

## ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА: ОПЫТ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИНАМИКИ ТРАНСГЕННЫХ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Брильков А.В., Брилькова Е.В.<sup>2</sup>, Ганусов В.В.<sup>2</sup>, Жабрун И.В.<sup>2</sup>, Логинов Ю.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

<sup>2</sup> Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

<sup>3</sup> Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ; e-mail: loginov@sibsau.ru

Поступила в редакцию: 28.07.2019

**Аннотация.** Настоящая статья посвящена математическому моделированию динамики популяций трансгенных микроорганизмов (ГМО) при культивировании в хемостате. Причины нестабильности трансгенных микроорганизмов при длительном периодическом или непрерывном культивировании в хемостате не совсем понятны до сих пор. Почему клетки, содержащие плазмиды с клонированными генами, растут медленнее бесплазмидных также неясно: или это прямое влияние экспрессии плазмидных генов на жизнеспособность плазмидсодержащих клеток, ингибирование клеточного роста или же расходование клеточных ресурсов на поддержание плазмид. Оценка параметров нестабильности плазмид с помощью методов, предложенных в настоящей работе, является первым шагом к пониманию главной причины: почему трансгенные микроорганизмы теряют плазмиды при культивировании и не теряют их в природе (плазмидный парадокс).

**Ключевые слова:** трансгенные микроорганизмы, нестабильность плазмид, математическое моделирование, стоимость плазмид, непрерывное культивирование микроорганизмов, хемостат.

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых технологий с использованием генетически модифицированных организмов (ГМО) обещает немалые перспективы в производстве, медицине, сельском хозяйстве, биоремедиации [1]. Однако существует и значительный риск негативных последствий, связанный с неконтролируемым распространением ГМО в окружающей среде [2]. Сама проблема оценки выживания и распространения ГМО даже в простых модельных экосистемах (хемостат и микроэкосистемы как модели природных экосистем) является многоуровневой и достаточно сложной [3].

Для оценки «стоимости» поддержания клонированных в/на плазидах генов трансгенных микроорганизмов при периодическом и хемостатном культивировании проанализирована математическая модель динамики популяций трансгенных микроорганизмов, основанная на известной модели Левина-Стюарта [4]. В этой модели выживание трансгенных микроорганизмов в хемостате с ограничением роста недостатком ресурса (субстрата) определяется селективным преимуществом бесплазмидных клеток и вероятностью потери или передачи плазмид. В настоящей работе показано, что нестабильность трансгенных микроорганизмов возрастает при эффективной экспрессии клонированных генов, что в модели Левина-Стюарта не учитывается.

### МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ТРАНСГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Математическая модель Левина-Стюарта, описывающая популяционную динамику плазмиднесущих микроорганизмов в хемостате, основывается на описании динамики популяций плазмидсодержащих ( $X^+$ ) и бесплазмидных ( $X^-$ ) клеток с учетом вероятности потери плазмиды ( $\tau$ ) при делении и вероятности передачи плазмиды в процессе конъюгации ( $\gamma$ ) [4]:

$$\begin{cases} \frac{dX^+}{dt} = \mu^+ X^+ - DX^+ - \tau\mu^+ X^+ + \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dX^-}{dt} = \mu^- X^- - DX^- + \tau\mu^+ X^+ - \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu^+ X^+}{Y^+} - \frac{\mu^- X^-}{Y^-}, \end{cases} \quad (1)$$

где  $X^+$ ,  $X^-$  – концентрации плазмиднесущих и бесплазмидных клеток,  $\tau$  – вероятность потери клеткой плазмиды;  $\gamma$  – параметр скорости конъюгационного переноса,  $D$  – удельная скорость разбавления среды в хемостате;  $S$ ,  $S_0$  – концентрации субстрата в ферментере и на входе;  $\mu^+$ ,  $\mu^-$  – удельные скорости роста популяций плазмидного и бесплазмидного штаммов:  $\mu^+ = \mu_{\max}^+ S / (K_s^+ + S)$ ,  $\mu^- = \mu_{\max}^- S / (K_s^- + S)$ ;  $\mu_{\max}^+$ ,  $\mu_{\max}^-$ ,  $K_s^+$ ,  $K_s^-$ ,  $Y^+$ ,  $Y^-$  – максимальные скорости роста, константы Моно и коэффициенты экономичности потребления субстрата для плазмидсодержащего и бесплазмидного вариантов.

Модель Левина-Стюарта (1) является вариантом известных в экологии и биофизике микробных популяций моделей Лотки-Вольтерра и хемостата Моно-Герберта [5, 6]. С помощью модели (1) и её обобщений удалось объяснить целый ряд экспериментальных данных, в том числе, длительное поддержание популяции неконкурентоспособных трансгенных бактерий в хемостате и водных экосистемах [7].

**Влияние эффективности экспрессии клонированных генов на параметры неустойчивости трансгенных бактерий.** Математическая модель Левина-Стюарта (1) описывает динамику популяций трансгенных бактерий. Большинство рекомбинантных плазмид, содержащих клонированные гетерологичные гены, являются неконъюгативными (гены, обеспечивающие конъюгативный перенос плазмид, занимают достаточно большой объем на плазмиде и обычно не включаются в состав векторов для клонирования, как, например, в популярных векторах pBR322, pUC18 и др.). Учитывая этот факт, можно упростить модель (1), найти ее аналитическое решение и оценить параметры неустойчивости трансгенных микроорганизмов  $\alpha$  и  $\tau$ .

Предлагаемый ниже метод оценки параметров  $\alpha$  и  $\tau$  основан на использовании приближения квазистационарного роста, наблюдаемого в начале и в конце культивирования в хемостате. Параметр  $\alpha$  характеризует «селективное преимущество бесплазмидных клеток» [4]  $\alpha = 1 - \mu^+(S) / \mu^-(S)$  или «давление отбора» [8]. Отметим, что часто используемый близкий по смыслу параметр «стоимость приспособленности» (fitness cost) отличается от  $\alpha$  и определяется «fitness cost» не по разнице скоростей размножения трансгенной и бесплазмидной популяций как  $\alpha$ , а по динамике численностей этих популяций в конкурентных экспериментах [7]. Параметр  $\tau$  характеризует вероятность потери плазмиды при делении клеток.

Перейдем к новой переменной  $z$ , выражающей отношение числа бесплазмидных клеток в популяции к числу плазмидсодержащих:

$$z = \frac{X^-}{X^+}. \tag{3}$$

Тогда

$$\dot{z} = \frac{\dot{X}^-}{X^+} - z \frac{\dot{X}^+}{X^+}, \tag{4}$$

или подставляя из (2) выражение для  $\dot{X}^+$  и  $\dot{X}^-$ , получаем:

$$\dot{z} = \mu^-(S)[\alpha + \tau(1 - \alpha)]z + \mu^-(S)\tau(1 - \alpha), \tag{5}$$

где  $\alpha = 1 - \mu^+(S) / \mu^-(S)$  - относительное селективное преимущество популяции бесплазмидных клеток.

Рассмотрим динамику популяций в состоянии, близкому к стационарному, когда доля клеток, содержащих плазмиды, мала, т.е.  $z \gg 1$ .

В этом случае можно положить:

$$\mu^-(S) \approx D. \tag{6}$$

С учетом допущений (6, 7) уравнение (5) переписывается следующим образом:

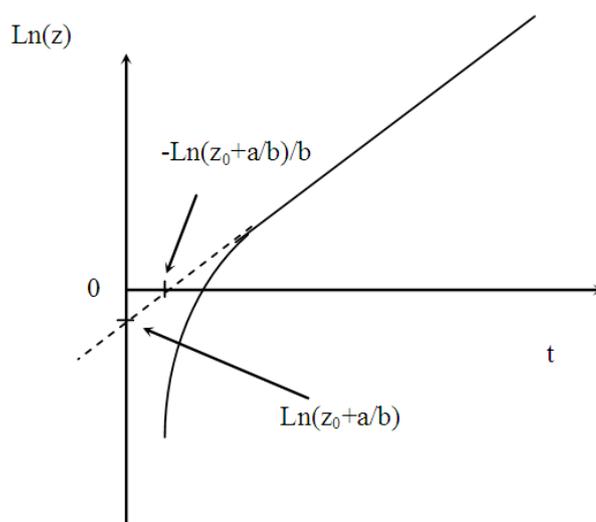
$$\dot{z} - Dbz - aD = 0, \tag{7}$$

где  $a = \tau(1 - \alpha)$ ,  $b = \alpha + a$ .

Решение уравнения (7) имеет вид:

$$z = -\frac{a}{b} + \left( z_0 + \frac{a}{b} \right) \cdot \exp(bDt), \tag{8}$$

где  $z_0$  – начальное значение  $z$ .

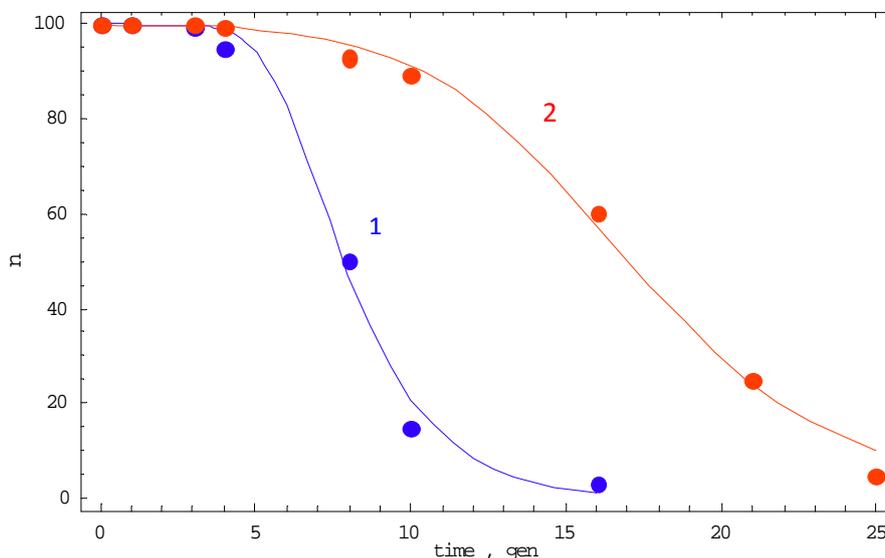


**Рисунок 1.** Определение параметров нестабильности трансгенных бактерий  $\alpha$  и  $\tau$  графическим способом. Сплошная линия описывается уравнением (9), штриховая – уравнением линейной регрессии. По оси абсцисс – время в безразмерных единицах  $Dt$

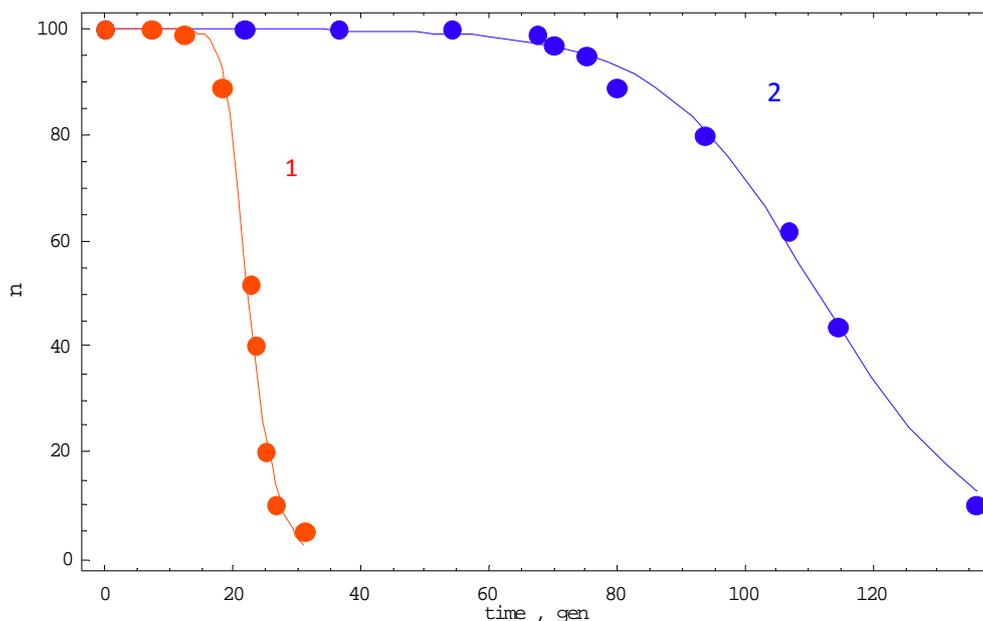
Таким образом, динамика замещения плазмидного штамма бесплазмидным в хемостате в состоянии, близком к стационарному, описывается следующим выражением:

$$\frac{X^-}{X^+} = -\frac{\tau(1-\alpha)}{\alpha + \tau(1-\alpha)} + \left[ \frac{X_0^-}{X_0^+} + \frac{\tau(1-\alpha)}{\alpha + \tau(1-\alpha)} \right] \cdot \exp([\alpha + \tau(1-\alpha)] \cdot D \cdot t). \quad (9)$$

Используя выражение (9), можно определить значения  $\alpha$  и  $\tau$  по экспериментальным данным. Они находятся с помощью аппроксимации зависимости  $\ln(z) = f(t)$  прямой линией при  $z \gg a/b$  (рис. 1).



**Рисунок 2.** Влияние экспрессии клонированных в *E. coli* Z905 (pPHL-7) генов биолюминесценции морских светящихся бактерий на нестабильность трансгенной популяции при культивировании в хемостате на различных субстратах-источниках углерода и энергии: 1 – на глицерине, 2 – то же на глюкозе. По оси ординат – доля плазмидосодержащих клеток в популяции; по оси абсцисс – время в поколениях бесплазмидной популяции. Точки – экспериментальные данные, непрерывные линии – расчеты по модели (1) с параметрами  $D = 0,1 \text{ час}^{-1}$ ,  $S_0 = 100$ ,  $K_s = 0,01$ ,  $\alpha_1 \approx 0,80$  (на глицерине),  $\alpha_2 \approx 0,36$  (на глюкозе),  $\tau_2 \approx 0,80$  (на глюкозе),  $\tau_1 \approx 0,55 \cdot 10^{-4}$  (на глицерине)



**Рисунок 3.** Влияние удельной скорости размножения в хемостате на параметры нестабильности плазмидсодержащих бактерий *E. coli* K-12, (pBR322). Точки на графиках – экспериментальные данные [10], непрерывные линии – расчеты по формуле (9). 1 –  $D = 0,1 \text{ час}^{-1}$ , 2 –  $D = 0,3 \text{ час}^{-1}$ . Параметры нестабильности:  $\alpha_1 \approx 0,52$ ,  $\alpha_2 \approx 0,11$ ,  $\tau_1 \approx 9,8 \cdot 10^{-8}$ ,  $\tau_2 \approx 1,0 \cdot 10^{-5}$

Проведем оценку параметров нестабильности трансгенных плазмидсодержащих бактерий *Escherichia coli* Z905 (pPHL-7) при ограничении роста недостатком источника углерода и энергии (глицерин или глюкоза) в хемостате (рис. 2).

Нестабильный рекомбинантный штамм *E. coli* Z905 (изогенный бесплазмидный штамм *E. coli* K-12), содержит плазмиду pPHL-7, в составе которой находятся клонированные под контролем *lac*-промотора в векторе pUC18 гены люминесцентной системы морских светящихся бактерий *P. leiognathi* [9]. Так как лактозный промотор является катаболитчувствительным, от типа лимитирующего рост субстрата – глицерин или глюкоза – зависит эффективность экспрессии клонированных *lux*-генов, что должно приводить к разной скорости элиминации плазмидсодержащих клеток. Действительно, как видно из экспериментальных данных, приведенных на рис. 2, длительность поддержания плазмидных клеток на среде с глюкозой значительно выше, чем на среде с глицерином. Таким образом, экспрессия клонированных *lux*-генов, является важным (если не основным) фактором, определяющим стоимость плазмид для клеток трансгенных бактерий в хемостате.

**Нестабильность трансгенных бактерий при различных скоростях размножения в хемостате.** Рассмотрим эксперименты Wouters с соавт. [10], в которых авторы исследовали длительность поддержания рекомбинантного штамма *E. coli* PC 221 (вариант штамма *E. coli* K-12), содержащего плазмиду pBR322, при разных удельных скоростях разбавления среды в хемостате при лимитировании по фосфору (источнику энергии). Оценка параметров нестабильности плазмидсодержащих бактерий приведена на рисунке 3.

Расчеты показывают, что стоимость плазмид резко возрастает при низких скоростях размножения плазмидсодержащих бактерий в хемостате (рис. 3). что может быть связано:

- 1) со снятием репрессии с энергозависимых промоторов, приводящему к повышению эффективности экспрессии плазмидных генов, при этом полное число копий плазмиды на хромосому не меняется;
- 2) с увеличением средней копийности плазмид на хромосому, что приводит к повышению метаболической нагрузки на плазмидсодержащие клетки бактерий.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Модели Левина-Стюарта принадлежит особое место в описании динамики популяций трансгенных микроорганизмов. По познавательной ценности ее можно сравнить с моделью Ходжкина-Хаксли в биофизике возбудимых мембран [5]. Однако существует ряд экспериментальных данных, которые не учитываются в математической модели (1). Например, влияние экспрессии клонированных на плаزمидах генов (рис. 2), изменение параметров нестабильности при низких скоростях размножения бактерий (рис 3), снижение числа копий плазмид у многокопийных штаммов микроорганизмов с течением времени [11], длительное сохранение плазмидсодержащих клеток бактерий в природных экосистемах несмотря на высокую стоимость поддержания плазмид (плазмидный парадокс) [12]. Эти экспериментальные факты не описывается моделью Левина-Стюарта, так как она относится к случаю однокопийного плазмидсодержащего штамма, а большинство трансгенных микроорганизмов являются многокопийными. Анализ математической модели (1) позволяет оценить «стоимость» поддержания плазмид трансгенных микроорганизмов (fitness cost) при периодическом (многократные пересевы, «transfer») и хемостатном культивировании (continuous culture), вероятность

выживания генетически модифицированных организмов (ГМО) в природных экосистемах и, таким образом, является первым шагом к прогнозированию экологических последствий интродукции.

**Список литературы / Reference:**

1. Kumar N.M., Muthukumar C., Sharmila G., Gurunathan B. Genetically Modified Organisms and Its Impact on the Enhancement of Bioremediation. *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management. Energy, Environment, and Sustainability*, 2018, pp. 53-76.
2. de Santisa B., Stockhofeb N., Walc J.-M. [et al.] Case studies on genetically modified organisms (GMOs): Potential risk scenarios and associated health indicators. *Food and Chem. Toxicology*, 2018, vol. 117, pp. 36-65.
3. Brilkov A.V., Ganusov V.V., Morozova E.V. and Pechurkin N.S. Computer modeling of the biotic cycle formation in a closed ecological system. *Adv. Space Res.*, 2001, vol. 27, no. 9, pp. 1587-1592.
4. Levin B.R., Stewart F.M. The population biology of bacterial plasmids: A priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*, 1977, vol. 87, no. 10, pp. 209-228.
5. Ризниченко Г.Ю. *Лекции по математическим моделям в биологии*. М.: Ижевск: Изд-во НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2011, 560 с. [Riznichenko G.Yu. *Lectures on mathematical models in biology*. М.: Izhevsk: RCD Publishing, 2011, 560 p. (In Russ.)]
6. Gitelzon I.I., Pechurkin N.S., Brilkov A.V. *Population Problems in the Biology of Unicellular Organisms*. London: Harwood Academic Publ. GmbH, United Kingdom, 1989, 77 p.
7. San Millan A., Peña-Miller R, Toll-Riera1 M., Halbert Z.V., McLean A.R., Cooper B.S., MacLean R.C. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature Communications*, 2014, vol. 5, article number: 5208.
8. Moser H. *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*. Carnegie Institution of Washington, 1958.
9. Ganusov V.V., Brilkov A.V. Estimating the instability parameters of plasmid-bearing cells. I. Chemostat culture. *J. of Theor. Biol.*, 2002, vol. 219, no. 2, pp. 193-205.
10. Wouters J.T.M., Driehuis F.L., Polaczek P.J. [et al.] Persistence of the pBR322 plasmid in *Escherichia coli* K12 grown in chemostat cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1980, vol. 46, no. 4, pp. 353-362.
11. Fedorec A.J.H., Ozdemir T., Doshi A. [et al.] Two New Plasmid Post-segregational Killing Mechanisms for the Implementation of Synthetic Gene Networks in *Escherichia coli*. *Science*, 2019, vol. 14, pp. 323-324.
12. MacLean R.C., Alvaro S.M. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology*, 2015, vol. 25, no. 17, pp. R753-R773.

**ECOLOGICAL BIOPHYSICS: MATHEMATICAL MODELLING EXPERIENSE OF TRANSGENIC MICROBIAL POPULATIONS DYNAMICS**

**Brilkov A.V.<sup>1</sup>, Brilkova E.V.<sup>2</sup>, Ganusov V.V.<sup>2</sup>, Jabrun I.V.<sup>2</sup>, Loginov Yu.Yu.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Siberian Federal University

*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru*

<sup>2</sup> Institute of biophysics FRC SB RAS

*Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru*

<sup>3</sup> Reshetnev Siberian State University of Science and Technology

*Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia; e-mail: loginov@sibsau.ru*

**Abstract.** The paper is devoted to mathematical modeling of transgenic microbial populations (GMO) dynamics during cultivation in the chemostat. Even at present time we do not completely understand why and how transgenic microorganisms are unstable during prolonged butch or chemostat cultivation. The exact mechanisms by which containing cloned genes plasmid-bearing cells grow at a slower rate than their plasmid-free counterparts are also unclear whether it is a direct effect of plasmid gene expression on the viability of plasmid-bearing cells, inhibition of the cell growth, or the use of cell resources on plasmid maintenance. Estimation of the plasmid instability parameters according to the methods developed in this paper is the first step in understanding the major causes of why transgenic microorganisms plasmids are lost in culture or not lost in nature (plasmids paradox).

**Key words:** *transgenic microorganisms, plasmids instability, mathematical modeling, cost of plasmids, continuous cultures of microorganisms, chemostat.*