

На правах рукописи

ЗАВАЛЬСКИЙ Леонид Юлианович

КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ
ПОДВИЖНОСТИ И ХЕМОТАКСИСА БАКТЕРИЙ
И ЕЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

Специальность - 03.00.02 «биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

ПУЩИНО-2005

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии
Государственный научный центр прикладной микробиологии Министерства
Здравоохранения и Социального Развития Российской Федерации

Научный консультант: Кандидат физико-математических наук,
доктор химических наук,
профессор
Волков Владимир Яковлевич

Официальные оппоненты по диссертации: доктор физико-математических наук, профессор
доктор химических наук
доктор медицинских наук
члнн-корр. РАН, профессор
Медвинский Александр Берельевич
Решетилов Анатолий Николаевич
Каркищенко Николай Николаевич

Ведущая организация: Институт Машиноведения РАН

Защита диссертации состоится 15 июля 2005 г. в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 200.22.01 при Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, адрес 142291, Московская область, г. Пушкино, ИТЭБ РАН

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИТЭБ РАН

Автореферат разослан 30 марта 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физико-математических наук



Ланина Н.Ф.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Тема диссертации связана с исследованием роли хемотаксиса в жизнедеятельности отдельных бактерий и их сообществ. Поэтому построение модели движения клеток при хемотаксисе, как и всестороннее экспериментальное изучение этого явления, могут найти широкое применение в различных областях микробиологии, экологии и медицинской практике. Это видно из перечня областей, где хемотаксис бактерий играет существенную роль

- экология и мониторинг окружающей среды,
- сельскохозяйственное применение бактериальных удобрений,
- биоремедиация (утилизация бактериями промышленных отходов),
- приспособление, выживаемость и миграция бактериальных популяций в естественных условиях,
- связь патогенности бактерий и хемосенсорной системы,
- образование и развитие биологических шенок,
- способы распространения и передачи инфекции,
- симбиотические отношения с микроорганизмами, минеральными, растительными и животными формами,
- биосенсоры на основе хемотаксиса бактерий

Исследованию различных аспектов хемотаксиса бактерий уделяют большое внимание во многих лабораториях мира. В российской науке это внимание явно недостаточно. В литературе появляются различные математические описания хемотаксиса микроорганизмов, но они носят разрозненный и частный характер, используются применительно к тем или иным характерным проявлениям в условиях конкретных задач исследования. Основными лабораторными способами наблюдения остаются качественные регистрация формы колоний на полужидких средах в чашках Петри и микроскопические наблюдения, а также полуколичественный способ Адлера, оперирующий с общим количеством клеток, зашедших в капилляр с веществом за определенное время. Наблюдается существенный пробел в анализе и сравнении различных способов изучения и выявления характерных физических параметров хемотаксиса, количественных способах регистрации, которые могли бы найти применение в лабораторной практике.

Поскольку хемотаксис бактерий имеет широкое распространение в самых различных сферах жизни, включая взаимодействие бактерий с высшими организмами, представляется актуальным проведение более полного и всестороннего анализа явления в целом. Подобного целостного описания явления мы попытались придерживаться в нашей работе, основываясь на подходе к подвижности и хемотаксису бактерий в рамках обобщенной модели, объединяющей характеристики движения отдельных клеток с движением популяции в целом. Для построения, проверки и уточнения теории использовали данные, полученные другими исследователями, так и данные собственных модельных экспериментов.

Цель исследования

Описание движения и хемотаксиса бактерий в рамках единой кинетической теории и проведение серии модельных экспериментов для корректировки входящих в модель параметров. Построение теории подвижности и хемотаксиса бактерий в жидких и пористых средах и на границе гетеротрофных сред. Исследование хемотаксиса разнообразными физико-химическими методами в режиме реального времени, в том числе в интерактивном режиме с использованием компьютерной обработки данных.

Задачи **исследования.**

1. Построение теории хемотаксисного взаимодействия обладающих подвижностью и хемотаксисом бактериальных популяций с корнями сельскохозяйственных культур с целью биогенного управления почвенным плодородием
2. Построение математической модели движения единичных подвижных и обладающих хемотаксисом бактерий.
3. Создание математической модели движения популяций хемотаксических бактерий, учитывающей закономерности движения отдельных клеток, в рамках единого интегро-дифференциального кинетического подхода.
4. Выявление в рамках предложенной модели связи между макропараметрами движения популяции и микропараметрами движения отдельной клетки.
5. Всесторонний анализ математической модели с подсчетом многофакторных эффектов хемотаксиса эффекта быстрой ориентации клеток и связанного с ним оптического эффекта при хемотаксисе, гетерогенного расслоения популяции на границе раздела гетеротрофных сред, особенностей миграции популяций в пористых средах.
6. Анализ влияния вязкости и температуры среды на подвижность и хемотаксис бактерий, построение модели движения бактерий в условиях переменной вязкости окружающей среды.
7. Выделение из рабочей коллекции ГНЦ ПМ перспективных с точки зрения практического применения бактерий для проведения модельных экспериментов, изучение их подвижности и хемотаксиса различными методами.
8. Проведение серии модельных экспериментов для проверки и уточнения теории
9. Конструирование лазерной установки для слежения за миграцией бактериальных полос и измерение с ее помощью характеристик движения клеток при хемотаксисе.
10. Создание и отработка денситометрической методики исследования хемотаксиса с интерактивной компьютерной обработкой экспериментальных данных
11. Построение подхода изучения хемотаксиса бактерий на колонках с пористым материалом.
12. Разработка методики изучения хемотаксиса бактерий в гелевых средах.
13. Создание экспериментальных методик по разделению различающихся по хемотаксису бактерий разных штаммов и методики отбора штаммов по хемотаксическим признакам.
14. Изучение связи подвижности и хемотаксиса бактерий с другими системами жизнедеятельности бактериальной клетки.
15. Изучение влияния на хемотаксис бактерий бактериофагов.

Научная новизна.

На основании данных о микроскопическом движении бактериальных клеток построена кинетическая теория подвижности и хемотаксиса бактерий.

Предложен новый метод исследования подвижности и хемотаксиса бактерий - кинетический, отличающийся от других существующих тем, что объединяет в себе как микро, так и макроскопический подход к движению. Метод позволяет решать одновременно две задачи: 1) исходя из микропараметров движения одной клетки, прогнозировать движение целой популяции в изменяющихся условиях окружающей среды; 2) исходя из пространственного распределения клеток, выявлять характеристики отдельно взятой клетки. Это становится возможным из кинетического уравнения, соединяющего различные характеристики движения клетки и параметры хемотаксической реакции

Детально проанализированы все входящие в модель параметры и выявлена их связь с хемотаксической реакцией клетки, проявляющейся в специфическом связывании рецептора с субстратом или неспецифической реакции хемотаксиса.

Впервые объяснен эффект образования и миграции бактериальных полос в средах с переменным химическим составом на основе кинетического уравнения и показано, почему этого нельзя сделать в рамках традиционного диффузионного подхода. Вместе с тем, на примере неспецифического (не рецепторного) хемотаксисного взаимодействия субстрат-хемоэффиктор показано, что волновой подход к описанию хемотаксиса может быть использован для интерпретации экспериментальных данных, процессов формирования и миграции бактериальных полос при неспецифическом взаимодействии.

Теоретически предсказан и экспериментально измерен оптический эффект, связанный с ориентацией бактериальных клеток при хемотаксисе.

Теоретически предсказана и экспериментально продемонстрирована возможность полного разделения различающихся по хемотаксису бактерий.

На основании модели жгутикового мотора впервые объяснен эффект влияния вязкости среды на подвижность и хемотаксис бактерий.

Теоретическая и практическая значимость.

Адекватное описание движения бактерий при хемотаксисе позволяет предсказывать поведение как одной клетки, так и серии конкурирующих между собой популяций в условиях изменяющейся окружающей среды, а также по внешним признакам распределения клеток в пространстве выявлять физиологические характеристики отдельно взятой клетки.

Сконструирована электромеханическая камера для управления разделением различающихся по хемотаксису штаммов микроорганизмов в пространственных градиентах концентрации химических веществ.

Разработан экспресс-способ количественного измерения реакции хемотаксиса по изменению оптической плотности суспензии клеток после химического воздействия, вызванного ориентацией бактериальных клеток при хемотаксисе (выдано свидетельство об изобретении).

Разработан метод количественного определения концентрации антибиотиков с использованием хемотаксиса бактерий. Тест-система с использованием хемотаксиса бактерий успешно прошла испытания на Бердском химическом заводе в условиях промышленного производства (выдано свидетельство об изобретении).

Разработана методика изучения «быстрого» хемотаксиса бактерий в пористых и приграничных средах, продемонстрирована возможность четного разделения различающихся по хемотаксису штаммов на колонках с пористым материалом.

Разработан денситометрический способ изучения и анализа хемотаксиса бактерий в жидких и гелевых средах с компьютерной обработкой экспериментальных данных.

Обнаружена корреляция подвижности и хемотаксиса бактерий с их энтомопатогенной активностью.

Предложен способ изучения мигрирующей эритемы при болезни Лайма *in vitro* с использованием хемотаксиса мигрирующих спирохет.

Продемонстрировано изменение хемотаксиса бактерий *Campilobacter jejuni* при действии связывающегося с флагаеллами бактериофага PV22.

Предложен денситометрический способ изучения гетерогенных популяций бактерий, способствующих трещинообразованию дорожных покрытий, на основе хемотаксического разделения клеток в пространственных химических градиентах.

Разработан способ создания биосенсора на основе хемотаксиса бактерий.

Предложена модель синхронизации бактериального удобрения с ризосферой культивируемых сельскохозяйственных растений.

Разработана методика определения с помощью реакции хемотаксиса присутствия в среде следовых концентраций биологически активных химических веществ.

Предложен способ быстрого количественного определения концентрации антибиотиков с использованием в качестве тест-системы хемотаксиса бактерий.

Разработана методика разделения бактерий, различающихся по хемотаксической активности. С помощью этой методики выявлена корреляционная связь между хемотаксической подвижностью и энтомопатогенной активностью клеток *Bacillus thuringiensis*.

Теория подвижности и хемотаксиса бактерий в приграничных и пористых средах, позволяет описывать процессы распространения бактерий в почвах, утилизации бактериями промышленных отходов (в частности, нефтяных пленок и полициклических ароматических углеводородов), моделировать существование и развитие микробных сообществ в конкретных условиях *in vitro*, *in vivo* и *in situ*.

На основе кинетического подхода разработана модель синхронизации почвенной и хемотаксисной активности бактериального удобрения «Гумовит», с помощью которой планируется осуществлять управление процессом синхронизации микрофлоры и сельскохозяйственных растений на территории Кыргызстана.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Кинетическая теория движения и хемотаксиса бактерий.
2. Модель влияния вязкости на подвижность и хемотаксис бактерий.
3. Физико-химические методы изучения хемотаксиса бактерий. Связь хемотаксиса с другими системами жизнеобеспечения клетки. Структура бактериальных полос в денситометрических исследованиях. Особенности поведения бактерий на границе сред. Тест-система обнаружения присутствия в среде следовых концентраций химически активных веществ. Экспресс-анализ окружающей среды с использованием хемотаксиса бактерий. Определение концентрации антибиотиков с использованием хемотаксиса бактерий.

Апробация работы.

Материалы диссертации многократно докладывались на региональных, всероссийских и международных конференциях и совещаниях, на биофизических и биотехнологических съездах. Диссертация апробирована на заседании ученого совета ФГУП «Государственный научный центр прикладной микробиологии».

Публикации.

Основное содержание работы отражено в 75 научных публикациях, в сборниках трудов конференций, в двух авторских свидетельствах на изобретение.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из предисловия, введения, 5 глав, выводов, списка литературы и приложения. Объем диссертации 250 страниц машинописного текста, 55 рисунков и 20 таблиц. Список литературы включает 460 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе обобщены данные литературы о движении отдельных бактерий и их популяций, что явилось основой развиваемой в главе 3 кинетической теории. Подробно рассматриваются различные аспекты хемотаксиса бактерий: характеристики движения, строение и энергообеспечение бактериальных жгутиков, структура и особенности вращения флагелл, феноменология хемотаксиса бактерий, структура и молекулярная организация механизма бактериального хемотаксиса, методы математического моделирования бактериальной подвижности и хемотаксиса.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе мы исследовали следующие виды бактерий *E coli* *S thyphimurium* *Ps aeruginosa* *B subtilis*, *B anthracis* *B thuringiensis* *Helicobacter pilori* *Campilobacter jejuni* *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi* и др

При изучении хемотаксиса бактерий использовались разнообразные физико-химические методы, позволяющие получать информацию о механизмах функционирования хемотаксической системы бактерий на молекулярном уровне. Поскольку внешнее проявление хемотаксиса в ответ на действие раздражителя заключается в изменении структуры движения бактерий, внимание уделяется способам, с помощью которых можно регистрировать реакцию движения хемотаксичных бактерий и количественно характеризовать их хемотаксическую активность

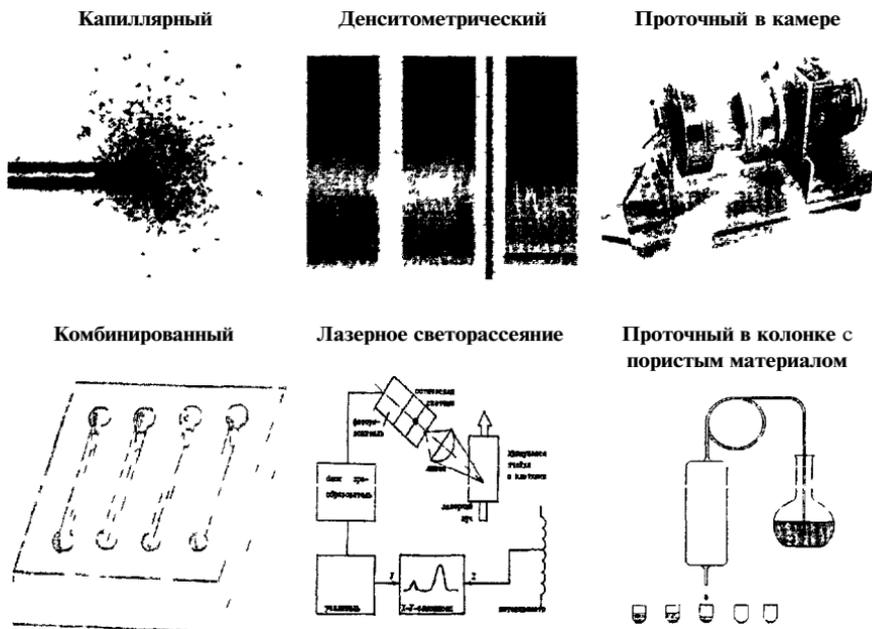


Рис. 1. Способы измерения хемотаксиса бактерий.

Глава 3. ИНТЕГРО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПОДВИЖНОСТИ И ХЕМОТАКСИСА БАКТЕРИЙ

В главе 3 излагается кинетический подход к моделированию хемотаксиса бактерий. В основу модели положены результаты опытов Берга и Брауна [Berg & Brown, 1972, Brown & Berg, 1974], согласующиеся с ними данные группы Кошланда [Dahlquist et al, 1975] и собственные модельные разработки

Основные положения кинетической теории подвижности и хемотаксиса следующие

- 1 траектория движения бактерии представляет собой ряд последовательных прямолинейных отрезков в пространственно-временной области вблизи точки $\{\bar{r}, t\}$,

- 2 вес участка ровного плавания (или пробега) бактерий характеризуются постоянной скоростью плавания v и направлением движения \vec{n} ,
- 3 время изменения направления движения от направления плавания \vec{n}' к последующему направлению плавания \vec{n} (так называемое «время тамблиша» или «время кувыркания») τ , пренебрежимо мало по сравнению со временем плавания g по прямолинейному участку траектории и полагается равным нулю,
- 4 частота кувырканий клетки γ ($\gamma = 1/\tau$ - величина, обратная продолжительности времени плавания) задается некой вероятностью распределения,
- 5 функция плотности вероятности для частоты кувырканий представляет собой спадающую экспоненциальную функцию γ ,
- 6 угол между двумя последовательными отрезками с направлениями \vec{n}' и \vec{n} задается вероятностным законом $\beta(\vec{n}', \vec{n})$ и не зависит от направления, продолжительности и скорости движения клетки по предыдущей траектории (для бактерий *E. coli* распределение изменения направления движения по углам после кувыркания измерено экспериментально Бергом и Брауном [Brown & Berg, 1974]),
- 7 все бактерии в группе считаются идентичными

Вообще говоря, условие 3 о равенстве времени кувыркания нулю не является обязательным для построения кинетической модели движения популяции, однако существенно упрощает вычисления и не сильно «загрязняет» модель.

Бактериальный хемотаксис по существу определяется условием 4, то есть зависимостью функции γ от направления движения клетки \vec{n} . В общем случае функция γ представима в виде.

$$\gamma = \gamma(v, \vec{n}, c, \frac{\partial c}{\partial t}, \nabla c),$$

где ∇c - вектор градиента хемозффектора

Далее в рассмотрение вводится функция f , которая является плотностью распределения бактерии по направлениям движения \vec{n} в окрестности точки \vec{r} в момент времени t . Плотность (концентрация) бактерий b выражается через функцию f усреднением по всем направлениям движения

$$b(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi} \int_n f(\vec{r}, \vec{n}, t) d\vec{n} \quad (1)$$

Рассматривая движение группы однородных бактерий в пространстве $\{\vec{r}, t\}$, пренебрегая ростом и гибелью клеток, когда общее число рассматриваемых бактерий остается неизменным, а состав популяции и входящих в неё клеток постоянны, из условия баланса с учетом изложенных в диссертации положений модели выводится интегродифференциальное уравнение кинетического переноса для функции f

$$\begin{aligned} \frac{\partial f(\vec{r}, \vec{n}, t)}{\partial t} + v \cdot \vec{n} \nabla f(\vec{r}, \vec{n}, t) = -\gamma(v, \vec{n}, c, \frac{\partial c}{\partial t}, \nabla c) \cdot f(\vec{r}, \vec{n}, t) + \\ \frac{1}{4\pi} \iiint_n \gamma(v, \vec{n}', c, \frac{\partial c}{\partial t}, \nabla c) \cdot \beta(\vec{n}', \vec{n}) f(\vec{r}, \vec{n}', t) \cdot d\vec{n}' \quad (2) \end{aligned}$$

Начальные и граничные условия задаются для конкретной задачи. Уравнение (2) дополняется уравнением, описывающим диффузию и потребление субстрата-хемозффектора

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = -K(c)b(\vec{r}, t) + D \frac{\partial^2 c(\vec{r}, t)}{\partial r^2} \quad (3)$$

где D - коэффициент диффузии хемозффектора, $K(c)$ - скорость потребления субстрата бактериями

Система уравнений (2)-(3) в рамках принятой модели полностью описывает движение гомогенной популяции бактерий в пространственно-неоднородной среде

Параметры ν и D зависят от вида бактерий и определяются из микроскопических наблюдений

Для функции γ используется следующее соотношение

$$\gamma = \gamma_0 \exp \left[- \frac{\alpha K_D}{(K_D + c)^2} \frac{dc}{dt} \right] \quad (4)$$

где γ_0 - частота кувырканий клеток в стационарной среде

Значения α и K_D могут быть измерены независимым образом в реакции специфического взаимодействия рецепторов E_0 с субстратом-хемозффектором (согласно уравнению Михаэлиса-Ментен) Величина $\gamma_0 = 1/\tau_0$ может быть найдена экспериментально путем микроскопических наблюдений за отдельными бактериями и усреднением по ансамблю

Средний угол и функция распределения $\beta(\vec{n}', \vec{n})$ между двумя последующими направлениями движения \vec{n} и \vec{n}' также могут быть измерены экспериментально [Brown & Berg, 1974] Функции эти видоспецифичны и зависят от вязкости среды

Таким образом, все входящие в систему уравнений (2)-(3) параметры допускают возможность независимых экспериментальных измерений Поэтому система (2)-(3), имеющая общий характер, в принципе применима для решения любых задач движения популяций однородных бактерий при условии, что выполняются требования модели 1-7 п 3 2 Система эта является полной, удовлетворяет условиям Коши и имеет единственное решение

Рассматривая движение клетки с равномерной скоростью \vec{v} в среде с осевым градиентом концентрации, составляющей с направлением оси угол, косинус которого обозначим через μ , для dc/dt получим

$$\frac{dc}{dt} = \frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial c}{\partial x} \nu \mu \quad (5)$$

где $\partial c / \partial t$ определяется из (3)

Численные оценки экспериментальных данных по миграции бактериальных полос показывают, что величина $\nu \partial c / \partial x$ в этих экспериментах обычно на порядок (в ~ 10 раз) больше рассчитанной по формуле (3) величины $\partial c / \partial t$ Пренебрежение временными изменениями концентрации хемозффектора за время одиночного пробега бактерии означает переход к «пространственной» рецепции от «временной» Обычно мы анализируем именно этот случай

Для одномерной задачи движения популяции однородных бактерий уравнение (2) примет вид

$$\frac{\partial f(x, \mu, t)}{\partial t} + \nu \mu \frac{\partial f(x, \mu, t)}{\partial x} = -\gamma_0 \exp(-\Psi \mu) f(x, \mu, t) + \frac{\gamma_0}{4\pi} \int_{\theta'} f(x, \mu', t) \exp(-\Psi \mu') \beta(\varphi', \theta' \rightarrow \varphi, \theta) d\varphi' d\theta' \quad (6)$$

где через $\beta(\varphi', \theta' \rightarrow \varphi, \theta)$ обозначена функция распределения вероятности для бактерии, движущейся в угловом направлении (φ', θ') , после кувыркания перейти в направление (φ, θ) , $\mu' = \cos \theta'$, $\mu = \cos \theta$, а функция Ψ определяется равенством

$$\Psi = \frac{\alpha E_0 K_D}{(K_D + c)^2} \frac{\partial c}{\partial x} \quad (7)$$

Условие нормировки функции $\beta(\varphi, \theta \rightarrow \varphi, \theta)$ определяется из соотношения

$$\frac{1}{4\pi} \iint_{\varphi, \theta} \gamma(\cos \theta) \beta(\varphi, \theta' \rightarrow \varphi, \theta) d\varphi d\theta = \gamma(\cos \theta) \quad (8)$$

Аппроксимируя функцию $\beta(\varphi, \theta' \rightarrow \varphi, \theta)$ по таномом третьей степени, на основании экспериментальных данных Бсрга и Брауна [Вгoup & Berg, 1974] об уловом распределении направлений движения бактерий *E coli K12* после кувыркания по отношению к предыдущему направлению движения можно ПОЛУЧИТЬ следующую зависимость для функции β

$$\beta(\varphi', \theta' \rightarrow \varphi, \theta) = 3\pi(1 + 4\mu_0 - \mu_0^2 - 4\mu_0^3), \quad (9)$$

где через μ_0 обозначен косинус угла между новым направлением движения клетки *B coli K 12* дикого по хемотаксису типа (после кувыркания) к предыдущем направлению движения (до кувыркания)

$$\mu_0 = \cos \theta' \cos \theta + \sin \theta' \sin \theta \cos(\varphi - \varphi') \quad (10)$$

Средний угол поворота бактерии *E coli* в опытах Берга и Брауна равен 64°

После подстановок всех функций в уравнения (2) (3) и разложения всех функций в ряды по полиномам Лежандра, выводится бесконечномерная система дифференциальных уравнений в частных производных

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial f^0}{\partial t} + \frac{v}{3} \frac{\partial f^1}{\partial x} = 0 \\ \frac{\partial f^1}{\partial t} + v \frac{\partial f^0}{\partial x} + \frac{2}{5} v \frac{\partial f^2}{\partial x} + \omega_k^1 f^k = 0 \\ \frac{\partial f^2}{\partial t} + \frac{2}{3} v \frac{\partial f^1}{\partial x} + \frac{3}{7} v \frac{\partial f^3}{\partial x} + \omega_k^2 f^k = 0 \\ \frac{\partial f^3}{\partial t} + \frac{3}{5} v \frac{\partial f^2}{\partial x} + \frac{4}{9} v \frac{\partial f^4}{\partial x} + \omega_k^3 f^k = 0 \\ \dots \\ \frac{\partial f^n}{\partial t} + \frac{n}{2n-1} v \frac{\partial f^{n-1}}{\partial x} + \frac{n+1}{2n+3} v \frac{\partial f^{n+1}}{\partial x} + \omega_k^n f^k = 0 \end{array} \right. \quad (11)$$

где f^k - k -й член разложения плотности распреаения бактерий f по направлениям движения μ , запись $\omega_k^r f^k$ означает суммирование по индексу k от 0 до

$$\left\{ \begin{array}{l} \omega_k^1 = \frac{3}{10} \sum_{l=0}^{\infty} (2l+1)(-1)^l \left(\frac{\pi}{2\Psi}\right)^{1,2} I_{l+1,2}(\Psi) \int_1^1 P_l P_l P_k d\mu \\ \omega_k^2 = 3 \sum_{l=0}^{\infty} (2l+1)(-1)^l \left(\frac{\pi}{2\Psi}\right)^{1,2} I_{l+1,2}(\Psi) \int_1^1 P_2 P_l P_k d\mu \\ \omega_k^3 = \frac{47}{10} \sum_{l=0}^{\infty} (2l+1)(-1)^l \left(\frac{\pi}{2\Psi}\right)^{1,2} I_{l+1,2}(\Psi) \int_1^1 P_3 P_l P_k d\mu \\ \omega_k^n = \frac{2n+1}{2} \sum_{l=0}^{\infty} (2l+1)(-1)^l \left(\frac{\pi}{2\Psi}\right)^{1,2} I_{l+1,2}(\Psi) \int_1^1 P_n P_l P_k d\mu \text{ при } n \geq 4 \end{array} \right. \quad (12)$$

где P_n - полиномы Лежандра n -й степени $I_{n+1,2}(\Psi)$ - модифицированные сферические функции Бесселя первого рода

С учетом сделанных предположений система (11) сводится к системе четырех уравнений

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{1}{3} \frac{\partial f}{\partial x} &= 0 \\ \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{1}{5} \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{2}{5} \frac{\partial f}{\partial x} + \gamma_0 (-0.2\Psi - 0.02\Psi) f + \gamma_0 (0.2 - 0.052\Psi) f + \\ &+ \gamma_0 (-0.08\Psi - 0.008\Psi) f + \gamma_0 (0.002\Psi) f = 0 \\ \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{2}{3} \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{3}{7} \frac{\partial f}{\partial x} + \gamma_0 (0.4\Psi) f + \gamma_0 (-0.8\Psi - 0.011\Psi) f + \\ &+ \gamma_0 (1.2 + 0.02\Psi) f + \gamma_0 (-0.051\Psi - 0.066\Psi) f^2 = 0 \\ \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{3}{5} \frac{\partial f}{\partial x} + \gamma_0 (-0.09\Psi) f^0 + \gamma_0 (0.27\Psi) f + \\ &+ \gamma_0 (-0.8\Psi - 0.013\Psi) f + \gamma_0 (1.34 + 0.32\Psi) f = 0 \end{aligned} \right. \quad (13)$$

Из уравнения (13) выводится минимальное диффузионное приближение при условии $f \rightarrow 0$ и $f \equiv 0$

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{1}{3} \frac{\partial f}{\partial x} &= 0 \\ \frac{\partial f}{\partial t} + \frac{1}{5} \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{2}{5} \frac{\partial f}{\partial x} + \gamma_0 (-0.2\Psi - 0.02\Psi) f + \gamma_0 (0.2 + 0.052\Psi) f &= 0 \end{aligned} \right. \quad (14)$$

Формально считая функцию f известной из второго уравнения (14) следует

$$f = \int_0^x \left[\frac{\partial f^0}{\partial x} + \gamma_0 (-0.2\Psi - 0.02\Psi) f^0 \right] \exp[-\gamma_0 (0.2 - 0.052\Psi)(x-t)] dt \quad (15)$$

При возрастании t ($t \gg t$) интеграл в правой части (15) асимптотически сходится к

$$f = \left[\frac{5v}{\gamma_0(1+0.26\Psi)} \right] \frac{\partial f}{\partial x} + \left[\frac{\Psi + 0.18\Psi}{1+0.26\Psi} \right] f^0 \quad (16)$$

Подставляя (16) в первое уравнение системы (14) получим уравнение для функции плотности бактерий f^0 (концентрация клеток) вдоль оси X

$$\frac{\partial f^0}{\partial t} - \frac{5v}{3\gamma_0(1+0.26\Psi)} \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{1}{3} \left[\frac{2.6v}{\gamma_0(1+0.26\Psi)} \frac{\Psi\Psi}{1+0.26\Psi} + \frac{\Psi+0.1\Psi}{1+0.26\Psi} \right] \frac{\partial f^0}{\partial x} + \\ + \frac{1}{5} \left[\frac{1+0.04\Psi^2+0.024\Psi^2}{(1+0.26\Psi)} \right] \Psi f^0 = 0 \quad (17)$$

Уравнение (17) по форме совпадает с уравнением Кеттел-Зигеля описанным в разделе 1.7 диссертации где функции подвижности μ и хемотаксиса χ выражаются через Ψ следующим образом

$$\mu = \frac{5v^2}{3\gamma_0(1+0.26\Psi)} \quad (18)$$

$$\chi \frac{\partial c}{\partial x} = \frac{1}{3} \frac{\Psi+0.1\Psi^2}{1+0.26\Psi}$$

Таким образом волновое уравнение Кеттел-Зигеля можно рассматривать как диффузионное приближение кинетического уравнения (2) причем функции μ и χ выражаются через микроскопические характеристики по формулам (18). При $\Psi \rightarrow 0$ формулы (18) функциональная зависимость μ и χ принимает вид

$$\mu|_{\Psi \ll 1} = \frac{5v^2}{3\gamma_0} = const, \quad (19)$$

$$\chi \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{\Psi \ll 1} = \frac{v}{3} \Psi = -\frac{\sigma \cdot v \cdot K_D}{3(K_D + c)^2} \cdot \frac{\partial c}{\partial x},$$

Диффузионное приближение принимает следующий вид:

$$\frac{\partial b}{\partial t} - \frac{v}{3} \frac{\partial}{\partial x} \left\{ \frac{1}{\omega_1} \left(v \frac{\partial b}{\partial x} + \omega_0^1 b \right) \right\} = 0, \quad (20)$$

где

$$\begin{aligned} \omega_0^1 &= -\frac{3}{5} \cdot \left(\frac{\pi}{2\Psi} \right)^{1/2} \cdot I_{3/2}(\Psi) = -\frac{1}{5} \cdot \left(\Psi + \frac{1}{10} \Psi^3 + \frac{1}{280} \Psi^5 + \frac{1}{15120} \Psi^7 + \dots \right), \\ \omega_1^1 &= \frac{1}{5} \cdot \left(\frac{\pi}{2\Psi} \right)^{1/2} \cdot [I_{1/2}(\Psi) + I_{3/2}(\Psi)] = \\ &= \frac{1}{5} \cdot \left(1 + \frac{1}{6} \Psi^2 + \frac{1}{120} \Psi^4 + \frac{1}{5040} \Psi^6 + \dots \right) + \frac{2}{75} \cdot \left(\Psi^2 + \frac{1}{14} \Psi^4 + \frac{1}{504} \Psi^6 + \dots \right) \end{aligned} \quad (21)$$

Уравнение (20) с коэффициентами (21) получено без ограничения на величины градиентов концентраций, определяемых функцией Ψ . В частности, если рассматривать движение бактерий в малых по величине градиентах, когда $\Psi \ll 1$, в (21) можно пренебречь членами разложения высокого порядка малости, и тогда вместо (40) получим:

$$\frac{\partial b}{\partial t} - \frac{5v^2}{3\gamma_0} \frac{\partial^2 b}{\partial x^2} + \frac{v}{3} \Psi \cdot \frac{\partial b}{\partial x} + \frac{v}{3} \frac{\partial \Psi}{\partial x} \cdot b = 0 \quad (22)$$

Поскольку для разных бактерий распределение β имеет видоспецифичный характер, диффузионное уравнение для других видов бактерий принимает более общий вид, чем уравнение (22) для *E coli*:

$$\frac{\partial b}{\partial t} - \frac{5\delta_1 \cdot v^2}{\gamma_0} \frac{\partial^2 b}{\partial x^2} + \delta_1 \cdot v \cdot \left(\psi \cdot \frac{\partial b}{\partial x} + \frac{\partial \psi}{\partial x} \cdot b \right) = 0, \quad (23)$$

где f — функция распределения бактерий по направлениям движения \vec{n} в окрестности точки \vec{r} ;

β — функция вероятности смены направления движения бактерии от направления \vec{n}' к направлению \vec{n} ;

b — концентрация клеток вдоль одномерной ячейки;

t — время проведения эксперимента;

v — скорость плавления бактерии в растворе;

γ_0 — частота кувырканий клетки в однородной среде в отсутствие хемотаксиса;

δ_1 — некоторый числовой коэффициент (обычно лежащий в диапазоне 0.2-0.4 [собственные измерения]), который зависит от вида исследуемых бактерий.

В разделе диссертации 4.4 показано, что уравнение (23) можно использовать при описании неспецифического хемотаксиса бактерий к соединениям, реакция взаимодействия которых не описывается уравнением (7) Михаэлиса-Ментен (например, хемотаксис к гидрофобному нафталину).

По форме уравнение (22) совпадает с известным уравнением Келлер-Зигеля, однако в (22) все функциональные параметры имеют четко определенный физический смысл. Наиболее общий вид диффузионного приближения кинетического уравнения представляет формула (17) с входящими параметрами, определяемыми из формулы (7). Исходя из вывода перечисленных соотношений, можно ожидать, что уравнение (17) более адекватно описывает процесс образования и миграции бактериальных полос, поскольку вывод уравнения (17) не использовал предположения о малости хемотаксического

воздействия Возвращаясь в связи с этим к экспериментальным данным Адлера по миграции бактериальных полос, заметим, что значение функции Ψ в полосе достигает значений ~ 1 , и поэтому неудивительно, что все попытки интерпретировать процесс образования миграционных бактериальных полос на основе феноменологического волнового подхода потерпели неудачу. Очевидно, что при вычислении точной формы "бактериальной полосы" переход от более общего уравнения (17) к уравнению (22) неправомерен. Отсюда можно сделать вывод, что коэффициенты μ и χ , используемые при волновом подходе вообще не выражаются простыми аналитическими функциями. В частности из уравнения И 8) видно что так называемый «коэффициент подвижности» бактерий μ может существенно отличаться от подвижности, наблюдаемой микроскопически у отдельных клеток в изотропной среде. То же самое можно сказать и про «коэффициент хемотаксиса».

На основании основного кинетического уравнения можно оценить изменения оптической плотности бактериальной суспензии, связанные с ориентационными эффектами в градиенте хемотаксиса. Считая в данной модели, что основным кинематическим проявлением хемотаксиса бактерий является различие в длительности пробегов по градиенту и против него, в качестве основной гипотезы предположим, что бактерии, имеющие анизотропную форму, на прямолинейных участках движения определенным образом ориентируются относительно направления движения (подтверждается экспериментальными наблюдениями). При этом асимметрия в длительности пробегов должна быть эквивалентна в среднестатистическом значении некоторому ориентационному эффекту. Ориентация анизотропных по форме клеток может явиться одной из причин изменения оптической плотности. Это изменение выражается через сечение ослабления света σ одной клетке и функцию углового распределения клеток F [Ван-де-Хюлет, 1961].

Численные оценки проведены на примере бактерий *Eschenchia coh*. Форма клеток моделируется эллипсоидами вращения с большой полуосью $a=1$ мкм и малой $b=0,5$ мкм [Holz & Chen, 1978]. В видимом диапазоне длин волн λ поглощением излучения клетками можно пренебречь и считать, что ослабление света обусловлено светорассеянием [Сидько, 1971]. Для расчетов относительную величину коэффициента преломления бактериальных клеток в водной среде следует выбирать из интервала $n=1,04-1,08$. Размеры клеток и величины n позволяют при вычислении сечения ослабления света воспользоваться приближением Ван-де-Хюлета

$$\sigma(\alpha) = 2\pi R_0^2 \eta \left\{ 1 - 2\rho^{-1} \eta \left[\sin\left(\frac{\rho}{\eta}\right) + \rho^{-1} \eta \cos\left(\frac{\rho}{\eta}\right) \right] + 2\rho^{-2} \eta^2 \right\}, \quad (24)$$

где $\rho = 4\pi(n-1)/\lambda$, R_0 - радиус эквивалентной сферы, α - угол между направлением падающего света и большой осью эллипсоида,
 $\eta = (a/b)^{1/3} \sqrt{\sin^2 \alpha + (b/a)^2 \cos^2 \alpha}$ Оптическая плотность τ в ячейке протяженностью l при этом имеет вид

$$\tau = 2\pi l \int_0^\pi \sigma(\alpha) F(\alpha) \sin \alpha d\alpha \quad (25)$$

Здесь функция распределения $F(\alpha)$ считается однородной по пространственным координатам и азимутальным углам.

Так как зависимость γ от временной производной $\partial/\partial t(\Psi(c))$ в рассматриваемом случае не влияет на ориентацию, достаточно рассмотреть пространственную часть этой функции

$$\gamma(\vec{n}) = \gamma_0 + \delta(c) v_0 \vec{n} \nabla_x c(\vec{x}) \quad (26)$$

В достаточно широком диапазоне концентраций хемотаксиса с высокой точностью выполняется равенство $\delta(c) = \delta_0 / c$, где δ_0 иногда называют коэффициентом

хемотаксической силы. Для оценок ограничимся рассмотрением одномерного экспоненциального градиента, когда можно считать $\delta(c)\nabla_x c(\bar{x}) \approx \delta_0 \nabla_x \ln c = \text{const}$ [Dahlquist et al., 1972]. В этом случае выражение (26) выглядит наиболее просто:

$$\gamma(\bar{n}) = \gamma_0 + \gamma_1 \cos \theta, \quad (27)$$

где θ есть угол между направлением пробега \bar{n} и направлением градиента \bar{x} ,

$$\gamma_0 = \text{const}, \gamma_1 = |\delta(c)v_0 \partial / \partial x c(x)| = \text{const}.$$

Из диффузионного приближения основного кинетического уравнения следует, что параметры γ_0 и γ_1 связаны со скоростью хемотаксического переноса u и коэффициентом диффузии бактерий D следующими соотношениями:

$$\gamma_0 = \frac{v_0^2}{3D}; \quad \gamma_1 = \frac{uv_0}{D}. \quad (28)$$

Для типичных значений D , u и v_0 для *E. coli* из [Macnab & Koshland, 1972; Mesibov et al., 1973] по формуле (28) получим $\gamma_1/\gamma_0 \approx 0,3-0,5$.

Изменение оптической плотности за счет ориентации бактерий должно наблюдаться при пространственно однородной и стационарной концентрации клеток. Следовательно, для оценки эффекта достаточно искать решение основного кинетического уравнения при условии $\partial f / \partial t = 0$, $\nabla_x f = 0$. В этом случае из (2) и (27) получим:

$$f(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{N_0 \gamma_0}{\gamma_0 + \gamma_1 \cos \theta}, \quad (29)$$

где N_0 – концентрация клеток.

Разложим (29) в ряд по полиномам Лежандра $P_k(\cos \theta)$:

$$f(\theta) = \frac{1}{4\pi} N_0 \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{\gamma_0}{\gamma_1} (2k+1) Q_k \left(-\frac{\gamma_0}{\gamma_1} \right) P_k(\cos \theta), \quad (30)$$

где $Q_k(-\gamma_0/\gamma_1)$ – функция Лежандра второго рода [Справочник по специальным функциям, 1979].

Чтобы воспользоваться соотношением (30) для выполнения интегрирования (25), проведем преобразование вращения и перейдем от углов θ к углам α . Пользуясь теоремой сложения полиномов Лежандра и проводя усреднение по азимутальным углам, из (30) получим:

$$F(\alpha) = \frac{1}{4\pi} N_0 \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{\gamma_0}{\gamma_1} (2k+1) Q_k \left(-\frac{\gamma_0}{\gamma_1} \right) P_k(\cos \beta) P_k(\cos \alpha), \quad (31)$$

где β – угол между направлением градиента \bar{x} и направлением падения света.

Обозначим через σ_k коэффициенты разложения сечения ослабления по полиномам Лежандра и из (25) и (31) получим:

$$\tau = IN_0 \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{\gamma_0}{\gamma_1} Q_{2k} \left(-\frac{\gamma_0}{\gamma_1} \right) P_{2k}(\cos \beta) \sigma_{2k}. \quad (32)$$

Подставляя в (32) значения параметров до и после ориентации (N_0 считаем сохраняющейся величиной), получим для возможной величины изменения плотности $\Delta \tau$ за счет ориентации следующее соотношение:

$$\Delta \tau = IN_0 \frac{\gamma_0}{\gamma_1} \sum_{k=1}^{\infty} Q_{2k} \left(-\frac{\gamma_0}{\gamma_1} \right) P_{2k}(\cos \beta) \sigma_{2k}. \quad (33)$$

Пренебрегая членами разложения выше второго, из (33) получим::

$$\frac{\Delta\tau}{\tau_0} \cong \frac{2}{15} \frac{\sigma_2}{\sigma_0} \left(\frac{\gamma_1}{\gamma_0} \right)^2 P_2(\cos\beta), \quad (34)$$

где через $\tau_0 = \sigma_0 \cdot l \cdot N$ обозначена оптическая плотность клеточной суспензии до ориентации.

В рассматриваемом случае на основе выражения (24) имеем $\sigma_2 / \sigma_0 \approx 0,5 - 0,8$, а $\Delta\tau / \tau_0 \approx 0,02 - 0,04$.

Таким образом, для таких бактерий, как *E. coli*, подсчитанный по формуле (34) оптический эффект может достигать нескольких процентов и вполне доступен экспериментальному изучению. Проведение измерений по изменению оптической плотности за счет ориентационных эффектов в специально созданных пространственных градиентах хемотропности может дать новую информацию о хемотаксисе бактерий. Результаты эксперимента приведены на рис.7.

Предложенная нами кинетическая модель хемотаксиса бактерий в принципе позволяет исследовать не только характер движения популяций, но и динамику образования «бактериальных полос», а также более «тонкие» эффекты, обусловленные ориентацией клеток при хемотаксисе (разделы 3.4 и 4.8 диссертации).

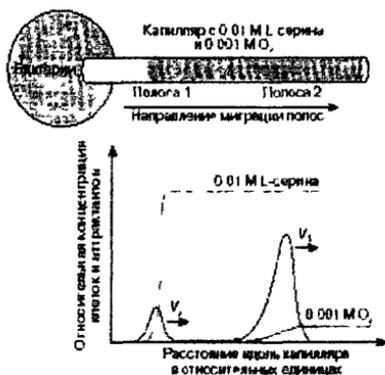
Глава 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В главе 4 изучалось влияние температуры и вязкости среды на подвижность и хемотаксис бактерий. Было показано, что собственная подвижность бактерий монотонно растет с увеличением температуры в примерном соответствии с законом Вант-Гоффа, тогда как хемотаксическая способность зависит от температуры более сложным образом и для каждого вида микроорганизмов достигает максимального значения в ограниченном интервале температур. Зависимость хемотаксиса бактерий от вязкости среды мы объясняем влиянием последней на скорость вращения филамента. Предложена модель, объясняющая существование для клеток оптимальных значений вязкости, при которых скорость движения клеток достигает наивысших значений. Мы показали, что встречающееся в литературе понятие «вязкотаксис», описывающее явление смещения популяций в направлении оптимальных значений вязкости, является следствием зависимости скорости плавания бактерии от ньютоновской вязкости жидкости.

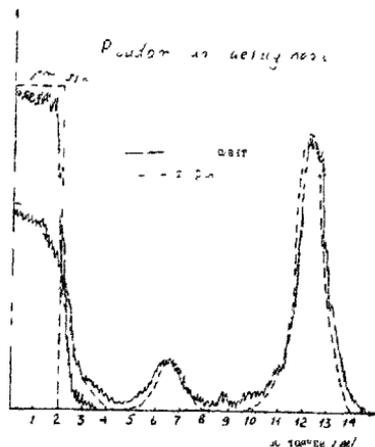
Исследована связь подвижности с другими системами жизнеобеспечения бактериальной клетки. Изучено влияние ультрафиолетового облучения на подвижность и хемотаксис бактерий. Установлена корреляционная связь энтомопатогенной и хемотаксической активности штаммов *Bac.thuringiensis*. Детально исследованы структура бактериальных полос в денситометрических исследованиях, распространение бактериальных фронтов в условиях метаболизируемого и неметаболизируемого субстрата, «быстрый» хемотаксис бактерий в пористых средах, особенности поведения бактерий на границе сред. Мы использовали хемотаксис бактерий для определения концентрации антибиотиков, но что получено свидетельство об изобретении. Вторым свидетельством об изобретении является экспресс-анализ окружающей среды с использованием системы хемотаксиса бактерий.

На Рис.2 приведены расчетные кривые распределения клеток *E.coli* вдоль оптической ячейки при реакции на аттрактант, полученные с помощью диффузионного приближения кинетического уравнения.

а



б



в

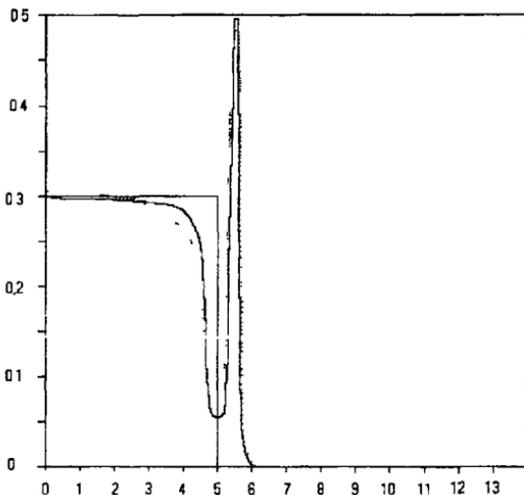


Рис 2а Образование и миграция двух бактериальных полос *E coli K12* в положительной хемотаксической реакции на растворенный в воде молекулярный кислород в концентрации 0,001 М (полоса 1) и L-серин в концентрации 0,01 М (полоса 2) Сначала формируется первая полоса, мигрирующая вдоль капилляра со скоростью V_1 , за ней - вторая, двигающаяся со скоростью V_2 $V_1 > V_2$ Картинка зафиксирована через 1 час после погружения капилляра с исследуемым раствором в суспензию бактерий [Завальский, 2001] Рис 2б Временное распределение концентрации клеток *Ps aeruginosa* вдоль оптической ячейки при реакции на растворенный в воде молекулярный кислород (10^3 М) и L-серин (10^2 М) Исходная концентрация клеток 6×10^8 кл/мл соответствовала оптической плотности суспензии $D=0,3$ при 540 нм Время измерения - 2 часа после наслоения суспензии Рис 2в Экспериментальная () и теоретическая () кривые распределения клеток *Pseudomonas putida AZ Naph*⁺ в момент времени $t=10$ мин В начальный момент времени ($t < 15$ мин) динамика распределения клеток *Naph*⁺ практически не отличается от *Naph*⁺

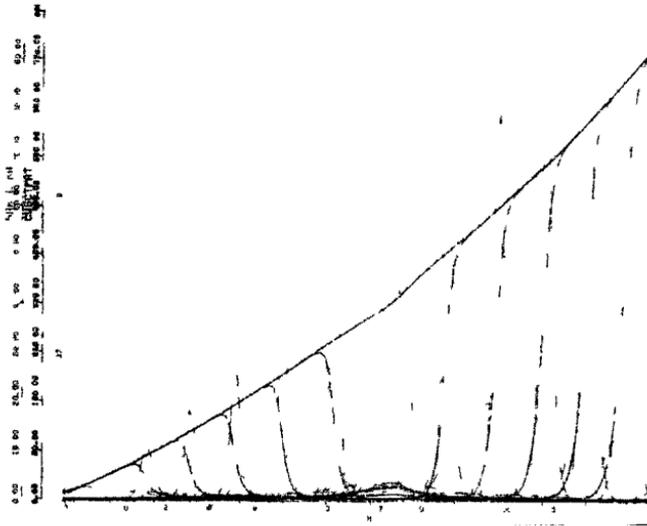


Рис 3 «Расщепление» популяции из двух вариантов одного штамма в метаболизируемом субстрате-хемосигнале в специализированной хемотаксисной камере (см рис 1)

Нами был изучен хемотаксис бактерий-деструкторов полициклических ароматических углеводородов к нафталину методом вертикальной денситометрии в градиенте хемосигнала. В работе использовали культуры *Pseudomonas putida* AZ $Naph^+$ и $Naph^-$, взятые из экспоненциальной фазы роста, когда подвижность и хемотаксисная активность бактерий наивысшая.

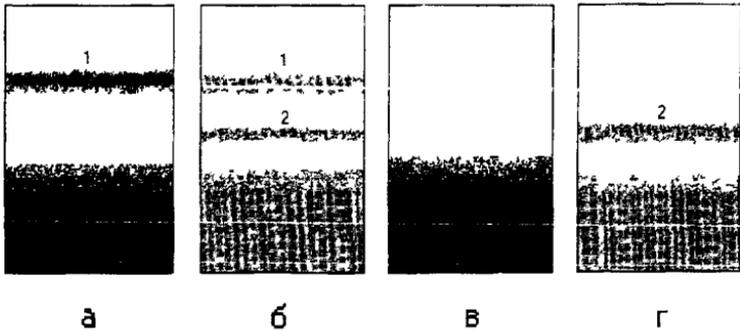


Рис 4 Распределение клеток *Pseudomonas Putida* AZ $Naph^+$ (а, в) и $Naph^-$ (б, г) в момент времени $t=60$ мин. На снимках а) и б) присутствует полоса 1, обусловленная азотаксисом клеток на растворенный в воде молекулярный кислород. На снимках в) и г) азотаксис не наблюдается из-за отсутствия в среде кислорода. Бактерии *Pseudomonas Putida* AZ $Naph^+$ не образуют мигрирующей полосы в хемотаксисной реакции на нафталин (в). *Pseudomonas Putida* A7 $Naph^-$ образуют (г).

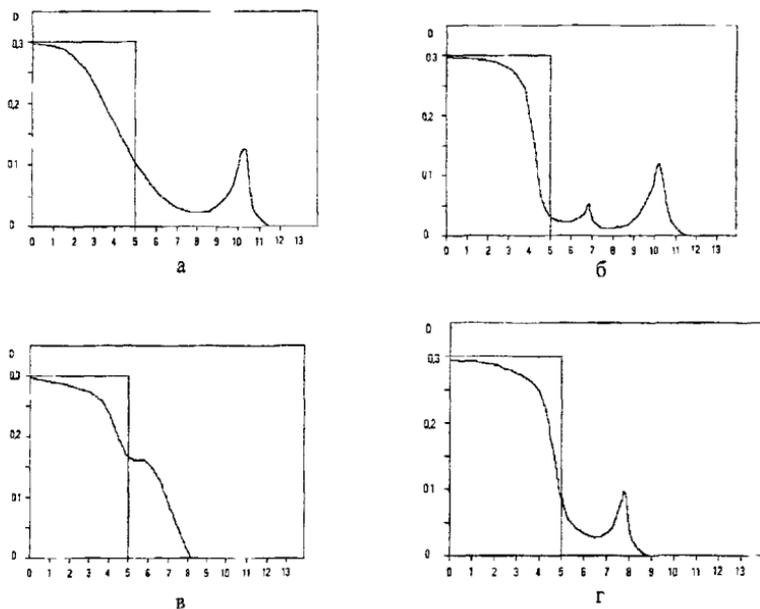


Рис.5. Денситограммы распределения клеток *Pseudomonas Putida AZ Naph⁻* (а, в) и *Pseudomonas Putida AZ Naph⁺* (б, г) в момент времени $t=60$ мин при наличии (а, б) и в отсутствие (в, г) аэротаксиса.

Популяция клеток *Naph⁻* смещается в сторону повышенной концентрации аттрактанта (смещения не наблюдалось в контрольном опыте, в отсутствие аттрактанта) без образования мигрирующей концентрационной полосы клеток.

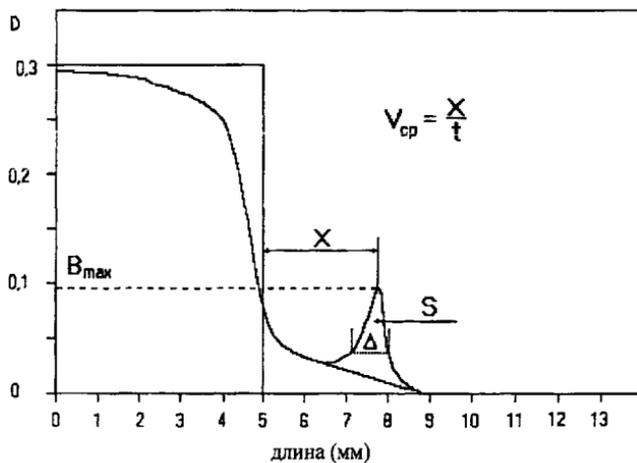


Рис.6. Измерение параметров хемотаксиса в денситометрическом методе исследования.

Таблица Параметры ценситометрии бактерий *Pputida AZ Naph* и *Pputida A7 Naph⁺* к нафталину

Параметр хемотаксиса	Время измерения t (минуты)						
	0	10	20	30	40	50	60
<i>Naph</i> (мигрирующая полоса не образуется)							
Смещение фронта X (мм)	0	1.5	2.0	2.5	2.75	3.0	3.2
Скорость фронта $V_{cp} = X/t$ (мм/час)	9	6	5	4	3.5	3.2	3
Скорость фронта $V = dX/dt$ (мм/час)	9	3	3	1.25	1.25	1.2	1.0
$W \times 10^7$ кл	0.3	1.0	1.5	2.0	2.3	2.4	2.5
<i>Naph⁺</i> (мигрирующая полоса образуется)							
Смещение полосы X (мм)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Скорость полосы $V_{cp} = X/t$ (мм/час)	3	3	3	3	3	3	3
Скорость полосы $V = dX/dt$ (мм/час)	3	3	3	3	3	3	3
B_{max} (в ед опт плотн)		0.5	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1
Δ (мм)		0.5	0.8	0.9	1.0	1.0	1.0
$S \times 10^7$ кл	0.3	0.8	0.15	1.5	1.3	1.2	1.1
$W \times 10^7$ кл	0.4	1.2	1.7	2.1	2.2	2.3	2.4

Перечислим основные параметры денситометрического метода смещение пика полосы относительно первоначальной границы раздела бактерии-хемозффектор (или смещение бактериального фронта популяции - в том случае, если полоса не образуется) X , скорость движения миграционной полосы V (или скорость распространения бактериального фронта - в отсутствие полосы), максимальная концентрация бактерий в полосе B_{max} , количество бактерий в полосе S , интегральная характеристика хемотаксиса W - общее количество смещенных в сторону аттрактанта клеток, ширина полосы Δ На рисунке 29 схематично показаны измеряемые параметры. Динамика параметров хемотаксиса для штаммов *AZ Pputida Naph* и *Naph⁺* представлена в таблице 2. Заметим, что скорость полосы можно определять либо через смещение пиковой концентрации относительно исходной границы за определенное время, либо как локальную скорость уже после полного формирования полосы (так называемые средняя скорость $V_{cp} = X/t$ и локальная скорость $V = dX/dt$). Как средняя, так и локальная скорости могут меняться в ходе проведения эксперимента.

Ширину полосы Δ предлагается измерять на высоте $1/e$ от пиковой концентрации в полосе (за основание полосы принимают интерполирующую кривую фона (рис 26), на котором выделяется полоса). Количество бактерий в полосе подсчитывается как площадь пика над интерполирующей кривой.

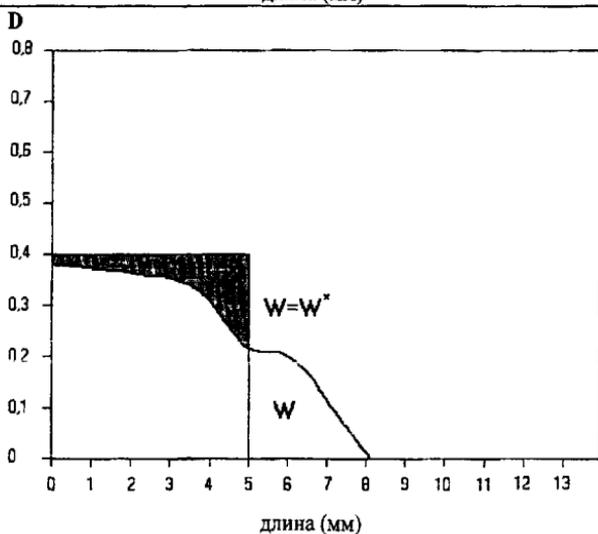
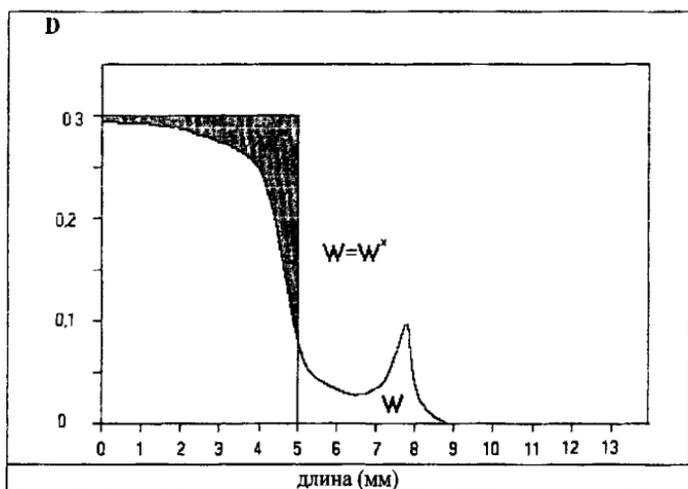


Рис.7. Денситограммы распределения бактерий *Pseudomonas putida* AZ $Naph^-$ (а) и $Naph^+$ (б) в оптической ячейке через 1 час после начала эксперимента. Общее число бактерий в оптической ячейке остается неизменным ($W=W^*$).

Интегральная характеристика хемотаксиса W - это общее количество бактерий, сместившихся вглубь хемотаксиса относительно границы раздела за время эксперимента. Подобную характеристику получают в капиллярном методе Адлера, подсчитывая число клеток, проникших в капилляр за определенное время. Есть, однако, и существенные различия в двух методах. В предлагаемом денситометрическом способе общее число клеток в ячейке остается неизменным, что схематично отражено в равенстве площадей $W = W^*$ на рис.7а, б. Общее число смещенных относительно границы клеток одинаково для штаммов $Naph^-$ (рис.39а) и $Naph^+$ (рис.76), тогда как картины распределения клеток вдоль ячейки существенно разнятся. Это означает, что в

интегральном методе измерения хемотаксиса Адлера различие между штаммами *Naph⁻* и *Naph⁺* может остаться незамеченным. Кроме того, в методе Адлера граничные условия менее определены. Поскольку объем капилляра существенно меньше объема камеры исследования, происходит постоянная «подпитка» окружающего устье капилляра трехмерного пространства хемотаксичными клетками - это усложняет математическую интерпретацию происходящих процессов, добавляя в модель многие неучтенные факторы.

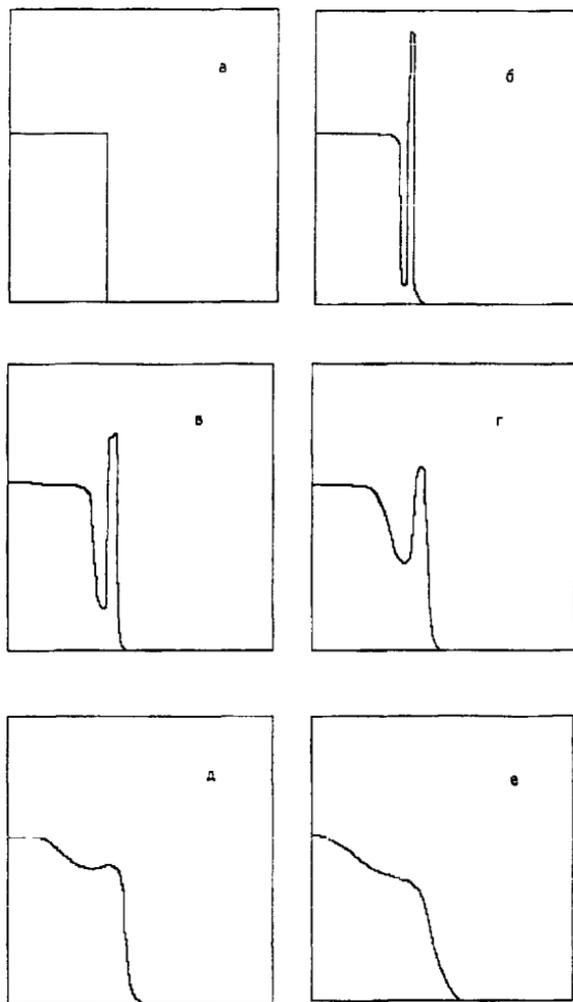


Рис 8 Фазы хемотаксиса бактерий *Pseudomonas putida AZ Naph⁻* к нафталину (теоретические кривые, полученные на основании математически о моделирования)

- а) в момент времени $t=0$ часов,
- б) $t=5$ минут,
- в) $t=10$ минут;
- г) $t=20$ минут,
- д) $t=40$ минут,
- е) $t=2$ часа

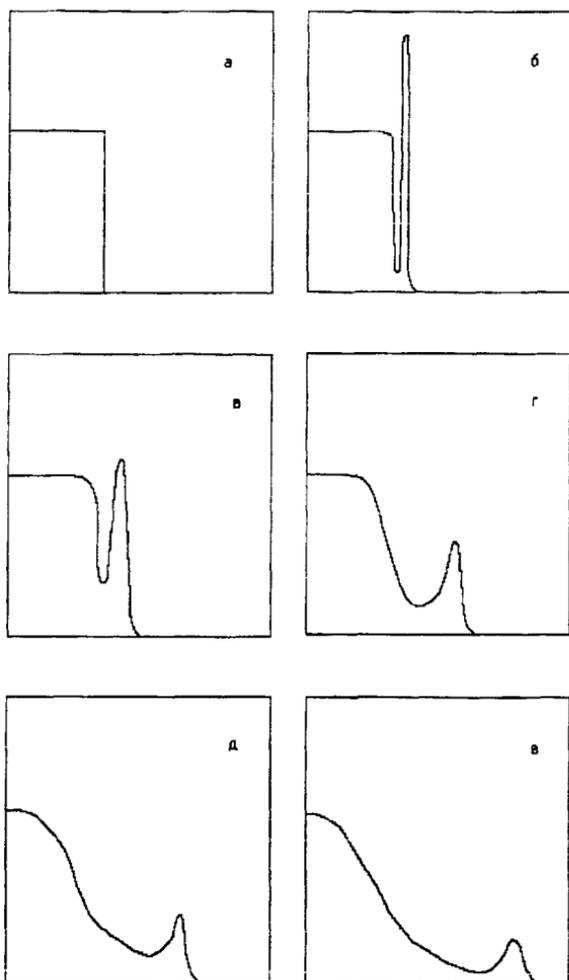
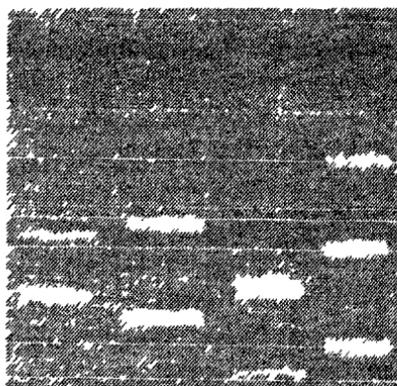


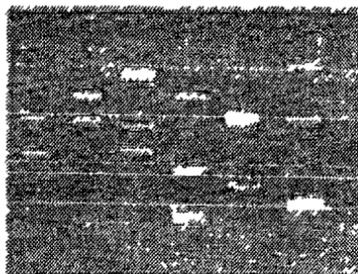
Рис.9. Фазы хемотаксиса бактерий *Pseudomonas putida AZ Naph** к нафталину (теоретические кривые, полученные на основании математического моделирования).

- а) в момент времени $t=0$ часов;
- б) $t=5$ минут;
- в) $t=10$ минут;
- г) $t=20$ минут;
- д) $t=40$ минут;
- е) $t=2$ часа.

Нами был разработан способ измерения хемотаксиса в гелевых средах. С помощью этого метода удобно исследовать панмиксию («генетическое расслоение») естественных популяций бактерий.



а



б

Рис 10 «Хемотаксисные» полосы бактерий, полученные путем разделения гетерогенной смеси теток в химических градиентах

Нами был разработан метод разделения различающихся по хемотаксису штаммов бактерий на колонках с пористым материалом. Целью измерения было изучение возможности разделения родственных штаммов бактерий, различающихся подвижностью и хемотаксисом. Для этого были использованы бактерии *cheB287* и *A W405*.

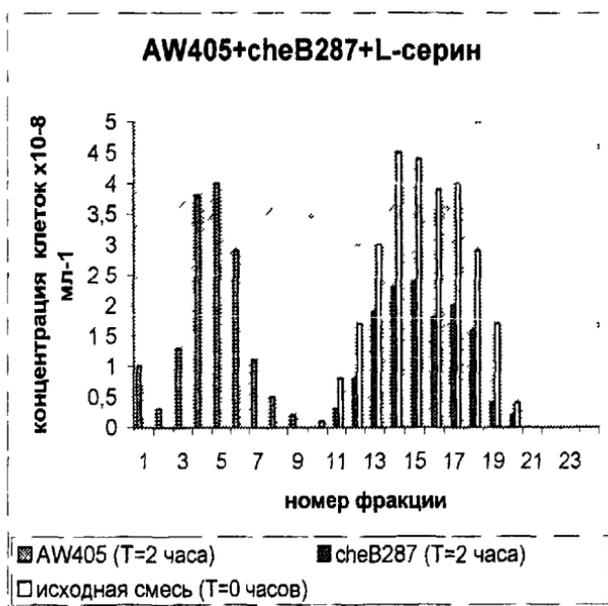


Рис 11 Гистограмма распределения смеси двух бактериальных штаммов *AW405* (нормального типа) и *cheB287* (мутанта по подвижности и хемотаксису) в градиенте L-серина

Способ создания мелкодисперсных систем, содержащих нерастворимые органические остатки, заключается в приготовлении аликвот исследуемых химических веществ в органических растворителях и последующем их разбавлении в СНЕ-буфере. Следует, однако, учитывать, что таким способом можно определять концентрации ТХД и ДОФ не ниже 10^{-3} Моль. Чтобы повысить чувствительность метода, в качестве тест-объекта следует использовать не клетки *E coli M-17* в культуральной жидкости, а те же клетки, но тщательно отмытые и приготовленные в СНЕ-буфере. Такая система «чувствует» присутствие в растворе ТХД или ДОФ уже в концентрации $\sim 10^5 - 10^4$ М. Когда же все эндогенные источники энергии в системе исчерпаются, чувствительность ее еще возрастет и достигнет максимального значения. В этот момент система наиболее пригодна для определения присутствия в воде следовых концентраций органических веществ. Пример использования такой максимально чувствительной системы клеток для определения концентраций ТХД $10^9 - 10^7$ М (точное значение концентрации установить не удалось из-за отсутствия необходимой диагностирующей аппаратуры) приведен на рис 12 (повторение в 6 сериях опытов).

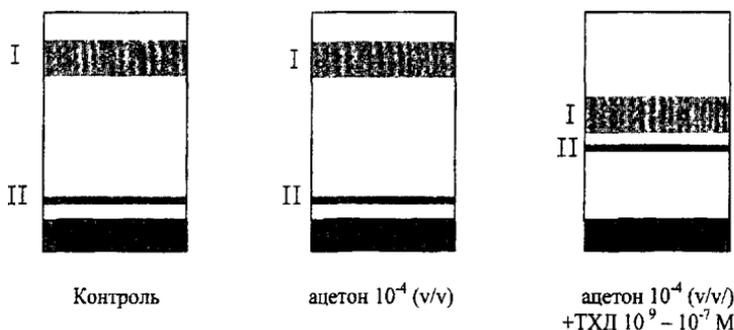


Рис. 12 Распределение бактериальных полос в реакции на ТХД в условиях максимальной чувствительности через 3 часа измерений.

Приготовление системы с максимальной чувствительностью довольно «тонкий» процесс и требует тщательной методической подготовки. Метод «бактериальных полос» в удовлетворяет всем требованиям чувствительности, простоты и надежности. Например, он оказался удобен для быстрого определения концентрации антибиотиков.

Нами было подсчитано, что в результате ориентации бактерий *E coli* при хемотаксисе должно наблюдаться уменьшение оптической плотности суспензии клеток на 2-4%. На основе проведенных вычислений и экспериментов нами был предложен и запатентован «Способ определения динамики таксиса анизотропных по форме микроорганизмов», включающий введение градиента раздражителя в суспензию бактерий, отличающийся тем, что, с целью повышения чувствительности и ускорения способа, после введения градиента раздражителя спектрофотометрически регистрируют ориентацию клеток.

Предлагаемый способ позволяет проводить оперативное измерение таксиса анизотропных по форме микроорганизмов, а следовательно, определять наличие подвижности у бактериальных клеток и оценивать динамику их поведения при воздействии градиента раздражителя. Изменение оптической плотности обуславливается изменением светорассеяния за счет обнаруженного явления ориентации микроорганизмов при положительном или отрицательном таксисе в градиентах раздражителя. Указанный эффект, заключающийся в изменении светорассеяния из-за ориентации клеток, наблюдается только для клеток, которые обладают анизотропной формой (палочки,

цилиндры, эллипсоиды вращения и т.д.) Для клеток абсолютно сферической формы этот эффект не имеет места. Следует отметить, что большинство подвижных клеток, обладающих эффектом таксиса, имеет анизотропную форму.

Изменение оптической плотности обуславливается изменением светорассеяния за счет обнаруженного явления ориентации микроорганизмов при положительном или отрицательном таксисе в градиентах раздражителя.

Указанный эффект, заключающийся в изменении светорассеяния из-за ориентации клеток, наблюдается только для клеток обладающих анизотропной формой (палочки, цилиндры, эллипсоиды вращения и т.д.) Для клеток абсолютно сферической формы этот эффект не имеет места. Следует отметить, что большинство подвижных клеток, обладающих эффектом таксиса, имеет анизотропную форму.

Поскольку ориентация клеток в градиенте концентрации раздражителя осуществляется быстро (менее чем за 1 с), предложенный способ позволяет определять таксис микроорганизмов прежде, чем начнут появляться концентрационные изменения, и следить за динамикой процесса возбуждения клеток. При этом указанные изменения вызваны только клетками, которые обладают собственной физиологической подвижностью в градиенте раздражителя.

Возможно применение различных методик регистрации, в том числе и регистрации изменений оптической плотности вдоль падающего луча, т.е. при углах рассеяния близких к 0° .

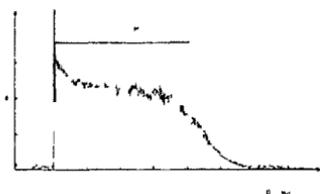
Расчет и проведенные эксперименты (Рис 13а) показывают, что изменение оптической плотности при измерениях вдоль падающего луча света за счет ориентации клеток в процессе таксиса составляет 5-10% от оптической плотности суспензии. При концентрации клеток в суспензии порядка 10^8 клеток/мл (при такой концентрации обычно **проводят эксперименты**) **эта величина регистрируется обычными фотометрическими системами с соотношением сигнал/шум не ниже 100**.

Измеряемыми характеристиками являются форма кривой изменения оптической плотности суспензии микроорганизмов во время воздействия градиента раздражителя и ее зависимость от начальной интенсивности (концентрации), амплитудное значение эффекта изменения оптической плотности и характеристика этой величины при различных интенсивностях (концентрациях) раздражителя, форма кривой процесса адаптации микроорганизмов (обратное изменение оптической плотности) к градиенту раздражителя при различных начальных интенсивностях (концентрациях).

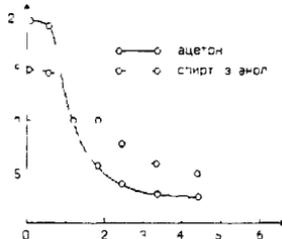
В эксперименте определялось наличие хемотаксиса у бактерий *Eschenchia coli K-12*, имеющих форму вытянутого эллипсоида вращения. Суспензия бактерий при оптической плотности 0,3 помещалась в оптическую ювету, в верхней части которой находилась дополнительная ювета с мембранным фильтром. Оптическая ювета облучалась лучом фотометрической системы (ФЭК-56М), с помощью которой осуществлялась регистрация (с помощью ЭПП-09) изменений оптического сигнала. Инъекция хемотаксиса выполнялась с помощью микрошпетки. При инъекции хемотаксиса в дополнительную ювету он под действием процесса диффузии проникал в пространство оптической юветы и суспензию бактерий. За счет диффузии и седиментации создавался градиент хемотаксиса в суспензии бактерий. Записывались изменения оптического сигнала при инъекции 20 мкл 10 М L-серина и при инъекции 20 мкл 20% этилового спирта. По оси ординат откладывали уменьшение оптической плотности D суспензии бактерий *E. coli K-12*, по оси абсцисс - время. С учетом времени диффузии и образования градиента хемотаксиса время отклика оптического сигнала не превышает одной минуты.

Инъекция 20 мкл буфера (того же состава, как в ювете) не вызвала изменений оптической плотности, также как и воздействие указанных хемотаксисов на клетки *E. coli*, не имеющие жгутиков.

а Экспресс-метод определения хемотаксиса



б Влияние растворителей на подвижность



в. Определение концентрации тилозина



г. Влияние УФ-облучения на хемотаксис

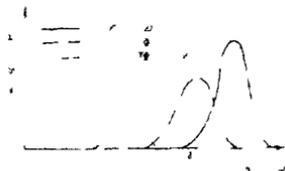


Рис 13а Оптический сигнал суспензии бактерий *E coli K 12* на воздействие 20 мкл L-серина. Исходная оптическая плотность суспензии составила $D=0.3$ при $\lambda 40$ нм, объем ячейки 4 мл (АС №1155428). Рис 13б Зависимость скорости плавания бактерий *E coli M-P* (мкм/с) от концентрации растворителя (% объем/объем). Рис 13в Уменьшение расстояния миграции хемосенсорной бактериальной культуры с увеличением концентрации тилозина (от 0.1 до 0.9 ед/мл с шагом 0.1 ед/мл) в среде [АС ЛМ650702]. Рис 13г Относительное содержание бактерий *E coli K 12* в полосе после УФ облучения популяции 100 Вт кварцевой лампой.

Нами был разработан способ денситометрической регистрации хемотаксиса в гелевых средах. В гелевой среде удобно изучать хемотаксис микроаэрофилов, требующих для поддержания жизнедеятельности незначительного присутствия в среде растворенного кислорода. Нами были исследованы бактериальные полосы, образуемые в среде бактериями *Ps aeruginosa*, *Bac thurmgensis*, *Helicobacter pilori*, *Campilobacter* и др.

Одним из преимуществ использования гелевых сред для изучения хемотаксиса бактерии является возможность изучения анаэробного хемотаксиса таких инфекционных штаммов (например, *Borrelia burgdorfen*), которые вообще не растут, не размножаются и не проявляют хемотаксической реакции в жидких средах, а только на поверхностях гетеротрофных сред. Гелевый наполнитель таким образом в ряде случаев не только стабилизирует внешнюю среду, но и является необходимым условием проведения исследования.

В пробирке (оптической ячейке), формируют градиент хемоэфлятора в геле, заполняющий пробирку (ячейку) на 2/3 высоты. Гелевым наполнителем могут служить самые разнообразные гелеобразующие среды: PVP (поливинилпирролидин), агар, агароза и др., - что определяется условиями проведения эксперимента. Сверху на гель (как и в способе электрофореза) в количестве около 1 мл наносят бактериальную культуру. Бактерии можно наносить на гель в среде роста, поскольку в ходе эксперимента они самостоятельно диффундируют в гелеобразующую среду. В результате диффузии, хемотаксиса и роста бактерии мигрируют внутрь геля и через определенное время образуют визуально различимую мигрирующую полосу. Образовавшуюся полосу сканируют денситометрически с помощью специального прибора, либо с помощью

видеокамеры, цифрового фотоаппарата, лазером или другими средствами оптической детекции

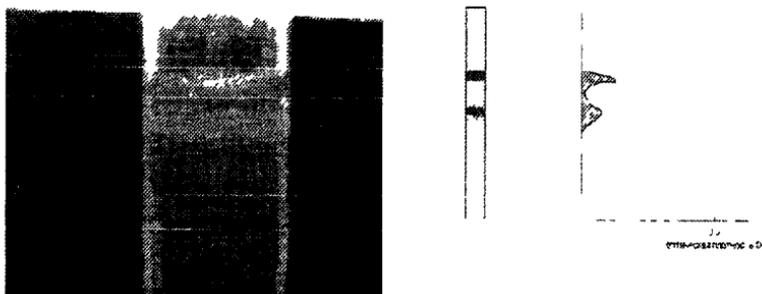


Рис 14 Фотография и денситограмма миграции спирохет *Borrelia burgdorferi*, вызывающих болезнь Лайма, внутрь гелевой среды, содержащей плазму и сыворотку крови

Глава 5. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ХЕМОТАКСИСА БАКТЕРИЙ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Глава 5 состоит из следующих разделов

Взаимодействие с окружающей средой

Внутривидовое и межвидовое взаимодействие

Роль хемотаксиса в образовании биопленок

Взаимодействие с растениями

Взаимодействие с высшими животными формами

Хемотаксис бактерий как простейшая модель межклеточного взаимодействия клеток

Миграция микробных популяций и образование минералов

Хемотаксис и эволюция живых форм

Насколько эволюционировали современные бактерии по сравнению с предшественниками? Как свидетельствуют достижения современной геномики и протеомики - наук, изучающих структуры и функции геномов и белков живых организмов, - начиная с этапа возникновения «производственных мощностей», к раскрытию секретов жизни вполне применим инженерный подход. Избирательно «включая» и «выключая» те или иные гены бактерии микоплазмы, сотрудники Института генетических исследований в Роквилле показали, что для запуска и функционирования «машинки жизни» достаточно 350 генов [Chamero, 2002]

Список «незаменимых» генов включает необходимые для поддержания жизнедеятельности функции сборки «двигательных моторов», насосов для перекачки питательных веществ внутрь клетки и выброса отработавших шлаков, оборудования для поддержания гомеостаза. Энергетические станции могут быть различной природы, включая АТФ-зависимое фосфорилирование и фотосинтез

Но наиболее простой и, по-видимому, наиболее древней могла бы быть «энергетическая машина», использующая разность в трансмембранном градиенте протонов для приведения «двигателя» в действие. Модель работы флаголярного мотора бактерий была предложена в 1978 году советскими исследователями А Н Глаголевым и В П Скулачевым [Glagolev & Skulachev, 1978]. Согласно этой модели вращение жгутика

объясняется электростатическим взаимодействием между подвижной роторной белковой структурой жгутика и неподвижно закрепленным в мембране статорным комплексом - настоящее подобие современного электродвигателя.

Способность бактерий к самостоятельному независимому движению является ярким примером обособления особи от общества, что дает основание назвать этот самодвижущийся объект первым в истории жизни организмом. Приобретенная «самостоятельность» дала возможность клетке активно осваивать окружающее пространство, независимо от хаотического влияния внешних сил. Многие бактерии обладают химическими рецепторами, регистрирующими кислотность и химические изменения окружающей среды. Бактерии могут также реагировать на изменения температуры, освещенности, магнитного поля Земли (из-за присутствующих в некоторых клетках частичек магнетита). Про условные рефлексy бактерий говорить не приходится, но примитивная память у них есть. Рыская по пространству в поисках благоприятных условий, бактерии сравнивают новое химическое окружение с предыдущим и на основании этого сравнения вырабатывают соответствующую стратегию поведения.

Сравнительный анализ различных видов подвижных бактерий показывает, что устройство двигателя, несмотря на некоторые различия, во многом сходно, у близких видов вплоть до идентичности структурных белков и организации генетического аппарата. Это дает основание предположить, что однажды возникшие в природе «удачные» инженерные решения сохраняются и продолжают успешно существовать, несмотря на сложные и увенчанные катастрофами пути макроэволюции.

Практическое значение представлений о месте возбудителей инфекционных болезней в живой природе и соответственно об их таксономическом положении, можно проиллюстрировать на нескольких примерах.

Так, одно время актиномицеты, являющиеся грамположительными бактериями, относили к грибам - эукариотам (некоторые исследователи до сих пор придерживаются такой точки зрения). Если признать возбудителя грибом, то лечить актиномикоз целесообразно антифунгальными препаратами, если бактерией, - пенициллином. Значение для пациента правильного выбора терапевтического средства очевидно.

Важный оппортунистический патоген *Pneumocystis carinii*, вызывающий пневмонию у пациентов, длительное время относили к простейшим. В конце 80-х годов таксономическое положение микроорганизма было уточнено и показано, что он относится к грибам. Это открыло перспективы разработки новых эффективных препаратов.

В некоторых отечественных руководствах по медицинской микробиологии последних лет издания бактерии по-прежнему относят к растениям. Если признать такую точку зрения, то необходимо изменить всю стратегию разработки антибактериальных средств и искать препараты, подавляющие функции эукариотических мишеней [Gurta, 1996, 1998].

Выявление тесной эволюционной связи бактерий с эукариотическими организмами объясняет, хотя бы в общем виде, причины развития побочных эффектов антибактериальных препаратов при лечении инфекционных болезней. Становится понятным, насколько сложно найти антибактериальный препарат, который избирательно подавлял бы только функции прокариотов-возбудителей инфекционных болезней, не влияя на функции организма-хозяина.

Представление о ключевых моментах эволюции эукариот как о событиях слияния клеток позволяет по-новому взглянуть на саму проблему инфекций. Взаимодействия между клетками эволюционно отдаленных организмов и образование химер можно рассматривать как важнейший механизм формирования биологического разнообразия и возникновения существ с более широкими адаптационными возможностями. С такой точки зрения инфекционные процессы (взаимодействие между эукариотическими и прокариотическими организмами), даже приводящие к гибели отдельных особей и

представляющие угрозу существованию целых видов, представляются неизбежной платой за возможность осуществления "прорывов" в эволюции [Сидоренко, 2001].

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная кинетическая теория движения бактерий в средах с неоднородным химическим составом, проведена экспериментальная оценка адекватности модели явлениям, возникающим при движении популяций в пространственно-неоднородных химических средах и в средах с переменным во времени химическим составом. Показано, что повсеместно используемая для описания пространственного перемещения клеток при хемотаксисе модель Келлер-Зигеля входит в предлагаемую теорию как частный случай и не объясняет многих явлений, следующих из кинетической модели. Найден параметр сингулярности, который определяет границы применимости традиционного диффузионного уравнения, являющегося первым приближением кинетической модели.
2. В рамках предложенной теории выявлена связь между макропараметрами движения популяции и микропараметрами движения отдельной клетки.
3. На основании кинетической теории получено второе приближение основного интегро-дифференциального уравнения, подсчитан оптический эффект изменения светорассеяния направленно движущихся при хемотаксисе клеток. Проведены численные расчеты эффекта, подтверждаемые экспериментами. На основании предсказанной теорией эффекта ориентации бактерий при хемотаксисе разработан экспериментальный метод измерения времени адаптации клеток в ходе хемотаксической реакции по изменению светорассеяния суспензии бактерий.
4. **Проведен всесторонний анализ кинетической теории с учетом многофакторных эффектов хемотаксиса:** эффекта быстрой ориентации, гетерогенного расслоения популяции на границе раздела гетеротрофных сред, роли генетических и фенотипических особенностей исследуемых штаммов, влияния внешних условий на подвижность и хемотаксис. Проведена серия модельных экспериментов для построения и уточнения модели в разных условиях. На примере неспецифического (не рецепторного) хемотаксисного взаимодействия субстрат-хемозффектор показано, что диффузионный подход к описанию хемотаксиса может быть использован для интерпретации экспериментальных данных, процессов формирования и миграции бактериальных полос. Проблема сингулярности при выводе диффузионного приближения из основного интегро-дифференциального кинетического уравнения, обусловленная формой хемотаксической функции при специфическом взаимодействии, не возникает при неспецифической хемотаксической реакции бактерий.
5. В рамках кинетической теории выведено диффузионное приближение, описывающее хемотаксис бактерий к гидрофобным органическим соединениям. Результаты вычислений подтверждены экспериментами по хемотаксису бактерий *Ps. aeruginosa* к нафталину.
6. Проанализировано влияние вязкости среды на скорость движения бактерий в растворе. Предложена модель, объясняющая существование для клеток оптимальных значений вязкости, при которых скорость движения клеток достигает наивысших значений. В рамках предложенной модели объяснено, что встречающееся в литературе понятие «вязкотаксис», описывающее явление смещения популяций в направлении оптимальных значений вязкости, является следствием зависимости скорости плавания бактерии от ньютоновской вязкости жидкости.
7. С помощью специализированной проточной двухцилиндровой камеры с вращением проведено разделение и отбор бактериальных штаммов по хемотаксису в различных химических градиентах разной формы. В результате такого разделения выделены

варианты штаммов бактерий с различающимися свойствами. Отобранные по хемотаксису штаммы использовали для дальнейших исследований. Для описания процессов разделения в камере применяли компьютерную обработку данных с использованием кинетической модели хемотаксиса.

8. Разработана денситометрическая методика исследования хемотаксиса бактерий, с ее помощью стало возможным получать более подробную количественную информацию о хемотаксисе, чем это принято в интегральном капиллярном методе Адлера. Денситометрический метод позволяет измерять характеристики движения бактериальных полос в оптической ячейке с интерактивной компьютерной обработкой экспериментальных данных:
 - смещение фронта бактериальной популяции в случае неметаболизируемого субстрата;
 - скорость распространения фронта бактериальной популяции в случае неметаболизируемого субстрата;
 - смещение мигрирующей полосы бактерий в случае метаболизируемого субстрата;
 - скорость мигрирующей полосы бактерий в случае метаболизируемого субстрата;
 - число, ширина и площадь мигрирующих полос, количественно выражающие пространственное распределение концентрации бактерий в полосах;
 - максимальная концентрация бактерий в полосах;
 - интегральный параметр хемотаксиса, выражающий общее количество мигрировавших через границу клеток в результате хемотаксиса.
9. С помощью денситометрического метода исследования и разделения вариантов бактериальных штаммов в химических градиентах в специализированной камере продемонстрирована неоднородность природных популяций бактерий по хемотаксическим признакам. В отличие от клонированных штаммов с однородными характеристиками по хемотаксису, природные популяции имеют дискретный разброс по признакам хемотаксиса.
10. Разработана методика разделения на колонках, содержащих пористый носитель, бактериальных культур, которые различаются по хемотаксису. Доказана практическая осуществимость полного разделения клеток по хемотаксическим признакам на колонках с пористым носителем.
11. Разработал экспериментальный способ моделирования мигрирующей эритемы при болезни Лайма на основе хемотаксиса патогенных бактерий *Borrelia burgdorferi* в гелевых средах, содержащих сыворотку крови опытных животных. До сих пор мигрирующая эритема, распространяющаяся после укуса инфицированными иксодовыми клещами по всему телу, наблюдалась и изучалась только на живых организмах.
12. Продемонстрировано изменение хемотаксиса бактерий *Campilobacter jejuni* при действии связывающегося с флагеллами бактериофага PV22. В результате связывания с фагом хемотаксис бактерий снижался. Уменьшалось как общее число бактерий, проникающих в зону действия аминокислот, так и скорость формирования и миграции бактериальных полос. Таким образом, было показано, что традиционные исследования, принятые в бактериофагии и вирусологии, могут быть дополнены физико-химическими способами измерения реакции хемотаксиса взаимодействующих с фагом бактерий.
13. Разработан простой метод диагностики загрязненности окружающей среды, использующий хемотаксическую систему бактерий. Метод удобен для применения в качестве экспресс-методики с целью изучения влияния на клетки внешних воздействий. С помощью этого способа установлена и изучена роль хемотаксиса в биоремедиации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) - отходов промышленного производства.

- 14 Изучена связь подвижности и хемотаксиса с некоторыми другими системами жизнедеятельности бактериальных клеток В частности, с помощью денситометрического метода измерения хемотаксиса выявлено действие на клетки таких физико-химических факторов как УФ-облучение, температура активные химические соединения (нафталин тетрахлордифенил, органические растворители) Обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между хемотаксисом клеток *Bacillus thuringiensis BT-H3* и их энтомопатогенной активностью
- 15 На основе хемотаксиса разработана тест-система быстрого определения концентрации антибиотиков в условиях промышленного производства, а также для определения следовых концентраций ряда химически активных веществ - отходов промышленного производства - в воде, почве и воздухе

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Брезгунов В Н , Завальский Л Ю , Олейников Р Р Динамика пространственного распределения популяций бактерий при хемотаксисе //Тез докл стенд Сообщ I Всесоюз биофиз съезда М - 1982 - Т 3 -С 15-16
- 2 Любченко Ю Л , Завальский Л Ю, Боровик А С Реакция взаимодействия рестриктазы LCOR1 с ДНК плазмиды COLEI // Молекулярная биология, - 1982, - Т 16, - №4, -С 871-878
- 3 Завальский Л Ю, Основы разделения клеток по физиологическим признакам // Архив ГосНИИ ПМ, Раздел отчета по теме ИПМ-2081 - 1983 - 9с
- 4 Завальский Л Ю , Светогоров Д Е, Брезгунов В Н Изменение оптической плотности суспензии бактерий при хемотаксисе //ДАН СССР -1984 - 1289 -С 488-491
- 5 **Завальский Л Ю, Светогоров Д Е, Брезгунов В Н Кинетическое описание движения** бактерий при хемотаксисе //Биофизика -1985 - Т30 -№1 -С 93-97
- 6 Завальский Л Ю Влияние вязкости на подвижность и хемотаксис бактерий // Биофизика -1986 -Т31 -С 83-86
- 7 А С №1155428 СССР А С 12 N 1/00 Способ определения динамики таксиса анизотропных по форме микроорганизмов / Брезгунов В Н, Завальский Л Ю Заявл 28 04 83 Опул 07 05 85 Бюл №17 Описание изобретения 5с
- 8 Завальский Л Ю Алгоритмы и набор программ «СHEMOTAXIS» для анализа движения и разделения клеток Б камере с вращением // Архив ГосНИИ ПМ, Приложение к отчету по теме ИПМ-1884 - 1984 - 29с
- 9 Завальский Л Ю, Экспериментальное выявление ориентационных эффектов при хемотаксисе // Архив ГосНИИ ПМ, Приложение к отчету по теме ИПМ-1884 - 1984 - 8с
- 10 Соломин Н С , Завальский Л Ю Расчет специализированной камеры для разделения клеток // Архив ГосНИИ ПМ, Раздел отчета по теме ИПМ-2584К - 1984 - 65с
- 11 Завальский Л Ю Разделение бактерий по хемотаксическим признакам // Архив ГосНИИ ПМ, Докл на науч конф ВНИИ ПМ -1986 -5с
- 12 Завальский Л Ю Лабораторная методика быстрого количественного определения хемотаксиса бактерий // Архив ГосНИИ ПМ, М15 61-86 - 1986 - 4с
- 13 Завальский Л Ю Лабораторная методика определения хемотаксиса бактерий рода *Ps aeruginosa* и *Pч sepaia* II Архив ГосНИИ ПМ, М15 60-86 - 1986 - 7с
- 14 Завальский Л Ю Хемотаксис бактерий рода *Ps aeruginosa* и *Ps sepaia* // Архив I осНИИ ПМ, Раздел отчета по теме ИПМ-0784 /дело 2103/ - 1986 - Юс
- 15 Завальский Л Ю , Брезгунов В Н , Попов В Г Хемотаксическая система бактерий / Тез докл Всесоюз конф «Электроповерхностные явления и мембранные процессы в биологических системах», Киев - 1987 - С 5-6

- 16 Завальский Л Ю , Соломин Н С Модель движения бактерии в цилиндрической камере с вращением //Архив ГосНИИ ПМ Раздел отчета по теме ИПМ-1884 - 1987 -5с
- 17 Завальский Л Ю , Пахтуев С Н Определение концентрации тилозина в условиях производства // ЦЗЛ Бердского химического завода, лаб Методика и акт испытаний -1987 - 8с
- 18 Завальский Л Ю , Щелокова Е В, Шевцов В В Вирулентность и хемотаксис штаммов ВТ-НЗ " Архив ГосНИИ ПМ, Раздел отчета по теме ИПМ-1567 - 1987 - 4с
- 19 Завальский Л Ю, Щелокова Е В , Шевцов В В Исследование хемотаксиса у вариантов ВТ-НЗ, раз тачающихся по продуктивности // Архив ГосНИИ ПМ Раздел отчета по теме ИПМ-2287 - 1988 - 4с
- 20 Завальский Л Ю Лабораторная методика для отбора вариантов *Bacillus thuringiensis* НЗ по хемотаксической подвижности //Архив ГосНИИ ПМ, М15 81-88 - 1988 - 7с
- 21 АС №1650702 А1 С 12 Q 1/04 Способ опреде ления концентрации антибиотиков / Завальский Л Ю Заявл 07 08 88 Опубл 23 05 91 Описание изобретения 7с
- 22 Завальский Л Ю Лабораторная методика отбора вариантов *Bac thuringiensis* раз тачающихся по энтомопатогенной активности // Архив ГосНИИ ПМ, М15 81-87 -1988 -5с
- 23 Завальский Л Ю , Асланян Ф М, Щелокова Е В Хемотаксические свойства штаммов *Vas thurmgienis*, различающихся по энтомопатогенной активности /Тез докл Всесоюз совещ Ветерож - 1989 -С 17-18
- 24 Завальский Л Ю Кинетический анализ хемотаксиса бактерий // Биофизика - 1988 - Т 33 С 328-332
- 25 Брезгунов В Н , Завальский Л Ю, Лазарев А Н Хемотаксис бактерий // Успехи микробиологии -1989 -Т 23 -С3-28
- 26 Завальский Л Ю Кинетический анализ движения бактерий при хемотаксисе // Автореферат на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, Пушкино, 1993, -16с
- 27 Завальский Л Ю Введение в информатику Ч 1 / Пушкино, - 1997, - 150 с
- 28 Завальский Л Ю, Марченко А И, Воробьев А В , Боровик Р В Изучение хемотаксиса бактерий *Pseudomonas fluorescens* MZ-20 методом денситометрии / Тезисы международной конференции по проблемам биологической и экологической безопасности от22-25 мая 2000года, Оболенск -С 391-392
- 29 Завальский Л Ю , Марченко А И и др Изучение хемотаксиса бактерий к нафталину / Тезисы конференции «Биотехнология-2000» 26-28 сентября 2000 года, Пушкино, - С 76
- 30 Завальский Л Ю Хемотаксис бактерии // Соровский образовательный журнал -2001 -№9 -С23-30
- 31 Завальский Л Ю Введение в информатику / М Телеком, - 2002, - 344 с
- 32 Завальский Л Ю Бактерии тоже могут впадать в алкогольную и наркотическую зависимость / Известия науки -2003 - www.podrobnosti.ua/technologies/2003/09/22/78516.html
- 33 Завальский Л Ю Освоение новых территорий эффект поезда / Известия науки - 2003 - <http://www.inauka.ru/blogs/article36481.html>
- 34 Завальский Л Ю Изучение подвижности и хемотаксиса бактерий в пористых средах, Тезисы Международной конференции // Наука и бизнес, Пушкино, 16-19 марта - 2004,-С 17
- 35 Завальский Л Ю Изучение свойств и гетерогенности микробных популяций, способствующих трещинообразованию дорожных покрытий, Тезисы Международной конференции // Наука и бизнес, Пушкино 16-19 марта - 2004, - С 21

- 36 Завальский Л Ю Изучение хемотаксиса бактерий к нафталину Тезисы Международной конференции // Наука и бизнес, ПУЩИНО 16-19 марта - 2004, - С 18
- 37 Завальский Л Ю Кинетический анализ поведения популяции хемотаксичных бактерий на границе раздела двух сред // Биофизика -2003 - Т38 -№2 -С 1281-1287
- 38 Завальский Л Ю Марченко А И Боровик Р В Изучение хемотаксиса бактерий к нафталину // Микробиология - 2003 - Т 72 - Вып 3 - С 363-368
- 39 Завальский Л Ю , Волошин А Г Движение бактерий в пористых средах // Микробиология - 2003 - Т 72 - Вып 3 - С 369-372
- 40 Завальский Л Ю Кинетический анализ поведения популяции хемотаксичных бактерий на границе раздела гетеротрофных сред // Тезисы Международной конференции Наука и бизнес, Пушино 16-19 марта - 2004 - С 19
- 41 Завальский Л Ю Мифология клонирования / Известия науки 2004 http://www.biofizteh.ru/student/biotech/klon_mif.html
- 42 Завальский Л Ю Первый самодвижущийся организм появился на Земле около трех миллиардов лет назад / Известия науки 2004 - www.inauka.ru/blogs/article37772.html
- 43 Завальский Л Ю Преимущества корпоративной жизни или тайный язык микробных сообществ / Известия науки - 2003 - www.inauka.ru/biology/article35812.html
- 44 Завальский Л Ю Приграничные явления жизни / Известия науки - 2003 - www.inauka.ru/blogs/article36286.html
- 45 Завальский Л Ю Разработка биосенсора для определения концентрации вредных примесей в окружающей среде с использованием хемотаксиса бактерий / Тезисы Международной конференции «Наука и бизнес», Пушино, 16-19 марта, - 2004 С 19
- 46 Завальский Л Ю Terra prota живая земля / Известия науки - 2004 - <http://www.inauka.ru/blogs/article50776.html>
- 47 Завальский Л Ю Успехи и трудности крионики / Известия науки 2004 - www.inauka.ru/biology/article41317.html
- 48 Завальский Л Ю Эпигенетический ландшафт / Известия науки 2004 - www.tninitas.ru/rus/doc/0202/010a/02020027.htm
- 49 Завальский Л Ю Новое средство борьбы с инфекциями // 3-й Всероссийский конкурс, 2004, <http://www.informnauka.ru>
- 50 Завальский Л Ю Фабрика жизни в капле росы /Известия науки 2005 - <http://www.inauka.ru/article52489.html>
- 51 Завальский Л Ю , Бунин В Д, Попов В Г и др Оценка эффективности антибиотиков и бактериофагов альтернативными методами / IFV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», 18-22 апреля, 2005
- 52 Попов В Г Каркищенко Н Н , Попов Д В , Пчелинцев С Ю, Завальский Л Ю Терапия сибирской язвы антибиотиками и бактериофагами / IFV / Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», 18-22 апреля, 2005
- 53 Marchenko A I, Zavalsky I Yu , Ortega J et al Studies of bacterial chemotaxis to polycyclic aromatic hydrocarbons // Bioavailability of organic chemicals concepts, tools & consequences M/EN081 Spam -2000 -P 70-71
- 54 Zavalsky L Yu Bacterial Motion in Porous Media // Science and Business, Pushchino - 2004, P175
- 55 Zavalsky L Yu Development of a Sensor on the Basis to Define harmful Impurity Concentration in the Environment // Science and Business, Pushchino - 2004, - P 178
- 56 Zavalsky L Yu Kinetic Analysis of the Behavior of a Population of Chemotactic Bacteria at the Interface between Two Media // Science and Business, Pushchino - 2004 - P 177
- 57 Zavalsky L Yu Studying of the properties and diversity of microbial populations causing formation of cracks on road covering // Science and Business, Pushchino - 2004, - P 179
- 58 Zavalsky L Yu The Study of Bacterial Chemotaxis to Naphthalene // Science and Business Pushchino - 2004, P 176

- 59 Zavalsky L Yu , Marchenko A I, Vorobyov A V , Borovick R V Chemotaxis of Pseudomonas fluorescent MZ-20 bacteria study by a densitometry method // Problems of biological and ecological safety International conference, Obolensk 2000, -P 391-392
- 60 Zavalsky L Yu, Marchenko A I, Vorobyov A V , Borovick R V Studies of bacterial chemotaxis to naphthalene // Abstracts Biotechnology-2000 Puschino -2000 P 76,157
- 61 Zhriekov E L , Popova V M , Zavalsky L Yu, Svetoch E A , Stern N J, Seal B S The Ability of Flagellum-specific Proteus vulgans Bacteriophage PV22 to Interact with Campilobacter jejum Fiagelia mCulture " ASM conference "New Phage Biology , 1-5 August, - 2004, - Key Biscayne, Florida, - P 64

Принято к исполнению 21/02/2005
Исполнено 22/02/2005

Заказ №614
Тираж 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
(095) 318-40-68
www.autoreferat.ru

01.04

22 АПР 2005

5 - - - -

178.