

УДК: 576.8: 577.3

## О математическом моделировании эволюционных процессов в мире микробов

Апонин Ю.М.\* , Апонина Е.А.

*Институт математических проблем биологии, Российская академия наук, Пущино,  
Московская область, 142290, Россия*

**Аннотация.** Обсуждается концепция мира микробов как базовой, относительно обособленной и быстро эволюционирующей подсистемы биосферы. Рассматривается обобщённая математическая модель эволюции микробных популяций на протоке. Даётся краткий обзор результатов исследования некоторых частных случаев обобщённой модели эволюции методом параметрических и фазовых портретов.

**Ключевые слова:** эволюция, математическая модель, дифференциальные уравнения, мир микробов, проточное культивирование.

### ВВЕДЕНИЕ

В течение последних нескольких десятилетий непрерывно возрастает интерес к практическому использованию микроорганизмов человеком. Методы геной инженерии позволяют создавать генетически изменённые микроорганизмы с повышенной эффективностью их использования в сельскохозяйственном производстве, в биоэнергетике, в микробиологической, пищевой и медицинской промышленности [1-3]. Однако мир микробов чрезвычайно динамичен, он эволюционирует. Эволюционируют и популяции генетически модифицированных микроорганизмов, теряя свои полезные свойства в ходе их практического применения.

Поэтому разработка современных микробиологических технологий в значительной степени связана с решением целого ряда проблем управления эволюцией микробных популяций и микробных сообществ, например, с целью длительного поддержания генноинженерных штаммов, обеспечивающих сверхсинтез полезного продукта.

Проблемы управляемой человеком эволюции актуальны и для медицины в связи с разработкой динамических стратегий приёма лекарств с целью подавления некоторых инфекций, например, ВИЧ-инфекции.

При решении такого рода проблем управления важную роль играет математическое моделирование эволюционных процессов в мире микробов. Математические модели эволюции позволяют, например, рассчитывать область устойчивости высокопродуктивных генноинженерных штаммов, т. е. область значений управляемых параметров непрерывнопроточного культивирования, при которых данный штамм поддерживается на протоке достаточно долгое время и обеспечивает высокий уровень продуктивности биотехнологического процесса [4].

Кроме того, математическое моделирование эволюции микробных популяций и микробных сообществ становится сегодня необходимой составляющей современной глобальной экологии.

---

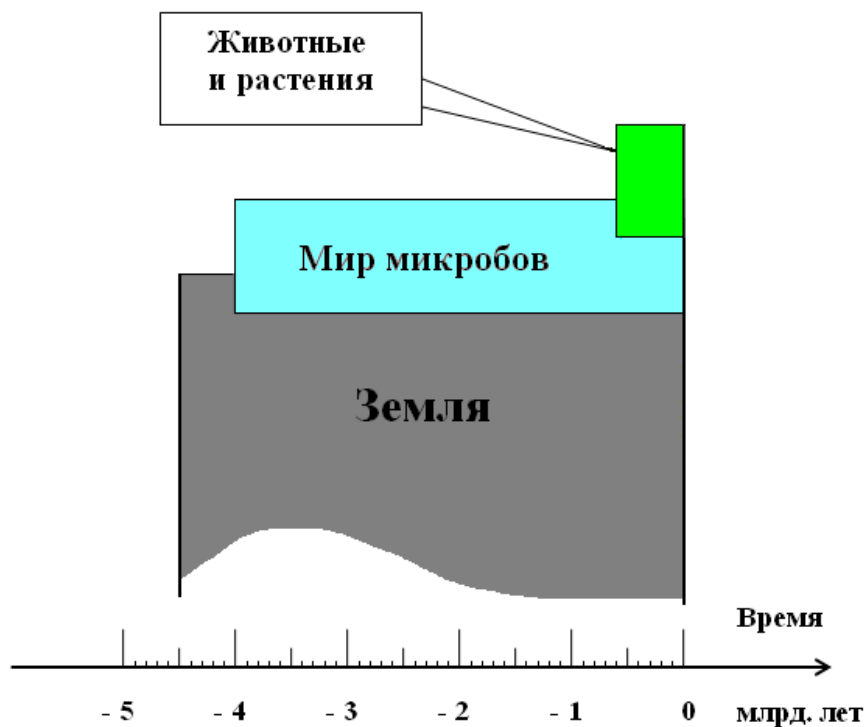
\*[yuma@impb.psn.ru](mailto:yuma@impb.psn.ru)

## 1. МИР МИКРОБОВ КАК БАЗОВАЯ И БЫСТРО ЭВОЛЮЦИОНИРУЮЩАЯ ПОДСИСТЕМА БИОСФЕРЫ

Выдающийся французский микробиолог Луи Пастер говорил, что «микробы – бесконечно малые существа, играющие в природе бесконечно большую роль». Однако «важность микроорганизмов для поддержания биосферы долгое время недооценивали, полагая, что при своих малых размерах они не могут оказывать существенного влияния на экологические системы. По современным представлениям биомасса прокариот составляет существенную часть живой биомассы на Земле и им принадлежит фундаментальная роль в превращениях органических и неорганических соединений в окружающей среде» [2].

В последнее время становится ясно, что эволюционные процессы в мире микробов играют очень важную роль в функционировании и развитии экологических систем, да и всей биосферы. В ходе эволюции «одноклеточные организмы, вроде бактерий и простейших, столь успешно адаптировались к разнообразным условиям среды, что составляют более половины всей биомассы Земли» [2]. Само существование современной биосферы, её эволюцию невозможно понять без понимания сравнительно быстрых эволюционных процессов, происходящих в мире микробов. «История биосферы – это в подавляющей степени история микробов и того, как они создавали биосферу, в которой появились более сложно организованные существа» [5].

Согласно современным представлениям наша Земля как небесное тело существует примерно 4.5 млрд. лет, и около 4 млрд. лет на ней существует жизнь [6]. Однако первые 3.4 млрд. лет существования жизни она была представлена только в виде микроорганизмов. Это был мир микробов, микробная биосфера (рис.1). И только около 0.6 млрд. лет тому назад на Земле стали формироваться тканевые многоклеточные организмы и началась эволюция многоклеточных существ [7]. Возник новый мир многоклеточных животных и растений (рис. 1).



**Рис. 1.** Предельно упрощённая схема «аддитивной эволюции» [8] жизни на Земле. Более детальная схема представлена на стр. 107 книги [8].

Но этот новый мир многоклеточной жизни не отменил, не перечеркнул существование микробного мира и не отделился, не обособился от него. Напротив, он погрузился в него, врос, встроился, вписался в созданную микробами биосферу. И вплоть до наших дней этот мир многоклеточных существует и развивается как весьма тонкая и уязвимая надстройка над более фундаментальной микробной составляющей современной биосферы.

Фундаментальную роль мира микробов в обеспечении существования многоклеточной жизни на Земле можно проследить и при изучении круговорота веществ в биосфере. На рис. 2 представлена предельно упрощённая схема глобального биотического круговорота. Центральным ядром этой схемы является замкнутый контур потоков вещества, связанных с деятельностью микроорганизмов (жирные стрелки на рис. 2). Это базовый цикл биотического круговорота (микробный цикл), который сформировался на Земле задолго до появления многоклеточной жизни, т. е. ещё в эпоху микробной биосферы. Потоки вещества, связанные с деятельностью многоклеточных организмов (тонкие стрелки на рис. 2) образуют внешний контур биотического круговорота, который рассматривается как надстройка над базовым микробным циклом. Эта надстройка многоклеточной жизни стала формироваться на Земле около 0.6 млрд. лет назад.

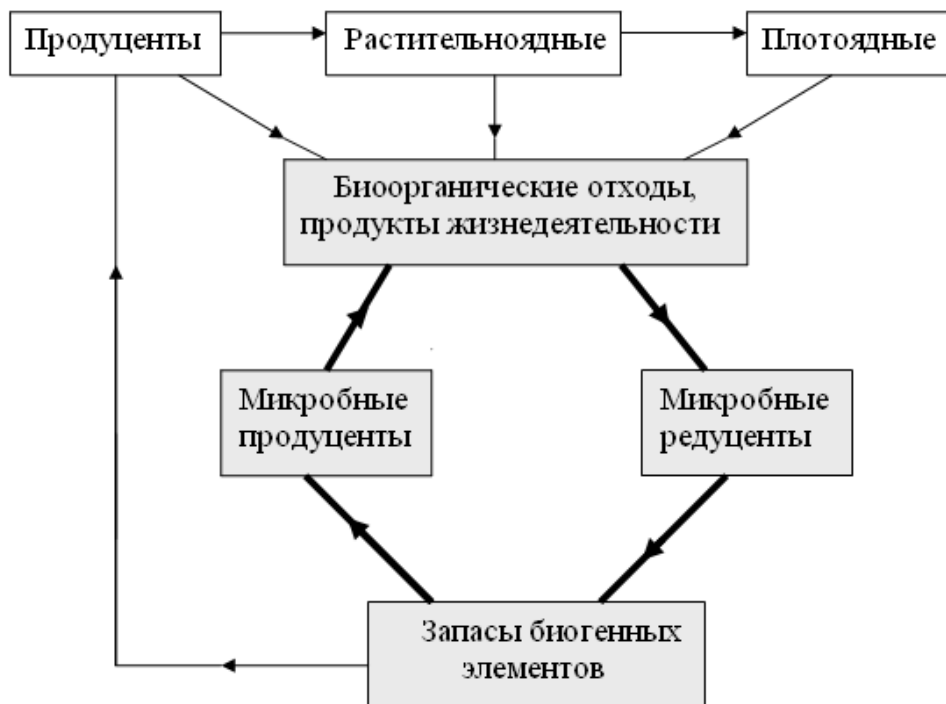


Рис. 2. Упрощённая схема глобального биотического круговорота.

Для существования биосферы ключевым звеном является звено микробных редуцентов. Уничтожение этого звена повлекло бы за собой цепь событий, в результате которых погибла бы вся надстройка многоклеточной жизни, да и биосфера в целом. Поэтому микробный мир является необходимой составляющей биосферы, её базой, основанием, её фундаментом. Этот микробиологический фундамент может существовать без надстройки многоклеточных организмов, и долгое время существовал без неё. А вот существование надстройки без фундамента, очевидно, невозможно.

Многочисленные данные наблюдений и экспериментов подтверждают высокий уровень прочности микробного фундамента биосферы. В истории Земли не раз происходили резкие катастрофические изменения условий среды обитания, приводившие к почти полному уничтожению надстройки многоклеточных. Однако

биосфера в целом выживала, т. к. сохранялся её микробиологический фундамент, т. е. мир микробов. А затем на этом фундаменте возводились новые здания надстройки. Надстройки временами приходят и уходят, а микробиологический фундамент остаётся.

Однако, как показал анализ экспериментальных и математических моделей эволюции популяций микроорганизмов, и микробный фундамент биосферы не остаётся постоянным. В ответ на изменения среды обитания он эволюционирует, приспособляясь к новым условиям, причём эволюционирует намного быстрее, чем мир многоклеточных организмов.

Таким образом, мир микробов представляет собой быстро эволюционирующую подсистему биосферы, намного более быструю по сравнению с эволюцией в мире многоклеточных организмов. Поэтому при математическом моделировании коэволюции этих двух миров естественно использовать теорию сингулярно возмущённых дифференциальных уравнений и вытекающий из неё принцип разделения движений. Целый ряд таких моделей можно построить на основе концептуальной схемы рис. 2, её обобщений и уточнений. Эти модели должны описывать динамику таких макропеременных состояния биосферы, как биомассы микробных продуцентов и редуцентов, биомассы многоклеточных продуцентов и консументов, массы продуктов жизнедеятельности, запасы биогенных элементов и т. д. Однако в настоящее время наиболее хорошо разработаны математические модели эволюции микробных популяций на протоке.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ НА ПРОТОКЕ

Бактерии, самые древние обитатели Земли, являлись главными конструкторами биосферы в течение первых двух третей её существования, и остаются одним из основных факторов биосферной эволюции [5]. Идея использования популяций микроорганизмов как экспериментальных моделей для изучения закономерностей биологической эволюции впервые высказана ещё в 1900 г. голландским исследователем Бейеринком. Однако систематическое изучение эволюции микробных популяций в контролируемых лабораторных условиях началось лишь в середине XX в., после того как Моно, Новик и Сцилард разработали математическую теорию проточного культивирования микроорганизмов.

Системы проточного культивирования микроорганизмов с первых лет после их математического обоснования стали использоваться как лабораторные «эволюционные машины», удобные для изучения закономерностей эволюции как отдельных микробных популяций, так и сложных микробных сообществ с различными типами межпопуляционных отношений. При этом вместе с экспериментальным моделированием развивалось и математическое моделирование эволюционных процессов [9–11].

Одна из первых математических моделей эволюции бактериальных популяций, в которых учитывается мутационная изменчивость бактерий, построена в 1957 г. Мозером [12]. При построении модели Мозер основывался на результатах экспериментальной работы Новика и Сциларда [13]. В этой работе при хемостатном культивировании бактерий *E. coli* наблюдались следовавшие друг за другом «шаги эволюции» в виде серии перестроек генетической структуры популяции, вызванных появлением в культуре новых быстрорастущих мутантов. Предложенная Мозером математическая теория хорошо описывала полученные Новиком и Сцилардом экспериментальные данные. Эта теория получила развитие в ряде последующих работ, в которых предлагались её обобщения, применимые не только к хемостату, но и к другим системам проточного культивирования [9–11].

Однако быстрое развитие молекулярной генетики в течение 1960–1980 годов привело к открытию немутационной изменчивости бактериального генома, связанной с существованием подвижных генетических элементов в клетках бактерий (вирусной ДНК, плазмид, транспозонов, IS-элементов и др.). Оказалось, что геном бактериальной клетки может изменяться вследствие не столько мутаций генов, сколько утраты или добавления генетического материала. Например, утрачиваются гены, содержащиеся в плаزمидах, при появлении бесплазмидных дочерних клеток после деления материнской клетки, содержащей плазмиды. С другой стороны, число генов в бактериальной клетке может увеличиваться за счёт конъюгационного переноса плазмид или вследствие автономной репликации плазмид, существенно повышающей их копиюность в клетке. Адаптационная пластичность клеточного генома обеспечивается также мобильными IS-элементами, которые при своих перемещениях изменяют структуру генома, повышают частоту мутаций некоторых генов и влияют на механизмы регуляции их активности.

Обобщённые математические модели эволюции бактериальных популяций на протоке с учётом немутационной изменчивости генома построены в работах [14, 15].

### 3. ОБОБЩЁННАЯ МОДЕЛЬ ЭВОЛЮЦИИ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ НА ПРОТОКЕ

Проточное культивирование микроорганизмов осуществляется в специальных аппаратах – ферментерах. В зону развития микробной популяции непрерывно с постоянной скоростью  $\Phi$  (л/ч) подается свежая питательная среда, и одновременно с той же скоростью удаляется избыточная часть культуральной жидкости вместе с содержащимися в ней микроорганизмами. Объем  $V$  (л) культуральной жидкости в ферментере интенсивно перемешивается и остается постоянным. Компоненты питательной среды подбираются таким образом, что рост микроорганизмов лимитируется количеством только одного субстрата. Все остальные элементы питания подаются в избытке [9–12].

При длительном культивировании микроорганизмов на протоке начинает сказываться действие целого ряда известных факторов генетической изменчивости, например, спонтанных мутаций. Поэтому популяция микроорганизмов, даже если она изначально была генетически однородной, с течением времени неизбежно становится гетерогенной. В ней будут присутствовать клетки, которые могут существенно различаться по своим генотипам.

Пусть  $x_1, \dots, x_n$  – концентрации микробных клеток различных генетических вариантов, присутствующих в ферментере. Эти концентрации характеризуют генетическую структуру популяции. С течением времени они могут изменяться, и если при этом происходит изменение распределения частот различных генетических вариантов в популяции, то говорят об эволюции генетической структуры или о микроэволюции популяции [9, 10].

Многие математические модели эволюции микробных популяций на протоке (см., например, [4, 9–12, 14–20]) представляют собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) следующего вида:

$$\begin{cases} \dot{s} = D(s_0 - s) - l_1 \mu_1(s, x) x_1 - \dots - l_n \mu_n(s, x) x_n, \\ \dot{x}_i = [\mu_i(s, x) - D] x_i + f_i(s, x), \quad i = 1, \dots, n. \end{cases} \quad (1)$$

Здесь  $s$  и  $s_0$  – концентрации лимитирующего субстрата в ферментере и в свежей питательной среде, поступающей в ферментёр,  $D = \Phi / V$  – удельная скорость протока,  $l_i$  – стехиометрический коэффициент, характеризующий пищевые потребности генетического варианта  $i$ , а его удельная скорость роста обозначена через  $\mu_i = \mu_i(s, x)$ ;  $x = (x_1, \dots, x_n)$ . Точка над переменной означает дифференцирование по

времени  $t$ . Функции  $f_1, \dots, f_n$  определяются интенсивностью процессов генетической изменчивости микробной популяции, например, спонтанных мутаций.

Пусть  $R$  – множество вещественных чисел,  $R_+ = \{\lambda \in R \mid \lambda \geq 0\}$ ,  $K$  – неотрицательный ортант пространства переменных  $s$  и  $x$ :  $K = R_+ \times R_+^n$ . Система (1) рассматривается в некоторой открытой области  $G$  пространства  $(s, x)$ , причем предполагается, что выполнены следующие условия:

$$K \subset G, \quad \mu_i, f_i \in C^1(G, R) \text{ при } i = 1, \dots, n, \quad (2)$$

$$(\forall i = 1, \dots, n) \begin{cases} \mu_i(0, x) = 0 \text{ при } x \in R_+^n, \\ f_i(s, x) \geq 0 \text{ при } (s, x) \in K, x_i = 0, \end{cases} \quad (3)$$

$$\sum_{i=1}^n f_i(s, x) = 0 \text{ при } (s, x) \in K, \quad (4)$$

$$(\forall i = 1, \dots, n) \quad (\mu_i(s, x) \geq 0 \text{ при } (s, x) \in K). \quad (5)$$

Предполагается также, что управляемые параметры  $s_0$ ,  $D$  и стехиометрические коэффициенты  $l_i$  постоянны и неотрицательны:

$$s_0 \geq 0, \quad D \geq 0, \quad (\forall i = 1, \dots, n) \quad (l_i \geq 0). \quad (6)$$

Заметим, что при любом  $i = 1, \dots, n$  функция  $f_i$  – это скорость изменения концентрации  $x_i$  за счет внутрипопуляционных переходов, вызванных такими факторами генетической изменчивости, как хромосомные мутации, мутации плазмидных генов, перенос плазмид между клетками микроорганизмов, потери плазмид при делении клеток, и другими [14]. Все эти процессы – внутрипопуляционные, то есть они не влияют на суммарную концентрацию клеток микробной популяции:

$$X = x_1 + \dots + x_n. \quad (7)$$

Поэтому скорости  $f_i$  в сумме взаимно сокращаются, и истинно тождество (4).

Здесь может возникнуть следующий вопрос: почему нужно вводить в рассмотрение открытую область  $G$ ? Ведь физический смысл имеют только неотрицательные значения переменных  $s$  и  $x_i$ , принадлежащие ортанту  $K$ . Суть дела в том, что множество  $K$  замкнуто, а все фундаментальные теоремы теории ОДУ обычно формулируются для систем, которые заданы на открытых множествах евклидова пространства  $R^m$ , например, теоремы существования и единственности решений, теоремы о свойствах непродолжаемых решений и др. [21]. Поэтому здесь и требуется, чтобы функции  $\mu_i$  и  $f_i$  можно было бы продолжить гладким образом из замкнутого множества  $K$  на некоторую охватывающую его открытую область  $G$ . Гладкость нужна для того, чтобы работала аналитика, работал математический анализ, в частности, принцип линеаризации, например, при исследовании характера положений равновесия.

Система ОДУ (1) представляет собой обобщённую математическую модель эволюции микробных популяций на протоке, так как функции  $\mu_i, f_i$  не заданы явно в виде формул, а подчиняются лишь общим условиям (2)–(5), допускающим широкий выбор конкретного вида этих функций. Выбирая конкретный вид функций  $\mu_i, f_i$  (в пределах, конечно, ограничений (2)–(5)), можно получить многие известные математические модели эволюции на протоке, в которых учитываются такие факторы генетической изменчивости, как мутационный процесс [9–12], горизонтальный перенос

генетического материала [4, 16, 17, 20, 22], нестабильность его переносчиков – плазмид [4, 18, 19] и др. (см. [14, 15] и указанную там литературу).

Заметим, что при конкретизации общей модели (1) в выборе явных формул для функций  $\mu_i$  и  $f_i$  отражаются допущения конкретной модели относительно процессов роста, размножения и изменчивости клеток микробной популяции. В конкретном виде функций  $\mu_i, f_i$  как бы концентрируется информация о предполагаемых механизмах этих процессов.

#### 4. О ДИССИПАТИВНОСТИ ОБОБЩЁННОЙ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЭВОЛЮЦИИ

Динамическая система называется диссипативной, если в пространстве состояний этой системы существует компактное глобально притягивающее множество [23–25]. Точное аналитическое описание этого множества играет важную роль в компьютерных исследованиях диссипативных систем, когда требуется дать начальную приближённую оценку числа и местоположения предельных множеств динамической системы, например, положений равновесия или предельных циклов. Необходимость таких оценок часто возникает при использовании стандартных компьютерных программ для исследования предельных множеств. В настоящем разделе даётся аналитическое описание компактного глобально притягивающего множества в обобщённой модели эволюции микробных популяций на протоке.

Очевидным следствием леммы 4.1 из книги [26] является следующее

**Предложение 1.** Пусть выполнены условия (2), (3) и (6). Тогда неотрицательный ортант  $K$  пространства переменных  $(s, x)$  является положительно инвариантным множеством системы (1), то есть вместе с каждой своей точкой множество  $K$  содержит и всю положительную полутраекторию системы (1), выходящую из этой точки.

Введём функцию  $V: K \rightarrow R$ , полагая

$$V(s, x) = \max(s_0 - s - l^+ X, 0, s + l^- X - s_0) \quad (8)$$

для любой точки  $(s, x) \in K$ , где

$$l^- = \min(l_1, \dots, l_n), \quad l^+ = \max(l_1, \dots, l_n). \quad (9)$$

Предложение 1 позволяет ввести орбитальную производную функции  $V(s, x)$ , то есть отображение  $\dot{V}: K \rightarrow R$  по формуле

$$\dot{V}(s, x) = \lim_{t \rightarrow 0^+} \frac{V(\hat{s}(t), \hat{x}(t)) - V(s, x)}{t} \quad (10)$$

для любой точки  $(s, x) \in K$ . Здесь функции  $\hat{s}(t), \hat{x}(t)$  представляют решение системы (1) с начальными условиями  $\hat{s}(0) = s, \hat{x}(0) = x$ .

Очевидно следующее

**Предложение 2.** При любых вещественных  $s_0, l_1, \dots, l_n$  функция  $V(s, x)$  непрерывна и имеет место  $V(s, x) \geq 0$  для любой точки  $(s, x) \in K$ .

Справедливо и следующее

**Предложение 3.** Пусть выполнены условия (2)–(6). Тогда орбитальная производная функции (8) удовлетворяет неравенству  $\dot{V}(s, x) \leq -D V(s, x)$  для любой точки  $(s, x) \in K$ .

Доказательство. Это предложение вытекает из Теоремы 5.5 работы [15].

◇

**Теорема 4.** Пусть выполнены условия (2) – (6) и  $D > 0$ ,  $l^- > 0$ . Тогда множество

$$N = \{(s, x) \in K \mid l^- X \leq s_0 - s \leq l^+ X\} \quad (11)$$

является компактным полиэдром в  $(s, x)$  – пространстве  $R \times R^n$ , то есть оно замкнуто, ограничено и определяется конечной системой линейных неравенств.

Кроме того, полиэдр  $N$  является устойчивым, положительно инвариантным и глобально притягивающим множеством системы (1) в ортанте  $K$ .

Доказательство. Полиэдральность и компактность множества  $N$  очевидны.

Из предложений 1, 2, 3 следует, что функция  $V(s, x)$  является функцией Ляпунова системы (1), то есть она определена на положительно инвариантном множестве  $K$ , непрерывна на  $K$ , и она не возрастает на любой положительной полутраектории системы (1), лежащей в  $K$  (см. Определение 3.1 из [15]).

С помощью предложений 2, 3 легко доказывается, что  $N$  есть нейтральное множество функции Ляпунова  $V(s, x)$ , то есть множество нулей её орбитальной производной:

$$N = \{(s, x) \in K \mid \dot{V}(s, x) = 0\}. \quad (12)$$

Поэтому, согласно теореме Ла-Салля (см. Теорему 3.1 из [15]), все предельные множества системы (1) в  $K$  лежат в множестве  $N$ . Отсюда следует, что множество  $N$  глобально притягивающее в  $K$ . Устойчивость и положительная инвариантность множества  $N$  следуют из Предложения 6.2 работы [15]. Теорема доказана.

◇

Подчеркнём, что глобальное притяжение инвариантного множества не гарантирует его устойчивость, см. пример на обложке книги [25]. Однако Предложение 6.2 работы [15] позволяет доказать, что в условиях теоремы 4 множество  $N$  является равномерно глобально притягивающим множеством системы (1) в ортанте  $K$ . Имеется в виду равномерность по начальным условиям решения системы (1), пробегающим любое ограниченное множество в  $K$ , см. [27].

## 5. НЕКОТОРЫЕ ЧАСТНЫЕ СЛУЧАИ ОБОБЩЁННОЙ МОДЕЛИ

В данном разделе рассматриваются некоторые известные в литературе конкретные частные случаи обобщённой модели (1)–(5).

### 5.1. Первые математические модели эволюции бактериальных популяций на протоке

Одна из первых математических моделей эволюции популяции бактерий при длительном культивировании на протоке была предложена Мозером ещё в 1957 году [12]. Мозер рассматривал случай, когда единственным фактором генетической изменчивости является мутационный процесс. Он считал, что в культуральной жидкости в ферментёре присутствуют клетки широкого спектра различных генетических вариантов  $P_1, \dots, P_n$ , которые могут переходить друг в друга посредством мутаций.

Предполагалось также, что кинетика этих переходов аналогична кинетике мономолекулярной реакции вида





где  $k_{ji}$  – удельная скорость мутирования клеток типа  $P_i$  в клетки типа  $P_j$ .

С учётом этих допущений Мозер вывел систему ОДУ (1), в которой функции  $f_i$  и  $\mu_i$  заданы явно следующими аналитическими формулами:

$$\begin{cases} f_i(x) = \sum_{j=1}^n (k_{ij} x_j - k_{ji} x_i), \\ \mu_i(s) = \frac{\mu_{im} s^{\kappa_i}}{K_i^{\kappa_i} + s^{\kappa_i}}, \end{cases} \quad \text{при } i = \overline{1, n}. \quad (14)$$

Здесь  $\mu_{im}, K_i, \kappa_i$  – постоянные параметры, причём

$$\mu_{im} \geq 0, \quad K_i > 0, \quad \kappa_i \geq 1 \quad \text{при } i = \overline{1, n}. \quad (15)$$

Нетрудно указать область  $G \subseteq R \times R^n$ , удовлетворяющую условию  $K \subset G$ , в которой функции (14) удовлетворяют условиям (2) – (5). Поэтому модель Мозера (1)  $\wedge$  (14)  $\wedge$  (15) является частным случаем обобщённой модели (1)–(5).

После Мозера построенная им математическая модель рассматривалась в ряде последующих работ других авторов. Например, в работах Печуркина Н.С., Терскова И.А. и их соавторов частные случаи модели (1)  $\wedge$  (14)  $\wedge$  (15) использовались для изучения закономерностей автоселекции на протоке, оценки характера, направления и темпов эволюции бактериальных популяций при длительном непрерывном культивировании [9–11].

Одно из первых применений математической модели (1)  $\wedge$  (14)  $\wedge$  (15) состояло в описании динамики перестроек генетической структуры бактериальной популяции, происходящих в ходе эволюции вследствие так называемого периодического отбора [10, 12, 28]. При длительном культивировании на протоке в популяции бактерий время от времени в результате редких спонтанных мутаций возникают новые более приспособленные формы. Каждое такое событие является случайной флуктуацией, возбуждающей в системе дополнительные степени свободы, т. е. новые переменные в модели (1)  $\wedge$  (14)  $\wedge$  (15), по которым прежнее достигнутое в ходе эволюции состояние равновесия становится неустойчивым. В результате запускается эволюционный процесс перестройки генетической структуры популяции к новому устойчивому состоянию.

Такие перестройки могут повторяться многократно, так как продолжают возникать всё новые мутанты, способные вытеснить преобладающий тип из популяции, например, за счёт более высокой скорости роста. Эти переходы, «шаги эволюции», хорошо изучены экспериментально и теоретически на основе математической модели (1)  $\wedge$  (14)  $\wedge$  (15), в которой число переменных  $1+n$  зависит от времени, т. к. кусочно-постоянная функция  $n = n(t)$  может скачком возрастать на единицу в случайные моменты времени. На этом основании иногда делается вывод о невозможности достижения эволюционного равновесия при непрерывнопроточном культивировании бактерий, несмотря на то, что условия культивирования поддерживаются строго постоянными [29].

Однако при этом упускается из виду, что и мутации, порождающие менее приспособленные формы, могут служить причиной нестационарности генетической структуры бактериальной популяции на протоке. В самом деле, рассмотрим наиболее простой случай модели Мозера – с двумя штаммами, когда  $n = 2$ , причём предположим, что

$$\kappa_1 = \kappa_2 = 1, \quad k_{21} = 0, \quad k_{12} = k > 0. \quad (16)$$

В этом случае модель (1) ∧ (14) ∧ (15) принимает следующий вид

$$\begin{cases} \dot{s} = D(s_0 - s) - l_1 \frac{\mu_{1m} s}{K_1 + s} x_1 - l_2 \frac{\mu_{2m} s}{K_2 + s} x_2, \\ \dot{x}_1 = \left( \frac{\mu_{1m} s}{K_1 + s} - D \right) x_1 + k x_2, \\ \dot{x}_2 = \left( \frac{\mu_{2m} s}{K_2 + s} - D \right) x_2 - k x_2. \end{cases} \quad (17)$$

Введём безразмерные переменные  $\sigma$ ,  $x$ ,  $v$  и безразмерное время  $t'$  по формулам

$$\sigma = \frac{s}{K_1}, \quad x = \frac{l_1}{K_1} X, \quad v = \frac{x_2}{X}, \quad t' = \mu_{1m} t, \quad (18)$$

где  $X = x_1 + x_2$ . Нетрудно показать, что в переменных  $\sigma$ ,  $x$ ,  $v$  система (17) приводится к базовой модели (31) при  $\tau = 0$ , которая обсуждается ниже в разделе 5.3. Результаты численного интегрирования этой системы представлены на рис. 6 (раздел 5.3).

Видно, что равновесие между формами  $P_1$  и  $P_2$  невозможно, т. к. траектория системы выходит на предельный цикл, хотя условия культивирования поддерживаются постоянными, а мутантная форма  $P_1$  имеет меньшую скорость роста по сравнению с родительской формой  $P_2$ . В самом деле, из оценок

$$\frac{\mu_{2m}}{\mu_{1m}} = \alpha = 60.4 > 1, \quad \frac{\mu_{2m} K_1}{\mu_{1m} K_2} = \frac{\alpha}{\beta} = \frac{60.4}{27} > 1$$

следует, что  $\mu_1(s) < \mu_2(s)$  при всех  $s > 0$ .

## 5.2. Математическое моделирование эволюции на протоке с учётом горизонтального переноса генетического материала

При делении бактериальной клетки её гены передаются двум дочерним клеткам. Этот процесс переноса генов от родителей к потомкам называется вертикальным переносом. Но в бактериальных популяциях возможен и другой механизм переноса генов, не связанный с процессом деления, когда гены передаются при контактном взаимодействии клеток. Этот так называемый горизонтальный перенос генетического материала обеспечивается, например, (конъюгативными) плазмидами – кольцевыми молекулами ДНК, которые могут автономно реплицироваться в клетках и передавать свои копии от клетки к клетке при их контакте.

Одна из первых математических моделей эволюции бактериальной популяции на протоке с учётом горизонтального переноса генов предложена в 1977 году Ф. Стюартом и Б. Левиным [16]. В этой модели рассматривается простейший случай горизонтального переноса, когда в ферментёре в культуральной жидкости присутствуют два типа клеток – бесплазмидные клетки  $P_1$  и плазмидосодержащие клетки  $P_2$ .

При контакте клеток  $P_1$  и  $P_2$  запускается процесс репликации плазмиды. При этом одна копия плазмиды остаётся в клетке донора  $P_2$ , а другая её копия передаётся в клетку реципиента  $P_1$ . В результате обе клетки становятся плазмидными. Предполагается, что кинетика этого процесса аналогична кинетике реакции 2-го порядка с константой скорости  $c$ :



Предполагалось также, что плазмидные клетки  $P_2$  могут терять свои плазмиды, превращаясь в клетки типа  $P_1$ , и этот процесс протекает аналогично реакции 1-го порядка с константой скорости распада плазмид  $d$ :



Основываясь на приведённых предположениях, Ф. Стюарт и Б. Левин вывели следующую систему ОДУ относительно концентрации питательного субстрата  $s$  и концентраций  $x_1, x_2$  клеток  $P_1, P_2$  соответственно:

$$\begin{cases} \dot{s} = D(s_0 - s) - l_1 \mu_1 x_1 - l_2 \mu_2 x_2 \\ \dot{x}_i = (\mu_i - D)x_i + f_i(x_1, x_2), \quad i = \overline{1, 2}, \end{cases} \quad (21)$$

где удельные скорости роста  $\mu_1, \mu_2$  являются гладкими функциями концентрации субстрата  $s$ :

$$\mu_i = \mu_i(s) \in C^1(R), \quad i = 1, 2, \quad (22)$$

а функции  $f_1, f_2$  имеют следующий вид

$$f_1(x_1, x_2) = -c x_1 x_2 + d x_2, \quad f_2(x_1, x_2) = c x_1 x_2 - d x_2. \quad (23)$$

Нетрудно видеть, что модель (21)–(23) принадлежит к выделенному ранее более общему классу математических моделей эволюции (1)–(5). К этому же классу относится и целый ряд более сложных математических моделей эволюции, предложенных Левиным и его сотрудниками после 1977 года.

Аналитическое исследование модели (21)–(23) при дополнительных предположениях

$$d = 0, \quad \mu_i(s) = k_i s, \quad i = \overline{1, 2} \quad (24)$$

проведено в работе [17].

После проведённого там обезразмеривания в уравнениях модели остаётся четыре параметра: параметры  $\alpha = l_2/l_1$  и  $\beta = k_2/k_1$ , характеризующие различия двух штаммов по потребностям в субстрате и по скорости роста, и параметры  $\gamma = c/k_1 l_1$  и  $\nu = D/k_1 s_0$ , характеризующие константу скорости конъюгационного переноса плазмид и скорость протока жидкой среды в ферментёре.

Проведено детальное аналитическое исследование модели методом параметрических и фазовых портретов [30], который последовательно применялся нами при исследовании многопараметрических моделей в работах [17, 19, 31, 32]. При фиксированных значениях параметров  $\alpha, \beta$  строился параметрический портрет в плоскости  $(\gamma, \nu)$ , т. е. разбиение этой плоскости на области, каждой из которых отвечает определённый фазовый портрет системы. Исследованы возможные типы эволюции параметрического портрета и его бифуркации при изменении параметров  $(\alpha, \beta)$ . Плоскость параметров  $(\alpha, \beta)$  разбивается на шесть областей, каждой из которых соответствует свой тип параметрического портрета в плоскости  $(\gamma, \nu)$ . Выделено двенадцать типов трёхмерных фазовых портретов системы.

Особую роль играет безразмерный параметр  $\beta = k_2/k_1$ , характеризующий различие популяций клеток  $P_2$  и  $P_1$  по удельной скорости роста. При  $\beta > 1$  плазмидные клетки размножаются быстрее бесплазмидных. В этом случае возможно только три

качественно различных фазовых портрета. Из них следует, что при  $\beta > 1$  отбор в хемостатной популяции всегда действует в пользу плазмидного штамма: доля бесплазмидных клеток в популяции с течением времени стремится к нулю.

В случае  $\beta < 1$  плазмидные клетки растут менее активно, чем бесплазмидные. В этом случае при низкой плотности популяции бактерий доля плазмидных клеток всегда убывает. Однако при большой плотности популяции решающую роль играет процесс конъюгационного переноса плазмид (скорость этого процесса возрастает с ростом плотности популяции), который способствует выживанию плазмидных клеток. Взаимодействие этих двух противоположных тенденций порождает в случае  $\beta < 1$  разнообразие типов динамического поведения системы. В этом случае у системы выделено девять типов фазовых портретов.

Исследована область значений параметров, при которых у системы имеется два устойчивых состояния равновесия, и проанализированы соответствующие гистерезисные эффекты при изменении скорости потока. Исследована также область значений параметров, при которых единственным аттрактором системы является устойчивый предельный цикл.

Показано, что эволюция системы к аттрактору может происходить как последовательность процессов самоорганизации, т. е. последовательно через несколько качественно различных стадий. Например, выход на предельный цикл может происходить через последовательность четырёх эволюционных переходов, причём три из них завершаются метастабильными состояниями системы, и только четвёртый шаг эволюции завершается выходом на предельный цикл.

Заметим, что эффекты бистабильности и колебательная динамика доли плазмидных клеток в бактериальной популяции наблюдались в ряде экспериментов по конкуренции плазмидных и бесплазмидных штаммов в условиях непрерывного культивирования (см. обзор литературы, приведённый в работе [17]).

### 5.3. Математическое моделирование эволюции микробных популяций на протоке с учётом нестабильности рекомбинантных плазмид

Одной из центральных проблем современной биотехнологии является задача оптимального управления процессами культивирования микроорганизмов, синтезирующих полезные продукты за счёт плазмид. Плазмиды, направляющие синтез полезного продукта, обычно конструируются *in vitro* методами генной инженерии (рекомбинантные, гибридные, химерные плазмиды) и отличаются нестабильностью. Существует два основных типа нестабильности рекомбинантных плазмид: репликационная и структурная нестабильность [33].

Репликационная нестабильность связана с тем, что в популяции при делении плазмидных клеток с определённой вероятностью появляются бесплазмидные клетки. Если такие клетки более жизнеспособны при заданных условиях культивирования, то в ходе эволюции они вытесняют из популяции исходные клетки, несущие плазмиды.

Второй тип нестабильности гибридных плазмид – структурная нестабильность: плазида хотя и остаётся в клетке, но спонтанно изменяет свою структуру [33]. Как правило, структурные изменения гибридных плазмид происходят в области генов, обуславливающих сверхпродукцию [29].

Таким образом, в результате репликационной и структурной нестабильности клетки суперпродуцента теряют либо плазмиду, обуславливающую сверхпродукцию, либо фрагмент плазмиды, ответственный за сверхпродукцию, и при неудачно выбранном режиме культивирования популяция клеток, продуцирующих полезный продукт, в ходе эволюции становится популяцией непродуцирующих клеток.

Поэтому математическое моделирование эволюции микробных популяций с учётом нестабильности плазмид актуально для биотехнологии в связи с проблемой управления

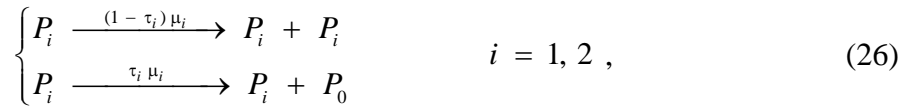
эволюционным процессом с целью поддержания рекомбинантных штаммов при длительном культивировании на потоке.

Рассмотрим одну из математических моделей такого рода [19]. Предположим, что культура микроорганизмов проявляет некоторую полезную биосинтетическую активность (ПБА), уровень которой определяется концентрацией клеток  $P_2$  с активными, то есть направляющими сверхсинтез полезного продукта, плазмидами. Вследствие структурной и репликационной нестабильности плазмид в культуральной жидкости присутствуют также неактивные, то есть утратившие способность к суперпродукции клетки двух типов: бесплазмидные клетки  $P_0$  и клетки  $P_1$  с мутантными плазмидами.

Относительно механизма снижения ПБА культуры, обусловленной структурной и репликационной нестабильностью плазмид, сделаем следующие предположения. Будем считать, что превращение активных плазмидных клеток в клетки с мутантными плазмидами аналогично реакции первого порядка



с константой скорости  $k$ . Предположим также, что процессы деления клеток и потери плазмид можно охарактеризовать следующими реакциями



где  $\mu_i$  – удельная скорость роста популяции клеток  $i$ -го типа, а  $\tau_i$  – вероятность появления бесплазмидной клетки в одном акте деления клетки  $P_i$ , несущей плазмиду ( $0 \leq \tau_i \leq 1$ ).

Пусть  $s$  – концентрация лимитирующего субстрата в культуральной жидкости в ферментёре и  $x_i$  – концентрация клеток типа  $P_i$  ( $i = 0, 1, 2$ ). Тогда при сделанных выше предположениях динамика переменных  $s, x_0, x_1, x_2$  описывается системой ОДУ вида (1):

$$\begin{cases} \dot{s} = D(s_0 - s) - l_0\mu_0x_0 - l_1\mu_1x_1 - l_2\mu_2x_2, \\ \dot{x}_0 = (\mu_0 - D)x_0 + \tau_1\mu_1x_1 + \tau_2\mu_2x_2, \\ \dot{x}_1 = (\mu_1 - D)x_1 - \tau_1\mu_1x_1 + kx_2, \\ \dot{x}_2 = (\mu_2 - D)x_2 - \tau_2\mu_2x_2 - kx_2. \end{cases} \quad (27)$$

Предположим также, что удельные скорости роста  $\mu_0, \mu_1, \mu_2$  зависят от концентрации субстрата  $s$  согласно известной формуле Моно:

$$\mu_i = \mu_i(s) = \frac{\mu_{im}s}{K_i + s}, \quad i = 0, 1, 2. \quad (28)$$

Таким образом, математическая модель (27)∧(28) представляет собой систему четырёх дифференциальных уравнений, зависящую от четырнадцати параметров. Величины  $s_0$  и  $D$  в дальнейшем будут называться управляемыми параметрами, так как в реальном эксперименте эти величины можно варьировать независимо. Остальные параметры модели (27)∧(28) могут измениться только при изменении физико-химических условий культивирования или при выборе другого объекта (другого микроорганизма-хозяина или другой плазмиды). Эти параметры мы будем называть структурными параметрами.

Нахождение численных значений структурных параметров и анализ зависимости этих параметров от физико-химических условий культивирования (от pH, температуры, аэрации, перемешивания) является задачей экспериментального исследования. Решение этой задачи достигается путём проведения независимых экспериментов и экспериментов, спланированных на основе математической модели. С другой стороны, исследование математической модели должно доводиться до алгоритма, позволяющего для любых фиксированных значений структурных параметров строить разбиение пространства управляемых параметров на области, отвечающие различным типам динамического поведения.

Решение этой второй задачи для модели (27)^(28) проведено в работе [19] при следующих упрощающих допущениях

$$\mu_{0m} = \mu_{1m}, \quad K_0 = K_1, \quad l_0 = l_1. \quad (29)$$

Таким образом, предполагается, что бесплазмидные клетки  $P_0$  и клетки с мутантными плазмидами  $P_1$  составляют единую (неактивную) популяцию, которая характеризуется значениями  $\mu_{1m}$ ,  $K_1$  и  $l_1$  – максимальной удельной скорости роста, константы полунасыщения и стехиометрического коэффициента. Популяция клеток с интактными плазмидами (активная популяция, обеспечивающая ПБА культуры) характеризуется, вообще говоря, другими значениями этих параметров:  $\mu_{2m}$ ,  $K_2$ ,  $l_2$ .

Введём суммарную плотность микробной популяции  $X = x_0 + x_1 + x_2$  и положим  $v = x_2 / X$ . Тогда безразмерная переменная  $v$  характеризует уровень обеспечиваемой плазмидами ПБА культуры. Введём также безразмерные переменные  $\sigma$ ,  $x$  и безразмерное время  $t'$ :

$$\sigma = \frac{s}{K_1}, \quad x = \frac{l_1}{K_1} X, \quad t' = \mu_{1m} t. \quad (30)$$

При условиях (28) и (29) из (27) следует, что переменные  $\sigma$ ,  $x$  и  $v$  удовлетворяют следующей системе дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \dot{\sigma} = v(\sigma_0 - \sigma) - \left[ (1 - v) \frac{\sigma}{1 + \sigma} + \gamma v \frac{\alpha \sigma}{\beta + \sigma} \right] x, \\ \dot{x} = \left[ (1 - v) \frac{\sigma}{1 + \sigma} + v \frac{\alpha \sigma}{\beta + \sigma} - v \right] x, \\ \dot{v} = \left[ \left( \frac{\alpha \sigma}{\beta + \sigma} - \frac{\sigma}{1 + \sigma} \right) (1 - v) - \delta - \tau \frac{\alpha \sigma}{\beta + \sigma} \right] v, \end{cases} \quad (31)$$

где

$$\begin{cases} \alpha = \frac{\mu_{2m}}{\mu_{1m}}, \quad \beta = \frac{K_2}{K_1}, \quad \gamma = \frac{l_2}{l_1}, \\ \delta = \frac{k}{\mu_{1m}}, \quad \tau = \tau_2, \\ \sigma_0 = \frac{s_0}{K_1}, \quad v = \frac{D}{\mu_{1m}} \end{cases} \quad (32)$$

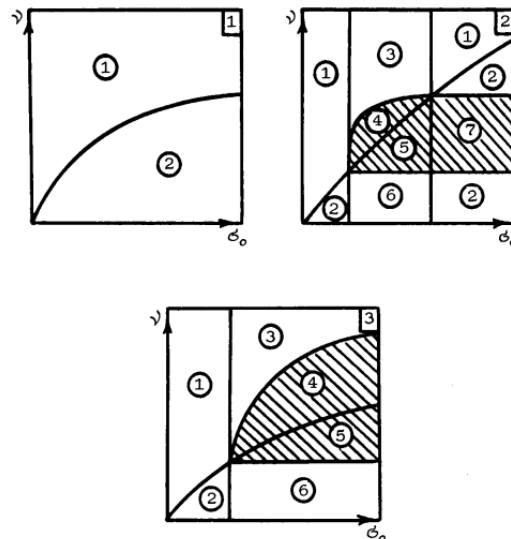
– безразмерные параметры.

Заметим, что  $\sigma_0$ ,  $\nu$  – безразмерные управляемые параметры, величины  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  характеризуют степень различия активной и неактивной популяций по основным параметрам роста, а уровни структурной и репликационной нестабильности определяются значениями безразмерных параметров  $\delta$ ,  $\tau$ .

Таким образом, при дополнительном предположении (29) исследование математической модели (27)^(28) сводится к более простой задаче исследования системы трёх ОДУ (31), зависящей от семи параметров (32).

Сформулируем основные результаты аналитического исследования системы (31). Установлено, что максимальное число состояний равновесия системы (31) равно четырём. При этом внутри первого октанта фазового пространства  $(\sigma, x, \nu)$  существует не более одного состояния равновесия, обозначим его через  $B$ . Остальные состояния равновесия лежат на границе первого октанта. При изменении параметров могут происходить бифуркации слияния состояний равновесия, причём возможно только четыре типа бифуркаций слияния коразмерности один.

Плоскость управляемых параметров  $(\sigma_0, \nu)$  разбивается на области линиями бифуркаций слияния состояний равновесия. Эти области различаются по соответствующим им типам фазового портрета системы (31). Установлено, что при изменении параметров  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\tau$  могут реализовываться только три невырожденных случая этого разбиения (см. рис. 3; подчеркнём, что это разбиение не зависит от параметра  $\gamma$ ). Соответствующие фазовые портреты системы (31) представлены на рис. 4.



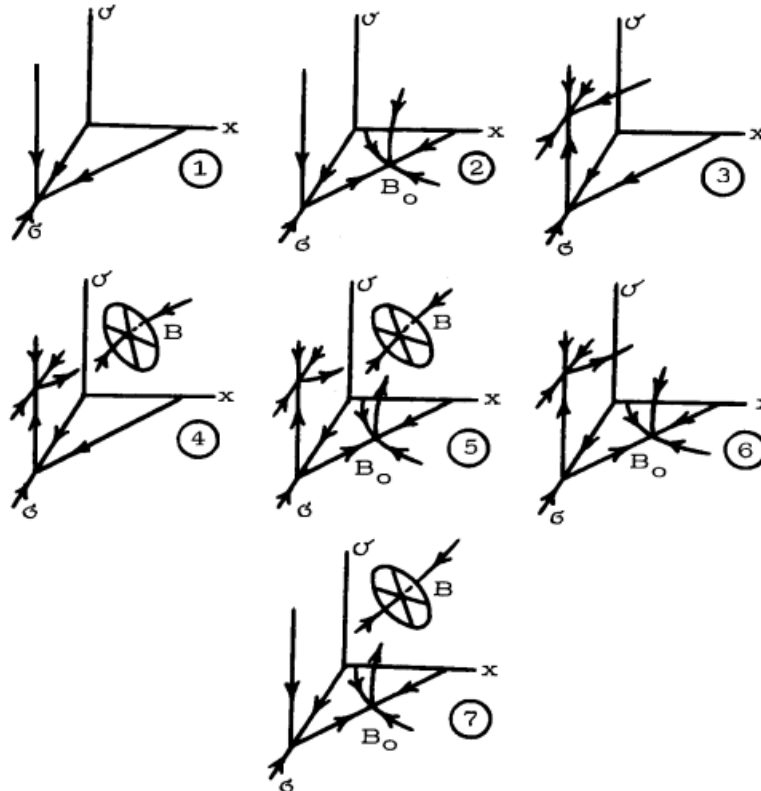
**Рис. 3.** Три возможных типа разбиения плоскости  $(\sigma_0, \nu)$  на области линиями бифуркаций слияния положений равновесия системы (31). Отвечающие этим областям фазовые портреты системы (31) соответствующим образом пронумерованы на рис. 4. Заштрихована область значений управляемых параметров  $\sigma_0$  и  $\nu$ , при которых в системе (31) существует положение равновесия  $B$ , то есть область устойчивости исходного плазмидного штамма.

На рис. 3 штриховкой выделена область значений управляемых параметров  $\sigma_0$  и  $\nu$ , при которых штамм с интактной плазмидой (активная популяция) не вымывается из ферментёра. Эта область называется областью устойчивости данного штамма. Она совпадает с областью значений параметров  $\sigma_0$ ,  $\nu$ , при которых внутри первого октанта пространства состояний  $(\sigma, x, \nu)$  существует равновесие  $B$ .

Установлено, что при изменении параметров  $\sigma_0$  и  $\nu$  в области устойчивости исходного плазмидного штамма (показана штриховкой на рис. 3) может происходить бифуркация смены устойчивости равновесия  $B$  (бифуркация Андронова–Хопфа).

Соответствующая бифуркационная линия в плоскости управляемых параметров  $(\sigma_0, \nu)$  называется линией нейтральности. На линии нейтральности характеристическое уравнение в точке  $B$  имеет один отрицательный и пару чисто мнимых корней. При пересечении линии нейтральности, с вхождением внутрь ограниченной ею области, равновесие  $B$  теряет устойчивость и из него рождается устойчивый предельный цикл.

На основании аналитического исследования системы (31) разработана программа, посредством которой для любых заданных значений параметров  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \tau$  на экран ЭВМ выводятся все линии, отвечающие бифуркациям состояний равновесия системы (31). Используя эту программу, можно проследить эволюцию параметрического портрета системы (31) в плоскости управляемых параметров  $(\sigma_0, \nu)$  при любых изменениях параметров роста  $\alpha, \beta, \gamma$  и параметров неустойчивости  $\delta, \tau$ .

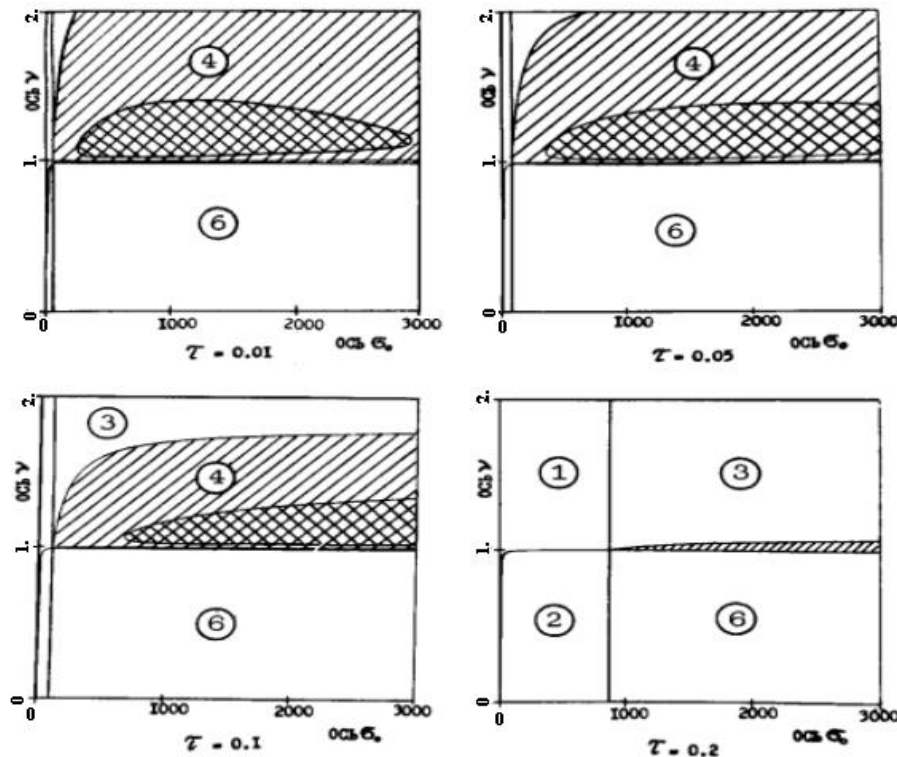


**Рис. 4.** Фазовые портреты системы (31) для семи областей параметрического портрета, соответствующим образом пронумерованных на рис. 3. На некоторых траекториях, примыкающих к точке  $B$ , направление движения не указано, так как характер устойчивости положения равновесия  $B$  не определяется однозначно по разбиению плоскости  $(\sigma_0, \nu)$ , представленному на рис. 3.

На рис. 5 представлены построенные численно параметрические портреты системы (31) при различных значениях параметра  $\tau$ . Некоторые из областей пронумерованы в соответствии с нумерацией, принятой на рис. 3. При выбранных значениях структурных параметров область 5 является настолько узкой, что оказывается практически неразличимой. На рис. 5 область устойчивости исходного, активного (т. е. обеспечивающего ПБА культуры) плазмидного штамма состоит из двух частей, отделённых друг от друга линией нейтральности. Штриховкой отмечена та часть области устойчивости, в которой положение равновесия  $B$  устойчиво, то есть штамм с интактной плазмидой поддерживается на протоке в устойчивом стационарном состоянии. Во второй части области устойчивости, отмеченной двойной штриховкой, равновесие  $B$  неустойчиво, то есть исходный плазмидный штамм хотя и поддерживается на протоке, но стационарный режим невозможен, и в системе



устанавливаются незатухающие колебания (при  $\sigma_0 \equiv const, v \equiv const$ ). При этом ПБА культуры периодически то падает, то вновь нарастает. Иллюстрирующий пример таких незатухающих колебаний представлен на рис. 6.



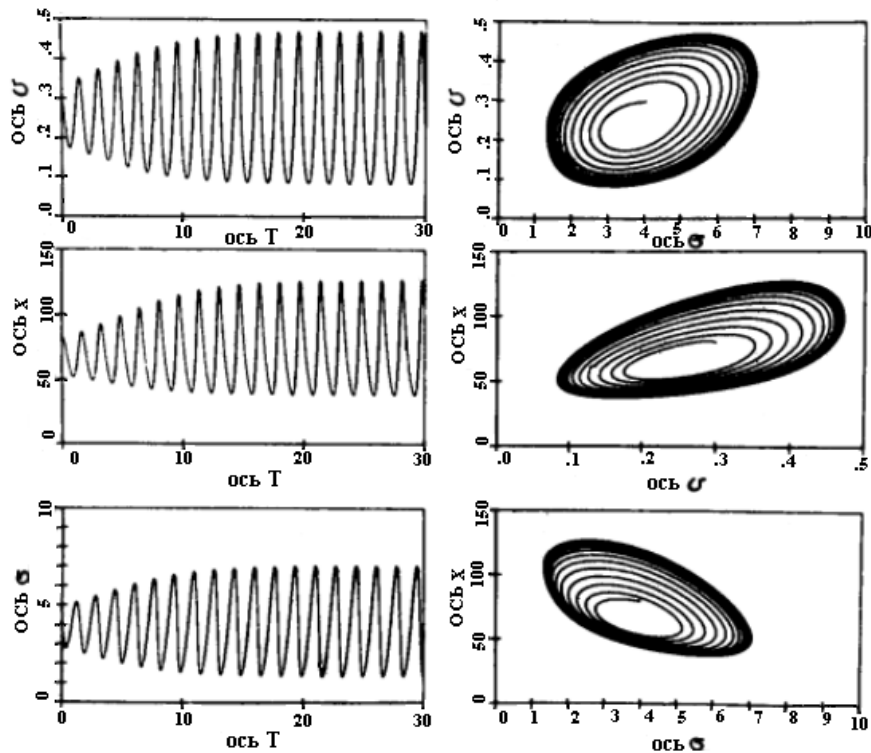
**Рис. 5.** Эволюция параметрического портрета системы (31) при изменении параметра  $\tau$ ;  $\alpha = 7, \beta = 16, \gamma = 0.25, \delta = 4.5$ . Штриховкой отмечена область устойчивости положения равновесия  $B$ , двойной штриховкой – ограниченная линией нейтральности область автоколебаний (т. е. область значений параметров  $\sigma_0$  и  $v$ , при которых в системе (31) существует устойчивый предельный цикл).

Математическая модель (27)–(28) использовалась в работе Koizumi, Aiba [34] для объяснения колебаний плотности популяции клеток *B. stearothermophilus* CU21 с рекомбинантной плазмидой pZAM26, которые наблюдались в течение 80-ти часов хемостатного культивирования. В ходе эксперимента регистрировались суммарная плотность популяции бактерий  $X = x_0 + x_1 + x_2$  и доля плазмидных клеток в этой популяции  $p = (x_1 + x_2)/X$ . Наблюдались колебания переменной  $X$  с периодом 19 часов, при этом переменная  $p$  практически не изменялась. В эксперименте обнаружены следующие характерные особенности этих колебаний: а) фаза убывания переменной  $X$  была приблизительно в два раза продолжительнее фазы её возрастания, б) переменная  $p$  практически не изменялась и принимала значения, близкие к единице. Эти две особенности популяционных колебаний хемостатной культуры рекомбинантного штамма и его дериватов наблюдались и в серии вычислительных экспериментов на математической модели (27)–(28), см. [14].

Интерес представляют и предсказанные математической моделью (31) многостадийные эволюционные переходы, когда эволюционный процесс развивается в несколько стадий, отделённых друг от друга метастабильными состояниями. Такая многостадийная эволюция возможна, например, при значениях управляемых параметров  $\sigma_0$  и  $v$  из области 7 параметрического портрета 2, рис. 3. В этом случае при низкой начальной плотности популяции,  $0 < x(0) \ll 1$ , эволюционный процесс протекает в три стадии (см. рис. 4, фазовый портрет 7).

На первой начальной стадии эволюции происходит уменьшение доли активного штамма в популяции: переменная  $v(t)$  непрерывно убывает, причём суммарная плотность популяции  $x(t)$  остаётся на низком уровне. По завершении этой стадии система попадает в малую окрестность метастабильного состояния с координатами  $\sigma = \sigma_0$ ,  $x = 0$ ,  $v = 0$ .

После выхода из этой окрестности начинается вторая стадия эволюционного процесса, когда суммарная плотность популяции  $x(t)$  непрерывно возрастает. Данная стадия характеризуется низкими значениями активности популяции:  $0 < v(t) \ll 1$ . По завершении этой стадии система попадает в малую окрестность метастабильного состояния равновесия, лежащего в плоскости  $v = 0$  (седловое равновесие  $B_0$ , см. фазовый портрет 7 на рис. 4).



**Рис. 6.** Результаты численного интегрирования системы (31) при  $\alpha = 60.4$ ,  $\beta = 27$ ,  $\gamma = 0.01$ ,  $\delta = 5$ ,  $\tau = 0$ ,  $\sigma_0 = 21.2$ ,  $v = 2.5$ . Начальные условия:  $\sigma(0) = 4$ ,  $x(0) = 80$ ,  $v(0) = 0.3$ ,  $T$  – безразмерное время:  $T = t' = \mu_{1m} t$ .

Наконец, при выходе из этой окрестности начинается последняя асимптотическая стадия эволюции, когда система асимптотически при  $t \rightarrow +\infty$  стремится к положению равновесия  $B$  (или к предельному циклу, если точка  $(\sigma_0, v)$  лежит в области автоколебаний).

Трёхстадийные процессы эволюции возможны и в тех случаях, когда точка значений управляемых параметров  $(\sigma_0, v)$  лежит в области 4 параметрического портрета (см. соответствующий фазовый портрет 4 на рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Понимание мира микробов и его фундаментальной роли в жизни биосферы подразумевает понимание того, как эволюционирует микробный мир. Непрерывнопроточное культивирование микроорганизмов реализуется в лабораторных

системах открытого типа. Такие системы имитируют многие ситуации, существующие в природных условиях, и могут служить полезными лабораторными моделями происходящих в природе процессов роста, развития и эволюции микробных популяций и микробных сообществ. Поэтому математические модели лабораторных систем культивирования микроорганизмов необходимы не только для оптимизации управления в промышленной микробиологии. Построение и исследование таких моделей становится сегодня одним из методов познания закономерностей эволюции микробных сообществ в природных местообитаниях.

Опыт математического моделирования сложных биосистем показывает, что новое знание о моделируемом объекте, углублённое понимание его свойств возникает при построении и исследовании иерархии «вложенных» друг в друга моделей увеличивающейся сложности [35]. Обобщённую модель (1)–(5) можно рассматривать как максимальный элемент (максимальную модель) некоторого фрагмента иерархии математических моделей эволюции микробных популяций на протоке. К первым этажам этой иерархии относятся малоразмерные модели, в каждой из которых учитывается только один из факторов генетической изменчивости микроорганизмов.

Например, в модели (17) учитывается только один такой фактор – мутационный процесс  $P_2 \rightarrow P_1$ . Другим примером однофакторной модели является модель (21)  $\wedge$  (23)  $\wedge$  (24), в которой учитывается другой фактор генетической изменчивости микроорганизмов – горизонтальный перенос генетического материала за счёт конъюгационного переноса плазмид. В модели (27)  $\wedge$  (28) учитывается уже два фактора генетической изменчивости – потери плазмид при делении клеток и мутации плазмидных генов.

Перечисленные малоразмерные модели являются базовыми. Так называются математические модели, допускающие детальное исследование аналитическими методами и, возможно, с использованием доказательных вычислений на ЭВМ [36, 37]. Конечно, при переходе к исследованию более сложных многофакторных моделей эволюции роль компьютерных вычислений будет возрастать. Однако при переходе к исследованию обобщённой модели (1)–(5) компьютеры не играют никакой роли.

Компьютеры бесполезны при исследовании обобщённых моделей – систем ОДУ, у которых в правых частях присутствуют произвольные функции. Эти функции не заданы явно в виде формул, и их невозможно запрограммировать для проведения компьютерных вычислений. Одной из первых обобщённых моделей популяционной динамики является модель системы «хищник–жертва», предложенная А.Н. Колмогоровым в работе [38], где подчёркивалась важность исследования такого рода общих моделей, так как они «дают возможность получения качественных результатов из качественных предпосылок» [39].

Эффективность использования компьютера при исследовании конкретных математических моделей вида (1), в которых функции  $\mu_i, f_i$  заданы явными формулами, существенно зависит от возможности дать аналитическую оценку местоположения предельных множеств: положений равновесия, предельных циклов, сепаратрисных контуров и других более сложно устроенных предельных множеств соответствующей конкретной системы ОДУ. Такую оценку можно получить с помощью функций Ляпунова на основании общих теорем прямого метода теории устойчивости. Ещё совсем недавно, как указано в книге [25], «очень многие из занимающихся приложениями не подозревали о полезности общих теорем или являлись жертвами мифа о неуловимости функции Ляпунова». Однако в последние годы число математических моделей, при исследовании которых построены функции Ляпунова и использованы теоремы прямого метода теории устойчивости быстро растёт [40]. Особый интерес среди них представляют теоремы Ла-Салля о локализации предельных множеств с помощью обобщённых функций Ляпунова [25, 40, 41].

Приведённые в разделе 4 результаты исследования обобщённой модели (1)–(5) получены с помощью функции (8), которая является функцией Ляпунова системы (1) [15]. При этом существенно используется теорема Ла-Салля в формулировке, приведённой в работе [15].

Из теоремы 4 следует, что любое решение конкретной модели вида (1)–(5) с начальным состоянием в ортанте  $K$  стремится к полиэдру  $N$  и, достигнув его, остаётся там в дальнейшем. Поэтому исследование любой такой модели сводится к задаче её исследования на множестве  $N$ . А это уже более простая задача, так как ограниченность и положительная инвариантность множества  $N$  позволяют эффективно использовать компьютер для нахождения и исследования полного набора предельных множеств соответствующей системы ОДУ. В самом деле, естественна следующая трёхэтапная схема использования компьютера для решения этой задачи.

На первом этапе строится конечное множество точек, равномерно распределённых по полиэдру  $N$ . Эта задача разрешима в силу ограниченности множества  $N$ . Причем плотность этого однородного облака точек можно выбрать сколь угодно большой, точнее, настолько большой, насколько позволяет мощность компьютера.

На втором этапе с помощью компьютера прослеживается эволюция этого облака точек в силу системы ОДУ (1). При этом оказывается возможным наблюдать, как с течением времени это изначально однородное облако точек становится неоднородным, как в нем постепенно формируются широкие области просветов, не содержащие точек этого облака. С другой стороны, оказывается возможным наблюдать, как в окрестности предельных множеств системы (1) формируются сгущения, уплотнения этого облака, которые и несут в себе информацию о числе и местоположении предельных множеств исследуемой системы.

Наконец, на третьем этапе, после того как приближенно установлено местоположение предельных множеств, используются стандартные компьютерные программы для их уточнения и дальнейшего исследования численными методами. Например, если это предельный цикл, то его уточнение проводится итерационным методом Ньютона применительно к отображению Пуанкаре на гиперплоскости, пересекающей этот цикл. Затем используются стандартные программы для слежения за предельным циклом при изменении параметра системы, нахождения критических значений параметра, при которых происходит вырождение предельного цикла в точку, в сепаратрисный контур и так далее. Соответствующие вычислительные алгоритмы и компьютерные программы разрабатывались в НИВЦ АН СССР еще в 1970-ые годы [42, 43].

В заключение заметим, что утверждение о существовании в модели (1)–(5) компактного глобально притягивающего множества остаётся в силе и для более широкого класса обобщённых математических моделей эволюции, в которых учитывается множественность потребляемых субстратов  $s = (s_1, \dots, s_m)$  и выделяемых продуктов жизнедеятельности  $p = (p_1, \dots, p_k)$ . В этих более общих моделях удельные скорости роста  $\mu_i$  и скорости внутривидовых переходов  $f_i$  являются функциями векторных переменных  $s, x, p$ :  $\mu_i = \mu_i(s, x, p)$ ,  $f_i = f_i(s, x, p)$ . Кроме того, в этих моделях учитывается и смертность микроорганизмов, которая описывается функциями смертности  $g_i = g_i(s, x, p)$ . Накладываемые при этом ограничения на функции  $\mu_i$ ,  $f_i$ ,  $g_i$  будут сформулированы в другой статье, которая готовится к публикации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии*. М.: Мир, 1984. 176 с.
2. *Современная микробиология. Прокариоты. В 2-х томах*. М.: Мир, 2005. 1152 с.
3. Щелкунов С.Н. *Генетическая инженерия*. Новосибирск: Сиб. университетское изд-во, 2004. 496 с.
4. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. О некоторых условиях устойчивого поддержания нестабильных плазмид в микробных популяциях при длительном непрерывном культивировании. В: *Исследования по математической биологии*. Под ред. Э.Э. Шноля. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1996. С. 32–48.
5. Заварзин Г.А. *Лекции по природоведческой микробиологии*. М.: Наука, 2003. 348 с.
6. Галимов Э.М. Что такое жизнь? Вместо введения. В: *Проблемы зарождения и эволюции биосферы*. Под ред. акад. Галимова Э.М. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2008. С. 9–19.
7. Арутюнов В.С., Стрекова Л.Н. *Ступени эволюции: эволюционная концепция природы и цивилизации*. М.: Наука, 2006. 347 с.
8. Заварзин Г.А. *Эволюция прокариотной биосферы: «Микробы в круговороте жизни». 120 лет спустя: Чтение им. С.Н. Виноградского*. М.: МАКС Пресс, 2011. 144 с.
9. Печуркин Н.С., Терсков И.А. *Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях)*. Новосибирск: Наука, 1975. 216 с.
10. Печуркин Н.С. *Популяционная микробиология*. Новосибирск: Наука, 1978. 278 с.
11. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. *Популяционные аспекты биотехнологии*. Новосибирск: Наука, 1990. 173 с.
12. Moser H. Structure and dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *Gold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*. 1957. V. 22. P. 121–137.
13. Novick A., Szilard L. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1950. V. 36. P. 708–719.
14. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. Математическое моделирование эволюции бактериальной популяции в непрерывной культуре с учётом немутационной изменчивости генома. *Биофизика*. 2008. Т. 53. № 4. С. 638–645.
15. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. Принцип инвариантности Ла-Салля и математические модели эволюции микробных популяций. *Компьютерные исследования и моделирование*. 2011. Т. 3. № 2. С. 177–190.
16. Stewart F.M., Levin B.R. The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*. 1977. V. 87. № 2. P. 209–228.
17. Апонин Ю.М. *Популяционная динамика бактериальных плазмид в условиях хемостатного культивирования*: препринт Научно-исследовательского вычислительного центра АН СССР. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1982. 18 с.
18. Апонин Ю.М., Апонина Е.А., Вельков В.В. *Кинетические коэффициенты плазмид и методология конструирования рекомбинантных ДНК*: препринт Научно-исследовательского вычислительного центра АН СССР. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1984. 12 с.
19. Апонин Ю.М., Апонина Е.А., Вельков В.В. *Математическое моделирование процессов непрерывного культивирования микроорганизмов, содержащих нестабильные гибридные плазмиды*: препринт Научно-исследовательского вычислительного центра АН СССР. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1984. 21 с.
20. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. Математическое моделирование эволюции бактериальных популяций в условиях длительного непрерывнопроточного

- культивирования. В: *Шестые Курдюмовские чтения: «Синергетика в естественных науках»*. Тверь: Тверской гос. ун-т, 2010. С. 26–29.
21. Понтрягин Л.С. *Обыкновенные дифференциальные уравнения*. М.: Наука, 1982. 332 с.
  22. Гуревич Ю.Л. Качественный анализ структуры гетерогенной популяции бактерий. В: *Анализ роста популяций биофизическими методами*. Под ред. чл.-кор. АН СССР Гительзона И.И. Новосибирск: Наука, 1984. С. 22–31.
  23. Плисс В.А. *Нелокальные проблемы теории колебаний*. М.–Ленинград: Наука, 1964. 368 с.
  24. Демидович Б.П. *Лекции по математической теории устойчивости*. М.: Наука, 1967. 472 с.
  25. Руш Н., Абетс П., Лалуа М. *Прямой метод Ляпунова в теории устойчивости*. М.: Мир, 1980. 302 с.
  26. Красносельский М.А. *Оператор сдвига по траекториям дифференциальных уравнений*. М.: Наука, 1966. 332 с.
  27. Леонов Г.А. *Хаотическая динамика и классическая теория устойчивости движения*. М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2006. 168 с.
  28. Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. *Мир микробов. В 3-х томах*. М.: Мир, 1979. 114 с.
  29. Dwivedi С.Р., Imanaka Т., Aiba S. Instability of plasmid-harboring strains of *E-coli* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 1982. V. 24. № 6. P. 1465–1468.
  30. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. Метод параметрических и фазовых портретов в задачах нелинейной динамики микробных популяций. В: *Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов*. Выпуск 16. Часть 1. Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2009. С. 66.
  31. Апонин Ю.М. К исследованию математических моделей простейших искусственных экосистем на протоке. В: *Математическая теория биологических процессов*. Под ред. Приц А.К. Калининград: Калининградская правда, 1976. С. 76–78.
  32. Апонин Ю.М., Апонина Е.А., Ванякин Е.Н. *Математическое моделирование процессов непрерывного культивирования с учётом гетерогенности микробных популяций*: препринт Научно-исследовательского вычислительного центра АН СССР. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1989. 32 с.
  33. Вельков В.В. Нестабильность рекомбинантных молекул. *Генетика*. 1983. Т. 19. № 10. С. 1573–1581.
  34. Koizumi J.-I., Aiba S. Oscillatory Behavior of Population Density in Continuous Culture of Genetic-Engineered *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1989. V. 34. P. 750–754.
  35. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. Иерархия моделей математической биологии и численно-аналитические методы их исследования. *Математическая биология и биоинформатика*. 2007. Т. 2. № 2. С. 347–360. URL: [http://www.matbio.org/downloads/Aponin2007\(2\\_347\).pdf](http://www.matbio.org/downloads/Aponin2007(2_347).pdf) (дата обращения: 28.05.2013)
  36. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. *Математическая биофизика*. М.: Наука, 1984. 304 с.
  37. Ризниченко Г.Ю. *Лекции по математическим моделям в биологии*. М.–Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2011. 560 с.
  38. Kolmogoroff A.N. Sulla teoria di Volterra della lotta per l'esistenza. *G. Ist. ital. attuar.* 1936. V. 7. P. 74–80.
  39. Колмогоров А.Н. Качественное изучение математических моделей динамики популяций. *Проблемы кибернетики*. 1972. Т. 25. № 2. С. 101–106.

40. Шестаков А.А. *Обобщённый прямой метод Ляпунова для систем с распределёнными параметрами*. М.: КомКнига, 2007. 320 с.
41. Хенри Д. *Геометрическая теория полулинейных параболических уравнений*. М.: Мир, 1985. 376 с.
42. Апонина Е.А., Апонин Ю.М., Крейцер Г.П., Шноль Э.Э. *Предельные циклы системы двух дифференциальных уравнений*. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1974. 45 с.
43. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. *Сепаратрисы системы двух дифференциальных уравнений*. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1976. 36 с.

Материал поступил в редакцию 20.05.2013, опубликован 30.06.2013.