

*ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет»  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии*

Дисциплина

«Основы физиологии роста и культивирования микроорганизмов»

**«КИНЕТИКА СБАЛАНСИРОВАННОГО РОСТА  
КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ В ЦЕЛОМ»**

**Занятие № 5**

Выполнила: магистрант гр. БМм-11 Бажина А. С.

Проверил: д.т.н., профессор Лещенко А. А.

Киров 2014

- Если небольшое количество живых клеток поместить в раствор, содержащий все необходимые питательные вещества, то при определенных температуре и pH клетки будут расти.
- В зависимости от морфологии клетки процесс ее роста может происходить двумя путями.
- Одноклеточные организмы претерпевают в процессе роста деление, и поэтому увеличение их биомассы (массы живых организмов) сопровождается увеличением числа клеток.
- Совершенно по-иному происходит рост плесневых грибов - в этом случае по мере роста организма возрастают в первую очередь длина и число гиф мицелия.
- Таким образом, в культуре растущей плесени увеличиваются размеры организмов и их концентрация, но не обязательно число организмов.

- С клеточным ростом тесно связаны два других процесса: поглощение клеткой некоторых веществ из окружения и выделение конечных продуктов метаболизма клетки в среду. В процессе роста скорости этих процессов изменяются в очень широких пределах.
- Среди множества известных процессов с участием культур клеток достаточно часто встречается только ограниченное число типичных путей утилизации субстрата и образования продуктов жизнедеятельности клеток.

# Анализ растущей популяции клеток в общем виде.

## Основные параметры, явления и взаимодействия влияющие на кинетику роста популяции клеток

### Среда (окружение)

Многокомпонентность

Реакции в растворе

Кислотно-основное равновесие

Изменение pH, t и др. параметров

Изменение реологических свойств

Многофазность

Объемная неоднородность

Питательные вещества  
Субстраты

Продукты  
метаболизма

Теплота

Механические  
воздействия

4

### Популяция клеток

Многокомпонентность

Гетерогенность популяции  
клеток

Множественность реакций

Системы внутренней регуляции

Способность к адаптации

Стохастические факторы

Генетические изменения

❖ Во всех случаях нужно учитывать две взаимодействующие системы:

- биологическую фазу, состоящую из популяции клеток,
- и фазу, окружающую эту популяцию, или среду.

❖ Клетки поглощают питательные вещества и превращают субстраты (взятые из среды) в продукты метаболизма.

❖ Клетки генерируют теплоту, а температура среды в свою очередь определяет температуру клеток.

❖ Среда оказывает механическое воздействие на клетки посредством гидростатического давления или гидродинамических эффектов, а также путем изменения вязкости среды вследствие накопления клеточной массы и продуктов жизнедеятельности клеток.

- ❑ Среда должна быть многокомпонентной (содержать все необходимые для роста клеток питательные вещества).
- ❑ В ней накапливаются (по мере роста клеток) различные конечные продукты клеточного метаболизма.
- ❑ Химические реакции могут происходить и в среде, что приводит к модификации продуктов метаболизма.
- ❑ Например, при гидролизе пенициллина.
- ❑ Часто клетки потребляют или продуцируют вещества, изменяющие кислотность среды; взаимосвязь клеточных процессов с кислотно-основным равновесием определяет рН среды, который в свою очередь влияет на клеточную активность и на процессы транспорта.
- ❑ В ходе клеточных реакций могут происходить изменения температуры, ионной силы, рН и реологических свойств бульона во времени.

- ❖ Часто среда представляет собой многофазную систему, состоящую из жидкой фазы и диспергированных в ней пузырьков газа или из двух несмешивающихся жидких фаз, а иногда из одной газовой и двух жидких фаз.
- ❖ К числу последних достижений в разработке биореакторов относятся методы одновременного проведения клеточных реакций и процессов разделения путем введения в среду особых веществ, способствующих образованию дополнительной жидкой или твердой фазы.
- ❖ Наконец, в силу большого объема биологического реактора, высокой вязкости и неньютоновской природы бульона в отдельных его точках могут создаваться разные условия.
- ❖ Все эти параметры и переменные среды существенно влияют на кинетику клеточного роста.

- Каждая индивидуальная клетка представляет собой сложную многокомпонентную систему, которая даже на клеточном уровне далека от гомогенности.
- В каждой клетке одновременно осуществляется множество химических реакций, управляемых сложным комплексом систем регуляции.
- Благодаря этим системам клетка может изменять (и изменяет на самом деле) скорость и даже тип происходящих в ней химических реакций в зависимости от условий и состава среды.
- Длительное культивирование клеточной популяции может сопровождаться накоплением спонтанных мутаций; кроме того, особенности технологического процесса могут налагать давление отбора, приводящее к медленным изменениям генетической природы штамма.



- ✓ С другой стороны, в культуре растущих клеток всегда наблюдается существенная гетерогенность популяции, т. е. в любой момент, в любом, даже самом малом объеме культуры индивидуальные клетки различаются по возрасту (одни только образовались в результате деления, другие уже достигли состояния зрелости, а третьи находятся в стадии деления) и, следовательно, по биохимической активности.
- ✓ Очевидно, практически невозможно создать кинетическую модель, которая учитывала бы все параметры и факторы, перечисленные в таблице выше.
- ✓ Поэтому рассмотрим ряд приближений, которые позволяют упростить эту картину и найти математические выражения, описывающие кинетику роста популяции клеток.

- Что касается среды, то обычно допускают, что, за исключением одного компонента, все ее составляющие присутствуют в таких высоких концентрациях, что их изменения практически не отражаются на общих скоростях процессов.
- Таким образом, один компонент среды становится питательным веществом, лимитирующим скорость клеточного роста, и при анализе влияния состава среды на кинетику роста клеток мы должны учитывать концентрацию только этого компонента.
- Иногда возникает необходимость в учете некоторых других составляющих среды, например накапливающегося в среде ингибитора, в противном случае наше описание кинетики было бы слишком далеким от истинной картины.

- В отношении других параметров среды часто можно допустить, что их изменения не влияют в сколько-нибудь существенной степени на кинетику роста микроорганизмов за тот период, в течение которого проводится типичный эксперимент или осуществляется типичный процесс, если эти изменения не превышают типичных для этого эксперимента или процесса пределов.
- К тому же системы контроля и регулирования биореакторов могут поддерживать на постоянном уровне целый ряд параметров среды, в том числе pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода.
- Впрочем, в некоторых случаях для адекватного описания требуемого диапазона кинетического поведения может возникнуть необходимость учета в модели многокомпонентности и нескольких параметров среды.

✓ На схеме 2 суммированы основные принципы различных приближений и способов описания, которые могут быть полезны при математическом анализе клеточной фазы системы.

✓ Согласно этой схеме, разработанной Фредриксоном и Цучия, подходы к анализу микробиологических систем классифицируются в соответствии с числом компонентов, используемых при описании клеток, а также в зависимости от того, рассматриваются ли клетки как гетерогенная популяция различных объектов (как оно и есть на самом деле) или как популяция некоторых усредненных клеток (в этом случае клетки принципиально не отличаются от какого-либо компонента в растворе).



Схема 2 - Различные способы описания кинетики роста популяции клеток

- Как показано на схеме 2 реальная ситуация отвечает структурированной сегрегированной системе.
- Если гетерогенность клеток не влияет в существенной степени на кинетику исследуемых процессов, то можно принять «приближение усредненной клетки» и тем самым упростить способ описания от сегрегированного до не сегрегированного.
- В так называемом состоянии «сбалансированного роста» вся синтетическая активность клеток скоординирована таким образом, что на средний состав клеток пролиферация популяции не влияет.
- В этом случае допустимо использовать модели, не учитывающие многокомпонентную природу клеток.
- Как мы видим ниже, при анализе и описании роста популяций клеток обычно принимают наиболее идеализированную ситуацию, т. е. несегрегированную, неструктурированную модель.

- ❑ С другой стороны, мы познакомимся с рядом таких ситуаций, когда выгоднее рассматривать биологическую фазу как более сложную систему.
- ❑ Так, в нестационарном состоянии (типичном, в частности, для периодических микробиологических процессов) условия сбалансированного роста даже в первом приближении соблюдаются только в течение сравнительно короткого промежутка времени.
- ❑ Хорошо известно, что в ходе периодического процесса в очень широких пределах могут изменяться как клеточный состав популяции, так и скорости и типы реакций, осуществляющихся в этой популяции, и тогда могут пригодиться более детальные модели.
- ❑ Кроме того, структурированные модели позволяют отражать непосредственно в математических выражениях известные особенности сети клеточных биохимических реакций.

- Аналогично не представляющее особых затруднений включение в модель кинетики клеточного роста особенностей клеточного цикла (сегрегированный подход) способствует повышению ценности и расширению диапазона применимости модели.
- Важнейшими элементами сегрегированных моделей являются кинетика и особенности регуляции роста индивидуальной клетки.



- ❖ Живые клетки представляют собой чрезвычайно малые системы, поэтому количество любого химического компонента в них крайне ограничено.
- ❖ Действительно величины очень малы по сравнению с обычным для химика числом молекул порядка  $10^{23}$ .
- ❖ Предельным случаем является ДНК, которая в медленно растущей бактерии содержится только в количестве одной молекулы; очевидно, что в этом случае само понятие «концентрация ДНК в клетке» становится весьма неопределенным.
- ❖ То же самое можно сказать о содержащихся в следовых количествах ионах, органоидах и многих других компонентах клетки.
- ❖ Хотя в некоторых из рассмотренных ниже моделей мы будем описывать внутриклеточные события как непрерывные, следует отдавать себе отчет в том, что такое описание является всего лишь удобным приближением типичной усредненной клетки в популяции клеток.

- ✦ Реакции и процессы массопередачи, в которых участвует ограниченное число молекул, должны рассматриваться как случайные события.
- ✦ Для описания таких событий создавались стохастические модели популяций клеток, не имеющих существенных преимуществ по сравнению с более простыми детерминистическими моделями.
- ✦ Предсказуемость поведения популяции клеток можно проиллюстрировать, например, оценив точность детерминистического описания очень малой популяции, в частности типичного инокулята (посевного материала; обычно около  $10^5$  клеток).
- ✦ Пусть совокупность продолжительностей клеточных циклов индивидуальных клеток описывается нормальным распределением:

$$P(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left[-\frac{(t-\bar{t})^2}{2\sigma^2}\right] \quad (1)$$

- ❖ Примем  $t = 1$ , а стандартное отклонение  $\sigma$  равным 0,5.
- ❖ Тогда мы можем сказать, что с коэффициентом доверительности 0,95 продолжительность клеточного цикла отдельной клетки составляет:

$$t_{\text{одна клетка}} = \bar{t} \pm 1,96\sigma = 1,0 \pm 0,98 \quad (2)$$

- ❖ Далее рассмотрим суспензию, содержащую достаточно большое число клеток, например  $n$  клеток.
- ❖ Пусть каждая из  $n$  клеток растет независимо от других клеток, т. е. клеточная суспензия содержит  $n$  независимых образцов.
- ❖ Тогда 955-ный доверительный предел времени удвоения численности этой популяции будет равен  $2 \sigma_{\text{популяция}}$ , где

$$\sigma_{\text{популяция}} = \frac{0,98 \sigma}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

- Следовательно с возрастанием  $m$  неопределенность времени удвоения численности популяции быстро уменьшается.
- Приняв, например, как и раньше,  $\sigma = 0,5$  и  $t = 1,0$ , легко найти, что 95%-ные доверительные пределы для  $t$  в случае популяции из  $m$  клеток составляют

$m$	
1	

В сущности, этот несложный расчет еще раз подтверждает известное положение, что, как и в любых стохастических процессах при относительно большом числе событий (например, в химических реакциях или в явлениях, связанных с транспортом жидкостей), изменения характеристик популяции могут быть предсказаны с достаточно большой точностью, даже если стандартные отклонения характеристик индивидуальных клеток велики.

Так, рост инокулята, приводящий к повышению концентрации с  $10^4$  до  $10^8$  клеток в 1 мл, очевидно, обеспечивает достаточное усреднение по всем стадиям роста, что позволяет с высокой точностью определить время удвоения численности популяции.

Точно так же можно достаточно обоснованно говорить о скорости синтеза ДНК в типичной клетке популяции, хотя в каждой индивидуальной клетке синтезируется только одна или две молекулы ДНК со скоростью, которая в данный момент может резко отличаться от средней величины.

- ❖ Невозможно обсуждать кинетику в отсутствие данных о конструкции реактора для измерения скоростей процессов и оценки их кинетики.
- ❖ В следующем разделе мы вкратце рассмотрим соответствующие материальные балансы для двух типов идеальных биореакторов.
- ❖ Затем мы приступим к анализу кинетики клеточного роста, начиная с ситуации, схематично изображенной в верхнем левом углу схемы 2, т. е. с простейших моделей кинетики клеточного роста, утилизации субстрата и образования продуктов метаболизма.
- ❖ В последующих разделах главы мы изучим другие ситуации, также изображенные на схеме 2, и попытаемся оценить важность различных концептуальных и математических подходов к анализу кинетики роста популяции клеток.

- ❑ В общем случае разработка кинетической модели популяции клеток является своего рода искусством, требующим,
- ❑ во-первых, учета окончательной цели, для которой эта модель предназначается,
- ❑ во-вторых, тщательно продуманного и обоснованного выбора основных переменных и параметров, влияющих на наиболее важные процессы, и,
- ❑ в-третьих, известной концептуальной и математической гибкости, что необходимо для перевода качественных характеристик системы на язык применимых в практической деятельности математических выражений

## КИНЕТИКА СБАЛАНСИРОВАННОГО РОСТА

- ❖ Моделирование и анализ кинетики роста популяций клеток мы начнем с неструктурированных моделей, в которых биофаза характеризуется только величиной клеточной массы или численной концентрацией.
- ❖ Суммарную скорость роста клеточной массы  $r_x$  часто выражают как  $\mu x$ , где  $x$  – клеточная масса в единице объема культуры, а  $\mu$  – удельная скорость роста клеток, выраженная в единицах обратного времени.
- ❖ В этих параметрах уравнение материального баланса клеточной массы для ПРПП в стационарном состоянии будет выглядеть следующим образом:  $Dx_1 = (D - \mu)x$  (4)



- Часто поступающий в проточный реактор поток раствора питательных веществ состоит только из стерильного питательного вещества, так что  $x_f = 0$ .
- В таком случае следует, что отличная от нуля популяция клеток может существовать в стационарном состоянии только при  $D = \mu$  (5)
- Т. е. тогда, когда удельная скорость клеточного роста равна скорости разведения.
- Если выполняется условие уравнения 4, то при стерильном питательном веществе уравнение 5 уже не определяет  $x$ .
- Неопределенность уровня популяции была подтверждена в экспериментах с культурой *Bacillus linens* в проточном реакторе.

В этих экспериментах стационарное состояние было достигнуто через 6 ч (рисунок 1), после чего культуру подвергали двум последовательным разведениям, при которых часть содержимого реактора, состоящего из популяции клеток и среды, удаляли и замещали чистой средой.

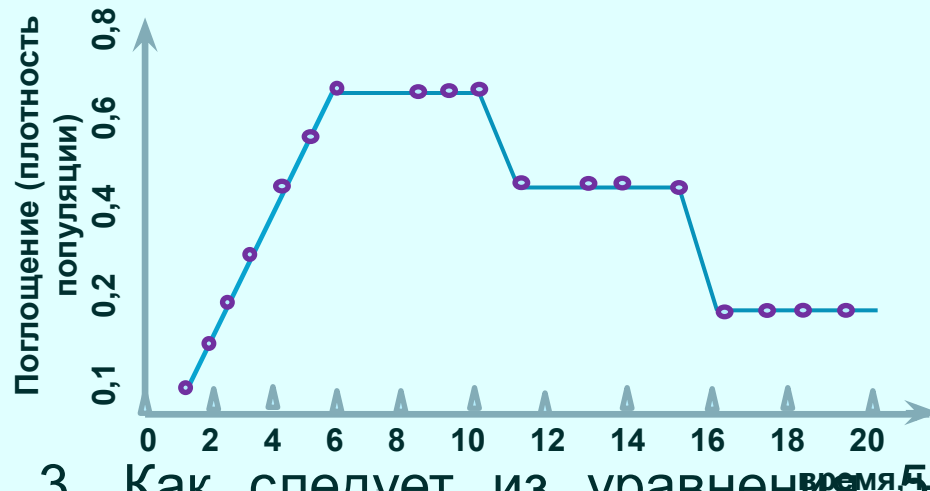


Рис. 3. Как следует из уравнения 5, при постоянном  $\mu$ , концентрация клеточной массы в проточной культуре неопределенна (*B. lineus* при 26 °C и  $D = 0,417 \text{ ч}^{-1}$ ).

После каждого такого разведения через некоторое время в системе устанавливалось новое стационарное состояние, характеризующееся иной концентрацией клеточной массы.