

УДК 579.017.8:57.036

Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 2. Хемостат

Лелеков А.С.* , Тренкеншу Р.П.**

*Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН,
Севастополь, Россия*

Аннотация. Работа посвящена моделированию динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей в условиях хемостата. Проведён анализ классических моделей (Михаэлиса – Ментен, Моно, Друпa), которые описывают кинетику субстратзависимого роста микроводорослей. Показано, что классические модели применимы при условии постоянства физико-химических параметров среды: температуры, облучённости клеток и др. В качестве альтернативного подхода показана возможность использования линейных сплайнов при моделировании кинетики поглощения нитратов микроводорослями. Для условий хемостата получены частные решения обобщённой модели динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей, а также определены граничные условия нелимитированного азотом роста культуры. Для условий лимитированного роста получено уравнение зависимости удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота, по форме совпадающее с моделью Друпa, а также зависимость удельной скорости роста от внеклеточной концентрации азота, по форме совпадающая с моделью Моно. Определены видоспецифические коэффициенты уравнений: максимальная удельная скорость поглощения азота, максимальная удельная скорость синтеза структурных компонентов, максимальное содержание резервных форм азота, минимальная доля структурных форм азота в общеклеточном содержании.

Ключевые слова: микроводоросли, хемостат, моделирование, уравнение Михаэлиса – Ментен, модель Моно, модель Друпa, структурный азот, резервный азот, внутриклеточное содержание азота.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования влияния факторов среды на рост и биосинтез культур микроводорослей проводятся при различных режимах их выращивания: накопительном и проточном. При моделировании влияния факторов среды на скорость роста микроводорослей в накопительной культуре необходимо учитывать постоянно изменяющиеся условия, в которых находятся клетки. Даже для небольших плотностей, когда клетки не затеняют друг друга, а количество биогенных элементов в среде позволяет обеспечить нелимитированный рост, происходит адаптация культуры микроводорослей к постоянному освещению. Адаптация выражается в изменении концентраций резервных и структурных форм биомассы [1, 2].

При вмешательстве экспериментатора в процессы роста в любой фазе развития накопительной культуры, например, посредством её разбавления питательной средой, картина роста будет зависеть от величины этого разбавления и используемой среды.

* a.lelekov@yandex.ru

** trenkens@yandex.ru

Если снижать промежуток времени между разбавлениями, уменьшая при этом коэффициент разбавления так, чтобы не изменилась удельная скорость протока, то в пределе мы получим непрерывную культуру, получившую название хемостат [3]. Достоинством использования хемостата при моделировании влияния тех или иных факторов на скорость роста является возможность стабилизации всех внешних условий. Также при стационарном динамическом равновесии, когда удельная скорость роста равна удельной скорости протока питательной среды, не будут изменяться биохимический состав клеток микроводорослей и размерная структура популяции [4].

Моделирование кинетики ассимиляции биогенных элементов микроводорослями базируется на классических подходах Михаэлиса – Ментен, Моно, Друпэ. Скорость поглощения азота, фосфора и других веществ V , в зависимости от их концентрации в питательной среде S , задаётся уравнением Михаэлиса – Ментен [5–7]:

$$V = V_m \cdot \frac{S}{K_S + S}, \quad (1)$$

где V_m и K_S – максимальная скорость ассимиляции и константа полунасыщения соответственно.

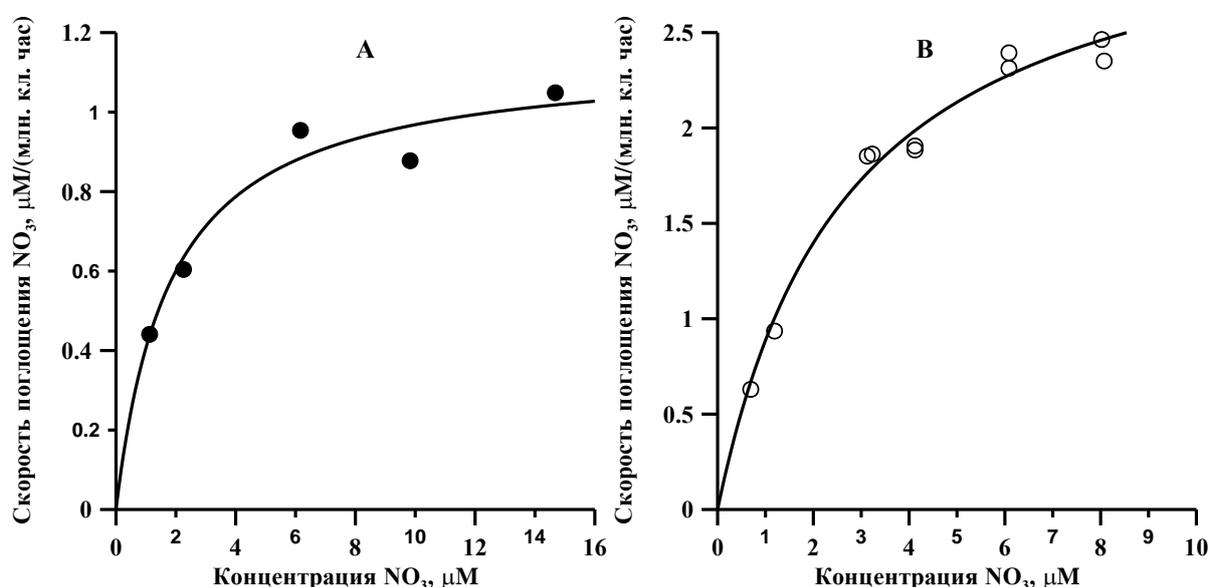


Рис. 1. Зависимость скорости поглощения нитратов от их концентрации для *Ditylum brightwellii* в темноте (А) и *Coscinodiscus lineatus* на свету (В) [9, 11]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1). Значения коэффициентов: $V_m = 1.14$, $K_S = 1.81$ (А); $V_m = 3.29$, $K_S = 2.71$ (В).

Уравнение Михаэлиса – Ментен с высокой точностью описывает экспериментальные данные поглощения различных биогенных элементов (азота, фосфора и др.) культурами микроводорослей и фитопланктоном [8–10]. Например, на рисунке 1 представлены типовые экспериментальные зависимости скорости поглощения азота от его концентрации в питательной среде для двух видов диатомовых водорослей [9, 11]. Отметим, что поглощение азота происходит как на свету, так и в темноте, но с разными скоростями. Рассчитанные величины максимальной скорости поглощения и константы полунасыщения на свету выше соответственно в 3 и 1.5 раза. В литературе приводятся многочисленные данные, что параметры уравнения Михаэлиса – Ментен зависят от облучённости, спектра падающего света, температуры, концентрации биогенных элементов в среде, внутриклеточной квоты, солёности и др. факторов [12–16]. Это объясняется тем, что ассимиляция азота и его дальнейший внутриклеточный метаболизм происходят с участием нескольких ферментов. Их число

и активность можно считать постоянными только в условиях стационарного динамического равновесия хемостата. Например, активность нитратредуктазы определяется внутриклеточным содержанием азота [17], а также энергетической обеспечённостью в виде НАДФ·Н [18, 19].

Рассмотрим зависимость удельной скорости роста μ от концентрации биогенных элементов в питательной среде. В хемостате такая кривая задается уравнением Моно [3, 11, 20]:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}, \quad (2)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость роста.

Модель Моно широко используется в микробиологии и основана на предположении о существовании «узкого места» метаболизма в цепи биосинтетических реакций, которые протекают с участием ферментов. Скорость роста биомассы в целом будет определяться скоростью самой медленной стадии, которая ограничена концентрацией лимитирующего субстрата S . Постоянство констант уравнения Моно предполагает инвариантность во времени соотношения элементов в клетке, так как только при постоянстве клеточного состава скорости ферментативных реакций могут оставаться постоянными [21]. Кроме того, многочисленными экспериментальными данными показано, что рост культуры микроводорослей и ассимиляция биогенных элементов являются независимыми процессами [10, 22].

Скорость субстратзависимого роста микроводорослей определяется, в конечном счёте, не концентрацией биогенного субстрата вне клетки, а его внутриклеточным содержанием Q . Многочисленными данными показано, что удельная скорость роста культуры микроводорослей при лимитировании азотом в различных формах определяется исключительно величиной Q [23]. Поглощённый клетками азот в форме нитратов преобразуется в цитоплазме в нитриты, далее в хлоропластах образуется аммоний, глутамин, глутамат, который и является субстратом для дальнейшего синтеза аминокислот. Соотношение различных компонентов метаболизма азота, например, глутамин/глутамат, используется как показатель N -стресса клеток микроводорослей [24]. Зависимость удельной скорости роста от Q описывается моделью Друпа [25]:

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{q_{\min}}{Q}\right), \quad (3)$$

где q_{\min} – минимальное клеточное содержание (минимальная квота) элемента.

На сегодняшний день моделирование субстратзависимого роста микроводорослей базируется исключительно на положениях модели Друпа, при этом скорость поглощения биогенных элементов из внешней среды описывается уравнением (1). Так, например, на рисунке 2 представлены экспериментальные данные зависимости удельной скорости роста *Scenedesmus sp.* от клеточной квоты азота при различных температурах [26]. Модель Друпа основана на предположении о пропорциональности скорости поглощения элемента из среды и его внутриклеточной концентрации. Выражение (3) не позволяет объяснить зависимость максимальной удельной скорости роста и минимальной квоты от различных факторов среды, в первую очередь, от температуры, облучённости культуры, и др. Известно, что лимитирование роста микроводорослей азотом приводит не только к исчерпанию всех внутриклеточных резервов, но и к перестройке фотосинтетического аппарата, катаболизма молекул хлорофилла [27]. Недостаток азота в условиях избытка световой энергии приводит к образованию в клетках микроводорослей липидов, углеводов и других безазотистых соединений. Современные представления о механизмах ассимиляции нитратов микроводорослями достаточно хорошо изучены. Так, в их транспорте в клетки зелёных

водорослей участвуют три группы ферментов-переносчиков, которые локализованы на клеточной мембране [19, 28]. Активность переносчиков зависит от температуры, pH среды, кроме того, для их функционирования необходима энергия в виде АТФ, либо НАДФ·Н.

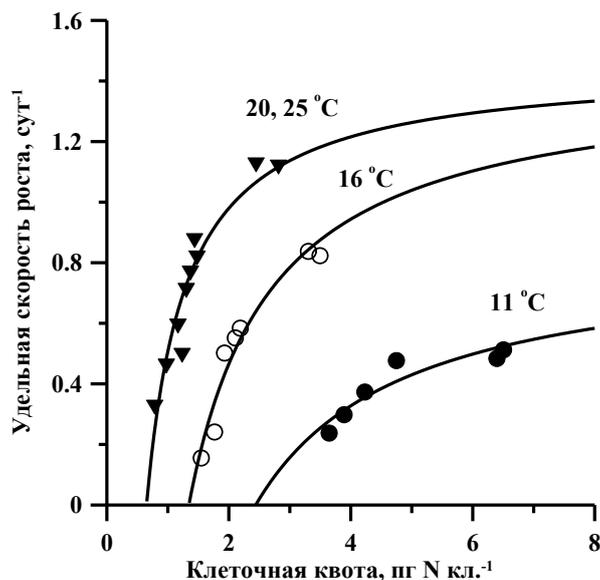


Рис. 2. Зависимость удельной скорости роста *Scenedesmus sp.* от клеточной квоты азота при различных температурах [26]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3). Значения коэффициентов: $\mu_m = 0.84$, $q_{\min} = 2.44$ (●); $\mu_m = 1.42$, $q_{\min} = 1.34$ (○); $\mu_m = 1.45$, $q_{\min} = 0.65$ (▲).

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

В предыдущей работе [1] предложена модель динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. Модель основана на положении о том, что весь внутриклеточный азот можно рассматривать как сумму условных структурных и резервных форм [29], причём ограничение роста культуры связано только с теми азотными формами, которые не ингибируют рост. К структурной части отнесём азот, входящий в структуру клеточной массы (N_{str}). Эта часть биомассы в основном представлена белками. Сюда же относим и небелковые, но входящие в структуры формы азота (например, коферменты). Резервная часть азота в клетках (N_{res}) представлена теми соединениями, которые еще не вошли в структурные формы и рассматриваются как субстрат в последовательности метаболических реакций (включая интермедиаты) [28]. Такое представление полностью согласуется с концепцией Друпа о том, что скорость роста микроорганизмов зависит от внутриклеточной концентрации лимитирующего субстрата [25].

В отличие от классического подхода, основанного на ферментативной кинетике, в предложенной модели скорость поступления азота в клетку и скорость его расхода на синтез структурной составляющей заданы в виде линейных сплайнов и выражены через соотношение структурных и резервных форм:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = \mu(N_{\text{str}}, N_{\text{res}}) \cdot B, \\ \frac{dN}{dt} = -\left(\frac{dN_{\text{str}}}{dt} + \frac{dN_{\text{res}}}{dt}\right), \\ \frac{dN_{\text{str}}}{dt} = \mu_m N_{\text{str}} \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \leq \varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \\ \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \geq \varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \end{cases} \\ \frac{dN_{\text{res}}}{dt} = \mu_{Nm} N_{\text{str}} \frac{1}{\varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon_{N/s}, \varepsilon_{N/s} \leq \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}; \\ \varepsilon_{N/s}, \varepsilon_{N/s} \geq \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}; \end{cases} - \mu_m N_{\text{str}} \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \leq \varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \\ \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \geq \varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \end{cases} \end{cases} \quad (4)$$

где $\mu(N_{\text{str}}, N_{\text{res}})$ – удельная скорость роста культуры, зависящая от соотношения структурных и резервных форм азота, сут⁻¹; N – концентрация азота в среде, г/л; N_{res} , N_{str} – концентрации резервного и структурного клеточного азота, г/л; $\varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{N/s}$ – отношение концентрации резервного и внеклеточного азота к структурному; $\varepsilon_{r/s}^{\text{sat}}, \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}$ – насыщающие значения соотношений; μ_{Nm} – максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, сут⁻¹; μ_m – максимальная удельная скорость включения азота в структуру клетки (или синтеза структурных компонентов), сут⁻¹.

Отметим, что отношение концентрации резервного азота к структурному, по сути, эквивалентно понятию λ – приведённой плотности потока внутриклеточного субстрата на ключевой фермент, который ограничивает скорость энергообменных реакций в клетке и является узким местом метаболизма. В отличие от концентрации элемента питания величина λ является интенсивным параметром, градиент которого можно рассматривать в качестве движущей силы роста и развития культуры микроводорослей [4].

В работе [1] для конкретных случаев обеспеченности азотом в накопительной культуре *Dunaliella salina* найдены частные интегральные решения системы (4). Однако недостатком предложенных решений является постулирование постоянства коэффициентов модели: максимальных удельных скоростей транспорта азота в клетку μ_{Nm} и синтеза структуры μ_m . В общем случае видоспецифичные коэффициенты μ_m и μ_{Nm} будут меняться вследствие изменения средней пространственной облучённости при увеличении плотности культуры.

Цель работы – получить решения предложенной ранее модели в условиях стационарного динамического равновесия хемостата при различной обеспеченности азотом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обоснование использования линейных сплайнов

Как отмечено выше, константы уравнения Михаэлиса – Ментен изменяются в широком диапазоне, что связано с изменением структурной организации клеток микроводорослей при их адаптации к тем или иным условиям среды. Например, на рисунке 3,А представлена кинетика поглощения азота культурой динофлагелляты *Prorocentrum micans* при различной интенсивности света [15].

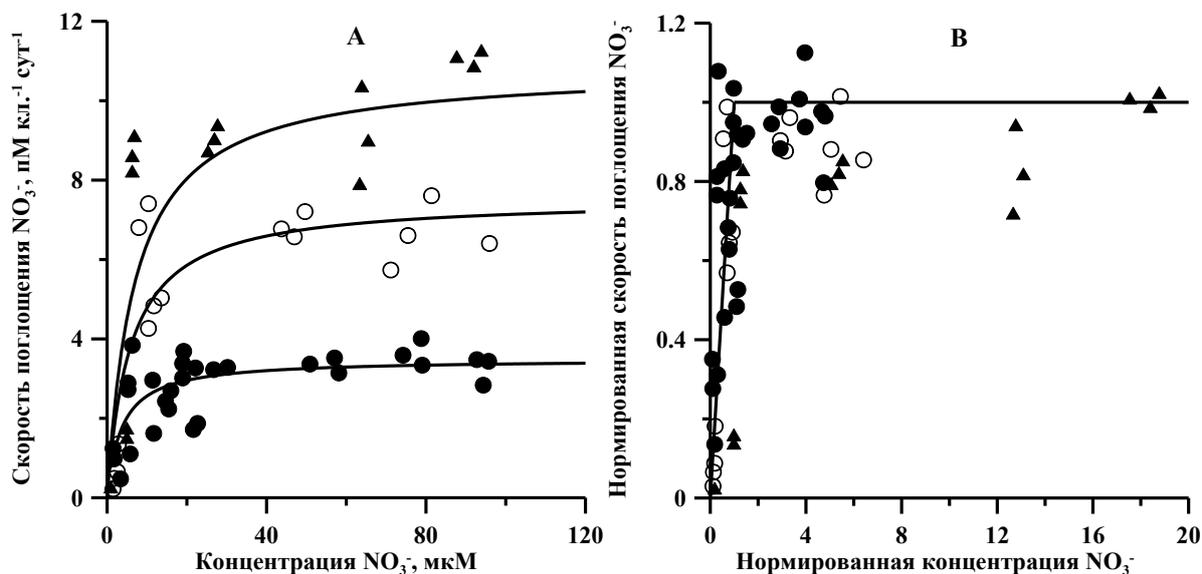


Рис. 3. А – Зависимость скорости поглощения нитратов от их концентрации в среде при различных облучённостях [15]: 10 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^2\cdot\text{с}^{-1}$ (●); 50 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^2\cdot\text{с}^{-1}$ (○); 100 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^2\cdot\text{с}^{-1}$ (▲). Линии – аппроксимация уравнением Михаэлиса – Ментен (1). В – данные [15] в нормированном виде. Линии – аппроксимация линейными сплайнами. Пояснения в тексте.

Очевидно, что её величина определяет максимальную скорость поглощения нитратов и величину константы Михаэлиса. Активность ферментов, которые ответственны за ассимиляцию и внутриклеточное преобразование азота, зависит от АТФ и НАДФ·Н, а, следовательно, светозависима. Если для каждой кривой величину скорости поглощения нормировать на максимальное её значение, а концентрацию нитратов нормировать на насыщающую величину (при которой скорость достигает максимума), то все точки лягутся на одну кривую, которая может быть описана линейными сплайнами (см. рис. 3,В). Следовательно, адаптация к изменившимся световым условиям проявляется в изменении активности или количества ключевого ферментного комплекса, отвечающего за поглощение азота.

Подобная нормировка имеет место и при анализе влияния других лимитирующих факторов на скорость роста микроводорослей, например, для световых кривых фотосинтеза [4]. В нормированном виде семейство световых кривых фотосинтеза, выращенных при разных интенсивностях света, представляет собой одну общую кривую и описывается линейными сплайнами.

Общая модель динамики азотистых соединений в хемостате

Основным свойством динамически равновесного непрерывного роста микроводорослей является равенство удельных скоростей всех внутриклеточных составляющих. Для получения такого роста необходима неизменность внешних условий, в которых находятся клетки. Эти условия можно обеспечить непрерывной подачей лимитирующего элемента питания в околочклеточную среду, для восполнения биогенов, используемых на рост клеток. Следовательно, систему (4) необходимо дополнить уравнением, отражающим скорость подачи лимитирующего вещества. Скорость подачи азота выразим через удельную скорость протока среды (ω) и его концентрацию в питающей среде (N_0). Используем те же обозначения величин для непрерывного процесса роста, но с надстрочным индексом (*). В случае устойчивого непрерывного роста система (4) для удельных скоростей принимает вид:

$$\left\{ \begin{aligned} \mu^* &= \omega = \frac{dN_0}{N_0 dt} = \frac{dN^*}{N^* dt} = \frac{dB^*}{B^* dt}, \\ \mu^* &= \frac{dN_{str}^*}{N_{str}^* dt} = \mu_m \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \varepsilon_{r/s}^*, \varepsilon_{r/s}^* \leq \varepsilon_{r/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{r/s}^{sat}, \varepsilon_{r/s}^* \geq \varepsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases} \\ \mu^* &= \frac{dN_{res}^*}{N_{res}^* dt} = \mu_{Nm} \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{1}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} \begin{cases} \varepsilon_{N/s}^*, \varepsilon_{N/s}^* \leq \varepsilon_{N/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{N/s}^{sat}, \varepsilon_{N/s}^* \geq \varepsilon_{N/s}^{sat}; \end{cases} - \mu_m \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \varepsilon_{r/s}^*, \varepsilon_{r/s}^* \leq \varepsilon_{r/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{r/s}^{sat}, \varepsilon_{r/s}^* \geq \varepsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases} \end{aligned} \right. \quad (5)$$

Система (5) описывает рост и соотношение форм азотистых соединений в клетке и внеклеточной среде в хемостате при единственном лимитирующем факторе – азоте.

Предельные характеристики непрерывной культуры

Рассмотрим случай непрерывной культуры при высоких концентрациях азота в среде и клетке. Система (5) редуцируется до вида:

$$\left\{ \begin{aligned} \mu_m &= \omega_m = \frac{d\mathcal{B}^{*m}}{\mathcal{B}^{*m} dt} = \frac{dN^{*m}}{N^{*m} dt} = \frac{dN_{str}^{*m}}{N_{str}^{*m} dt} = \frac{dN_{res}^{*m}}{N_{res}^{*m} dt} = \frac{dN_0}{N_0 dt}, \\ \mu_m &= \omega_m; (\varepsilon_{r/s}^{sat} = \varepsilon_m), \\ \mu_m &= \omega_m = \mu_{Nm} \frac{1}{\varepsilon_m} - \mu_m \frac{1}{\varepsilon_m}; (\varepsilon_{N/s}^* \geq \varepsilon_{N/s}^{sat}, \varepsilon_{r/s}^{sat} = \varepsilon_m). \end{aligned} \right. \quad (6)$$

Второе уравнение системы (6) накладывает ограничение на удельную скорость протока среды. Она не может быть выше максимальной величины ω_m . В противном случае произойдет вымывание клеток из системы культивирования:

$$\omega = \mu^* \leq \mu_m = \omega_m.$$

Рассмотрим второе уравнение системы (5), которое накладывает ограничения на содержание резервных форм азота в клетке. Оно не может быть максимального значения ε_m , т. к. удельная скорость роста непрерывной культуры не может быть выше максимальной:

$$\varepsilon_{r/s}^* \leq \varepsilon_{r/s}^{sat} = \varepsilon_m.$$

Величина максимальной удельной скорости роста зависит от лимитирующего фактора, не связанного с внешней концентрацией азота. При этом ω_m будет определять соотношение форм внутриклеточного азота. Из третьего уравнения редуцированной системы (6) находим эту связь:

$$\begin{aligned} \varepsilon_m &= \frac{N_{res}^{*m}}{N_{str}^{*m}} = \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m}, \\ N_{res}^{*m} &= N_{str}^{*m} \cdot \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m}, \\ N_{str}^{*m} &= N_{res}^{*m} \frac{\mu_m}{\mu_{Nm} - \mu_m}. \end{aligned}$$

Из последних двух соотношений следует, что стационарные концентрации резервных и структурных форм азота не изменяются, а, следовательно, биохимический состав клеток постоянен. Этот факт отображает суть нелимитированного роста культуры микроводорослей.

Внутриклеточное содержание азота

Найдём внутриклеточное содержание азота при максимальной скорости протока:

$$N_{\text{cell}}^{*m} = N_{\text{str}}^{*m} + N_{\text{res}}^{*m} = (1 + \varepsilon_m) N_{\text{str}}^{*m} = \frac{1 + \varepsilon_m}{\varepsilon_m} N_{\text{res}}^{*m}.$$

Важной характеристикой является доля структурных форм азота в его общем внутриклеточном содержании θ . При максимальной скорости протока эта величина будет минимальна θ_{\min} :

$$\theta_{\min} = \frac{N_{\text{str}}^{*m}}{N_{\text{str}}^{*m} + N_{\text{res}}^{*m}} = \frac{1}{1 + \varepsilon_m}.$$

θ может быть выражена через максимальные кинетические характеристики и позволяет вычислить максимальную удельную скорость транспорта азота в клетки микроводорослей:

$$\theta_{\min} = \frac{1}{1 + \varepsilon_m} = \frac{1}{1 + \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m}} = \frac{\mu_m}{\mu_{Nm}},$$

$$\mu_{Nm} = \frac{\mu_m}{\theta_{\min}} = \mu_m \cdot (1 + \varepsilon_m). \quad (7)$$

Для реализации максимального содержания азота в клетках необходимо, чтобы внеклеточная концентрация азота была выше или равной её единичному значению N_1 , при этом поток азота в клетку больше либо равен насыщающему:

$$\varepsilon_{N/s}^{\text{sat}} = \frac{N_1}{N_{\text{str}}^{*m}} = \varepsilon_m \cdot \frac{N_1}{N_{\text{res}}^{*m}}.$$

При максимальной скорости протока концентрация азота на входе непрерывной культуры N_0 должна быть выше или равной сумме единичных значений внеклеточного и внутриклеточного содержания:

$$N_0 \geq N_1 + N_{\text{cell}}^{*m} \geq N_1 + \frac{1 + \varepsilon_m}{\varepsilon_m} N_{\text{res}}^{*m} \geq N_1 + (1 + \varepsilon_m) \cdot N_{\text{str}}^{*m},$$

$$N_0 \geq \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}} \cdot N_{\text{str}}^{*m} + (1 + \varepsilon_m) \cdot N_{\text{str}}^{*m} \geq (1 + \varepsilon_m + \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}) \cdot N_{\text{str}}^{*m}.$$

Граничным условием нелимитированного азотом роста микроводорослей в непрерывной культуре является равенство:

$$N_{0\min} = (1 + \varepsilon_m + \varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}) \cdot N_{\text{str}}^{*m} = \frac{\varepsilon_{N/s}^{\text{sat}}}{\varepsilon_m} \cdot N_{\text{res}}^{*m} + \frac{\varepsilon_m}{1 + \varepsilon_m} N_{\text{res}}^{*m}.$$

Увеличение концентрации азота на входе непрерывной культуры выше этой границы не приведет к увеличению скорости роста, но при значительном превышении может ингибировать рост.

Лимитирование роста азотом

При лимитировании роста микроводорослей внутренний $\varepsilon_{r/s}$ и внешний $\varepsilon_{N/s}$ потоки азота меньше единичных (насыщающих) значений. В таких условиях система (5) будет иметь вид:

$$\begin{cases} \mu^* = \omega = \frac{dN_0}{N_0 dt} = \frac{dN^*}{N^* dt} = \frac{dB^*}{B^* dt}, \\ \mu^* = \mu_m \frac{\varepsilon_{r/s}^*}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} = \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \varepsilon_{r/s}^*, \\ \mu^* = \mu_{Nm} \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^*} \frac{\varepsilon_{N/s}^*}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} - \mu_m \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} = \frac{\mu_{Nm}}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} \frac{\varepsilon_{N/s}^*}{\varepsilon_{r/s}^*} - \frac{\mu_m}{\varepsilon_m}. \end{cases} \quad (8)$$

Рассмотрим зависимость удельной скорости расхода азота при синтезе структурных составляющих клеток. Из второго уравнения системы (8) следует, что стационарное содержание резервных форм азота в клетке прямо пропорционально удельной скорости роста стационарной непрерывной культуры:

$$\frac{\mu^*}{\mu_m} = \frac{\varepsilon_{r/s}^*}{\varepsilon_m}. \quad (9)$$

Внешний и внутренний потоки азота также взаимосвязаны. Найдём эту связь, приравнявая второе и третье уравнение системы (8):

$$\begin{aligned} \varepsilon_{N/s}^* &= \frac{\mu_m \varepsilon_{N/s}^{sat}}{\mu_{Nm} \varepsilon_m} \cdot \left((\varepsilon_{r/s}^*)^2 + \varepsilon_{r/s}^* \right), \\ \varepsilon_{r/s}^* &= -\frac{1}{2} + \sqrt{\frac{1}{4} + \frac{\mu_{Nm} \varepsilon_m}{\mu_m \varepsilon_{N/s}^{sat}} \cdot \varepsilon_{N/s}^*}. \end{aligned}$$

Третье уравнение системы (8), с учётом (9), позволяет выявить взаимосвязь удельной скорости роста и внешнего потока азота:

$$\mu_{1,2}^* = -\frac{\mu_m}{2 \varepsilon_m} + \sqrt{\left(\frac{\mu_m}{2 \varepsilon_m} \right)^2 + \frac{\mu_{Nm} \mu_m}{\varepsilon_{N/s}^{sat} \varepsilon_m} \cdot \varepsilon_{N/s}^*}.$$

Внутриклеточное содержание азота лимитированной культуры

Концентрация структурного и резервного азота будет зависеть от удельной скорости протока ω :

$$\begin{aligned} \mu^* &= \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \frac{N_{res}^*}{N_{str}^*} = \omega, \\ N_{str}^* &= \frac{\mu_m}{\varepsilon_m \omega} \cdot N_{res}^*, \\ N_{res}^* &= \frac{\varepsilon_m \omega}{\mu_m} \cdot N_{str}^*. \end{aligned}$$

Определим внутриклеточное содержание азота:

$$N_{cell}^* = N_{str}^* + N_{res}^* = N_{str}^* + \frac{\varepsilon_m \omega}{\mu_m} \cdot N_{str}^* = N_{str}^* \cdot \left(1 + \frac{\varepsilon_m \omega}{\mu_m} \right) = N_{res}^* \cdot \left(1 + \frac{\mu_m}{\varepsilon_m \omega} \right).$$

Доля структурных форм азота в общеклеточном содержании также будет зависеть от ω :

$$\theta = \frac{N_{str}^*}{N_{cell}^*} = \frac{\mu_m}{\mu_m + \varepsilon_m \omega}.$$

Последнее уравнение показывает, что доля структурных форм азота гипереболически снижается с ростом величины удельной скорости потока за счёт увеличения концентрации резервных форм.

Зависимость удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота культуры

Для практического применения удобно рассматривать зависимость удельной скорости роста культуры микроводорослей от доли структурного азота, которая следует из последнего уравнения:

$$\mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \frac{1-\theta}{\theta}. \quad (10)$$

Для верификации (10) рассмотрим экспериментальные данные, представленные на рисунке 2. Доля структурных форм азота θ численно равна отношению минимальной квоты q_{\min} к Q , так как минимальное клеточное содержание азота будет наблюдаться при исчерпании всех резервных составляющих. Поэтому для нахождения доли структурных форм для каждой температуры константу q_{\min} разделим на клеточную квоту. На рисунке 4 (А, В, С) представлена аппроксимация уравнением (10) экспериментальных данных [26]. Пунктиром на графике отмечена точка переключения лимитирующего фактора. В этой точке доля структурных форм достигает минимального значения θ_{\min} , а удельная скорость роста не зависит от клеточного содержания азота, максимальна и равна μ_m . Аппроксимация позволила определить коэффициенты модели: максимальную удельную скорость роста, максимальное клеточное содержание резервных форм азота, минимальную долю структурных форм. Полученные результаты (табл. 1) подтверждают литературные данные для *Scenedesmus sp.*: максимальная удельная скорость роста зависит от температуры и описывается в виде ломаной [12]. Значения максимального содержания резервных форм азота с учётом (7) позволяют определить величины максимальной удельной скорости поступления азота в клетки для *Scenedesmus sp.* Результаты представлены в таблице 1. Отметим, что величина μ_{Nm} также зависит от температуры.

Таблица 1. Кинетические коэффициенты культуры *Scenedesmus sp.* при различных температурах, рассчитанные с помощью аппроксимации уравнением (10) данных [26]

Температура, °С	Максимальная удельная скорость роста, сут ⁻¹	Максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, сут ⁻¹	Максимальное содержание резервных форм азота	Минимальная доля структурных форм азота в общеклеточном содержании
11	0.5	1	1	0.5
16	0.82	1.52	0.84	0.54
20, 25	1.13	3.05	1.64	0.37

Зависимость удельной скорости роста от внешней концентрации азота

Предлагаемая модель (5) позволяет найти связь удельной скорости роста с концентрацией азота в среде. Для этого необходимо переписать систему уравнений (5) через концентрации структурных, резервных форм и концентрацию азота в среде:

$$\begin{cases} \mu = \mu_m \frac{N_{res}}{N_{res1}}, \\ \mu = \mu_{Nm} \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N}{N_1} - \mu_m \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N_{res}}{N_{res1}}. \end{cases} \quad (11)$$

Первое уравнение системы (11), показывает, что удельная скорость роста микроводорослей линейно зависит от концентрации резервных форм азота в области лимитированного роста. На рисунке 4,D представлена аппроксимация экспериментальных данных [26] данным уравнением. N_{res} есть разница между клеточной Q и минимальной квотой q_{min} . Согласно (11), удельная скорость роста равна нулю при исчерпании всех резервных форм азота и достигает максимального значения μ_m при некоторой насыщающей концентрации N_{res1} . Данные параметры зависят от температуры, так как определяются активностью ферментов, которые участвуют в ассимиляции и преобразовании азота [18].

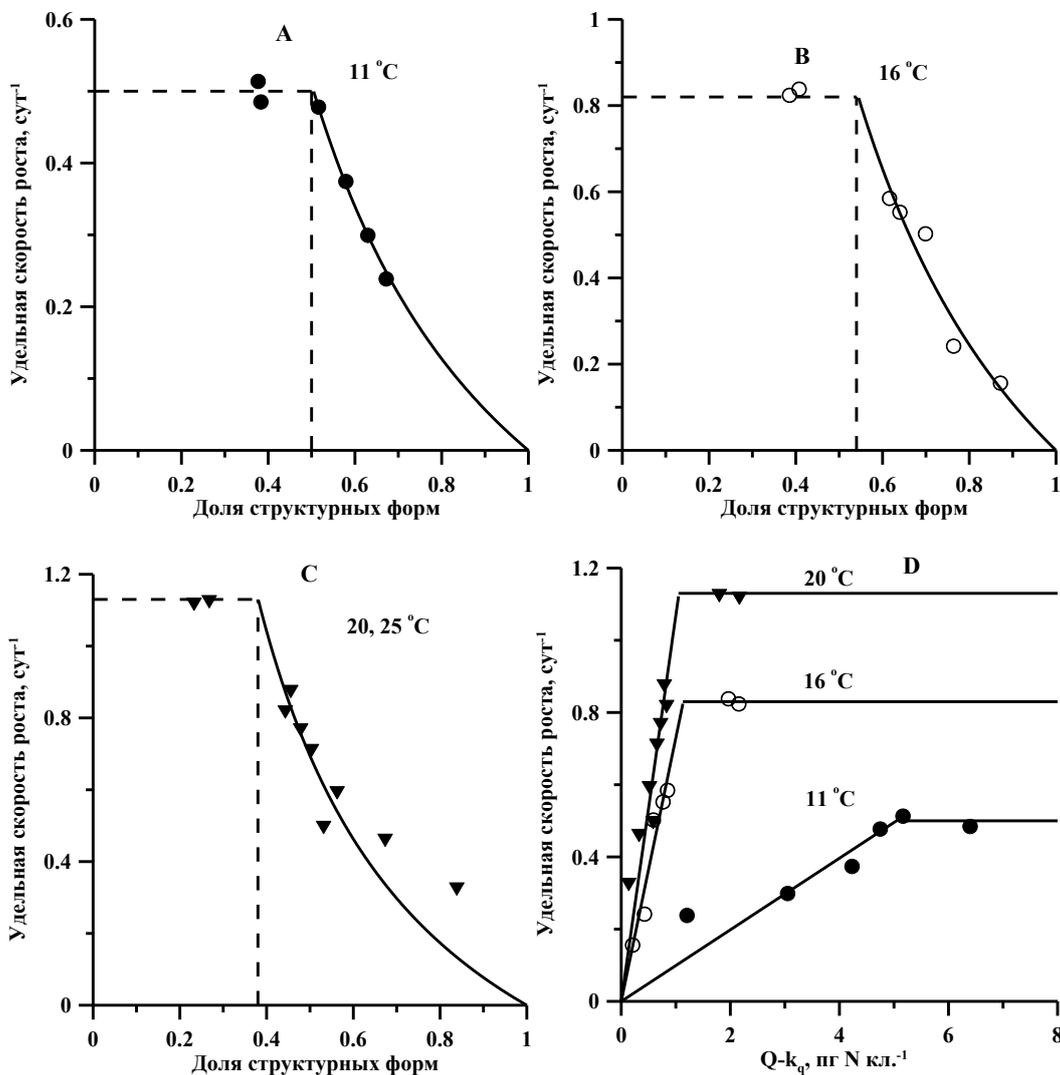


Рис. 4. Зависимость удельной скорости роста *Scenedesmus sp.* от доли структурных форм азота при различных температурах по данным [26]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (10). Значения коэффициентов – в тексте.

Третье уравнение системы (11) позволяет выявить взаимосвязь удельной скорости роста и концентрации азота во внешней среде:

$$\mu^* = \mu_{Nm} \frac{1}{\varepsilon^*} \frac{N^*}{N_1} - \mu_m \frac{1}{\varepsilon^*} \frac{N_{res}^*}{N_{res1}}$$

Приравняем второе и третье уравнение системы (11), найдем взаимосвязь величины ε^* с концентрацией азота в среде:

$$\varepsilon^* = \frac{\mu_{Nm} N_{res1}}{\mu_m N_1} \frac{N^*}{N_0 - N^*}.$$

Подставляя значение ε^* , получим:

$$\mu^* = \frac{\mu_m \mu_{Nm} \cdot (N_0 - N^*) N^*}{\mu_{Nm} N_{res1} N^* + \mu_m N_1 \cdot (N_0 - N^*)},$$

Так как разница между концентрацией азота на входе N_0 и в среде N^* равна его концентрации в клетке N_{cell} , окончательно получим:

$$\mu^* = \frac{\mu_m N^*}{\frac{\mu_m}{\mu_{Nm}} N_1 + \frac{N_{res1}}{N_{cell}} N^*}. \quad (12)$$

Уравнение (12) отображает гиперболическую зависимость μ от N^* и по форме идентично модели Моно. Очевидно, что (12) будет работать только при постоянной клеточной концентрации N_{cell} , неизменных световых и температурных условиях, которые определяют активности ферментов (μ_m и μ_{Nm}), участвующих в поглощении и метаболизме азота в клетках микроводорослей. В литературе использование уравнения Моно при описании кинетики зависимости скорости роста микроводорослей от концентрации субстрата практически не встречается, обычно предпочтение отдается модели Друпа. Однако в хемостате, когда клетки находятся в постоянных физико-химических условиях среды, при этом происходит стабилизация их биохимического состава, использование гиперболической зависимости μ от N^* допустимо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрена кинетика различных форм азота в клетках микроводорослей в хемостате. Скорости накопления структурных и резервных форм азота заданы линейными сплайнами: в области насыщения скорости максимальны, в области лимитирования линейно зависят от соотношения резервных и структурных форм азота. Следует подчеркнуть, что скорости линейно зависят не от концентрации нитратов в среде, а от приведённой плотности потока азота на единицу ключевого ферментного комплекса, участвующего в ассимиляции нитратов и их дальнейшем преобразовании. Достоинством предлагаемого подхода является чёткое определение точки смены лимитирующего фактора или звена, если рассмотреть поток субстрата внутри клетки. В окрестностях этой точки возможны отклонения экспериментальных данных от идеализированной ломаной. Для повышения точности описания экспериментальных данных следует разбить кривую на большее количество участков, каждый из которых опишем линейным сплайном. Метод линейных сплайнов, или метод касательных, широко применяется во многих науках, позволяя описать сложные процессы простыми уравнениями. Кроме того, такой подход обладает универсальностью и ранее применялся при моделировании мгновенных световых кривых [4], влияния света на макромолекулярный состав микроводорослей [30].

Полученные частные решения общей системы (4) позволяют описать зависимость удельной скорости роста от доли структурных форм азота в его внутриклеточном

содержании (10), а также от концентрации азота в среде (12). Выражение (10) описывает многочисленные литературные данные зависимости удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота. В отличие от подхода Друпа, с его помощью можно определить большее число кинетических параметров культуры микроводорослей: максимальные удельные скорости поступления азота в клетки, включения в структуру, максимальное содержание резервных форм азота, минимальную долю структурных форм азота в общеклеточном содержании.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФГБУН ИМБИ № 0828-2018-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 1. Накопительная культура. *Мат. биол. и биоинф.* 2018. Т. 13. № 2. С. 348–359. doi: [10.17537/2018.13.348](https://doi.org/10.17537/2018.13.348).
2. Тренкеншу Р.П. Рост микроводорослей при переходе от темноты к постоянному освещению. *Вопросы современной альгологии.* 2018. № 2. URL: <http://algology.ru/1350> (дата обращения: 10.11.2019).
3. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 1949. V. 3. P. 371–394.
4. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей в культуре.* Белгород: Константа, 2017. 152 с. doi: [10.21072/978-5-906952-28-8](https://doi.org/10.21072/978-5-906952-28-8).
5. Bougarana G., Bernard O., Sciandra A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *J. Theor. Biol.* 2010. V. 265. № 3. P. 443–454. doi: [0.1016/j.jtbi.2010.04.018](https://doi.org/0.1016/j.jtbi.2010.04.018).
6. Bernard O., Mairet F., Chachuat B. Modelling of microalgae culture systems with applications to control and optimization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2015. doi: [10.1007/10_2014_287](https://doi.org/10.1007/10_2014_287).
7. Malerba M.E., Heimann K., Connolly S.R. Improving dynamic phytoplankton reserve-utilization models with an indirect proxy for internal nitrogen. *J. Theor. Biol.* 2016. V. 404. P. 1–9. doi: [10.1016/j.jtbi.2016.05.023](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.05.023).
8. Dugdale R.C. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance. *Limnol. Oceanogr.* 1967. V. 12. № 4. P. 685–695. doi: [10.4319/lo.1967.12.4.0685](https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.4.0685).
9. Eppley R.W., Coatsworth J.L. Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii*-kinetics and mechanisms. *J. Phys.* 1968. V. 4. № 2. P. 151–156. doi: [10.1111/j.1529-8817.1968.tb04689.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1968.tb04689.x).
10. *Молисмология Чёрного моря.* Под ред. Поликарпова Г.Г. К.: Наук. думка, 1992. 304 с.
11. Eppley R.W., Rogers J.N., McCarthy J.J. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 1969. V. 14. № 6. P. 912–920.
12. Rhee G.Y., Gotham I.J. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 1981. V. 26. P. 635–648.
13. Ullrich W.R., Lazarova J., Ullrich C.I., Witt F.G., Aparicio P.J. Nitrate uptake and extracellular alkalization by the green alga *Hydrodictyon reticulatum* in blue and red light. *J. Exp. Bot.* 1998. V. 49. No. 324. P. 1157–1162.
14. Baird M.E., Emsley S.M., Mcglade J.M. Modeling the interacting effects of nutrient uptake, light capture and temperature on phytoplankton growth. *J. Plan. Res.* 2001. V. 23. № 8. P. 829–840. doi: [10.1093/plankt/23.8.829](https://doi.org/10.1093/plankt/23.8.829).

15. Lee K.H., Jeong H.J., Kim H.J., Lim A.S. Nitrate uptake of the red tide dinoflagellate *Prorocentrum micans* measured using a nutrient repletion method: effect of light intensity. *Algae*. 2017. V. 32. № 2. P. 139–153. doi: [10.4490/algae.2017.32.5.20](https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.5.20).
16. Егоров В.Н., Поповичев В.Н., Гулин С.Б., Бобко Н.И., Родионова Н.Ю., Царина Т.В., Марченко Ю.Г. Влияние первичной продукции фитопланктона на оборот биогенных элементов в прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море). *Биология моря*. 2018. Т. 44. № 3. С. 207–214.
17. Eppley R.W., Renger E.H. Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. *J. Phys.* 1974. V. 10. No. 1. P. 15–23. doi: [10.1111/j.1529-8817.1974.tb02671.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1974.tb02671.x).
18. Berges J. Miniview: algal nitrate reductases. *Eur. J. Phys.* 1997. V. 32. № 1. P. 3–8. doi: [10.1080/09541449710001719315](https://doi.org/10.1080/09541449710001719315).
19. Sanz-Luque E., Chamizo-Ampudia A., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant. Sci.* 2015. doi: [10.3389/fpls.2015.00899](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899).
20. Caperon J. Population growth response of *Isochrysis Galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. *Ecology*. 1968. V. 49. № 5. P. 866–872. doi: [10.2307/1936538](https://doi.org/10.2307/1936538).
21. Фурсова П.В., Левич А.П. Математическое моделирование в экологии сообществ. *Проблемы окружающей среды и природных ресурсов*. 2002. Т. 8. № 4. С. 2035–1045.
22. Dyhrman S.T. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae. In: *The Physiology of Microalgae*. Eds.: Borowitzka M., Beardall J., Raven J. Springer, 2016. P. 155–183. (Developments in Applied Phycology, Vol. 6). doi: [10.1007/978-3-319-24945-2_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_8).
23. Bienfang P.K. Steady state analysis of nitrate-ammonium assimilation by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 1975. V. 20. № 3. P. 402–411. doi: [10.4319/lo.1975.20.3.0402](https://doi.org/10.4319/lo.1975.20.3.0402).
24. Flynn K.J. The determination of nitrogen status in microalgae. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 1990. V. 61. P. 297–307.
25. Droop M.R. 25 years of algal growth kinetics a personal view. *Bot. Mar.* 1983. V. 26. № 3. P. 99–112. doi: [10.1515/botm.1983.26.3.99](https://doi.org/10.1515/botm.1983.26.3.99).
26. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton. *J. Plan. Res.* 2001. V. 23. P. 977–997.
27. Кузнецова А.В., Погосян С.И., Воронова Е.Н., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Влияние азота на рост и фотосинтетический аппарат микроводорослей. *Вода: химия и экология*. 2012. № 4. С. 68–76.
28. Perez-Garcia O., Escalante F., de-Bashan L., Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 2011. V. 45. № 1. P. 11–36. doi: [10.1016/j.watres.2010.08.037](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037).
29. Силкин В.А., Хайлов К.М. *Биоэкологические механизмы управления в аквакультуре*. Л.: Наука, 1988. 230 с.
30. Тренкеншу Р.П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (Часть 1). *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 2. URL: <http://algology.ru/1180> (дата обращения: 10.11.2019).

Рукопись поступила в редакцию 24.04.2019, переработанный вариант поступил 16.07.2019.
Дата опубликования 04.10.2019.