
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIOVANNI CESARENI, GIANFRANCO GROSSI, FERNANDO
LIELLO

Modello matematico per lo sviluppo di una popolazione mista di batteri e fagi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.5, p. 776–786.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_5_776_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biofisica. — *Modello matematico per lo sviluppo di una popolazione mista di batteri e fagi*^(*). Nota di GIOVANNI CESARENI^(**), GIANFRANCO GROSSI e FERNANDO LIELLO, presentata^(***) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — A mathematical model for the interaction kinetic in phage-bacterium cultures is proposed. An approximate analytical relationship between phage and bacterial concentrations has been derived. Characteristic kinetic constants have been obtained by comparing the experimental growth curves with computer-simulation analysis. The model allows also the evaluation of the phage-yield as a function of the initial concentrations.

PARTE I

MODELLO MATEMATICO

Da più di un quarto di secolo, i batteriofagi rivestono una importanza fondamentale come materiale di elezione in un gran numero di ricerche di biologia molecolare. Pur tuttavia, non ci risulta che una popolazione mista batterio ospite-fago sia mai stata studiata in modo esauriente dal punto di vista cinetico.

Un tale studio è importante per almeno due motivi. Da un lato, esso può indicare quali siano i valori più convenienti per le concentrazioni iniziali di batteri e fagi ai fini di una produzione massiva di questi ultimi. D'altro lato, un modello matematico corretto permette evidentemente di calcolare l'andamento in funzione del tempo delle numerosità delle due popolazioni interagenti: il confronto con gli andamenti sperimentali offre quindi la possibilità di ricavare i valori dei parametri essenziali del sistema allo studio, quali la probabilità di adsorbimento, il tempo di latenza, il numero di scoppio.

Scopo del presente lavoro è appunto quello di presentare un modello matematico del genere, basato su un sistema di ipotesi generalmente valide per parecchi dei fagi più comuni. Occorre tuttavia tener presente che ogni coppia fago-batterio ospite ha, di solito, delle caratteristiche peculiari, che influenzano spesso anche la cinetica del sistema. Ne segue che non è possibile costruire un modello matematico valido in ogni caso, anche se è in generale possibile adattare ai singoli casi il sistema di equazioni a cui perverremo, introducendo in esso opportune modifiche.

(*) Lavoro eseguito con fondi C.N.R. presso il Gruppo di Biofisica dell'Istituto di Fisica, Università di Roma.

(**) Durante il periodo della ricerca ha goduto di una borsa di studio del Centro Linceo Interdisciplinare di Scienze Matematiche e loro Applicazioni.

(***) Nella seduta del 28 maggio 1974.

Le ipotesi da noi assunte sono in parte di carattere biologico (limitanti quindi la varietà di sistemi cui il modello si può di fatto applicare) e in parte ipotesi di schematizzazione, che, attraverso una conveniente descrizione approssimata di taluni aspetti dei processi coinvolti, hanno lo scopo di semplificare il problema matematico. Esse sono le seguenti:

a) il tasso di crescita α costante, la crescita batterica viene quindi considerata solo in fase esponenziale;

b) l'adsorbimento fago-ospite segue una cinetica del primo ordine sia per la concentrazione dei fagi $n(t)$ che per quella degli ospiti $N(t)$. Questa ipotesi, come hanno dimostrato Krueger e Delbruck [1, 2] è valida per un intervallo di concentrazioni molto largo;

c) la probabilità d'infezione di un batterio k viene considerata costante. In realtà la velocità di adsorbimento dipende [3] dalle condizioni chimico-fisiche del terreno di coltura, in particolare dalla concentrazione degli ioni in soluzione; inoltre l'estensione della teoria di Smoluckowsky [4] all'adsorbimento del fago fa dipendere la probabilità d'infezione dalle dimensioni del batterio. Il fatto che nel modello si consideri la probabilità d'infezione k una costante implica quindi le ipotesi che l'ambiente di crescita non subisca sostanziali variazioni e che le dimensioni medie dei batteri non cambino, ipotesi che in pratica sono molto ben verificate qualora sia soddisfatta la « a »;

d) non si fa distinzione tra probabilità di adsorbimento e probabilità d'infezione: si suppone cioè che tutti i fagi che si adsorbono ad una parete batterica inizino un ciclo litico. Con ciò si esclude dalle nostre considerazioni il fenomeno della lisogenia;

e) il numero di scoppio è considerato costante; in pratica, la costante λ che compare nelle equazioni non sarà altro che un conveniente valore medio degli effettivi numeri di scoppio, variabili da batterio a batterio;

f) il tempo di latenza τ è considerato costante. È questa un'ipotesi più critica ai fini della capacità del modello di riprodurre i risultati sperimentali. Assumendo che la distribuzione dei tempi di latenza sia gaussiana, il numero di batteri che lisano al tempo t è proporzionale all'integrale

$$\int_0^t kn(x) N(x) \exp \left[-\frac{(x-t+\tau)^2}{\sigma^2} \right] dx.$$

Questo integrale può essere approssimato da $kn(t-\tau) N(t-\tau)$ solo se non si commette un grosso errore sostituendovi ad $n(x)$ ed $N(x)$ il loro valore nel punto di massimo della gaussiana, cioè solo se $\sigma \ll \tau$, che è il tempo caratteristico su cui variano n ed N .

Consideriamo dunque, sotto queste ipotesi, lo stato ad un istante t di una coltura batterica infettata al tempo $t=0$ da un fago virulento attivo in modo specifico sui batteri in coltura. Poniamo, per semplicità, che sia i batteri che i fagi appartengano a ceppi puri, derivanti sia gli uni che gli altri

da un unico clone, e che l'eventuale insorgere di mutanti nel corso dello sviluppo della coltura non abbia alcuno effetto sull'andamento temporale delle popolazioni allo studio.

Le variazioni delle concentrazioni di batteri (N), fagi (n) e batteri infetti (N_f) all'istante t saranno espresse dalle equazioni:

$$(I) \quad \begin{cases} \frac{dN(t)}{dt} = \alpha N(t) - kn(t)N(t) \\ \frac{dn(t)}{dt} = k\lambda n(t-\tau)N(t-\tau) - kn(t)N(t) - kn(t)N_f(t) \\ \frac{dN_f(t)}{dt} = kn(t)N(t) - kn(t-\tau)N(t-\tau). \end{cases}$$

RISOLUZIONE DEL SISTEMA PER VIA NUMERICA

Il sistema di equazioni (I) presenta notevoli difficoltà di integrazione per via analitica. Se ne può dedurre [5] una relazione in termini finiti fra le variabili da determinare $N(t)$, $n(t)$ introducendo l'approssimazione

$$(2) \quad \frac{1}{\tau} [N(t)n(t) - N(t-\tau)n(t-\tau)] \simeq \frac{d}{dt} n(t)N(t).$$

Ciò tuttavia non è in pratica di grande utilità.

La soluzione del sistema (I) è stata quindi ottenuta per via numerica con un calcolatore IBM 7040, nell'approssimazione

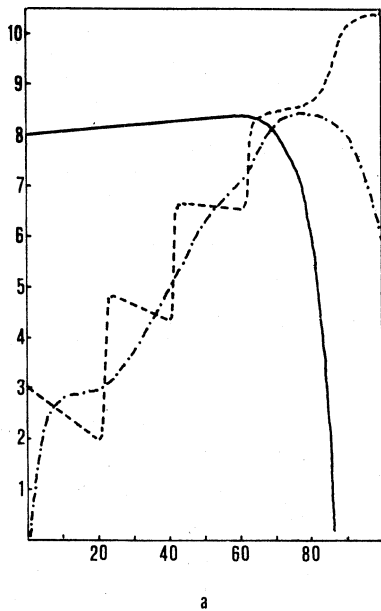
$$(3) \quad f(t + \Delta t) = f(t) + f'(t) \Delta t$$

dando a Δt il valore di 6 sec.

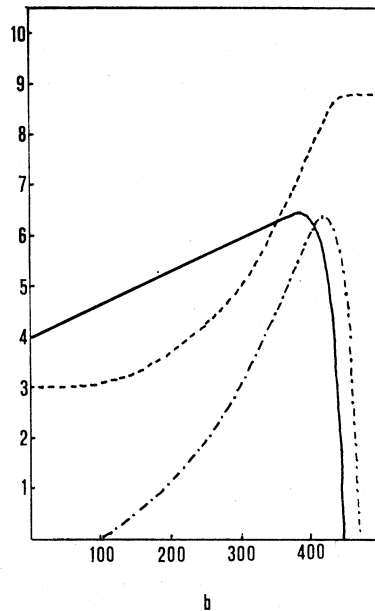
In fig. 1 sono riportati esempi di andamenti teorici in funzione delle popolazioni iniziali n_0 ed N_0 ottenuti dal sistema (I) assegnando alle costanti i valori $\lambda = 150$, $\alpha = 0.015 \text{ min}^{-1}$, $k = 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\tau = 20 \text{ min}$, che in base ai dati che si ricavano dalla letteratura possono essere indicati rappresentativi per molti tra i sistemi fago-batterio più comunemente usati come materiale di esperimento. In particolare, questi dati sono approssimativamente validi per il sistema *E. coli*-T 2 in terreno sintetico [6].

PARTE II

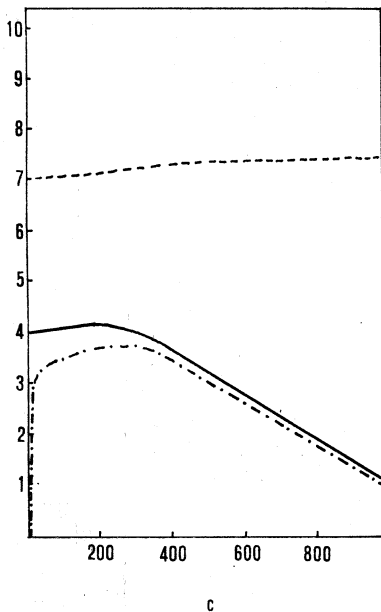
La validità del modello presentato è stata quindi da noi sottoposta a controllo sperimentale nel caso di due sistemi: *E. coli*-T 2 ed *E. coli*-T 4. Il controllo è consistito nel determinare sperimentalmente l'andamento delle funzioni $n(t)$ ed $N(t)$, e nel cercare poi quei valori delle costanti α , k , λ , τ che inserite nelle (I) fornissero per tali funzioni un andamento il meglio possibile in accordo con i dati sperimentali. Diciamo subito che il risultato del confronto tra andamenti sperimentali e curve calcolate è stato in ogni caso del tutto soddisfacente.



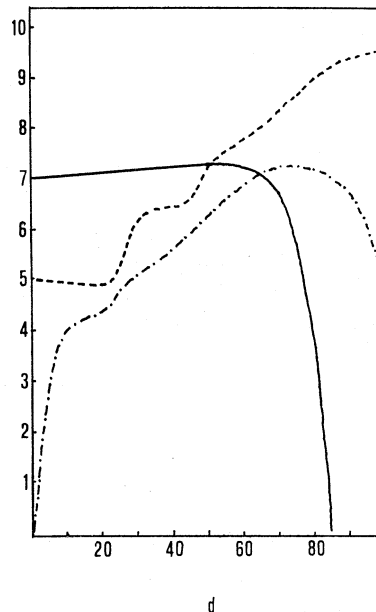
a



b



c



d

Fig. 1 *a, b, c, d.* - Andamenti teorici delle popolazioni dei batteri (—), dei fagi (---) e dei batteri infetti (-.-) in funzione delle popolazioni iniziali n_0 ed N_0 . In ordinate i logaritmi delle popolazioni ed in ascisse il tempo in minuti.

MATERIALI E METODI

I sistemi *E. coli* B-T₄rII ed *E. coli* B/5-T₂r⁺ sono stati gentilmente forniti dal prof. Cafè del Centro Acidi Nucleici del C.N.R.

Le colture sono state eseguite in terreno sintetico M 9 con aggiunta, per il T₄, di triptofano allo 0.05 %, e fatte sviluppare in un fermentatore New Brunswick MA 100 (T = 37° C, agitazione = 1000 giri/min, areazione = 1 litro/min, pH = 6.8-7.1).

Durante la crescita batterica si sono eseguiti periodicamente prelievi per determinare la concentrazione batterica mediante misura della densità ottica ($\lambda = 660 \text{ m}\mu$). Quando la concentrazione aveva raggiunto il valore prefissato, veniva immessa nella coltura una dose opportuna di sospensione fagica precedentemente titolata. Da questo momento si eseguivano prelievi ulteriori ad intervalli di tempo regolari, per seguire nel tempo l'andamento delle concentrazioni batterica e fagica.

A) Misura della popolazione batterica non infetta $N(t)$:

1 cc del prelievo viene opportunamente diluito in tampone fosfato e piastrato con la tecnica del doppio strato.

B) Misura della popolazione fagica $n(t)$:

10 cc della diluizione 1 : 100 del prelievo vengono centrifugati per 10 min a bassa temperatura (3° C) a 4.000 giri/min (1.900 g). Il sopranatante, opportunamente diluito in tampone fosfato, viene piastrato con la tecnica di d'Herelle [7].

RISULTATI

A) Andamenti sperimentali e determinazione delle costanti:

sono state eseguite due curve di infezione con due differenti ceppi fagici.

1) Un ceppo batterico di *E. coli* B ($N_0 = 2.8 \times 10^8$ batteri/cm³) viene infettato con un ceppo fagico T₄rII ($n_0 = 2.5 \times 10^5$ fagi/cm³). La curva sperimentale è riportata in fig. 2.

2) Il ceppo batterico usato è ora *E. coli* B/5 ($N_0 = 2.0 \times 10^8$ batteri/cm³) infettato con T₂r⁺ ($n = 4.0 \times 10^5$ fagi/cm³), che presenta il fenomeno del ritardo della lisi dovuta ad infezione multipla [8]. La curva sperimentale è riportata in fig. 3.

Dall'andamento delle due curve è possibile ricavare i valori dei parametri caratteristici della cinetica d'infezione. Indichiamo con l'indice 1 i valori corrispondenti alla prima esperienza, con l'indice 2 quelli relativi alla seconda.

a) *Tasso di crescita*. Dalla prima equazione del sistema (1), quando $kn \ll \alpha$, si ha:

$$(4) \quad \frac{dN}{dt} \simeq \alpha N$$

da cui:

$$(5) \quad \log N = \log N_0 + \alpha t.$$

La determinazione mediante il metodo dei minimi quadrati della pendenza della retta, che rappresenta la crescita batterica in carta semilogaritmica, permette di ricavare il valore di α :

$$(6) \quad \begin{aligned} \alpha_1 &= (0.015 \pm 0.002) \text{ min}^{-1} \\ \alpha_2 &= (0.014 \pm 0.002) \text{ min}^{-1}. \end{aligned}$$

b) *Numero di scoppio*. Il rapporto tra le massime concentrazioni di fagi e di batteri è una buona valutazione per eccesso del numero di scoppio. Nel nostro caso si ha quindi:

$$(7) \quad \begin{aligned} \lambda_1 &= \frac{n_{1 \max}}{N_{1 \max}} = 75 \pm 10 \\ \lambda_2 &= \frac{n_{2 \max}}{N_{2 \max}} = 180 \pm 20. \end{aligned}$$

c) *Tempo di latenza*. Il tempo di latenza è stato ricavato osservando quando la concentrazione dei fagi raggiunge un valore pari al numero dei fagi adsorbiti nei primi 5 minuti, moltiplicato per il numero di scoppio:

$$(8) \quad \begin{aligned} \tau_1 &= (16 \pm 2) \text{ min} \\ \tau_2 &= (23 \pm 3) \text{ min}. \end{aligned}$$

d) *Probabilità d'infezione*. Dalla prima equazione del sistema (1) si ha che nel punto di massimo ($dN/dt = 0$) vale la relazione:

$$(9) \quad k = \frac{\alpha}{n}.$$

Nelle due situazioni sperimentali quindi si avrà:

$$(10) \quad \begin{aligned} k_1 &= \frac{\alpha_1}{n_1} = (6 \pm 1) \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \\ k_2 &= \frac{\alpha_2}{n_2} = (7 \pm 1) \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}. \end{aligned}$$

e) *Probabilità di adsorbimento*. Questo parametro si può calcolare dalla scomparsa dei fagi nei primi minuti dell'infezione. Dalla terza equazione del sistema (1), osservando che $kn \ll \alpha$, si può ricavare per k l'espressione:

$$(11) \quad K = \frac{\alpha}{N_0 [\exp(\alpha t_2) - \exp(\alpha t_1)]} \log \frac{n(t_1)}{n(t_2)}.$$

Calcolando i valori di K corrispondenti all'adsorbimento fagico fra tre punti sperimentali nei primi 10 minuti e facendone la media, si ottiene nei due casi:

$$(12) \quad \begin{aligned} K_1 &= (5 \pm 3) \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \\ K_2 &= (3 \pm 2) \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}. \end{aligned}$$

Confrontando i risultati (10) e (12) risulta quindi che nei limiti degli errori le due costanti assumono lo stesso valore.

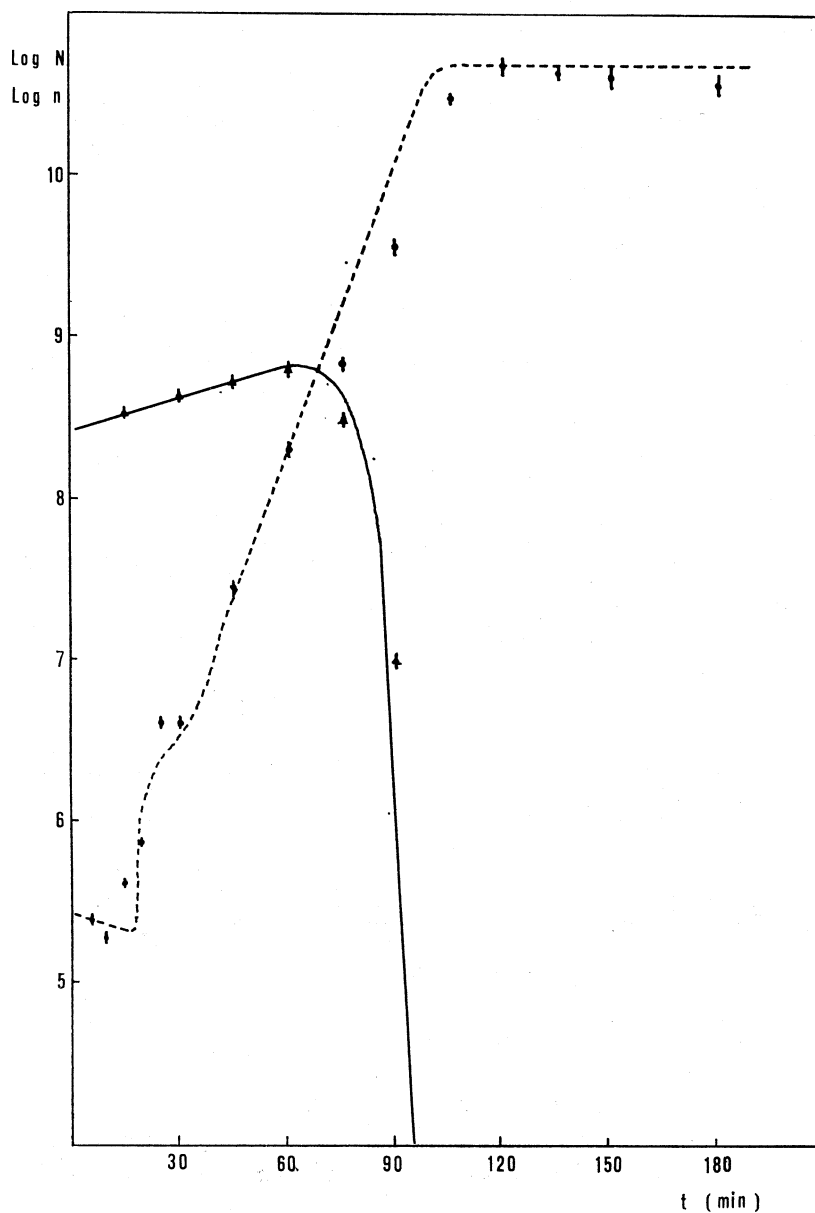


Fig. 2. - Confronto tra punti sperimentali ed andamenti teorici per il sistema *E. coli* B-T4rII. ▲— *E. coli* B ●---T4rII.

B) Confronto tra risultati teorici e sperimentali.

Una migliore determinazione dei valori delle costanti si può avere assumendo i valori precedenti come puramente indicativi, ed adattandoli in modo da ottenere il miglior accordo possibile tra le curve sperimentali e quelle ottenute risolvendo numericamente il sistema di equazioni (I).

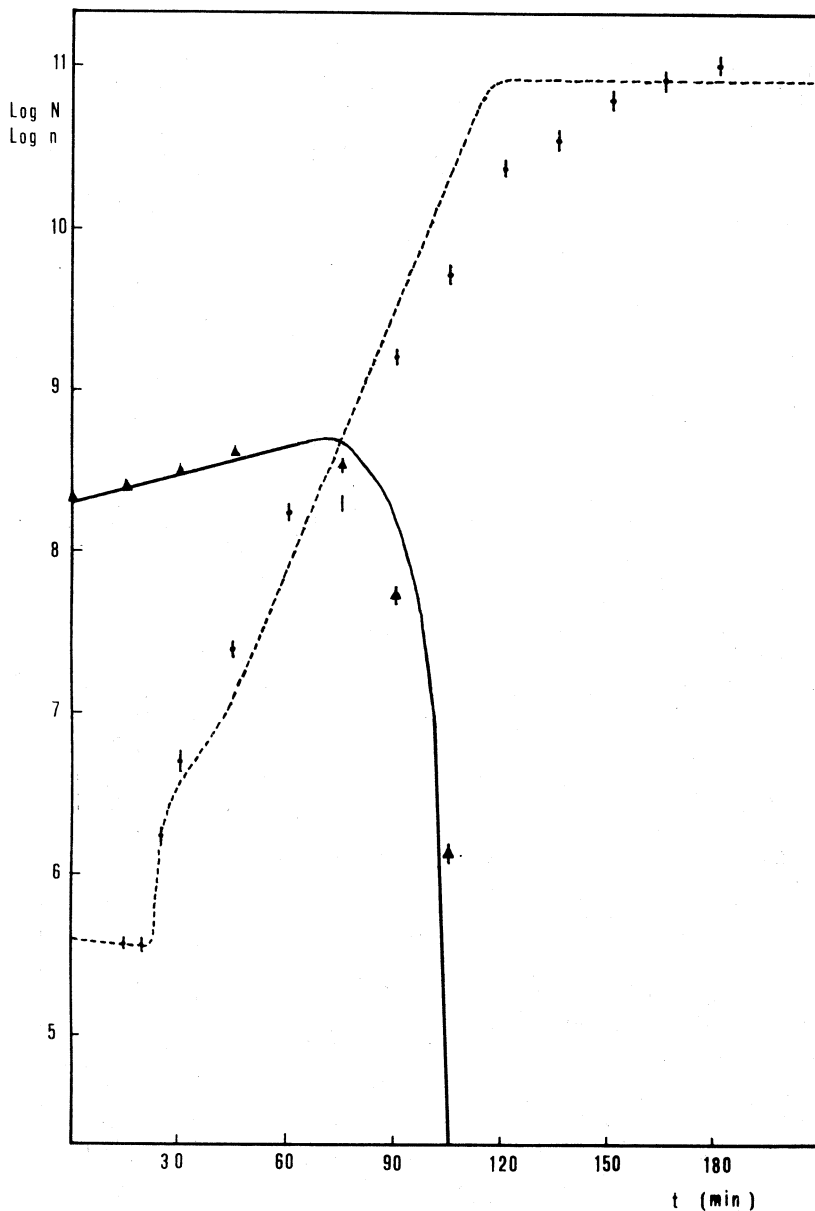


Fig. 3. - Confronto tra punti sperimentali ed andamenti teorici per il sistema *E. coli* B/5-T2r⁺. ▲— *E. coli* B/5 ●--- T2r⁺.

Nel primo caso (sistema *E. coli* B-T4rII) gli andamenti teorici, confrontati con quelli sperimentali, sono in buono accordo con questi quando i parametri caratteristici assumono i valori:

$$\lambda_1 = 70 ; \tau_1 = 16 \text{ min} ; k_1 = 5 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} ; \alpha_1 = 0.016 \text{ min}^{-1}.$$

In fig. 2 è riportato l'andamento teorico a confronto con i risultati sperimentali.

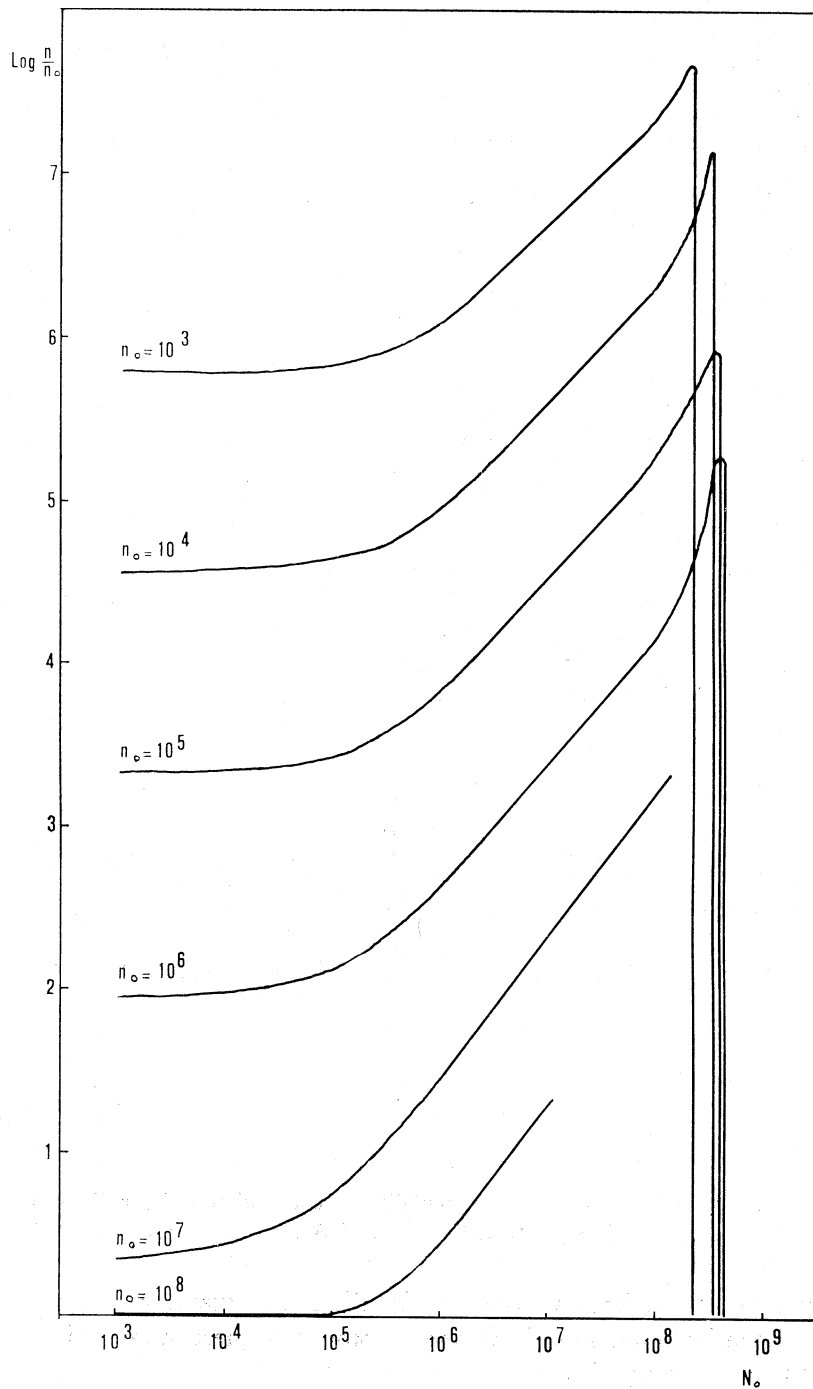


Fig. 4. - Rendimento di una produzione massiva di fagi in funzione della concentrazione iniziale N_0 di batteri al variare dell'inoculo di virus n_0 .

Il disaccordo più evidente è nella parte finale della curva che rappresenta l'andamento temporale della popolazione fagica; i punti sperimentali sembrerebbero indicare un ritardo della lisi di circa 8 minuti rispetto all'andamento ricavato in base al modello matematico.

Un analogo confronto è stato effettuato per il secondo sistema (*E. coli* B/5-T₂r⁺).

Come mostra la fig. 3 i punti sperimentali si discostano in misura molto maggiore che non nel caso precedente dalle previsioni teoriche, specialmente per valori elevati di $n(t)$. Inoltre gli andamenti sperimentali fanno notare un allungamento del periodo latente quando aumenta il rapporto di infezione fago-batterio ospite.

Era da attendersi un risultato di questo tipo, in quanto il modello matematico proposto non tiene conto del fenomeno dell'inibizione della lisi. Il buon accordo che si ha per la parte iniziale della curva, quando questo fenomeno non si presenta, è comunque un fatto positivo giacché sta ad indicare che il modello si discosta dai risultati sperimentali solo quando intervengono fenomeni che non sono da esso esplicitamente previsti.

Da quanto detto, risulta che il modello non ha solo valore predittivo ma può anche essere un utile mezzo di indagine per mettere in evidenza eventuali anomalie di comportamento di particolari sistemi.

C) Rendimento.

Il modello presentato permette anche di ricavare facilmente informazioni riguardanti il rendimento di una produzione massiva di fagi in determinate condizioni iniziali.

Nei calcoli seguenti si è tenuto conto della evidenza sperimentale che la lisi dei batteri cessa quando viene arrestato il metabolismo batterico. Abbiamo quindi imposto che le $n(t)$, $N(t)$, $N_f(t)$ rimangano costanti quando la concentrazione dei batteri raggiunge un valore tale da impedire una ulteriore crescita per esaurimento delle sostanze nutritive o per altre cause chimico-fisiche. Questo valore, che dipenderà dalle condizioni sperimentali, è stato assunto pari a 10^9 batteri/cm³.

I grafici di fig. 4 mostrano il logaritmo del rendimento $\left(\log \frac{n_{\text{fin}}}{n_0}\right)$ in funzione della concentrazione iniziale N_0 di batteri al variare della concentrazione dell'inoculo di fagi per una particolare scelta dei valori dei parametri λ , k , α , τ .

L'andamento iniziale piatto comincia a salire per valori della concentrazione batterica iniziale prossimi a 10^5 batteri/cm³, per raggiungere un massimo che dipende dalla concentrazione iniziale dei fagi, quindi cala rapidamente a zero. Tale andamento dipende dal fatto che i più alti rendimenti si ottengono per alti valori della concentrazione iniziale dei batteri, compatibilmente col fatto, tuttavia, che deficienze nutrizionali non arrestino il processo moltiplicativo prima della lisi completa della coltura.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. P. KRUGER (1931) - « J. Gen. Physiol. », 14, 493.
- [2] M. DELBRUCK (1940) - « J. Physic. Chem. », 8, 120.
- [3] L. J. TOLMACH (1957) - « Adv. Virus Res. », 4, 63.
- [4] M. SMOLUCHOWSKY (1917) - « Z. Physic. Chem. », 92, 140.
- [5] G. CESARENI, G. F. GROSSI e F. LIELLO (1974) - « Nota interna Istituto di Fisica Università di Roma », n. 547.
- [6] S. E. LURIA e J. E. DARNELL (1968) - « *General Virology* », John Wiley & Sons, New York.
- [7] F. D'HERELLE (1926) - *The bacteriophage and its behaviour*, Williams & Wilkins, Baltimora.
- [8] A. H. DOERMAN (1948) - « J. Bact. », 55, 257.