

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТРЕБНОСТЕЙ ДИССОЦИАНТОВ *Pseudomonas aeruginosa* В УГЛЕРОДЕ, АЗОТЕ И ФОСФОРЕ

П.В. Фурсова, Е.С. Милько, И.А. Опарина, В.Н. Максимов, А.П. Левич

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

В работе получены точные количественные данные о потребностях микроорганизмов, необходимые для прогнозирования поведения бактериального сообщества в зависимости от условий культивирования и управления его структурой. По данным 88 опытов по культивированию монокультур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* определены потребности бактерий в углероде, азоте и фосфоре. В отличие от ранних исследований для каждого из диссоциантов найдены коэффициенты перевода оптической плотности культуры в количество клеток; зафиксировано достижение стационарной фазы роста; проверены изменения в диссоциативном составе культур на стационарной фазе; выявлены ресурсы, ограничивающие рост культур. Проведено сравнение полученных значений потребностей с данными других экспериментов.

Ключевые слова: диссоциация, *Pseudomonas aeruginosa*, потребность в основных источниках питания

Многие бактерии, в том числе псевдомонады, в процессе роста могут расщепляться (диссоциировать) на варианты, которые различаются по физиолого-биохимическим и морфологическим признакам: по морфологии колоний, устойчивости к внешним воздействиям, способности к синтезу практически важных веществ, интенсивности разрушения ксенобиотиков и углеводов, требовательности к содержанию питательных веществ в среде [1]. Морфологические и некоторые физиолого-биохимические свойства диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* описаны в ряде работ [2, 3, 4, 5].

Цель настоящей работы – определение величины потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в основных компонентах питания. Количественные данные о потребностях необходимы для прогнозирования поведения бактериального сообщества в зависимости от условий культивирования и управления его структурой. Под потребностью микроорганизмов в ресурсах среды понимается потребляемое из среды количество вещества в расчете на одну образовавшуюся в процессе культивирования клетку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 1999 г. по 2001 г. были проведены 88 опытов по культивированию R-, S-, и M-диссоциантов штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2. Бактерии выращивали на средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов и фосфатов. Исходная среда для R- и S-диссоциантов содержала 2% глюкозы, 1.1% нитратов и 0.055% фосфатов, для M-диссоцианта количество веществ было уменьшено в два раза. Для изучения зависимости роста бактерий от начального содержания ресурса в среде уровень глюкозы варьировали в пределах от 0.03 до 2%, нитратов – от 0.01 до 1.1%, фосфатов – от 0.001 до 0.055%. Опыты проводили на 24-х средах для каждого диссоцианта (для некоторых сред – с повторностями), причем среды составляли таким образом, чтобы один из ресурсов был лимитирующим.

Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 28°C в течении полутора-трех суток до достижения стационарной фазы роста. В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на агаризированной среде, содержащей мясо-пептонный бульон и сусло в отношении 1:1 (БСА). Бактерии со скошенного агара переносили петлей в пробирку с физиологическим раствором. Плотность инокулята каждого из диссоциантов во всех опытах выравнивали по нефелометру или по стандарту мутности до содержания клеток 10^9 в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3% об.

Во время проведения эксперимента проводили измерения оптической плотности культуры, уровня кислотности, отмечали появление в монокультурах клеток других диссоциантов, а также в некоторых из опытов определяли уровень питательных веществ в среде в процессе культивирования. Пробы отбирали в начале опыта, через 14-16 часов, затем каждые 4-6 часов, пока культура не достигала стационарной стадии. Для измерения pH среды использовали микропотенциометр Checker фирмы “HANNA Instruments”. Глюкозу определяли с помощью трифенилтетразолия хлорида [6], азот – с сульфифеноловым реактивом [7], фосфор – методом Пануша [8].

Рост бактерий оценивали нефелометрически по клеточной плотности культуры. Измерения проводили на ФЭК 56 М (светофильтр № 6, зеленый, максимум пропускания 540 нм) в кювете с длиной оптического пути 0.5 см. При слабом росте бактерий использовали кювету с длиной пути 2 см, с последую-

щим пересчетом полученных данных. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100.

Для определения количества клеток в культуре на стационарной стадии развития для каждого диссоцианта был получен коэффициент, связывающий оптическую плотность с численностью. С помощью люминесцентной микроскопии на фиксированных препаратах считали количество бактерий в суспензии известной оптической плотности. Для этого 48-часовые культуры R- и S-диссоциантов, выросших на исходной среде, разводили в 100 и 10 000 раз, а 24-часовую культуру M-диссоцианта в 10 и 100 раз. Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (светофильтр Ж-С –19, окуляр х 4, объектив х 90 Л). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 мл исходной суспензии вычисляли по формуле

$$N = \frac{4an}{S} \cdot 10^{10},$$

где N – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее число клеток в поле зрения; S – площадь поля зрения (10 000 мкм²); n – показатель разведения [9].

В результате были получены следующие коэффициенты перевода оптической плотности в количество клеток: для R-диссоцианта – 10^8 кл/мл·ед.неф.х100, для S-диссоцианта – $0.3 \cdot 10^8$ кл/мл·ед.неф.х100, для M-диссоцианта – $0.17 \cdot 10^8$ кл/мл·ед.неф.х100.

Соотношение диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний при рассеивании клеточной суспензии на БСА.

Потребности в источниках питания рассчитывали по формуле $q_i^L = \frac{\Delta L}{\Delta n_i}$,

где ΔL – количество потребленного из среды вещества, L – компонент питания, Δn_i – количество вновь образовавшихся клеток за тот же период времени, индекс i характеризует диссоциант. Для расчетов средних значений потребностей и доверительных интервалов применялось стандартное приложение Microsoft Excel 7.0 (анализ – описательная статистика).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным опытов, в динамике которых определяли концентрации питательных веществ, потребности рассчитывали, исходя из соответствующих измерений величин ΔL и Δn_i . В большинстве экспериментов химическое определе-

ние концентраций питательных веществ в динамике культивирования не проводили. Поэтому для определения количества потребленного ресурса, используемого при расчетах потребностей, руководствовались следующим: если остановка роста произошла по причине истощения 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. Итак, для расчета потребностей необходимо выполнение следующих условий:

1. Число выросших клеток следует определять в стационарной фазе роста.
2. Остановка роста (достижение стационарной стадии) должна быть обусловлена истощением в среде одного из изучаемых ресурсов.
3. Из ряда косвенных соображений, изложенных ниже, должно быть известно, какой именно ресурс полностью истощен, т.е. является лимитирующим.

Диктуемая названными условиями экспериментальная задача состояла в необходимости зафиксировать достижение стационарной стадии. Для этого измерения оптической плотности проводили с интервалом в несколько часов в течение двух – двух с половиной суток.

Задача анализа полученных данных состояла в выявлении лимитирующего роста ресурса. Для ее решения были применены три подхода. Первый основан на априорном представлении о том, какой питательный компонент мог бы ограничивать рост культуры на среде с заданным составом. Исходную (указанную в разделе о методике) среду, исходя из опыта культивирования *P.aeruginosa*, принимали за сбалансированную. А среду, где содержание некоторого ресурса было снижено по сравнению с исходной (в два и более раз), считали лимитированной по этому ресурсу. Второй путь – проверка пропорциональности оптической плотности культуры в стационарной фазе начальному количеству ресурса в среде в серии опытов с различными начальными содержаниями ресурса. При этом одна из сред в серии согласно первому подходу могла быть признана лимитирующей по рассматриваемому ресурсу. Третий подход основан на методе добавок. В некоторых опытах в предполагаемый момент достижения стационарной фазы культуру разделяли на четыре части. В три из них вносили добавки – глюкозу, нитрат или фосфат, – четвертую оставляли без изменений. Культуру ос-

тавляли расти еще четыре часа, затем проводили измерение оптической плотности. Возобновление роста после добавки ресурса принимали за экспериментальное доказательство его лимитирующей роли.

Были проведены 26 опытов с культурой R-диссоцианта, 34 опыта с S-диссоциантом, 28 – с M-диссоциантом. В табл.1 приведены уровни содержания питательных веществ в начале эксперимента (в расчете на элемент), значения оптической плотности культуры (показания нефелометра, умноженные на 100) и уровня pH в стационарной фазе роста (или в конечный момент культивирования). Упомянутая в предыдущем абзаце исходная среда в табл.1 приведена под номером 1. В последующих средах постепенно снижали начальные концентрации основных питательных веществ, что позволяло считать их лимитированными по соответствующему ресурсу. По данным табл.1 судили о наличии пропорциональности оптической плотности культуры начальному количеству ресурса в среде. Среда, при культивировании на которых применяли метод добавок, отмечены символом "*". Необходимо отметить ряд причин, по которым часть экспериментальных данных исключали из дальнейшего рассмотрения:

1. Не во всех опытах конечный момент культивирования соответствовал стационарной стадии (это означает, что культура не достигла максимально возможной на данной среде численности клеток).
2. В некоторых экспериментах в процессе культивирования вместо исходной монокультуры возникала смесь диссоциантов [10] (эти данные не подходят для определения потребностей, поскольку по ним невозможно определить в каком количестве потребляются ресурсы каждым из диссоциантов).

В результате проведенного анализа были выбраны данные нескольких опытов, по которым можно рассчитывать потребности. Рассчитанные по результатам этих экспериментов значения потребностей приведены в табл.2. Полученные значения потребностей были усреднены, для средних были рассчитаны 95%-е доверительные интервалы (табл.3).

В конце 2002 г. – начале 2003 г. на основе рассчитанных потребностей (табл.3) была составлена сбалансированная среда (0.225% глюкозы, 0.03% нитратов и 0.004% фосфатов), на которой были проведены дополнительные опыты по культивированию R- и S-диссоциантов (без применения метода добавок) для экспериментальной проверки полученных величин. По данным указанного опыта были получены следующие значения потребностей: в углероде – $122 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $345 \cdot 10^{-12}$ мг/кл для R- и S-диссоцианта соответственно; в азоте –

$5.75 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $24 \cdot 10^{-12}$ мг/кл; в фосфоре – $0.85 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $3.5 \cdot 10^{-12}$ мг/кл. Сравнение приведенных величин потребностей со значениями в табл.3 показывает их близость в пределах погрешностей определения.

Отметим, что ранее были получены оценки потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах на основе данных 1997-1999 гг. [11]. Однако, при расчетах этих значений для перевода оптической плотности в численность для всех диссоциантов использовался один и тот же коэффициент. В работе было высказано намерение осуществить "дифференцированную калибровку" показаний нефелометра для каждого из диссоциантов, что и проделано в настоящем исследовании. Уточненные значения потребностей в расчете на элемент содержатся в табл.4. Как видно из сравнения представленных в данной работе величин потребностей и опубликованных раньше, имеет место их взаимное соответствие (с учетом погрешностей вычислений, которые достигают 50% [11], за исключением значений потребностей М-диссоцианта. Это различие можно объяснить следующим обстоятельством. В опытах 1997-1999 гг. наблюдался очень плохой рост указанного диссоцианта. Так, оптические плотности, которых достигала М-культура в прежних и нынешних опытах, примерно одинаковые, а содержание ресурсов в средах опытов 1997-1999 гг. было в 5-10 раз выше. И наоборот, при одинаковом содержании питательных веществ в более поздних опытах оптическая плотность достигала значений в несколько раз превышающих уровень ранних экспериментов. Вероятно, остановка роста культуры М-диссоцианта в ранних опытах связана с образованием клетками из глюкозы муравьиной кислоты и, как следствие, снижением уровня кислотности среды (указанная особенность клеток М-диссоцианта была обнаружена позднее [5]. Итак, можно сделать вывод о том, что в экспериментах 1997-1999 гг. остановка роста М-диссоцианта происходила по причине, не связанной с исчерпанием ресурса из среды, и предположение о том, что ресурсы были полностью потреблены из среды, было неверным, а рассчитанные величины потребностей оказались завышенными.

Авторы выражают глубокую благодарность Л.М.Полянской за помощь в проведении люминесцентной микроскопии, а так же Н.Г.Булгакову за плодотворные обсуждения материалов и помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 02-04-48085 и 03-04-06044).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142 с.
2. Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5. С. 352 – 356.
3. Милько Е.С. Выживаемость диссоциантов углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* при хранении // Микробиология. 1998. Т. 67. № 1. С. 102 – 105.
4. Милько Е.С., Никитенко Л.А. Влияние физических и химических факторов среды на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 2. С. 171 – 174.
5. Милько Е.С., Красильникова Е.Н. Особенности углеводного метаболизма R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 211 – 214.
6. Химия углеводов. / Под ред. Н.К.Кочеткова и др. М.: Изд-во Химия, 1967. 671 с.
7. Поляков Г. Пособие по гидрохимии для рыбоводов. М.: Пищепромиздат, 1950. 88 с.
8. Малый практикум по биохимии. / Под ред. проф. В.В. Юркевича. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. 209 с.
9. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под. ред. Д.Г.Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
10. Милько Е.С., Опарина И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов в среде на динамику роста и состав популяции R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004 (в печати).
11. Максимов В.Н., Милько Е.С., Левич А.П. Потребности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах. Лимитирующие рост концентрации веществ при культивировании без пополнения запаса ресурсов // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 607 – 612.

Таблица 1. Начальный состав сред по углероду, азоту и фосфору, оптическая плотность культуры в единицах нефелометра, умноженных на 100, и уровень кислотности среды (pH) на стационарной стадии роста или в конце опыта. Символом "*" отмечены среды, при культивировании на которых применяли метод добавок

R-диссоциант					
номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (x100)	pH
	углерод	азот	фосфор		
1.	7.98	1.81	0.11	473	
2.	4	0.9	0.056	430	
3.	4	0.9	0.056	342	8.5
4.	7.8	0.72	0.056	224	7.3
5.	7.8	0.72	0.056	276	8
6.	7.8	0.9	0.056	249	7.7
7*.	0.78	0.4	0.028	87	8.8
8*.	3.18	0.1	0.028	89	4.1
9*.	3.18	0.4	0.007	95	4
10*.	0.282	0.1	0.008	21	8.4
11*.	1.6	0.03	0.008	37	4.4
12*.	1.6	0.1	0.002	26	4.1
13.	0.4	0.035	0.01	31	8.1
14.	1.62	0.14	0.04	120	7.5
15.	0.4	0.015	0.01	22	6.8
16.	1.6	0.06	0.04	110	7.6
17.	0.12	0.035	0.01	17	7.1
18.	0.48	0.14	0.04	31	7.2
19.	0.12	0.015	0.01	14	7.5
20.	0.48	0.06	0.04	52	8.4
21.	0.78	0.1	0.01	63	8.8
22.	3.24	0.4	0.04	200	5.3
23.	1.6	0.2	0.01	120	7.6
24.	6	0.8	0.04	225	8.4
25.	1.2	0.035	0.01	49	7.1
26.	4.8	0.14	0.04	100	4.1

Таблица 1. Продолжение

S-диссоциант					
номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (x100)	pH
	углерод	азот	фосфор		
1.	7.98	1.81	0.11	400	
2.	7.98	1.81	0.11	372	
3.	4	0.9	0.056	376	
4.	4	0.9	0.056	334	7.7
5.	7.98	0.72	0.056	350	6.7
6.	7.98	0.72	0.056	340	6.2
7.	7.98	0.9	0.056	320	8.6
8.	7.98	0.9	0.056	243	4.4
9*.	0.78	0.4	0.028	51	8.8
10*.	0.78	0.4	0.028	74	8
11*.	3.18	0.1	0.028	111	4
12*.	3.18	0.1	0.028	109	4
13*.	3.18	0.4	0.007	106	3.7
14*.	3.18	0.4	0.007	90	3.6
15*.	0.282	0.1	0.008	22	8.3
16*.	0.78	0.03	0.008	60	7.4
17*.	0.78	0.1	0.002	34	6.6
18*.	0.282	0.1	0.008	25	8.2
19*.	0.78	0.03	0.008	63	7.3
20*.	0.78	0.1	0.002	30	6.6
21.	0.4	0.035	0.01	30	8.4
22.	1.62	0.14	0.04	123	8.7
23.	0.4	0.015	0.01	28	7.6
24.	1.6	0.06	0.04	136	8.8
25.	0.12	0.035	0.01	9	7.7
26.	0.48	0.14	0.04	30	6.9
27.	0.12	0.015	0.01	14	8.2
28.	0.48	0.06	0.04	52	8
29.	0.78	0.1	0.01	74	8.2
30.	3.24	0.4	0.04	177	8.3
31.	1.6	0.2	0.01	99	8.6
32.	6	0.8	0.04	220	8.9
33.	1.2	0.035	0.01	68	7.3
34.	4.8	0.14	0.04	160	3.2

Таблица 1. Продолжение

М-диссоциант					
номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (x100)	pH
	углерод	азот	фосфор		
1.	4	0.9	0.056	72	3.3
2.	4	0.9	0.056	75	3.3
3.	1.62	0.9	0.056	86	5.5
4.	1.62	0.9	0.056	76	3.5
5.	7.8	0.2	0.056	37	4
6.	7.8	0.2	0.056	42	3.9
7.	7.8	0.9	0.01	67	4.1
8.	7.8	0.9	0.01	44	4.2
9*.	0.78	0.4	0.028	111	8.5
10*.	3.18	0.1	0.028	95	4.1
11*.	3.18	0.4	0.007	77	3.8
12*.	0.282	0.1	0.008	27	8.3
13*.	0.78	0.03	0.008	58	7.4
14*.	0.78	0.1	0.002	31	3.4
15.	0.4	0.035	0.01	31	8.5
16.	1.62	0.14	0.04	109	8.3
17.	0.4	0.015	0.01	29	7.7
18.	1.6	0.06	0.04	129	8.8
19.	0.12	0.035	0.01	10	8.5
20.	0.48	0.14	0.04	35	7.3
21.	0.12	0.015	0.01	15	7
22.	0.48	0.06	0.04	69	8.6
23.	0.78	0.1	0.01	71	8.8
24.	3.24	0.4	0.04	142	3.3
25.	1.6	0.2	0.01	90	7.8
26.	6	0.8	0.04	220	8.8
27.	1.2	0.035	0.01	69	7.2
28.	4.8	0.14	0.04	155	3.1

Таблица 2. Значения потребностей диссоциантов (10^{-12} мг/кл), рассчитанные по данным экспериментов. Обозначение: q_i^L – потребность диссоцианта i в ресурсе L ; номера сред соответствуют номерам сред из табл.1

R-диссоциант			
номер среды	q_R^C	q_R^N	q_R^P
2.	96		0.7
3.	120		
4.	156		
6.			1.8
7.	90		
10.	148		1.2
11.		8	1.1
12.			0.8
14.	144		
15.		6	
18.	156		
21.	120		
22.			2
24.			1.8
25.		7	

S-диссоциант			
номер среды	q_S^C	q_S^N	q_S^P
3.	342		2.3
4.	384		5.6
5.			5.1
6.	384		3.1
7.	432		6.5
9.	540		
10.	384		
15.	433		
16.		19	
17.			2
18.	381		
19.		18	
20.	243		2
23.		18	
24.		15	
25.	450		
28.	348		
29.	384		
30.	612		
32.			6

M-диссоциант			
номер среды	q_M^C	q_M^N	q_M^P
1.			4.2
2.	630		3.2
7.	384		9
9.	432		
11.			5.3
12.	642		
13.		31	
14.			4
17.		32	
18.		28	
21.	480		
22.	420		
23.	684		
25.			6.7
26.			10.6
27.		31	

Таблица 3. Средние значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом 95% - х доверительных интервалов

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	129 ± 22	7.0 ± 2.5	1.0 ± 0.5
S	409 ± 55	17.5 ± 3.0	4.0 ± 1.5
M	525 ± 114	31 ± 3	6.0 ± 2.5

Таблица 4. Ранее полученные значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом погрешностей

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	110 ± 8	8.5 ± 3.1	1.0 ± 0.3
S	366 ± 23	38.3 ± 10.3	3.8 ± 1.0
M	1706 ± 941	144.0 ± 63.5	11.8 ± 5.8

Calculation of *Pseudomonas aeruginosa* dissociants requirements in carbon, nitrogen and phosphorus

P.V. Fursova, E.S. Mil'ko, I.A. Oparina, V.N. Maksimov, A.P. Levich

Moscow State University

The quantitative data on microorganisms requirements, which are necessary for forecasting bacterial community behavior depending on cultivation conditions and for management of its structure are received. R-, S- and M- *Pseudomonas aeruginosa* dissociants requirements in carbon, nitrogen and phosphorus are calculated on the data of 88 experiences on cultivation of bacteria monocultures. As distinct from early researches the translation of optical density of culture to cells amount factors are found for each dissociant; the stationary phase of growth achievement is fixed; the change of dissociant structure of cultures on a stationary phase is checked up; the resources limiting growth are revealed. The comparison of the received requirement meanings and other experiments is carried out.

Key words: dissociation, *Pseudomonas aeruginosa*, basic resources requirement.

Сведения об авторах.

Фурсова Полина Викторовна
аспирантка кафедры общей экологии
Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет,
каф. общей экологии
Тел.: 939-55-60
e-mail: polina_fursova@mail.ru

Милько Елена Серафимовна
к.б.н.
старший научный сотрудник кафедры микробиологии

Опарина Ирина Алексеевна
аспирантка кафедры общей экологии

Максимов Виктор Николаевич
профессор д.б.н.
заведующий кафедрой общей экологии

Левич Александр Петрович
д.б.н.
ведущий научный сотрудник кафедры общей экологии