

МОДЕЛЬ РИТМИЧНОГО СПОРОГЕНЕЗА В КОЛОНИЯХ СТРЕПТОМИЦЕТА

Савельев А.П.

(г. Пушкино, Московской области)

Рассмотрена имитационная одномерная модель развития и зонообразования колонии лучистого грибка – стрептомицета – растущего на синтетической агаризированной питательной среде с пируватом, глюкозой или сукцинатом в качестве лимитирующего источника энергии и углерода. Определены ведущие параметры, величина которых задается составом питательной среды и состоянием окружающего пространства.

MODEL OF THE RHYTHMICAL SPOROGENESIS IN STREPTOMYCES COLONIES

Saveliev A. P.

(Puschino, Moscow Region)

It is considered single measured imitation model of the growth and zoneforming of the radiant fungi – streptomycetes – colony on synthetic agar nutritious with piruvate, glucose or succinate as a limiting source of energy and carbon. A certain basic and conducting parameters was determine. The quantities of this parameters is set by composition of nutritious and condition of environmental space.

Введение

Ранее нами [1-5, 7-12], с применением различных биофизических, биохимических, гистологических и т.д. методов, было показано:

- спорообразование в колониях нитчатых стрептомицетов происходит ритмично за счет периодического, пространственно локализованного внутри вегетативной клетки, переключения синтетических (ростовых) процессов на репродуктивные, ведущие к формированию зрелых спор в

воздушном мицелии;

- процесс периодического спорообразования на поверхности колонии стрептомицета выглядит как система концентрических колец воздушного мицелия, образованных в результате равномерного радиального от точки инокуляции роста субстратной части колонии в толще изотропной питательной среды;
- величины основных параметров вегетативного (скорость роста субстратной части колонии) и репродуктивного (частота зонообразования, скорость роста ширины унитарного кольца) процессов зависят от вида и концентрации энергетических субстратов в питательной среде и модулируются колебаниями гелио-геофизических параметров электромагнитного поля Земли;
- однажды начавшийся (волна первого порядка) процесс зонообразования на поверхности колонии стрептомицета неоднократно повторяется (волны второго и т.д. порядков) в виде серии дополнительных колец, формирующихся в межкольцевых пространствах предыдущей волны зонообразования.

Данная работа посвящена рассмотрению основных параметров и закономерностей одномерной модели роста и зонообразования колоний стрептомицета, развивающихся на синтетической агаризированной питательной среде с лимитирующим источником энергии и углерода.

Материал и методы

Объектом исследований служили колонии *Streptomyces levoris* Kras., растущие на твердых питательных средах с лимитирующим источником энергии и углерода: глюкоза, сукцинат или пируват в концентрациях от 2 до 40 mmol/l [1-4, 14].

Посев производили "уколом" в центр чашки Петри и культивировали при +27° С. Через каждые 2-3 суток роста в колониях одной серии просчитывали количество колец и измеряли их радиусы. В статистических расчетах использовали β -распределение [6]. В обработке использовались экспериментальные данные, среднеквадратичное отклонение которых не превышало 10-15% ширины распределения [14]

Результаты и обсуждение

На основании предыдущих исследований [1-5, 7-12] могут быть рассмотрены несколько видов моделей: точечная, одномерная, двумерная и трехмерная.

Точечная модель для изотропной среды описывает реципроктную динамику концентраций потребления лимитирующего субстрата и накопления метаболитов. Результатом потребления лимитирующего субстрата является изменение плотности распределения вегетативных гиф в единице объема среды. Описать качественные изменения субстратного мицелия в рамках этой модели, очевидно, не представляется возможным.

Одномерная модель, с некоторыми допущениями и упрощениями, позволяет описывать задаваемую видом и концентрацией лимитирующего субстрата радиальную динамику спроецированных на плоскость поверхности питательной среды точек: а) фронта роста субстратной части колонии; б) наружного и в) внутреннего контура каждой зоны [1]. Эта модель достаточно полно описывает разнородные, по сути, события роста и зонообразования в поверхностном и приповерхностном слоях питательной среды, но не может описать процессы качественных изменений гиф субстратного мицелия в толще питательной среды.

Двумерная модель, для плоскости радиус – глубина питательной среды, описывает рост, септацию и ветвление субстратных гиф, не затрагивая процессы их биохимической и физиологической дифференциации.

Трехмерная модель является наиболее полной, поскольку должна описывать в толще изначально изотропной питательной среды а) динамику роста субстратной части колонии, включая начальные этапы нелинейного роста субстратного мицелия и формирования микроколонии; б) процессы многократного ветвления; в) пространственно-временную локализацию биохимико-морфологической дифференцировки гиф субстратного мицелия, приводящую к образованию репродуктивных протогиф; на поверхности питательной среды – динамику формирования зон воздушного мицелия из протогиф дифференцированного субстратного мицелия. Трехмерная модель пока не реализована и ждет своих исследователей.

Поскольку питательная среда может считаться изотропной для роста структур диаметром 0.5 мкм и конечной длиной порядка 10-15 мм (гифы субстартного мицелия), предлагаемая одномерная модель представляет собой набор математических функций, каждая из которых описывает динамику радиуса контура определенной структуры при его проекции на плоскость поверхности питательной среды или взаимосвязь параметров функций и их зависимость от концентрации субстрата.

Как было показано ранее [5,6,10], радиус фронта роста (рис.1) изменяется линейно:

$$R_{\text{суб}} = K_r * t \quad (1)$$

где $R_{\text{суб}}$ – радиус колонии от точки инокуляции до кончиков субстратных гиф периферической ростовой зоны (мм), K_r – линейная скорость роста (мм/сут), t – текущее время, возраст колонии (сут).

Радиус фронта зонообразования (рис.1), растет также линейно [12,13]:

$$R_{\text{зон}} = K_r * (t - \varphi(P)) \quad (2)$$

где $\varphi(P)$ – фазовый сдвиг 2-го, 3-го и P -го фронтов зонообразования.

Однако, дискретные координаты (радиусы и время) точки закладки n -ой зоны ρ -го порядка могут быть найдены из:

$$R_{n,\rho} = R_1 + \theta * (n-1) - \Delta * (\rho-1) \quad (3)$$

$$t_{n,\rho} = t_1 + T * (n-1) + \varphi * (\rho-1) \quad (4)$$

где R_1 – радиус точки закладки первой зоны, θ – расстояние между точками закладки соседних зон, n – номер зоны, Δ – радиальный сдвиг между соседними волнами зонообразования, ρ – номер волны зонообразования, t_1 – время начала формирования первой зоны, T – период зонообразования, φ – фаза, временной сдвиг между соседними волнами зонообразования.

Скорость роста радиуса субстратной части колонии стрептомицета может быть задана соотношением:

$$K_r = r_0 / \varphi_0 \quad (5)$$

где r_0 – радиус микроколонии, а φ_0 – время, за которое она сформировалась.

Зависимость линейной скорости роста K_r от вида и концентрации $[S]$ лимитирующего субстрата в питательной среде, получена нами [10]:

$$K_r = K_{r0} * [(S+S_0)/S] * \{ [(S_{kr}+S_0)^2 K_s + S_0 + S_0^2 K_i] / [(S_{kr}+S_0)^2 K_s + (S+S_0) + (S+S_0)^2 K_i] \} \quad (6)$$

где K_{r0} - линейная скорость роста колонии при $S=0$; S_{kr} - критическая концентрация С-источника, при которой K_r максимальна (mmol/l), S_0 - концентрация С-источника, при которой $K_r=0$, K_i - константа ингибирования, K_s - константа насыщения. Значения параметров для трех видов С-источников сведены в таблицу 1:

	K_{r0}	S_k	S_0	K_s	K_i	ψ
Пируват	0.3	1.5414	0.5336	0.1244	0.0134	0.272
Глюкоза	0.3	16.256	3.958	2.5	5.798	0.284
Сукцинат	0.3	1.0562	0.0686	0.0689	0.0119	0.216

Поскольку

$$r_0 = \psi * K_r \quad (7)$$

где ψ - субстратоспецифический коэффициент, вид концентрационной зависимости $r_0=f([S])$ аналогичен таковой для K_r : при низких концентрациях апикальная неразветвленная часть - ростовая единица субстратной гифы существенно длиннее, а частота и количество порядков ветвления субстратных гиф значительно ниже, чем при росте на высоких концентрациях [15].

Такова, вероятно, стратегия колонизации питательного субстрата мицелиальным микроорганизмом - плотность растущих кончиков гиф должна быть оптимальна существующей в среде концентрации питательных веществ. Высокопитательная среда может быть метаболизирована медленно растущей колонией с большой плотностью ростовых единиц.

Экспериментально нами [8] было установлено, что динамика ширины зоны описывается:

$$W_n = (t - t_n) * W^\wedge / (\tau_w + (t - t_n)) \quad (8)$$

где W^\wedge - максимальная (теоретическая) полуширина кольца (мм), $(t - t_n)$ - возраст зоны (сут), τ_w - полупериод формирования - время (сут), за которое кольцо достигнет половины W^\wedge . Из (8) видно, что основным параметром уравнения является τ_w - "скорость" роста зоны в ширину, зависящей от возраста колонии и номера волны зонообразования. Анализ этой зависимости показывает, что, по видимому, чем позже образовалось на по-

верхности колонии кольцо, тем дольше оно будет расти в ширину.

После несложных преобразований и упрощений (1), (3), (4) и (8) получаем:



Рис. 1.

Пояснения к рисунку:

- $R_{\text{суб}}$ – максимальный радиус субстратной части колонии (мм);
- K_r – линейная скорость роста (мм/сут);
- t – текущее время (возраст колонии) (сут);
- $R_{n,p}$ – радиус начала формирования n-й зоны (мм);
- $t_{n,p}$ – время начала формирования n-й зоны (сут);
- $n = 1, 2, 3, \dots, N$ – номер зоны, считая от центра;
- γ – коэффициент;
- $\rho = 1, 2, 3, \dots, P$ – номер волны зонообразования;
- r_0 – радиус микроколонии (мм);
- φ_0 – фазовый сдвиг первой волны зонообразования;
- φ_v – временной сдвиг следующей волны зонообразования;
- α – коэффициент продуктивного торможения;
- W_n – ширина зоны воздушного мицелия на поверхности колонии (мм);
- W_{\wedge} – максимальная ширина зоны (теоретическая) (мм);
- $t_z = (t - t_n)$ – возраст n-й зоны (сут);
- τ_w – “скорость” расширения зоны;
- $R_{n,v}$ – радиусы наружного (н) и внутреннего (в) контуров n-й зоны (мм).

Очевидно, что основными параметрами для описания фронтов роста и зонообразования являются K_r , r_0 , γ , φ_v и α . Ведущими же среди них являются первые три, величины которых определяются составом питательной среды и модулируются экогенными факторами окружающего пространства [1-4, 14-17].

Параметры φ_v и α задают величины пространственно-временного сдвига каждой последующей волны зонообразования относительно предыдущей и, вероятно, отражают (α) тор-

можение репродуктивных процессов под влиянием накопления в питательной среде продуктов метаболизма.

В модель заложены следующие допущения: в развитии колонии длина неразветвленной апикальной части субстратных гиф периферической ростовой зоны, линейная скорость роста, период зонообразования и ширина зон остаются постоянными.

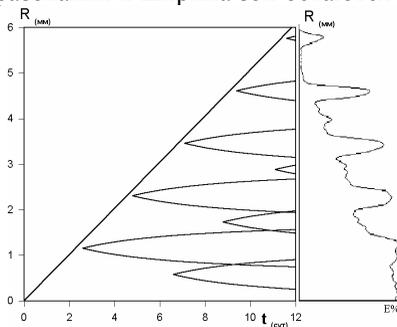


Рис. 2.

На рис. 2 показан результат моделирования роста и зонообразования колонии стрептомицета, развивавшейся на агаризированной питательной среде с глюкозой в концентрации 5 mmol/l при стандартных условиях культивирования. Справа дана радиальная сканограмма (E% – оптическая плотность) реальной колонии. Видно удовлетворительное совпадение расположения пиков на сканограмме с финальным распределением зон на модельном графике. Параметры модели сведены в таблицу 2:

	[S] (mmol/l)	t _{наб} (сут)	N	P	r ₀ (мм)	K _r (мм/сут)	γ	φ _v (сут)	α	τ _w (сут)	W ^λ (мм)
глюкоза	5	12	5	2	0.144	0.5069	8	4	1.2	5	1.25
пируват	5	12	6	3	0.1397	0.5136	6	2	2.0	1	0.3
сукцинат	5	12	4	3	0.1365	0.6323	11	3	0.65	1	0.6

Предлагаемая модель описывает изменение ширины зоны так, как будто она равномерно заполнена воздушным мицелием. В реальной колонии зона представляет собой ограниченное пространство, заполненное множеством “кустов” воздушного мицелия, которые, разрастаясь вверх и в стороны, сливаются, в конечном итоге, в единую зону [8].

Выявить наличие второй, третьей и т.д. волн зонообразования удастся путем анализа сканограмм более молодых зон, либо

– при изучении колоний, развивающихся на средах с низкой концентрацией лимитирующего субстрата, где скорость роста максимальна, а частота зонообразования низка. При этом расстояния между зонами настолько велики, что позволяют сканированием открыть существование дополнительных зон и идентифицировать их порядок.

Таким образом, проведенное нами имитационное моделирование роста и зонообразования колоний стрептомицета, растущих на синтетических питательных средах с различными лимитирующими источниками энергии и углерода показало:

- ритмичное спорообразование в колониях стрептомицета протекает несколькими последовательными волнами;
- фронт зонообразования, также как и фронт роста, распространяется линейно во времени;
- количество волн зонообразования, по видимому, не определяется ни возрастом колонии, ни скоростью её роста, что предполагает наличие эндогенных механизмов, регулирующих частоту и порядок ветвления. В качестве показателя последнего, например, может быть предложена фрактальная размерность Хаусдорфа, зависящая, по видимому, от вида и концентрации лимитирующего источника энергии и углерода;
- пространственно-временные координаты точек начала формирования зон спорогенного воздушного мицелия на поверхности колоний стрептомицета могут быть определены уравнениями, ведущими параметрами в которых являются: задаваемая интенсивностью внутриклеточного метаболизма, линейная скорость роста колонии K_r , радиус микроколонии r_0 и субстратоспецифичный коэффициент γ . Остальные параметры определяют формирование вторичных волн зонообразования и могут быть определены из комбинации ведущих.
- **Литература.**
 1. Ахмадиева А.Х. и др., Экспериментальные исследования по космической биофизике. Пушино. ОНТИ НЦБИ АН СССР.1976.с.31-37.
 2. Савельев А.П. и др. Экспериментальные исследования по

- космической биофизике. Пушино, ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1976. с.38-51.
3. Ахмадиева А.Х., Савельев А.П., Успехи космической биофизики. Пушино. ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1978. с.21-25.
 4. Савельев А.П., Ахмадиева А.Х., Успехи космической биофизики. Пушино. ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1978. с.26-35.
 5. Савельев А.П., Акоев И.Г., Микробиология. 1982. т.51. Вып.6. с. 954-960.
 6. Перт С.Дж., Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М. «Мир».1978.331С.
 7. Хастингс Н., Пикок Дж., Справочник по статистическим распределениям. М. “Статистика”.1980.
 8. Saveliev A. P., Studia biophysica. 1984. V.102. № 1. P.51-60.
 9. Saveliev A. P., Studia biophysica. 1984. V.102. № 1. P.61-67.
 10. Saveliev A. P., Gen. Phys. and Biophys. 1987. V.6. P.79-85.
 11. Савельев А.П., Карнаузов В.Н., Биофизика. 1999. Т.44. Вып.2. С.318-324.
 12. Савельев А.П., Митьковская Л.И., Куньева Л.Ф., Карнаузов В.Н., Савельева Л.Н., II съезд биофизиков России. Тезисы докладов. М. 1999. С.278-279.
 13. Савельев А.П., Митьковская Л.И., Куньева Л.Ф., Карнаузов В.Н., Савельева Л.Н., Биофизика. 1999. Т.44. Вып.3. С.505-509.
 14. Савельев А.П., Ахмадиева А.Х., Акоев И.Г., Космическая биология и авиакосмическая медицина 1981. т.6. с.28-30.
 15. Савельев А.П., Зависимость ритма зонообразования стрептомицета от космофизических факторов. Дисс. Пушино.: 1983. 131с.
 16. Савельев А.П., Известия РАН, сер. биол. 1996. №4. с. 460-466.
 17. Савельев А.П., Карнаузов В.Н., II съезд биофизиков России. Тезисы докладов. М. 1999. С.911-912.