

рено 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.

Объектом работы были 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 плейотропным 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 биотехнологических 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 для расчетов были использованы данные наших с соавторами экспериментов: 152 эксперимента по выращиванию монокультур и 77 – смешанных (попарных комбинаций диссоциантов и смеси всех трех) (Милько, Ильных, 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 расеевом 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 ограничивает развитие 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 взаимонезаменяемых ресурсов, может быть описана решением следующей вариационной задачи на условный экстремум (Levich, 2000; Левич, 1982; Левич и др., 1994; 1997; Левич, Алексеев, 1997):

$$H(n_1, \dots, n_w) = \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) \ln \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) - \sum_{i=1}^w n_i \ln n_i \rightarrow \text{extr};$$

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^w q_i^k n_i \leq L^k, k = \overline{1, m}; \\ n_i > 0, i = \overline{1, w} \end{cases}$$

Зарез
крася
сильнок

Здесь n_i – искомая численность каждой из групп клеток сообщества на стационарной стадии роста; q_i^k – потребляемое из среды количество k -го ресурса, необходимое для деления клетки группы i , в расчете на одну клетку, или потребность организма группы i в ресурсе k (предполагается выполнение равенства $\text{rank} q_i^k = \min(m; w)$, что обеспечивает различимость групп клеток); 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. 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 вариационной 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 ограничивающих рост ресурсов L^k ($k \in J$), которые образуют совокупность \vec{L}^J (J – множе-

ство 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

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

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). Тангенсы угла наклона прямых, ограничивающих области лимитирования, задаются следующим образом: $\nu = \nu(q_i^k) =$

$$= \frac{q_1^1 x_0^{q_1^1} + q_2^1 x_0^{q_2^1}}{q_1^2 x_0^{q_1^2} + q_2^2 x_0^{q_2^2}}, \quad \eta = \eta(q_i^k) = \frac{q_1^1 y_0^{q_1^1} + q_2^1 y_0^{q_2^1}}{q_1^2 y_0^{q_1^2} + q_2^2 y_0^{q_2^2}},$$

где x_0 – корень уравнения $x^{q_1^1} + x^{q_2^1} = 1$, 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 равно 1, 2 или 3) относительные численности диссоциантов на стац-

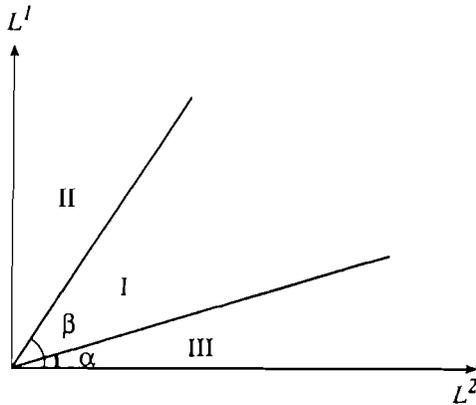


Рис. 1. Стратификация пространства двух потребляемых ресурсов. В области I лимитируют оба фактора, в II – L^1 , в III – L^2 .

на ранней стадии роста задаются выражениями $\frac{n_1}{n} = \frac{n_2}{n} = \frac{n_3}{n} = x_0$, где x_0 – корень уравнения $x_0^{q_1} + x_0^{q_2} + x_0^{q_3} = 1$. Аналогично, для культуры, состоящей из двух групп организмов, доли задаются выражениями $\frac{n_1}{n} = x_0^{q_1}$, $\frac{n_2}{n} = x_0^{q_2}$, причем $x_0^{q_1} + x_0^{q_2} = 1$.

Для численных расчетов и был использован математический пакет Mathcad.

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 позволил сделать следующие выводы. Наименьшие изменения показателей оценки чувствительности происходили в областях однофакторного лимитирования. Относительная величина отклонения значений обилий групп не превышала относительной величины изменения параметра. Исключение составляли случаи, когда колебание значения потребности вызывало 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 ресурса, необходимое для роста вида, в расчете на одну клетку. Таким образом, получить соответствующие величины потребностей диссоциантов в источниках питания можно по формуле $q_i^L = \frac{\Delta L}{\Delta n_i}$, 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.

Потребности R-, S- и M-диссоциантов бактерий *P. aeruginosa* определяли по результатам анализа данных экспериментов с монокультурами (Фурсова и др., 2004а). Для расчетов потребности 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) и 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 в нем. Если остановка роста произошла по причине исчерпания некоторого питательного вещества, то его количество, потребленное культурой к концу роста, 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, т.е. 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.

О убрать касание 5

Выявление лимитирующих ресурсов. Согласно теореме стратификации (Левич и др., 1994), пространство Ω 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 принадлежит, 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 *P. aeruginosa* (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 были 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 ее бедности 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 ро-

Таблица 1. Средние значения потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре, $\times 10^{14}$ мг/кл. (с учетом 95%-ных доверительных интервалов)

Диссоциант	Ресурс		
	C	N	P
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 ± 3.0	6.0 ± 2.5

ста фосфором. Несмотря на снижение относительного содержания фосфатов, полного исчерпания этого ресурса не происходило. Анализ данных по культивированию сообществ диссоциантов в этой серии опытов 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).) Возможно, существенное значение имела бедность сред с заданным лимитированием (в опытах на 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 пересмотрены 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). Таким образом,

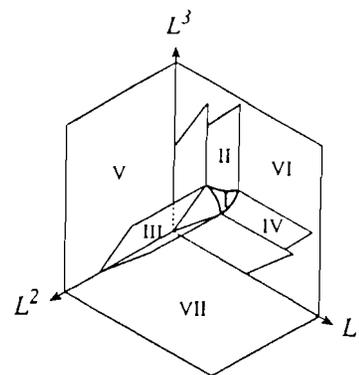


Рис. 2. Стратификация пространства трех потребляемых ресурсов. В области I лимитируют все три ресурса, в II – L^1 и L^2 , в III – L^1 и L^3 , в IV – L^2 и L^3 , в V – L^1 , в VI – L^2 , в VII – L^3 . $\text{tg } \alpha = \nu$; $\text{tg } \beta = \eta$.

к рис. 1

Таблица 2. Оптическая плотность монокультур после добавки питательных веществ, %

Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
C	C	121	220	110
	N	91	102	96
N	C			101
	N			131
C	C			117
	N			119
C	C	220	140	217
	N	97	80	74
C	C		227	
	N		73	
N	C	93		
	N	93		
C	C	94	62	100
	N	95	100	68
N	C	95	100	90
	N	143	112	100
C	C		122	160
	N		100	90
C	C	212		97
	N	162		66
C	C	129	129	143
	N	86	100	86
C	C	131	101	119
	N	76	68	81
C	C			112
	N			91
C	C	246	171	184
	N	103	76	92
C	CN1	195	140	163
	C	213	213	222
C	N	104	100	110
	CN	204	178	208
C	C1	223	209	212
	N1	100	120	120
CN	CN1	223	219	194
	C	105		
CN	N	105		
	CN	86		
CN	C1	104		
	N1	82		
CN	CN1	168		
	C	135	149	178
CN	N	91	102	104
	CN	214	202	216
CN	C1	135	153	158
	N1	100	104	92
CN	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.).

по данным двух экспериментальных этапов и с учетом гипотезы о неоднократном обращении фосфора в 83% случаев теоретические и опытные данные совпадают. Несовпадения 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.

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 составом среды, принадлежат стратам с однофакторным лимитированием и 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 единицы, 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 предсказанной моделью состав поликультур отличался от экспериментального менее, чем на 15%. Наибольшее отклонение расчетных значений от опытных составляла 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 сравнение расчетного и экспериментального состава культур по всем проведенным опытам дало следующие результаты (табл. 4). В 7 из 45 экспериментов разница в долях диссоциантов составляла 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 была 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) (Левис и др., 1997; Levich, 2000). На рис. 3 представлены относительные численности видов p_i , $x_i = \overline{1, 4}$ для

Таблица 3. Оптическая плотность смешанных культур после добавки питательных веществ, %

Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	RS	RM	SM	RSM
C	C		82	89	87
	N		59	84	98
N	C	92	96	104	96
	N	104	104	116	128
C	C	142	160	160	150
	N	75	100	90	71
C	C			121	
	N			79	
C	C	120	120		113
	N	100	93		75
C	C	103	143		
	N	81	102		
C	C	103	109		129
	N	88	81		91
C	C	220	200	194	254
	N	98	94	98	114
	CN	202	198	214	237
	CI	204	227	276	254
C	NI	110	114	94	116
	CN1	212	227	270	237
	C		233		
	N		102		
	CN		246		
C	CI		200		
	CN1		173		
	C				222
	N				100
	CN				222
CN	CI				256
	NI				113
	CN1				220
	C	102	99	77	126
	N	116	81	87	93
CN	CN	116	157	107	137
	CI	111	104	103	86
	NI	96	68	91	89
	CN1	113	157	125	200
	C	100	108	116	142
CN	N	90	92	110	102
	CN	104	125	127	205
	CI	90	98	112	142
	NI	92	92	102	98
	CN1	170	163	163	193

Таблица 4. Состав смешанных культур на стационарной стадии роста, %

Культура	В эксперименте	Расчетный
RS	67 : 33	69 : 31
SM	66 : 34	54 : 46
RS	62 : 38	65 : 35
RM	71 : 29	74 : 26
SM	50 : 50	60 : 40
RSM	43 : 41 : 16	60 : 29 : 11
RS	70 : 30	69 : 31
SM	50 : 50	54 : 46
RSM	67 : 11 : 22	62 : 23 : 15
RSM	58 : 18 : 24	62 : 23 : 15
RM	60 : 40	73 : 27
SM	42 : 58	54 : 46
RS	61 : 39	69 : 31
RM	62 : 38	73 : 27
SM	50 : 50	54 : 46
RSM	62 : 32 : 6	62 : 23 : 15
RM	78 : 22	73 : 27
SM	43 : 57	54 : 46
RSM	68 : 17 : 15	62 : 23 : 15
RS	79 : 21	69 : 31
RM	87 : 13	73 : 27
SM	52 : 48	54 : 46
RSM	75 : 12 : 13	62 : 23 : 15
RSM	68 : 19 : 13	62 : 23 : 15
RS	60 : 40	67 : 33
RS	70 : 30	65 : 35
RM	80 : 20	74 : 26
RSM	45 : 31 : 24	60 : 29 : 11
RSM	65 : 19 : 16	60 : 29 : 11
RM	75 : 25	74 : 26
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
RS	35 : 65	67 : 33
RM	54 : 46	73 : 27
SM	65 : 35	57 : 43
RSM	56 : 24 : 20	61 : 26 : 13
RS	67 : 33	67 : 33
RM		73 : 27
SM	62 : 38	57 : 43
RSM	76 : 9 : 15	61 : 26 : 13

следующих экспериментальных значений потребностей, 10^{-9} мг/кл.):

$$q_1^N = 3.94; q_2^N = 0.91; q_3^N = 0.41; q_4^N = 0.41; H_{1.69}$$

$$q_1^P = 0.79; q_2^P = 0.28; q_3^P = 0.22; q_4^P = 0.21.$$

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. 4.

Отметим еще одно свойство вариационной задачи, имеющее отношение к управлению (или регулированию) составом сообщества: относительная численность заданного вида принимает наибольшее значение при соотношении в среде ресурсов, равном отношению 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. 4). 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 растительноядных рыб в рыбоводных хозяйствах, в задачах ликвидации последствий эвтрофирования водоемов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе описан 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.

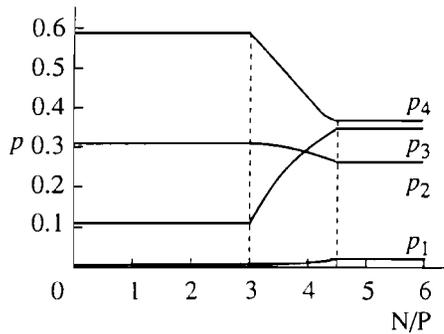


Рис. 3. Относительные численности видов (ось ординат) p_i , $i = \overline{1, 4}$ для экспериментальных потребностей как функции от N/P (Левич и др., 1997).

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.

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 прогноз стационарного состояния, 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 с помощью вариационных методов для расчета численностей 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 помо-

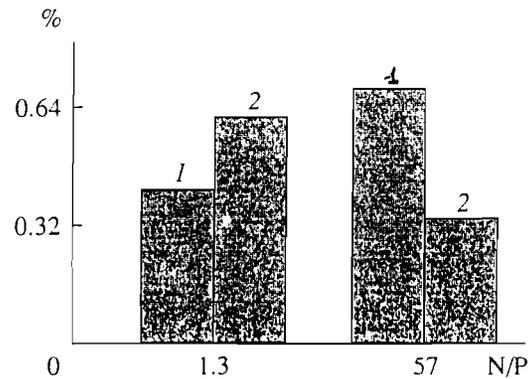


Рис. 4. Зависимость относительных численностей видов от отношения азота к фосфору в лабораторных экспериментах с двухвидовыми культурами: 1 – *S. quadricauda*, 2 – *A. falcatus* (Левич и др., 1997). По оси абсцисс – отношение азота к фосфору; по оси ординат – относительная численность вида, %.

щью 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).

Вариационное моделирование нашло свое применение в различных областях биологии, однако, несмотря на ряд достоинств, по-прежнему остается мало востребованным. 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).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. Учеб. 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. Учеб. 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 пониженных концентраций углерода, азота и фосфора в среде на динамику роста трех диссоциантов *Ps. aeruginosa* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 607–610.
- Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов на динамику роста и состав популяции R-, S- и M-диссоциантов *Ps. aeruginosa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 37–44.
- Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5. С. 352–356.
- Мордехова 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.
- Фурсова П.В. Потребности в глюкозе, нитратах, фосфатах и их вариации в анализе смешанной культуры диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Изв. РАН. 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 И.А. 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* // Вестн. 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 // Arch. 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 II. 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.

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.