

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ СООБЩЕСТВА
ДИССОЦИАНТОВ *Pseudomonas aeruginosa***

© 2006 г. П. В. Фурсова, А. П. Левич

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119992 Москва, Ленинские горы
E-mail: fursova@biophys.msu.ru
Поступила в редакцию 22.12.2005 г.*

Среди современных проблем биологии центральное место занимает проблема адекватного экологического прогноза. В приложении к экологии сообществ, в частности микробиологических, она может быть переформулирована как проблема строгого количественного предсказания (расчета) численностей видов, образующих сообщество, как функций, аргументами которых являются факторы, определяющие жизнедеятельность организмов. Среди таких факторов одно из первых мест занимает обеспеченность особей ресурсами среды. Критерием адекватности расчетных схем может служить умение управлять структурой сообщества или, другими словами, умение поддерживать необходимый состав сообщества, представленного группами организмов в необходимых пропорциях. Интерес к подобным прикладным задачам связан с тем, что параметры биологических процессов и урожай продуцируемых веществ сильно зависят от доли, которая в биомассе сообщества приходится на те или иные виды организмов. Особая ситуация в микробиологических биотехнологиях возникает из-за явления диссоциации микроорганизмов. При этом активность диссоциантов, их физиологические особенности, влияющие на продуцирование биологически активных веществ, различны, что приводит к необходимости контролировать состав возникающей поликультуры.

Для исследования возможностей описания микробиологических культур с точки зрения проблем прогноза и управления в работе используется вариационная модель потребления и роста для экологических сообществ (Levich, 2000; Левич и др., 1994). Эта модель позволяет по известным потребностям физиологически различающихся групп организмов рассчитывать как области лимитирования для любых сочетаний ресурсных факторов в среде, так и численности популяций сообщества на стационарной стадии роста как функции лимитирующих рост ресурсов. Подход, лежащий в основе вариационной модели, берет свое начало в классической

статистической физике, в которой каноническое распределение (стационарное состояние идеального газа) получается решением задачи на максимум энтропии при условии, что задана средняя энергия газа. В рамках используемой модели стационарное состояние сообщества микроорганизмов описывается решением задачи на условный экстремум функции обобщенной энтропии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведенное исследование состояло из следующих основных этапов. Сначала были получены явные формулы для расчетов границ областей лимитирования и численностей групп клеток в тех ситуациях, которые имеют место в лабораторных экспериментах. Затем были проведены анализ чувствительности модели к изменению ее параметров, что позволило судить о степени согласованности теоретических и экспериментальных результатов. По результатам лабораторных экспериментов с монокультурами были определены параметры модели, которые представляют собой потребности микроорганизмов в основных питательных веществах. Затем, основываясь на данных опытов по экспериментальному определению ресурсов, ограничивающих рост сообщества (так называемые опыты с добавками), как для моно-, так и для смешанных культур, было проверено соответствие предсказываемых теоремой стратификации лимитирующих ресурсов экспериментальным данным. И, наконец, для различных вариантов поликультур (для всех попарных смесей и смеси трех диссоциантов) проведена проверка адекватности теоретических расчетов состава сообщества на стационарной стадии роста результатам опытов.

Объекты и методики экспериментов. Экспериментальным объектом работы являются R-, S- и M-диссоцианты бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Диссоциативные переходы бактерий, или вариация фаз, вносят важнейший вклад в создание гетерогенности бактериальной популяции (Милько, Егоров, 1991). Они обусловлены геномными перестройками, которые происходят с высокой частотой, превышающей частоту случайных мутаций на несколько порядков, и обладают плеiotропным действием. Это определяет постоянные и обратимые изменения многих морфологических и физиолого-биохимических свойств клеток: способность к деградации и синтезу практически ценных веществ, устойчивость к внешнему воздействию, скорость роста (Милько, Мартынкина, 1996), потребность в питательных веществах. В настоящее время диссоциативные формы обозначают символами согласно некоторым морфологическим признакам их колоний: S (smooth) — гладкие, R (rough) — шероховатые, M (mucoid) — слизистые. Представители рода *Pseudomonas* широко используются в различных биотехно-

логических процессах: в химических производствах, в биогидрометаллургии, в производстве химических препаратов для сельского хозяйства, при получении полимеров, для повышения нефтеотдачи пластов, при переработке и удалении отходов и веществ, загрязняющих среду, в том числе нефтяных загрязнений (Калакуцкий и др., 1996; Мордухова и др., 2000).

Всего было проведено 152 эксперимента по выращиванию монокультур и 77 – смешанных (попарных комбинаций диссоциантов и смеси всех трех) (Милько, Ильиных, 2001; 2004; Фурсова и др., 2004а, б; 2005). Микроорганизмы помещали в замкнутую среду, содержащую различные компоненты питания, необходимые для развития. В процессе развития культуры, включающем в себя деление клеток и их гибель, не производили добавления или изъятия ресурсов и микроорганизмов каким-либо искусственным способом. При таком росте сообщество развивалось до наступления стационарной фазы. Продолжение культивирования приводило после некоторого времени пребывания в стационарной фазе к естественной деградации сообщества (фаза отмирания).

Сообщества псевдомонад выращивали на средах с различными начальными содержаниями углерода, азота и фосфора методом накопительного культивирования. Эти вещества необходимы для роста и являются взаимонезаменяемыми. В процессе роста проводили измерения оптической плотности культуры, уровня кислотности среды, в некоторых опытах контролировали химический состав среды. В том числе пользовались полуколичественными экспресс-методами определения глюкозы, нитратов и фосфатов.

Для определения количества клеток в культуре на стационарной стадии развития для каждого диссоцианта был получен коэффициент, связывающий оптическую плотность с численностью клеток.

Соотношение диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний рассевом на плотную среду, содержащую мясо-пептонный бульон и сусло в равных отношениях.

Для экспериментального определения ресурса, ограничивающего рост культуры, проводили так называемые опыты с добавками. В момент предполагаемого достижения стационарной стадии культуру разделяли на четыре пробирки. В три из них вносили добавки – глюкозу, нитрат или фосфат, а четвертую оставляли без изменений (контроль). В других опытах для проверки возможности многофакторного лимитирования вносили не три, а семь возможных комбинаций добавок – каждое вещество в отдельности, их парные комбинации и все три ресурса. Количество добавляемых веществ равнялось их первоначальному содержанию в среде. Культуру оставляли расти в различных опытах на срок от 4 до 12 ч, затем проводили измерение оптической плотности. Если добавление компонента питания в среду приводило к возобновлению деления клеток, то этот ресурс считали лимитирующим. В случае если внесение

вещества не приводило к росту культуры, считали, что этот фактор не ограничивал развития сообщества.

Если условия культивирования и измерений не соответствовали предпосылкам используемой в работе модели, данные эксперимента исключали из дальнейшего рассмотрения.

Вариационное моделирование роста и потребления для сообщества микроорганизмов.

Стационарная стадия развития сообщества, состоящего из w групп микроорганизмов, которые потребляют m взаимонезаменимых ресурсов, может быть описана решением следующей вариационной задачи на условный экстремум (Levich, 2000; Левич, 1982; Левич и др., 1994; 1997):

$$\begin{cases} H(n_1, \dots, n_w) = \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) \ln \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) - \sum_{i=1}^w n_i \ln n_i \rightarrow \text{extr}; \\ \sum_{i=1}^w q_i^k n_i \leq L^k, \quad k = \overline{1, m}; \\ n_i > 0, \quad i = \overline{1, w}. \end{cases}$$

Здесь n_i – искомая численность каждой из групп клеток сообщества на стационарной стадии роста; q_i^k – потребляемое из среды количество k -ого ресурса, необходимое для деления клетки группы i , в расчете на одну клетку (потребность организма группы i в ресурсе k), L^k – содержание ресурса k в среде в начале культивирования ($L^k \geq 0$); w – количество групп микроорганизмов, образующих сообщество; m – количество потребляемых взаимонезаменимых ресурсов.

Предполагается, что наборы потребностей клеток из различных групп $(q_i^1, \dots, q_i^m)$, $i = \overline{1, w}$ непропорциональны друг другу. Это связано с тем, что в рамках рассматриваемой модели именно отсутствие пропорциональности обеспечивает различимость групп клеток.

В качестве целевой функции H использован так называемый функционал обобщенной энтропии, а ограничения отражают конечность запасов потребляемых ресурсов. Важно отметить, что функционал H не постулирован, а выведен на основе категорно-функторного метода сравнения математических структур (Левич, 1982; Levich, Solov'yov, 1999). Само сообщество описано математической структурой множеств из n элементов, разбитых на w непересекающихся классов размером n_i ($n = \sum_{i=1}^w n_i$).

Допустимыми преобразованиями для этих объектов являются инъективные, сюръективные, не всюду определенные и не функциональные соответствия (такой тип преобразования адекватно отражает условия эксперимента по накопительному культивированию бактерий). Логарифм удельного числа допустимых преобразований данного состояния системы, названный обобщенной энтропией, является мерой структурированности состояний системы (Levich, 1995). Экстремальный принцип, формализуемый вариаци-

онной задачей, постулирует, что динамические системы из заданного состояния переходят в состояние с экстремальной (в пределах, допустимых имеющимися ресурсами) структурой (Levich, 2000).

Существенно, что ограничения вариационной задачи записаны в виде неравенств. Тем самым учтен тот факт, что ресурсы не могут заменить друг друга, а, следовательно, для остановки роста сообщества достаточно истощения хотя бы одного ресурса и наступление стационарной стадии вовсе не означает, что все компоненты питания потреблены полностью.

Для сформулированной вариационной задачи найдено решение, получившее название «формула структуры сообщества»:

$$n_i(\vec{L}^J) = n \exp \left\{ - \sum_{k \in J} \lambda^k q_i^k \right\}.$$

Численности групп сообщества зависят от запасов тех ресурсов $\vec{L}^J$, которые ограничивают его рост (J – множество индексов, нумерующих лимитирующие ресурсы). Множители

Лагранжа λ^k и полная численность $n = \sum_{i=1}^w n_i$ как функции потребляемых ресурсов $\vec{L}$ ищутся

из алгебраических уравнений

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^w \exp \left\{ - \sum_{k=1}^m \lambda^k q_i^k \right\} = 1; \\ \lambda^k \left(n \sum_{i=1}^w q_i^k \exp \left\{ - \sum_{k=1}^m \lambda^k q_i^k \right\} - L^k \right) = 0, \quad k = \overline{1, m}; \\ \lambda^k \geq 0, \quad k = \overline{1, m}. \end{cases}$$

Показано, что это решение всегда существует, единственно и осуществляет максимум функционала H (Левич и др., 1994). Доказана теорема стратификации, которая позволяет для любого заданного набора ресурсов L^k определять те компоненты, которые будут ограничивать рост сообщества на стационарной стадии (Левич и др., 1994; Alexeyev, Levich, 1997; Levich, 2000).

Получены все формулы, которые необходимы для определения границ стратов в изучаемых случаях, а именно: для монокультур, смеси двух и трех групп клеток, потребляющих два или три питательных вещества (Фурсова, 2003а). Пусть, например, задано сообщество, состоящее из двух групп клеток, потребляющих два ресурса: L^1 и L^2 . Пусть известны потребности микроорганизмов в ресурсах: $\{q_i^k\}$, $k = 1, 2$; $i = 1, 2$ (индекс k нумерует ресурсы, индекс i – группы). Согласно теореме стратификации пространство ресурсов распадается на 3 области

(рис. 1), в одной из которых лимитирующими оказываются оба ресурса (область I), а в двух других – один ресурс (в области II – L^1 , в области III – L^2). Коэффициенты угла наклона прямых, ограничивающих области лимитирования, задаются следующим образом:

$$\nu = \nu(q_i^k) = \frac{q_1^1 x_0^{q_1^1} + q_2^1 x_0^{q_2^1}}{q_1^2 x_0^{q_1^1} + q_2^2 x_0^{q_2^1}}, \quad \eta = \eta(q_i^k) = \frac{q_1^1 y_0^{q_1^1} + q_2^1 y_0^{q_2^1}}{q_1^2 y_0^{q_1^1} + q_2^2 y_0^{q_2^1}}, \quad \text{где } x_0 - \text{корень уравнения } x^{q_1^1} + x^{q_2^1} = 1, \text{ а } y_0$$

– корень уравнения $y^{q_1^1} + y^{q_2^1} = 1$.

В зависимости от условий лимитирования по формуле структуры сообщества рассчитывают, какая доля в общей численности будет приходиться на каждую из двух или трех групп клеток, образующих сообщество. Так, в области лимитирования одним ресурсом L^k , $k = 1, 2, 3$ относительные численности диссоциантов на стационарной стадии роста задаются выражениями

$$\frac{n_1}{n} = x_0^{q_1^k}, \quad \frac{n_2}{n} = x_0^{q_2^k}, \quad \frac{n_3}{n} = x_0^{q_3^k}, \quad \text{где } x_0 - \text{корень уравнения } x_0^{q_1^k} + x_0^{q_2^k} + x_0^{q_3^k} = 1. \text{ Аналогично, для}$$

культуры, состоящий из двух групп организмов, доли задаются выражениями

$$\frac{n_1}{n} = x_0^{q_1^k}, \quad \frac{n_2}{n} = x_0^{q_2^k}, \quad \text{причем } x_0^{q_1^k} + x_0^{q_2^k} = 1.$$

Для численных расчетов и построения диаграмм были использованы программные продукты Mathcad и MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ чувствительности модели к изменению ее параметров. Каждое значение потребности (клеток каждой группы в каждом веществе) изменяли в отдельности на 10, 25, 50 и 100% при неизменных остальных величинах (Фурсова, 2003б).. В качестве показателя для оценки чувствительности модели к изменению параметров использовали относительные численности каждой группы на стационарной стадии роста, общую численность сообщества, а также величины, характеризующие границы областей лимитирования. Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы. Наименьшие изменения показателей оценки чувствительности происходят в областях однофакторного лимитирования. Относительная величина отклонения значений обилий групп не превышает относительной величины изменения параметра. Исключение составляют случаи, когда колебание значения потребности вызывает изменение ранга требовательности организмов некоторой группы к ресурсу (т.е., изменяется порядок групп в ряду от самой большой потребности в данном ресурсе к самой маленькой).

Определение параметров вариационной модели – потребностей микроорганизмов в основных питательных веществах. Под потребностью организма понимается количество ресур-

са, необходимое для роста вида, в расчете на одну клетку. Таким образом, получить соответствующие величины потребностей диссоциантов в источниках питания можно по формуле

$$q_i^L = \frac{\Delta L}{\Delta n_i}, \text{ где } \Delta L - \text{количество потребленного из среды вещества, } L - \text{компонент питания, } \Delta n_i$$

– количество вновь образовавшихся клеток за тот же период времени, индекс i характеризует диссоциант.

Потребности R-, S- и M-диссоциантов бактерий *P. aeruginosa* определяли по результатам анализа данных экспериментов с монокультурами (Фурсова и др., 2004а). Для расчетов потребностей диссоциантов по данным экспериментов, в которых проводили химические определения состава среды, достаточно было проследить, чтобы изменение количества клеток и уровней содержания питательного вещества были зафиксированы за один и тот же промежуток времени. Потребности рассчитывали, исходя из соответствующих измерений величин ΔL и Δn_i . В большинстве экспериментов химическое определение концентраций питательных веществ в динамике культивирования не проводили. В этом случае сначала следовало проверить: достигнута ли стационарная стадия (и известно ли количество клеток на этот момент); вызвана ли остановка роста именно исчерпанием рассматриваемых питательных веществ (другими причинами могли быть: нарушение температурного режима культивирования, закисление среды, недостаточная аэрация, слишком высокая плотность культуры для используемых пробирок и др.). Затем следовало по различным косвенным признакам сделать вывод о том, какие питательные вещества могли быть полностью исчерпаны в каждом из опытов. Знание лимитирующего, т.е. полностью потребленного из среды ресурса, позволяет рассчитать величину потребности: если остановка роста произошла по причине исчерпания некоторого питательного вещества, то количество потребленного к концу роста культурой этого ресурса можно считать равным его содержанию в среде в начальный момент культивирования. При этом для вычисления потребности необходимо использовать количество клеток, выросших за тот же период времени, то есть к моменту достижения стационарной фазы.

Все экспериментальные данные проанализировали с точки зрения ответа на вопрос о том, какие ресурсы могли ограничивать рост культуры в каждом из опытов. В результате были выбраны результаты тех экспериментов, по которым можно рассчитывать потребности. Средние значения приведены в табл. 1.

Выявление лимитирующих ресурсов. Согласно теореме стратификации (Левич и др., 1994), пространство m потребляемых сообществом ресурсов распадается на $2^m - 1$ областей лимитирования. Для каждого набора питательных веществ, определяющих исходную экспериментальную среду, можно определить, к какой из областей лимитирования она принадле-

жит, а это значит указать те ресурсы, исчерпание которых приведет к остановке роста культуры. Теорема стратификации дает однозначный алгоритм расчета границ областей лимитирования для сообщества с заданным набором потребностей q_i^k . Стратификация пространства двух и трех ресурсов в случае смешанных культур представлены на рис. 1, 2.

Для проверки адекватности предсказания вариационной моделью фактора, ограничивающего рост микробиологического сообщества, проводили сравнение расчетных и экспериментальных данных. Основой для получения последних стали результаты опытов с добавками, являющихся реализацией метода экспериментального определения лимитирующего ресурса (Фурсова и др., 2004б).

Используя для расчетов значения потребностей R-, S- и M-диссоциантов (табл. 1), получили для культур этих бактерий границы областей лимитирования. Для начальных условий опытов с добавками, исходя из соответствующих для каждой из культур расчетов, определяли область лимитирования, которой принадлежит изучаемая среда. Сравнение модельных и экспериментальных данных показало, что в 75% опытов рост возобновился после добавки вещества, определенного моделью как лимитирующего.

Одним из аспектов управления структурой сообщества можно считать создание таких начальных условий культивирования, при которых ограничивать рост будут заданные исследователем факторы. Для изучения подобной возможности по рассчитанным значениям потребностей составили среды, которые с точки зрения вариационной модели ограничены по углероду, азоту и фосфору. Затем, основываясь на данных опытов с добавками, проверяли наличие заданного лимитирования при выращивании моно- и смешанных культур. Результаты опытов с добавками на среде, ограниченной по углероду, полностью подтверждают заданный характер лимитирования: во всех случаях возобновление роста происходило после внесения в культуру глюкозы или комбинации веществ, ее содержащую. При выращивании всех культур на среде, ограниченной по азоту, из-за бедности сред происходило закисление, которое, вероятно, приводило к гибели бактерий, поскольку добавки любых комбинаций ресурсов не приводили к возобновлению роста. Также в эксперименте не удалось наблюдать ограничение роста фосфором. Несмотря на снижение относительного содержания фосфатов, полного исчерпания этого ресурса не происходило. Анализ данных по культивированию сообществ диссоциантов на этих средах позволил сформулировать гипотезу о неоднократном использовании фосфора клетками диссоциантов *P. aeruginosa*. (Подобная идея была высказана ранее на основе биохимических исследований фосфорного обмена у микроорганизмов (Кулаев, 1975).) Причем для этого явления, возможно, существенное значение имеет бедность сред, на которых выращивали культуры на данном этапе (в ранних опытах на ранее более богатых средах

было зафиксировано как исчерпание фосфора, так и возобновление роста после его добавки, что и позволило рассчитать потребности диссоциантов в этом ресурсе).

Принятие гипотезы о неоднократном обращении фосфора приводит к необходимости считать этот ресурс находящимся в среде в достаточном количестве. В результате были рассмотрены все экспериментальные данные с точки зрения двух факторов, которые могут ограничить рост диссоциантов – углерода и азота. Всего для анализа опытов с добавками оказался пригодным 71 опыт (37 с монокультурами и 34 со смешанными). В 59 из них произошло возобновление роста после внесения ресурса, предсказываемого моделью как лимитирующего (табл. 2, 3, рис. 3). Таким образом, по данным двух экспериментальных этапов и с учетом гипотезы о неоднократном обращении фосфора в 83% случаев теоретические и опытные данные совпадают. Несоответствия между предсказанным и полученным в экспериментах характером лимитирования объяснимы ошибками в значениях потребностей, которые являются параметрами расчетов границ стратов, а также погрешностями в составлении исходных сред для культивирования. Интересным представляется тот факт, что экспериментальное подтверждение получило совместное лимитирование роста культур углеродом и азотом. (В таблицах приведены результаты всех экспериментов. В качестве наглядной иллюстрации, на рис. 3 в виде диаграммы приведены данные по опытам со смешанной культурой, состоящей из трех диссоциантов.)

Состав смешанных культур на стационарной стадии развития. В рамках вариационной модели потребления и роста данные о потребностях организмов позволяют в зависимости от начального состава среды определять те ресурсы, которые будут ограничивать рост культуры. Знание лимитирующего фактора, в свою очередь, дает возможность рассчитать состав сообщества (доли каждой из образующих его групп клеток) на стационарной стадии развития. Получены формулы, по которым можно определить, какая доля в общей численности будет приходиться на каждую из двух или трех групп клеток, образующих сообщество, при всех возможных условиях лимитирования (Фурсова, 2003а).

На основании полученных значений потребностей диссоциантов *P.aeruginosa* и границ областей лимитирования рассчитывали состав смешанных культур бактерий на стационарной стадии роста. Адекватность модельных предсказаний проверяли, сравнивая их с результатами экспериментов (Фурсова и др., 2005).

Экспериментальные данные составляют результаты выращивания четырех типов смешанных культур диссоциантов *P. aeruginosa*. Для теоретических расчетов стационарного состава сообщества для каждой опытной среды сначала были определены ресурсы, ограничивающие рост сообщества. Оказалось, что все наборы ресурсов, определяемые начальным со-

ставом среды, принадлежат стратам с однофакторным лимитированием (полученные результаты хорошо согласуются с результатами опытов с добавками).

Полученные по модельным расчетам относительные численности диссоциантов сравнивали с данными экспериментов. Здесь необходимо сделать существенное замечание о сопоставлении теоретических и опытных данных. Из эксперимента по результатам посева известны доли единиц, образующих колонии (КОЕ) диссоциантов, в то время как модель позволяет рассчитывать относительные численности клеток. В рамках данной работы принята следующая гипотеза: на стационарной стадии роста клетки бактерий находятся в одинаковом физиологическом состоянии и доля проросших клеток (КОЕ) среди всех клеток данного диссоцианта одинакова для всех диссоциантов.

Итак, было получено, что из 36 наборов данных в 33 предсказанный моделью состав популяций отличается от экспериментального менее, чем на 15%. Наибольшее отклонение расчетных значений от опытных составляет 17%. Согласно проведенному анализу чувствительности модели к вариациям параметров, полученные различия могут быть объяснены ошибками в значениях потребностей, применявшихся в расчетах. Кроме того, согласно результатам определения состава смешанных культур в повторностях, разброс данных достигает $\pm 15\%$.

После проведения экспериментов на средах с заданными условиями лимитирования и последующего перехода к двум рассматриваемым ресурсам (см. предыдущий раздел) сравнение расчетного и экспериментального состава культур по всем проведенным опытам дал следующие результаты. Данные представлены в табл. 4 (приведены результаты всех экспериментов. В качестве наглядной иллюстрации на рис. 4 приведены данные о доле R-диссоцианта в смешанных культурах.) В 7 из 45 экспериментов разница в долях диссоциантов составляет 15% и более от общей численности сообщества (24, 32, в остальных случаях менее 20%). В остальных 38 случаях (85% опытов) разность между предсказанными моделью и полученными в эксперименте долями диссоциантов составляет менее 15% от общей численности. Причины несоответствий экспериментальных и расчетных значений аналогичны указанным выше.

Полученные данные о величинах потребностей и произведенные расчеты численностей диссоциантов в каждой из областей лимитирования позволили проанализировать возможные пути регулирования состава культур с помощью изменения отношения запаса ресурсов (Фурсова, Левич, 2004). Регулирование состава возможно лишь в задаваемых моделью пределах. Оказалось, что для исследованных диссоциантов *P. aeruginosa* с их значениями потребностей нельзя существенно изменять структуру сообщества. Это связано, во-первых, с узостью интервалов, задающих области многофакторного лимитирования, в сравнении с точностью, с которой могут быть составлены исходные среды, а во-вторых, с незначительными различиями

состава сообщества в разных стратах по сравнению с погрешностью определения долей диссоциантов. Однако при "подходящих" значениях потребностей, варьируя соотношение питательных веществ в среде, можно получать на стационарной стадии роста различные распределения групп по рангам (от наименее до наиболее многочисленной). В качестве демонстрации указанного свойства приведем расчеты состава сообщества, состоящего из четырех протококковых водорослей, потребляющих азот (N) и фосфор (P) (Левич и др., 1997; Levich, 2000). На рис. 5 представлены относительные численности видов $p_i, i = \overline{1, 4}$, исходя из следующих экспериментальных значений потребностей (размерность 10^{-9} мг/кл):

$$\begin{aligned} q_1^N &= 3.94; q_2^N = 0.91; q_3^N = 1.69; q_4^N = 0.41; \\ q_1^P &= 0.79; q_2^P = 0.28; q_3^P = 0.22; q_4^P = 0.21. \end{aligned}$$

По результатам лабораторных экспериментов смену доминирующего вида можно проследить на примере культивирования двух видов из порядка протококковых *Ankistrodesmus falcatus* и *Scenedesmus quadricauda* (Левич, Булгаков, 1993). Результаты исследования роста сообщества на средах с различными начальными отношениями азота и фосфора ($N/P = 1.3; 57$) проиллюстрированы на рис. 6.

Отметим еще одно свойство вариационной задачи, имеющее отношение к управлению (или регулированию) составом сообщества: относительная численность заданного вида принимает наибольшее значение при отношениях в среде ресурсов, равных отношениям потребностей в них заданного вида (Левич и др., 1993; Levich, 2000). Данные экспериментов подтверждают этот теоретический факт. Так, например, полученное из опытов отношение потребностей в азоте и фосфоре для *A. falcatus* равно 7, а для *S. quadricauda* – 25. Следовательно, на средах с отношениями ресурсов в среде 1.3 и 57 должен преобладать анкистродесмум и сценедесмум, соответственно. Именно это и наблюдалось в эксперименте (рис. 6). Более подробное описание указанного опыта, а также других экспериментов *in lab*, *in vitro* и *in situ* содержится в работах, специально посвященных управлению структурой сообществ фитопланктона (Levich, Bulgakov, 1992; Bulgakov, Levich, 1999; Левич и др., 1997; Levich, 2000).

Таким образом, сформулированное свойство относительных численностей сообщества также может быть использовано для создания сообществ одноклеточных организмов с нужными свойствами путем изменения отношений питательных веществ в среде. Полученные результаты позволяют говорить о перспективах решения задач, связанных с биологической утилизацией многокомпонентных загрязнений, с проблемами создания кормовой базы растительных рыб в рыбоводных хозяйствах, в задачах ликвидации последствий эвтрофирования водоемов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе получен алгоритм для расчета границ областей лимитирования и относительных численностей групп микроорганизмов, образующих сообщество, на стационарной стадии роста в зависимости от содержания в среде лимитирующих ресурсов.

Изучены частные случаи вариационной модели потребления и роста, соответствующие лабораторным опытам.

Исходя из экспериментальных материалов по культивированию моно- и смешанных культур диссоциантов бактерий *P.aeruginosa*, рассчитаны необходимые параметры вариационной модели, которыми являются потребности диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре. На основе полученных значений потребностей реализован алгоритм расчетов границ областей лимитирования и относительных численностей диссоциантов. Проведено сравнение модельных предсказаний и результатов опытов. Полученные результаты позволяют говорить о согласованности теоретических расчетов и экспериментальных данных.

На основе рассчитанных величин потребностей численностей диссоциантов в каждой из областей лимитирования проанализированы возможные пути регулирования состава культур с помощью изменения отношения запаса ресурсов.

Еще раз отметим некоторые особенности применяемых в работе методов. В отличие от широко применяемых в математической биологии методов моделирования, использующих аппарат теории дифференциальных уравнений (обыкновенных или с частными производными) и позволяющих исследовать динамику процессов, протекающих в биологической системе, указанный подход дает лишь стационарное состояние, в которое система приходит с течением времени. Используя вариационное моделирование, можно избежать ряда трудностей в изучении динамических моделей, связанных с их чрезвычайной громоздкостью, неопределенностью значений множества параметров, невозможностью применения традиционных методов сокращения числа переменных, обусловленной спецификой задач и т. п. Так, например, при моделировании сообщества трех видов, потребляющих три ресурса (что и делается в работе) с помощью вариационных методов, для расчета численностей нам надо решить систему из трех алгебраических уравнений с тремя неизвестными. При этом параметры модели – 9 значений потребностей и 3 значения начальных запасов ресурсов (всего – 12). Для реалистичного описания развития подобного сообщества с помощью системы дифференциальных уравнений необходимо составить 15 уравнений (динамика биомассы, динамику внутриклеточного содержания трех веществ для каждого вида и динамику трех веществ в среде). В этих уравнениях будет 42 параметра (минимальное и максимальное содержание веществ в клетке, константы полунасыщения, скорости потребления веществ).

ИЗВ. РАН. СЕР. БИОЛ. 2007. № 1. С. 58-67

Вариационное моделирование нашло свое применение в различных областях биологии, однако, несмотря на ряд достоинств, по-прежнему остается мало востребованным методом моделирования. Основной причиной этого является трудность в выборе целевой функции. Используемая в работе вариационная модель основана на принципе максимума обобщенной энтропии, который является развитием формализма Джейнса. Результаты проведенного исследования могут быть использованы для описания различных биологических объектов, удовлетворяющих предъявляемым моделью требованиям. Кроме того, возможно их применение и в других областях естествознания, где решаются подобные экстремальные задачи.

Работы выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 05-04-49238 и № 05-06-80062).

- Калакуцкий Л.В., Озерская С.М., Евтушенко Л.И. Российская коллекция микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. Вып. 1. С. 144–154.
- Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль // 30-е Баховское чтение. М.: Наука. 1975, 33 с.
- Левич А.П. Теория множеств, язык теорий категорий и их применение в теоретической биологии. Учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 1982. 191 с.
- Левич А.П., Алексеев В.Л. Энтропийный экстремальный принцип в экологии сообществ: результаты и обсуждение // Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 2. С. 534–541.
- Левич А.П., Алексеев В.Л., Никулин В.А. Математические аспекты вариационного моделирования в экологии сообществ // Мат. моделирование. 1994. Т. 6. № 5. С. 55–76.
- Левич А.П., Алексеев В.Л., Рыбакова С.Ю. Оптимизация структуры экологических сообществ: модельный анализ // Биофизика. 1993. Т. 38. Вып. 5. С. 877–885.
- Левич А.П., Булгаков Н.Г. О возможности регулирования видовой структуры лабораторного альгоценоза // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 4. С. 569–578.
- Левич А.П., Максимов В.Н., Булгаков Н.Г. Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ. Учебное пособие. М.: НИЛ, 1997. 184 с.
- Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142 с.
- Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов на динамику роста и состав популяции R-, S- и M-диссоциантов *Ps.aeruginasa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 37–44.
- Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние пониженных концентраций углерода, азота и фосфора в среде на динамику роста трех диссоциантов *Ps.aeruginasa* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 607–610.
- Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5. С. 352–356.
- Мордухова Е.А., Кочетков В.В., Лобанова Е.В., и др. Влияние салицилата натрия на популяционную динамику ризосферного штамма *Pseudomonas aureofaciens* в почве и на корнях пшеницы // Микробиология. 2000. Т. 69. № 6. С. 844–849.
- Фурсова П.В. Алгоритмы расчетов в вариационной модели экологического сообщества // Мат. моделирование. 2003а. Т. 15. № 5. С. 115–128.

ИЗВ. РАН. СЕР. БИОЛ. 2007. № 1. С. 58-67

Фурсова П.В. Потребности в глюкозе, нитратах, фосфатах и их вариации в анализе смешанной культуры диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Изв.АН. Сер. биол. 2003б. № 1. С. 122–127.

Фурсова П.В., Левич А.П. О регулировании состава экологического сообщества с помощью изменения отношения концентраций ресурсов в среде // Биофизика. 2004. Т. 49. № 5. С. 912–919.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных А.И., и др. Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре // Микробиология. 2004а. Т. 73. № 1. С. 45–50.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. Выявление компонентов питания, ограничивающих рост моно- и смешанных культур диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Вест. МГУ. Сер. 16, Биология. 2004б. № 1. С. 19–23.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. Подходы к управлению составом сообщества диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa*: экспериментальные данные и модельные расчеты // Биотехнология. 2005. № 1. С. 73–82.

Alexeyev V.L., Levich A.P. A search for maximum species abundances in ecological communities under conditional diversity optimization // Bull. Mathemat. Biol. 1997. V. 59. № 4. P. 649–677.

Bulgakov N.G., Levich A.P. The nitrogen:phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure // Archiv für Hydrobiol. 1999. V. 146. № 1. P. 3–22.

Levich A.P. Time as variability of natural systems: ways of quantitative description of changes and creation of changes by substantial flows // On the way to understanding the time phenomenon: the constructions of time in natural science. Part 1. // Ed. Levich A.P. Singapore, Jersey, London, Hong-Kong: World Sci., 1995. P. 149–192.

Levich A.P. Variational modelling theorems and algocoenoses functioning principles // Ecol. Modelling. 2000. V. 131. P. 207–227.

Levich A.P., Bulgakov N.G. Regulation of species and size composition in phytoplankton communities *in situ* by N : P ratio // Rus. J. Aquatic Ecol. 1992. № 2. P. 149–159.

Levich A.P., Solov'yov A.V. Category-functor modelling of natural systems // Cybernetics and Systems. 1999. V. 30. № 6. P. 571–585.

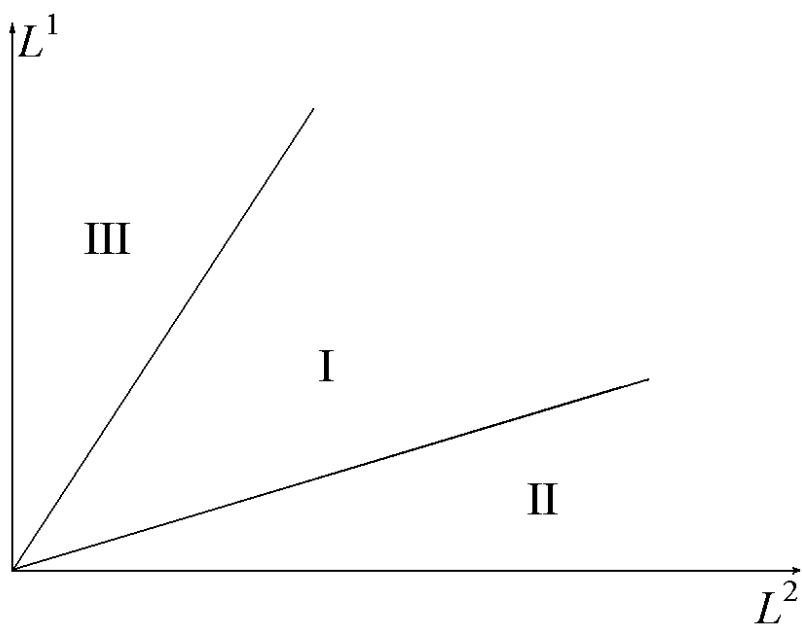


Рис. 1. к статье Фурсовой и др.

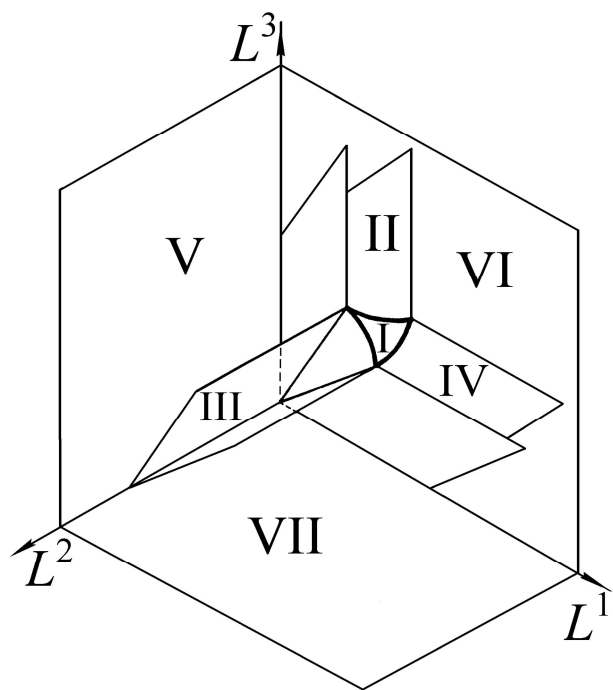
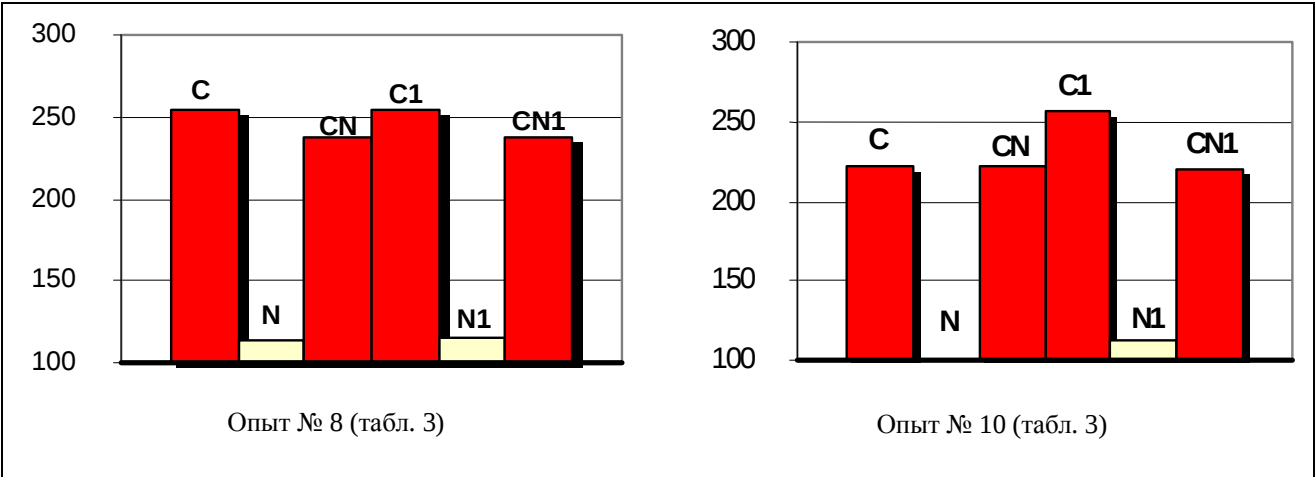
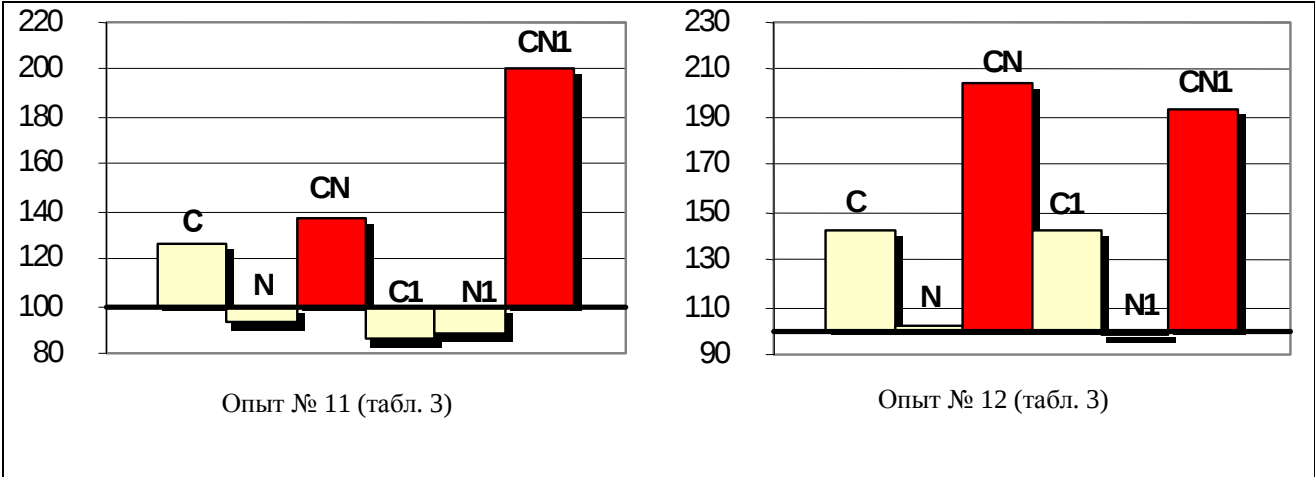


Рис. 2 к статье Фурсовой и др.

(a)



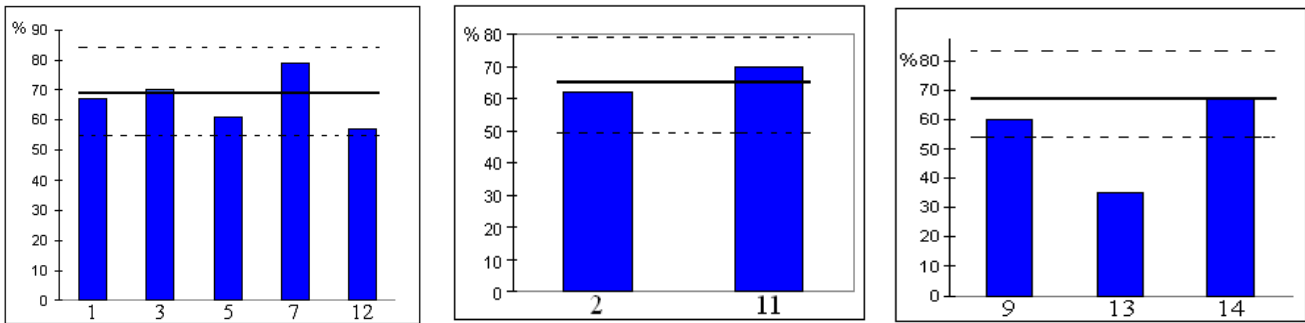
(б)



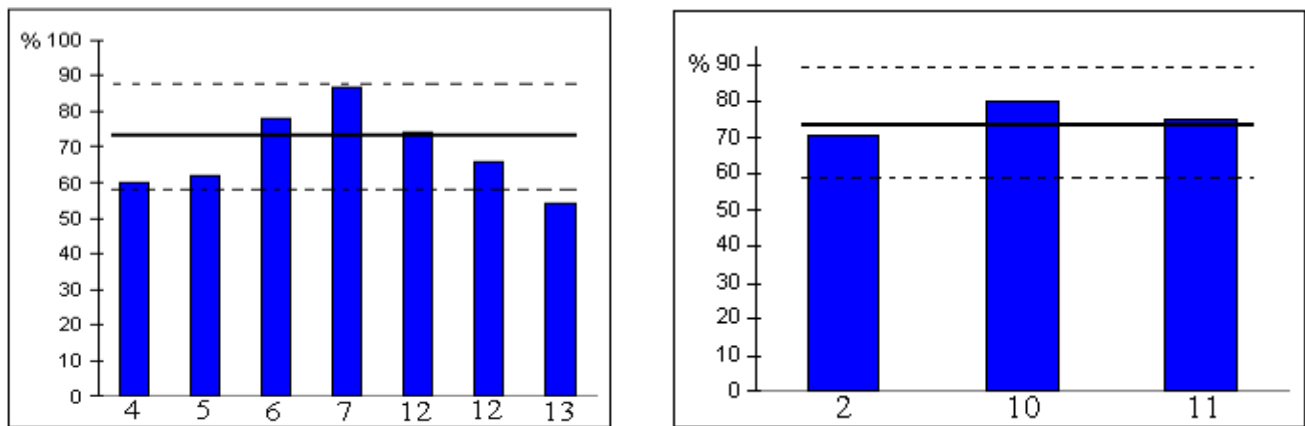
■ – 1; □ – 2.

Рис. 3 к статье Фурсовой и др.

(а)



(б)



(в)

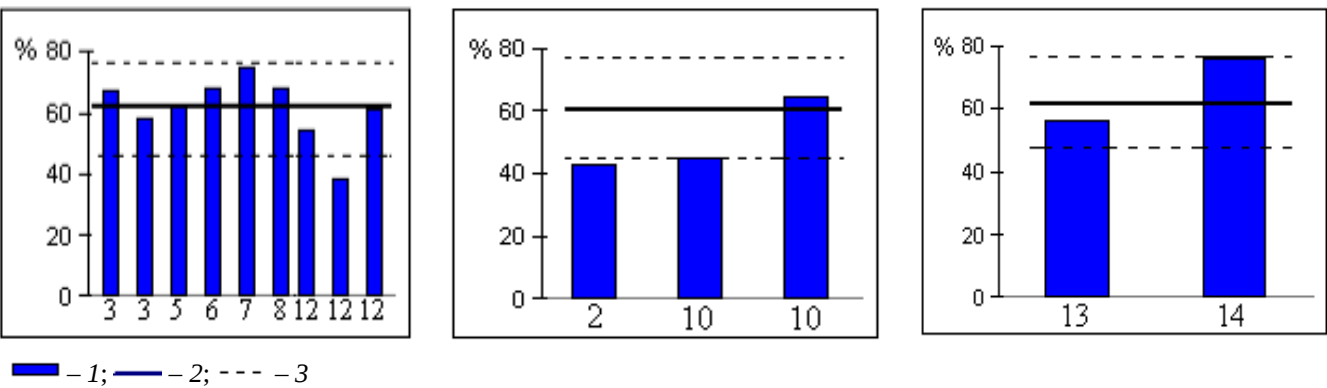


Рис. 4 к статье Фурсовой и др.

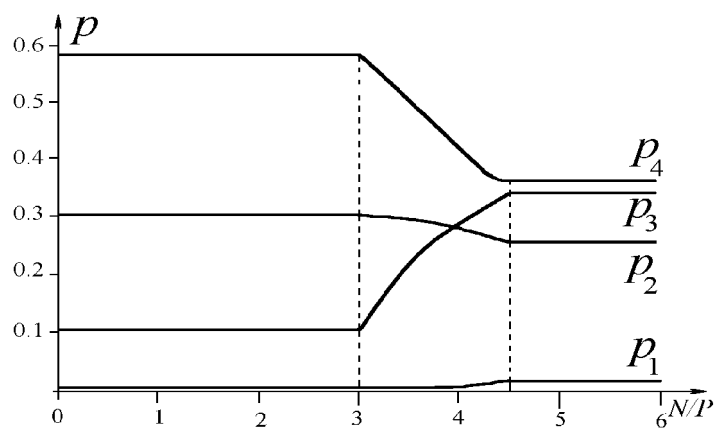


Рис. 5 к статье Фурсовой и др.

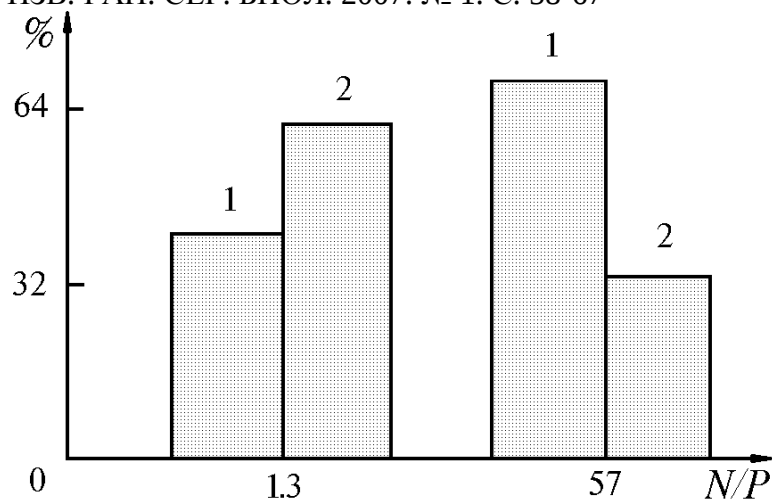


Рис. 6 к статье Фурсовой и др.

Подписи к рисункам в статье Фурсовой П.В., Левича А.П.

Рис. 1. Стратификация пространства двух потребляемых ресурсов. В области I лимитируют оба фактора, в II – L^1 , в III – L^2

Рис. 2. Стратификация пространства трех потребляемых ресурсов. В области I лимитируют все три ресурса, в II – L^1 и L^2 , в III – L^1 и L^3 , в IV – L^2 и L^3 , в V – L^1 , в VI – L^2 , в VII – L^3

Рис. 3. Влияние добавок на оптическую плотность смешанной культуры, состоящей из R-, S- и M-диссоциантов в случае лимитирования углеродом (а); углеродом и азотом (б). Столбцы диаграмм – результаты опытов с добавками. По оси ординат – оптическая плотность культуры по сравнению с контролем, %. За 100% принята оптическая плотность культуры без добавок (контроль). 1 – добавка лимитирующего вещества или комбинаций его содержащих; 2 – добавка нелимитирующих веществ. Объяснения см. в тексте.

Рис. 4. Доля R-диссоцианта (ось ординат, %) в смешанной культуре, состоящей из: R- и S-диссоциантов (а); R- и M-диссоциантов (б); R-, S- и M-диссоциантов (в). 1 – результаты эксперимента; 2 – модельный расчет; 3 – границы допустимых ошибок согласно результатам определения состава смешанных культур в повторностях (в). Номер опыта на оси абсцисс соответствует номеру в табл. 4.

Рис. 5. Относительные численности видов (ось ординат) $p_i, i = \overline{1,4}$ для экспериментальных потребностей как функции от N/P (Левичи др., 1997).

Рис. 6. Зависимость относительных численностей видов от отношения азота к фосфору в лабораторных экспериментах с двухвидовыми культурами.: 1 – *S. quadricauda*, 2 – *A. falcatus* (Левичи и др., 1997). По оси абсцисс – отношение азота к фосфору; по оси ординат – относительная численность вида, %.

Таблица 1. Средние значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$

мг/кл) с учетом 95% доверительных интервалов

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	129 $\pm$ 22	7.0 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 0.5
S	409 $\pm$ 55	17.5 $\pm$ 3.0	4.0 $\pm$ 1.5
M	525 $\pm$ 114	31 $\pm$ 3.0	6.0 $\pm$ 2.5

Таблица 2. Реакция на добавки в монокультурах, %.

№	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
1	C	C N	121 91	220 102	110 96
2	N	C N			101 131
3	C	C N			117 119
4	C	C N	220 97	140 80	217 74
5	C	C N		227 73	
6	N	C N	93 93		
7	C	C N	94 95	62 100	100 68
8	N	C N	95 143	100 112	90 100
9	C	C N		122 100	160 90
10	C	C N	212 162		97 66
11	C	C N	129 86	129 100	143 86
12	C	C N	131 76	101 68	119 81
13	C	C N			112 91
14	C	C N CN C1 N1 CN1	246 103 195	171 76 140	184 92 163
15	C	C N CN C1 N1 CN1	213 104 204 223 100 223	213 100 178 209 120 219	222 110 208 212 120 194
16	CN	C N CN C1 N1 CN1	105 105 86 104 82 168		

Таблица 2. Окончание.

№	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
17	CN	C	135	149	178
		N	91	102	104
		CN	214	202	216
		C1	135	153	158
		N1	100	104	92
		CN1	207	196	218

Примечание. За 100% принята оптическая плотность культуры без добавок (цифра 1 в обозначении вносимых ресурсов означает дополнительное присутствие фосфора). Жирным шрифтом выделены показатели, свидетельствующие о возобновлении роста в результате внесения питательного вещества, предсказанного моделью как лимитирующего (для табл. 2, 3).

Таблица 3. Добавки в смешанных культурах, % (см. Примечание).

№	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	RS	RM	SM	RSM
1	C	C N		82 59	89 84	87 98
2	N	C N	92 104	96 104	104 116	96 128
3	C	C N	142 75	160 100	160 90	150 71
4	C	C N			121 79	
5	C	C N	120 100	120 93		113 75
6	C	C N	103 81	143 102		
7	C	C N	103 88	109 81		129 91
8	C	C N CN C1 N1 CN1	220 98 202 204 110 212	200 94 198 227 114 227	194 98 214 276 94 270	254 114 237 254 116 237
9	C	C N CN C1 N1 CN1		233 102 246 200 173		
10	C	C N CN C1 N1 CN1				222 100 222 256 113 220
11	CN	C N CN C1 N1 CN1	102 116 116 111 96 113	99 81 157 104 68 157	77 87 107 103 91 125	126 93 137 86 89 200
12	CN	C N CN C1 N1 CN1	100 90 104 90 92 170	108 92 125 98 92 163	116 110 127 112 102 163	142 102 205 142 98 193

Таблица 4. Состав смешанных культур на стационарной стадии роста

№	Культура	Состав по результатам эксперимента (в процентах)	Состав по модельным расчетам (в процентах)
1	RS	67 : 33	69 : 31
	SM	66 : 34	54 : 46
2	RS	62 : 38	65 : 35
	RM	71 : 29	74 : 26
	SM	50 : 50	60 : 40
	RSM	43 : 41 : 16	60 : 29 : 11
3	RS	70 : 30	69 : 31
	SM	50 : 50	54 : 46
	RSM	67 : 11 : 22	62 : 23 : 15
	RSM	58 : 18 : 24	62 : 23 : 15
4	RM	60 : 40	73 : 27
	SM	42 : 58	54 : 46
5	RS	61 : 39	69 : 31
	RM	62 : 38	73 : 27
	SM	50 : 50	54 : 46
	RSM	62 : 32 : 6	62 : 23 : 15
6	RM	78 : 22	73 : 27
	SM	43 : 57	54 : 46
	RSM	68 : 17 : 15	62 : 23 : 15
7	RS	79 : 21	69 : 31
	RM	87 : 13	73 : 27
	SM	52 : 48	54 : 46
	RSM	75 : 12 : 13	62 : 23 : 15
8	RSM	68 : 19 : 13	62 : 23 : 15
9	RS	60 : 40	67 : 33
10	RS	70 : 30	65 : 35
	RM	80 : 20	74 : 26
	RSM	45 : 31 : 24	60 : 29 : 11
	RSM	65 : 19 : 16	60 : 29 : 11
11	RM	75 : 25	74 : 26
12	RS	57 : 43	69 : 31
	RM	74 : 26	73 : 27
	RM	66 : 34	73 : 27
	SM	72 : 28	54 : 46
	RSM	54 : 34 : 12	62 : 23 : 15
	RSM	38 : 23 : 39	62 : 23 : 15
	RSM	61 : 22 : 17	62 : 23 : 15
13	RS	35 : 65	67 : 33
	RM	54 : 46	73 : 27
	SM	65 : 35	57 : 43
	RSM	56 : 24 : 20	61 : 26 : 13
14	RS	67 : 33	67 : 33
	RM		73 : 27
	SM	62 : 38	57 : 43

	RSM	76 : 9 : 15	61 : 26 : 13
--	-----	-------------	--------------

**QUANTITATIVE DEVELOPMENT LAWS OF
PSEUDOMONAS AERUGINOSA DISSOCIANTS COMMUNITY**

P. V. Fursova, A. P. Levich

Biological Faculty, Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119992, Russia

Abstract

Among the problems of the microbiological communities' ecology a central place belongs to the problem of populations' sizes calculation depending of environment resources. The solution of this problem will allow to control community composition. To study the possibility of describing microbiological cultures we use a variational model of consumption and growth in ecological communities. By this model, using the requirements of physiologically different groups of organisms as parameters, it is possible to calculate the limitation ranges for arbitrary combinations of environmental resource factors and the community population sizes at a stationary stage of growth as functions of the resources that constrain the growth. Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* dissociant variants are investigated. It's shown, that variational model of consumption and growth allow to predict the limiting nutrients and dissociant's abundances adequately. The possibility of composition control is discussed.

Key words: Limiting resources; Species composition; Community structure regulation; *Pseudomonas aeruginosa*; Variational modeling; Extremal principles

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; лимитирующие ресурсы; структура сообщества; регулирование состава сообщества; вариационное моделирование, экстремальные принципы