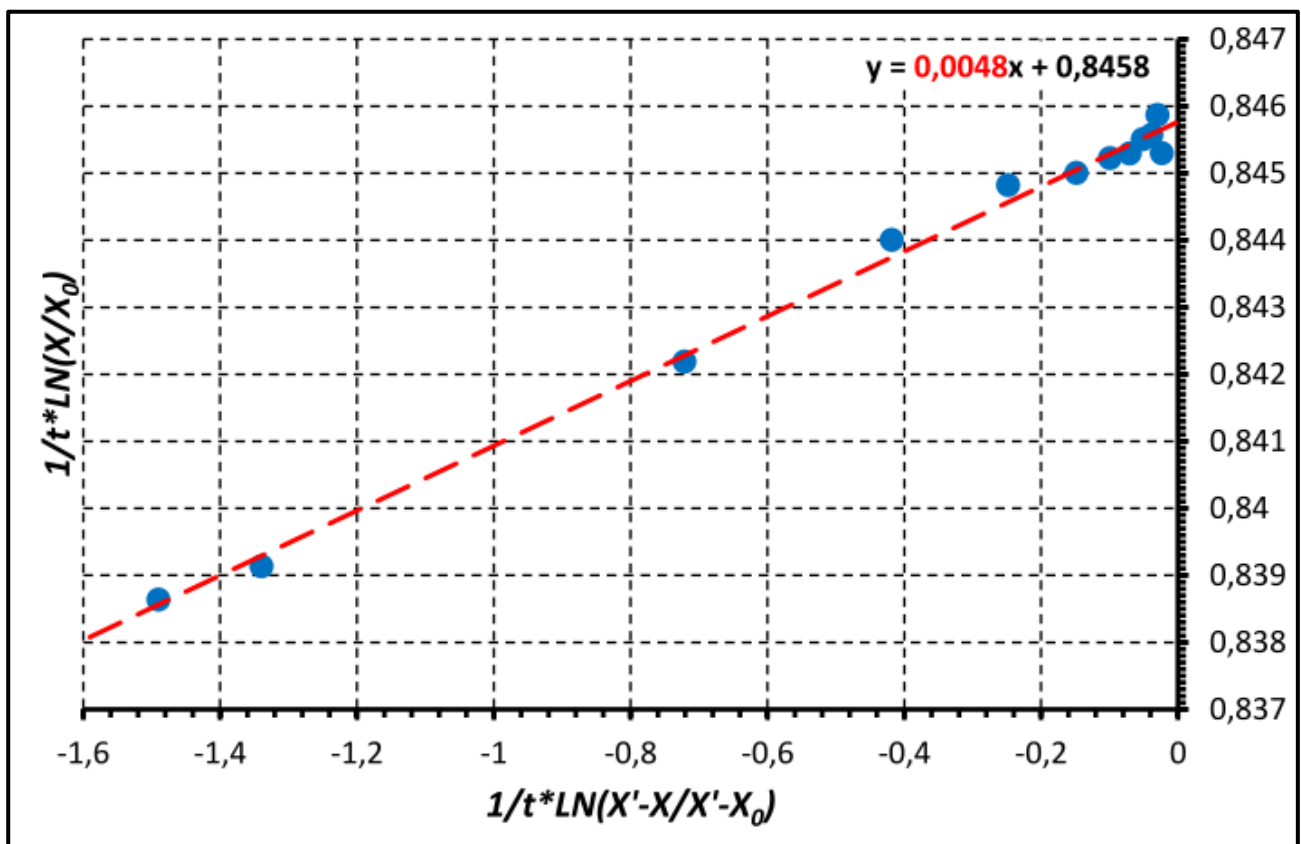


Рисунок 6 – Определение кинетических параметров роста клеток бактерии *Streptococcus basilaris*

Точка пересечения линии тренда с осью ординат (согласно формуле (8)) дает значение $\frac{r_{max} \cdot S_0}{K_S + S_0} = 0,8458 \text{ час}^{-1}$, а коэффициент наклона линии тренда значение $\frac{K_S}{K_S + S_0} = 0,00485$. Отсюда и рассчитываются необходимые кинетические показатели:

$$\begin{array}{ll}
 1) \frac{K_S}{K_S + 2000} = 0,00485 & 2) \frac{r_{max} \cdot S_0}{K_S + S_0} = 0,8458 \text{ час}^{-1} \\
 K_S = 0,00485(K_S + 2000) & \\
 K_S = 0,00485 \cdot K_S + 0,00485 \cdot 2000 & \frac{r_{max} \cdot 2000}{9,75 + 2000} = 0,8458 \\
 K_S = 0,00485 \cdot K_S + 9,7 & 2000 \cdot r_{max} / 2009,75 = 0,8458 \\
 K_S - 0,00485 \cdot K_S = 9,7 & 2000 \cdot r_{max} = 2009,75 \cdot 0,8458 \\
 K_S / K_S - 0,00485 \cdot K_S / K_S = 9,7 & 2000 \cdot r_{max} = 1699,8 \\
 1 - 0,00485 \cdot K_S = 9,7 & r_{max} = 1699,8 : 2000 \\
 0,99515 \cdot K_S = 9,7 & r_{max} = 0,8499 (\sim 0,85) \\
 K_S = 9,7 / 0,99515 & \\
 K_S = 9,74727 (\sim 9,75) &
 \end{array}$$

Таким образом, в результате проведенного решения было выявлено, что экономический коэффициент составляет 0,4501 г биомассы, $K_S - 9,75 \text{ мг/л}$, а $r_{max} - 0,85 \text{ час}^{-1}$.

2. Непрерывное культивирование. Хемостат

Для определения лимитированного роста популяции в условиях хемостата используется ряд уравнений:

$$\begin{aligned}
 \frac{\Delta X}{\Delta t} &= X \cdot \left(\frac{r_{max} \cdot S}{K_S + S} - D \right), \\
 \frac{\Delta S}{\Delta t} &= D \cdot (S_0 - S) - \frac{X}{Y} \cdot \frac{r_{max} \cdot S}{K_S + S}
 \end{aligned} \quad (9)$$

Здесь параметр D – это проток, т.е. скорость подачи питательного субстрата в культиватор, которая нормирована на эффективный объем культиватора. Измеряется поток как время⁻¹. Чаще всего на практике используют соотношения, которые выводятся из стационарного состояния хемостата:

$$r' = D, \quad S' = \frac{K_S D}{r_{max} - D}, \quad X' = Y \cdot (S_0 - S') \quad (10)$$

Здесь r' – стационарная удельная скорость роста, S' и X' – стационарные концентрация субстрата и биомассы соответственно

Задание 3. Исследовали кинетику новой молочнокислой бактерии *Lactobacillus cefirosus* в хемостате при различных значениях протока (D) и концентрации питательного лимитирующего субстрата (лактозы) в подаваемой среде (S_0). В каждом из случаев при достижении стационарного состояния хемостата измерялись концентрация биомассы клеток (X) и концентрация лактозы (S) (таблица 3).

Таблица 3 – Концентрация биомассы и субстрата при культивировании *Lactobacillus cefirosus* с различной скоростью протока

Концентрация субстрата в подаваемой питательной среде S_0 , мМ	Проток D , час ⁻¹	Стационарная концентрация биомассы X' , г/л	Стационарная концентрация субстрата S' , г/л
4	0,1	1,903	0,025
4	0,2	1,822	0,056
4	0,4	1,812	0,168
4	0,6	1,67	0,49
4	0,75	1,041	1,858
8	0,1	1,921	0,025
8	0,2	1,892	0,056
8	0,7	1,67	1,04
8	0,75	1,417	1,875
8	0,8	0,27	7,198
16	0,2	1,882	0,057
16	0,4	1,89	0,169
16	0,7	1,728	1,038
16	0,75	1,685	1,883
16	0,8	1,093	7,095

Необходимо определить по имеющимся данным значения кинетических параметров K_S , r_{max} , а также экономический коэффициент Y , которые характеризуют рост в хемостате бактерий *Lactobacillus cefirosus* в указанных условиях (4, 8 и 16 мМ).

Решение:

Изначально составляется рабочая электронная таблица на основе таблицы 3. Затем для расчета экономического коэффициента добавляется в рабочую таблицу дополнительная переменная $S_0 - S$ (5-й столбец). После этого для получения значения экономического коэффициента необходимо построить диаграмму рассеивания (точечный график) между переменными

$S_0 - S$ и X' , где по оси абсцисс будут значения пятого столбца, а по оси ординат – третьего. График следует строить для одной концентрации, т.е первоначально – только для концентрации субстрата в подаваемой питательной среде в 4 мМ. Получившийся график сравните с рисунком 7.

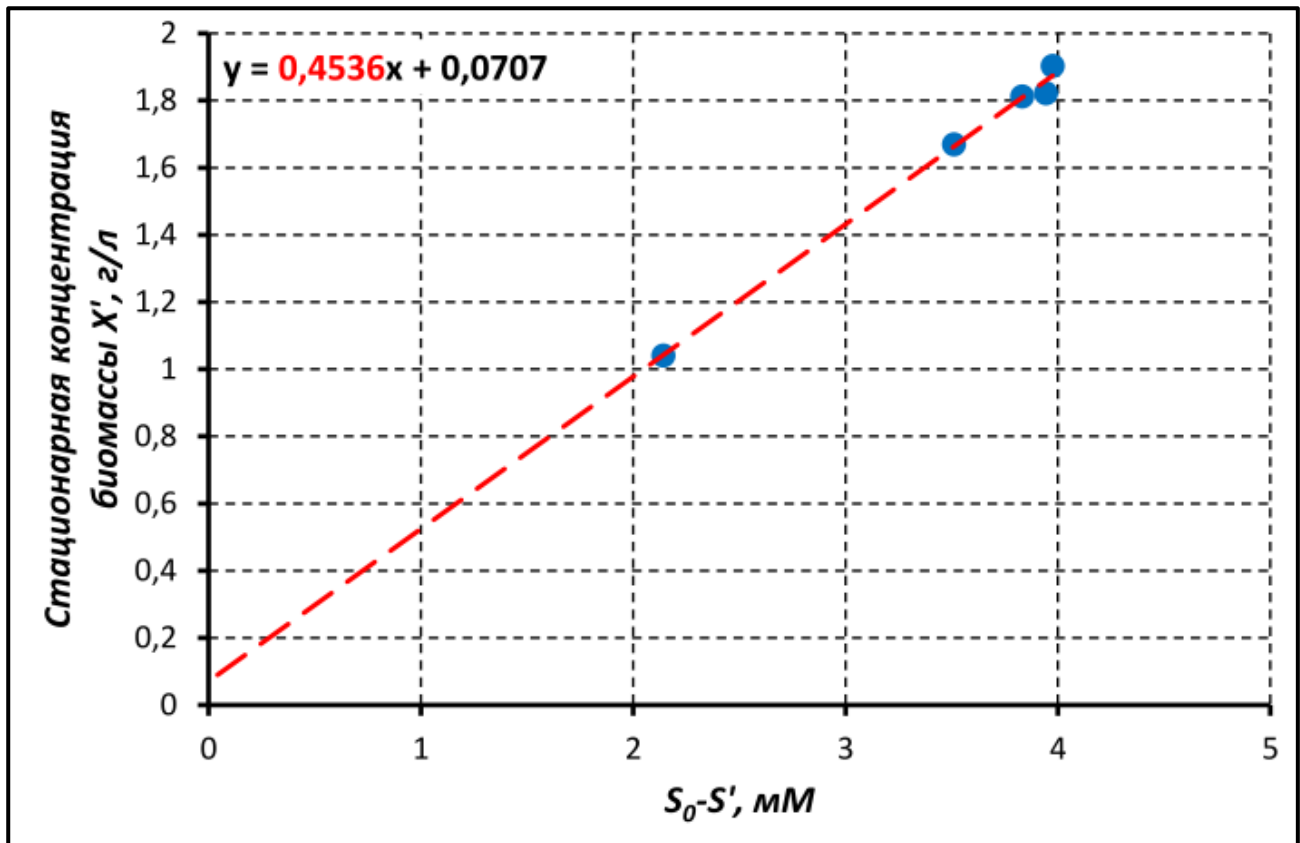


Рисунок 7 – Экономический коэффициент при культивировании бактерии *Lactobacillus cefirosus* в хеостате при концентрации субстрата S_0 4 мМ

Аналогично рассчитываются экономические коэффициенты для 8 и 16 мМ.

Далее для определения кинетических параметров K_S и r_{max} необходимо использовать линейное преобразование S' из соотношения (10):

$$\frac{1}{S'} = -\frac{1}{K_S} + \frac{r_{max}}{K_S} \cdot \frac{1}{D} \quad (11)$$

Предварительно рассчитываются переменные $1/D$ и $1/S'$ для чего добавляются столбцы 6 и 7. Затем используя данные из этих столбцов для концентрации 4 мМ строится диаграмма рассеивания (точечный график). При этом по оси абсцисс – $1/D$, а по оси ординат – $1/S'$ (рисунок 8).

Пересечение линии тренда с осью абсцисс является соотношением $1/r_{max}$ ($1,1 \text{ час}^{-1}$), а с осью ординат – $1/K_S$ ($-5,1 \text{ мМ}^{-1}$).

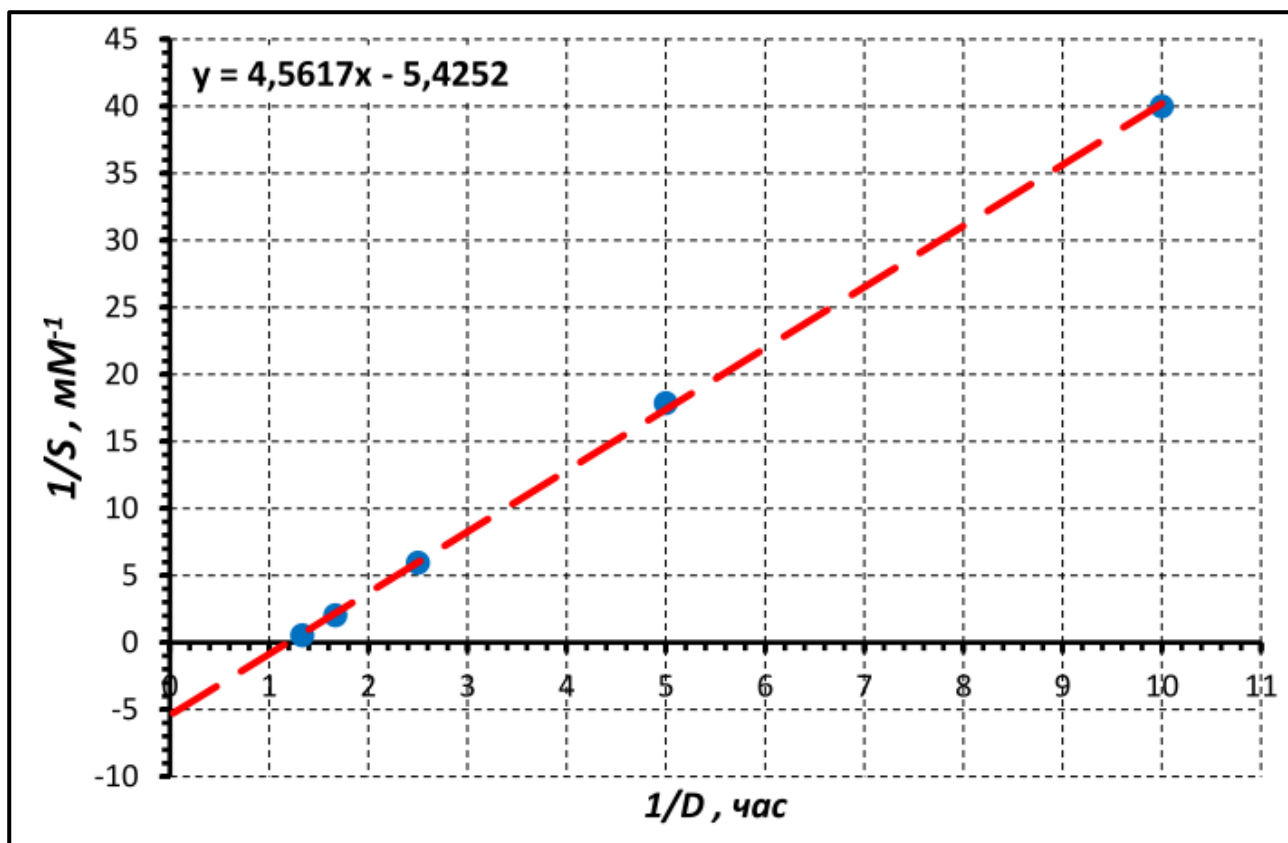


Рисунок 8 – Определение $1/K_S$ и $1/r_{max}$ при культивировании бактерии *Lactobacillus cefirosus* в хемостате при концентрации субстрата S_0 4 мМ

Таким образом, для концентрации хемостата 4 мМ лактозы экономический коэффициент Y составил 0,45 г биомассы, K_S – 0,19 мг/л, а r_{max} – 0,9 час⁻¹.

Аналогично рассчитывается для концентрации 8 и 16 мМ.

Задания для самоконтроля

1) Исследователи изучали кинетические параметры K_S , r_{max} , а также экономический коэффициент Y у бактерии *Acetobacterium woodii* на глюкозной питательной среде до выхода популяции в стационарную фазу. В процессе культивирования измеряли как концентрацию биомассы клеток бактерии, так и концентрацию глюкозы:

Время t, час	Концентрация биомассы, X, г/л	Концентрация глюкозы S, г/л
0	15	1000
1	28,3	970
2	59,25	901,5
3	131,25	741,5
4	298,5	370

4,2	447,5	38,5
4,5	464	2,2
4,7	464,5	1,1
5	465	0
6	465	0

2) Исследовали кинетику уксуснокислой бактерии *Gluconacetobacter diazotrophicus* в хемостате при различных значениях протока (D) и концентрации питательного лимитирующего субстрата (лактозы) в подаваемой среде (S_0). В каждом из случаев при достижении стационарного состояния хемостата измерялись концентрация биомассы клеток (X) и концентрация сахарозы (S).

Концентрация субстрата в подаваемой питательной среде S_0 , мМ	Проток D , час-1	Стационарная концентрация биомассы X' , г/л	Стационарная концентрация субстрата S' , г/л
2	0,05	0,9515	0,0125
2	0,1	0,911	0,028
2	0,2	0,906	0,084
2	0,3	0,835	0,245
2	0,375	0,5205	0,929
4	0,05	0,9605	0,0125
4	0,1	0,946	0,028
4	0,35	0,835	0,52
4	0,375	0,7085	0,9375
4	0,4	0,135	3,599
8	0,1	0,941	0,0285
8	0,2	0,945	0,0845
8	0,35	0,864	0,519
8	0,375	0,8425	0,9415
8	0,4	0,5465	3,5475

Определите по имеющимся данным значения кинетических параметров K_S , r_{max} , а также экономический коэффициент Y , которые характеризуют рост в хемостате бактерий *G. diazotrophicus* в указанных условиях (2, 4 и 8 мМ).