

На правах рукописи

ВАРИЧЕВ

АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

**ВОЗРАСТНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ
ПЕРЕСТРОЙКИ ВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВ
СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА
И НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ РЕЗЕРВУАРОВ**

03.02.08 – экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2011

Работа выполнена на кафедре экологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Национальный исследовательский университет

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Гелашвили Давид Бежанович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Смирнов Василий Филиппович

доктор биологических наук, профессор
Новикова Надежда Алексеевна

Ведущая организация:

Институт экологии Волжского
бассейна РАН, (г. Тольятти)

Защита диссертации состоится «**21**» **декабря 2011 г.** в **15⁰⁰** часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.12 при ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

E-mail: dis212.166.12@gmail.com

факс: (831) 462-30-85.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ им. Н.И. Лобачевского, с авторефератом – в сети Интернет на сайте ННГУ им. Н.И. Лобачевского по адресу: <http://www.unn.ru>.

Автореферат разослан «___» ноября 2011 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.С. Снегирева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. По современным представлениям сообщества микроорганизмов, обитающие в кишечнике человека, нередко структурно организованы в биопленки, представляющей собой форму сосуществования микробов в окружающей среде (Осипов, 2005). Микроорганизмы в биопленке рассматриваются как взаимодействующая общность разных видов микроорганизмов, сгруппированных в микроколонии и окруженных защитным матриксом. Между биопленкой и кишечной стенкой имеется тесная взаимосвязь, что позволяет объединить их в единый микробно-тканевой комплекс. В этом комплексе происходит как транслокация микроорганизмов в ткани, так и постоянный обмен генетическим материалом, регуляторными молекулами, фрагментами структурных генов, плазмидами. В пределах этого комплекса существуют сложные трофические и регуляторные связи. В результате возникает сложная многоуровневая система регуляции симбиотических взаимоотношений между микробными популяциями и клетками макроорганизма (человека) (Gill, 2006; Бухарин и др., 2011). Так, по имеющимся оценкам, в желудочно-кишечном тракте взрослого человека присутствует более 2 кг микроорганизмов, относящихся к сотням разных видов. Из них идентифицированы лишь несколько десятков типичных представителей, которых можно вырастить на питательных средах (Шендеров, 1998; Gill, 2006). Большинство же существующих в природе микроорганизмов на искусственных средах не растет, это так называемые «некультивируемые» микробы. Однако вопрос об экологической структуре сообществ микроорганизмов биопленки толстой кишки человека, представленной *фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов*, остается открытым. Эта проблема имеет отношение и к природным резервуарам микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae, которые часто высеваются из воды и почвы, сохраняют жизнеспособность в широком диапазоне абиотических факторов среды, нередко являются патогенными для большинства видов беспозвоночных, например для представителей перепончатокрылых (Hymenoptera), позвоночных животных и для человека.

В рассматриваемом ключе актуальным является синэкологический анализ микроорганизмов биопленки толстой кишки человека, как высокоинтегрированной структурной организации биотических сообществ, равно как и энтеробактерий природных резервуаров.

Целью работы явился анализ видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп, проживающих на территории города Нижнего Новгорода, а также сообществ энтеробактерий природных резервуаров г. Н. Новгорода и Нижегородской области: кишечника пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.) и муравейников (*Formica aquilonia* Yarow и *F. pratensis* Retzius) с применением методов статистического, экологического и фрактального анализа.

Задачи исследования:

1. Провести статистический анализ различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп, включая верификацию классификационных решений по разбиению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве признаков с применением кластерного и дискриминантного анализа.

2. Провести синэкологический анализ перестройки видовой структуры (видового богатства и видового разнообразия) сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки, *представленных фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов*, у здоровых и больных людей разных возрастных групп.

3. Провести статистический и синэкологический анализ видовой структуры сообщества симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной *A. mellifera*.

4. Провести сравнительный монофрактальный анализ видового богатства сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека и природных резервуаров (пчелы медоносной *A. mellifera* и муравейников *F. aquilonia*, *F. pratensis*).

Научная новизна работы. Статистическими методами многомерного кластерного и дискриминантного анализа впервые проведена верификация клинических классификационных решений по разбиению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста. Впервые проведен синэкологический анализ сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека, выявивший статистически значимые различия видового разнообразия, оцениваемого индексом Шеннона, только у больных людей разных возрастных групп и отсутствие таковых у здоровых людей. Впервые методом кусочно-линейной регрессии ранговых распределений установлено, что значение демаркационного числа на шкале численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых людей всегда больше такового у больных. При помощи фрактального формализма впервые установлено, что видовое богатство сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека и природных резервуаров (пчелы медоносной *A. mellifera* и муравейников *F. aquilonia* и *F. pratensis*) характеризуется самоподобием.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы востребованы научными, учебными, лечебно-профилактическими учреждениями и организациями медико-биологического профиля: Федеральное государственное учреждение науки Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии (ФГУН ННИИЭМ) им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижегородский государственный университет (ННГУ) им. Н.И. Лобачевского и др., а также используются в учебном процессе ННГУ им. Н.И. Лобачевского при подготовке бакалавров, магистров и аспирантов по направлению – 022000 «Экология и природопользование».

Положения, выносимые на защиту:

1. Начиная со второй недели жизни и до 30 лет значение суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых людей статистически значимо превышает таковую у больных людей.

2. У здоровых людей всех возрастных групп значение демаркационного числа (D_{Nh}) на шкале численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки всегда статистически значимо больше такового у больных людей (D_{Nd}) ($D_{Nh} > D_{Nd}$).

3. Статистически значимые различия в видовом разнообразии симбиотических микроорганизмов толстой кишки, оцениваемом индексом Шеннона (с учетом поправки Бонферрони), выявлены только у больных людей разных возрастных групп и отсутствуют у здоровых людей.

4. Видовое богатство сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп, а также природных резервуаров (кишечник пчелы медоносной *A. mellifera* и муравейников *F. aquilonia*, *F. pratensis*) характеризуется самоподобием и является монофракталом.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертационного исследования были доложены на научно-практических конференциях: «Современное состояние и пути развития популяционной биологии» (X Всероссийский популяционный семинар, Ижевск, 2008); «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования» (III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Нижний Тагил, 2010); «Fourth Russian-Polish School of Young Ecologists» (Тольятти, 2010). По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертация

иллюстрирована 37 рисунками и 22 таблицами. Основной текст изложен на 118 страницах. Библиографический указатель включает 138 источника литературы (77 отечественных и 61 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования, выполнении всех этапов обработки экспериментального материала для проведения статистического, экологического и фрактального анализа, а также обсуждения и теоретическом осмыслении полученных результатов.

Благодарности. Автор выражает сердечную, искреннюю благодарность своему научному руководителю проф. Д.Б. Гелашвили за мудрые советы, терпение и понимание. Автор работы признателен к.м.н. И.В. Соловьевой, к.б.н. А.И. Речкину, к.б.н. Н.И. Евтеевой, к.б.н. Л.А. Солнцеву за оказанную консультационную помощь и сотрудничество при получении материала для настоящего исследования. Особую благодарность автор выражает редактору сайта «Биометрика» к.т.н В.П. Леонову за консультации при проведении статистической обработки экспериментального материала. Слова благодарности автор направляет в адрес преподавателей и сотрудников кафедры экологии биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского за постоянную дружескую поддержку, помощь и ценные замечания на всех этапах выполнения работы. Автор высказывает особую признательность своей семье за помощь и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе на основе данных отечественной и зарубежной литературы приведены сведения о количественных характеристиках видовой структуры биотических сообществ; рассмотрены вопросы разных типов симбиоза; описаны фрактальные аспекты видовой структуры биотических сообществ и особенности возрастных перестроек видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов кишечника человека и пчелы медоносной.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Исходным материалом для настоящей работы послужили две группы экспериментальных данных, любезно предоставленные нашими коллегами.

1. Первую группу составили данные бактериологических исследований микрофлоры толстой кишки человека, полученные в лаборатории микробиоценозов и конструирования пробиотиков ФГУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (к.м.н. И.В. Соловьева). Материал на исследование направлялся из 14 лечебно-профилактических учреждений г. Н.Новгорода. Экспериментальные группы здоровых и больных людей разных возрастных групп были сформированы по следующим критериям включения.

«Здоровые» – лица, обратившиеся в лечебно-профилактические учреждения по поводу профилактического осмотра и дети во время диспансеризации, в анамнезе которых не было хронической патологии, не имевшие на момент обследования клинических проявлений каких-либо заболеваний и в течение двух месяцев до этого не принимавшие антибактериальные и другие химиопрепараты.

«Больные» – лица, в анамнезе которых на момент обследования отмечались хронические заболевания в стадии обострения или клинические проявления острой формы, на фоне применения антибактериальных и других лекарственных средств, так и при первичном обращении до назначения этиотропной терапии. В исследование не включались люди, не отвечающие вышеперечисленным критериям. На стадии планирования работы, тип исследования был определен как «поперечное» (Реброва, 2002).

Все обследованные люди были разделены на 8 возрастных групп (табл. 1):

1) новорожденные в возрасте от 1 часа до 7 суток; 2) новорожденные в возрасте от 8 суток до 1 месяца; 3) дети в возрасте от 2 месяцев до 1 года; 4) дети в возрасте от 2 до 5 лет; 5) дети в возрасте от 6 до 15 лет; 6) взрослые в возрасте от 18 до 30 лет; 7) взрослые в возрасте от 31 года до 60 лет; 8) пожилые в возрасте от 61 года до 80 лет. В соответствии с дизайном исследования возрастные группы 7 и 8 экспертно были отнесены к категории «больные».

2. Вторую группу составили данные предоставленные к.б.н. А.И. Речкиным и к.б.н. Н.И. Евтеевой (кафедра молекулярной биологии и иммунологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского) по симбиотическим микроорганизмам (энтеробактериям) в природных резервуарах: кишечнике пчелы медоносной (*A. mellifera*) и муравейниках (*F. pratensis* и *F. aquilonia*).

2.2. Объем экспериментальных данных

Экспериментальный материал был получен от 1115 здоровых и больных людей разного возраста (табл. 1).

Таблица 1

Дизайн и объем исследования по изучению микрофлоры толстой кишки жителей разного возраста г. Н.Новгорода за период 1981–2007 гг.

№ п/п	Возрастные группы пациентов	Количество пациентов		
		Здоровые	Больные	Всего
1	Новорожденные (от 1 часа до 7 суток)	30	34	64
2	Дети (от 8 суток до 1 месяца)	39	70	109
3	Дети (от 2 месяцев до 1 года)	147	226	373
4	Дети (от 2 до 5 лет)	107	31	138
5	Дети (от 6 до 15 лет)	76	54	130
6	Взрослые (от 18 до 30 лет)	96	45	141
7	Взрослые (от 31 года до 60 лет)	–	44	44
8	Пожилые (от 61 года до 80 лет)	–	116	116
Всего		495	620	1115

Из кишечника медоносной пчелы (*A. mellifera*) было отобрано 20 проб, из которых выделено и идентифицировано 11 видов энтеробактерий представителей 10 родов. Из муравейников (*F. aquilonia* и *F. pratensis*) было получено 52 пробы, из которых выделено 12 видов энтеробактерий, относящихся к 7 родам.

2.3. Методы изучения видового состава и численности симбиотических микроорганизмов

Микрофлора толстой кишки человека. Использованы результаты микробиологического анализа микрофлоры толстой кишки людей за период с 1981–2007 гг. На протяжении всего периода исследования микрофлора толстой кишки людей изучалась в соответствии с методическими рекомендациями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза», утвержденными Минздравом СССР (Эпштейн-Литвак, 1977). Метод основан на мерном посеве десятикратных разведений фекалий человека на питательные среды, позволяющих наиболее широко охарактеризовать состав микробных популяций кишечника, включающий 70 родов, 376 клинически значимых видов (Соколова, Соловьева, 1999; Бондаренко, 2007; Дисбиоз кишечника..., 2009). Следует

отметить, что в настоящей работе не использованы данные по частоте выделения *Clostridium spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Helicobacter spp.*, *Streptomyces spp.*, *Eubacterium spp.*, *Nocardia spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.* и др., так как представления о значении этих микроорганизмов в патологии толстой кишки человека неоднозначны и менялись на протяжении анализируемого периода (Ипатова, 2009; Osipov, 2009). Методом экспертных оценок определен набор *фиксированных клинически значимых культивируемых видов*, объединенных в 29 показателей, характеризующихся количеством микроорганизмов в 1 г фекалий человека. Восемь из этих показателей учитывают отдельные виды микроорганизмов (*Escherichia coli* и др.), двадцать один показатель – виды микроорганизмов, сгруппированные по родам (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и др.) (Диагностика и биокоррекция..., 2004; Соколова, Соловьева, 1999; Соколова и др., 1991). Полный перечень 29-ти *фиксированных клинически значимых культивируемых видов* (показателей) представлен на рис. 3.

Результаты исследований были оформлены в виде электронных таблиц. Каждый из пациентов в таблице описывается вектор-строкой из 29 показателей, характеризующих численность микроорганизмов толстой кишки человека.

Микрофлора кишечника пчелы медоносной (*A. mellifera*). Использованы результаты микробиологического анализа микрофлоры кишечника пчелы медоносной. Пробы пчел отбирали на пасеке в п. Доскино (Автозаводский район, г. Н. Новгород) в декабре 2009 г., а также в феврале, апреле, мае, июне, июле 2010 г. Идентификацию выделенных культур проводили с помощью пластин биохимических дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ, «Диагностические системы», г. Н. Новгород), систем индикаторных бумажных (СИБ, «Микроген», г. Нижний Новгород). Видовую принадлежность устанавливали в соответствии со схемами и таблицами определителя бактерий Берджи (Определитель бактерий, 2007). Определение микроорганизмов было произведено до вида с оценкой его численности.

Микрофлора муравейников (*F. aquilonia* и *F. pratensis*). Использованы результаты микробиологического анализа микрофлоры муравейников. Пробы из муравейников отбирались в смешанном лесу Володарского, Городецкого, Дальнеконстантиновского и Перевозского районов Нижегородской области в 2006–2007 гг. Методика выделения энтеробактерий из муравейников аналогична методике выделения энтеробактерий из кишечника пчелы медоносной. В ходе анализа была проведена идентификация видовой принадлежности энтеробактерий муравейников без расчета их численностей.

2.4. Количественные методы обработки экспериментальных данных

Статистический анализ исходных данных. Проверка данных на нормальность распределения проводилась с применением статистических критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Дальнейший статистический анализ проводился с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Крускала–Уоллиса (Гланц, 1998). В работе также был использован многомерный кластерный анализ методами Варда, К-средних, а также дискриминантный анализ. Проведен анализ таблиц сопряженности. Статистическая обработка материала была проведена с использованием прикладных программ STATISTICA 8.0 фирмы StatSoft. Критический уровень значимости (p) принимали равным 0,05. В случае множественных сравнений производилась корректировка критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони (Гланц, 1998). Для описания ранговых распределений симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека применялись экспоненциальная и гиперболическая модели ранговых распределений (Левич, 1980). Адекватность исследуемых моделей оценивали при помощи коэффициента детерминации R^2 (Левич и др., 2009). Анализ зависимости численности вида микроорганизмов от его ранга проводился с помощью статистического метода кусочно-линейной регрессии модуля *Piecewise linear regression* (STATISTICA 8.0).

Экологический анализ исходных данных. Для сравнения видового состава микроорганизмов толстой кишки человека (двух списков видов) был использован коэффициент сходства Жаккара (C_j) (Southwood, 1978; Janson, Vegelius, 1981), для сравнения большего числа списков видов – его обобщённая форма – индекс биотической дисперсии Коха (I_k). Количественное описание видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека и кишечника пчелы медоносной проведено с использованием общепринятых в экологии индексов: видового разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, видового богатства Маргалефа и выравнимости Пиелу (Мэгарран, 1992; Одум, 1975; Маргалеф, 1992). Для подтверждения сделанных обобщений и получения статистически корректных оценок различий (t -критерий Стьюдента) в видовом разнообразии микрофлоры толстой кишки разновозрастных групп здоровых и больных людей и микрофлоры кишечника пчелы медоносной применен индекс Шеннона, для которого разработаны соответствующие алгоритмы (Мэгарран, 1992). Апробированы канонические ранговые распределения зависимостей численности микроорганизмов толстой кишки человека и кишечника пчелы медоносной от ранга. Также использованы ранговые профили с фиксацией порядка показателей и его сохранение для последующих групп сравнения.

Фрактальный анализ исходных данных. При построении монофрактальных зависимостей основывались на модели Р. Маргалефа (Маргалеф, 1992), связавшего накопление видового богатства (S) при росте объема выборки (N) степенной зависимостью.

ГЛАВА 3. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ В ЧИСЛЕННОСТИ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА В ВОЗРАСТНОМ И ФУНКЦИОНАЛЬНОМ АСПЕКТАХ

Задачей статистического анализа было не только установление возрастных и функциональных закономерностей в изменениях численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека, но и проверка правильности классификационных решений разбиения пациентов по категориям «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве признаков с применением кластерного и дискриминантного анализа.

3.1. Проверка правильности классификационных решений разбиения пациентов по категориям «здоровые» и «больные»

Многомерный кластерный анализ методом Варда. Для верификации правильности и полноты экспертного разбиения исходного массива данных на категории «здоровые» и «больные» по *фиксированному набору клинически значимых культивируемых* 29-ти показателей на первом этапе статистического анализа проведен многомерный кластерный анализ методом Варда. Кластерный анализ был проведен для матрицы данных, полученных от 1115 пациентов. Каждый пациент в выборке данных описывался вектор-строкой из 29 показателей, характеризующих численность микроорганизмов толстой кишки и отнесение его к категории «здоровых» или «больных». Таким образом, анализируемая матрица имела размер 1115x29. Анализ данных методом Варда выявил, что в многомерном пространстве данных по 29 показателям, наблюдается устойчивое разбиение всех обследованных пациентов на два крупных кластера (рис. 1). Дальнейшее сопоставление результатов многомерного кластерного анализа и исходной матрицы данных показало, что выделенные кластеры соответствуют категориям «здоровых» и «больных» пациентов.

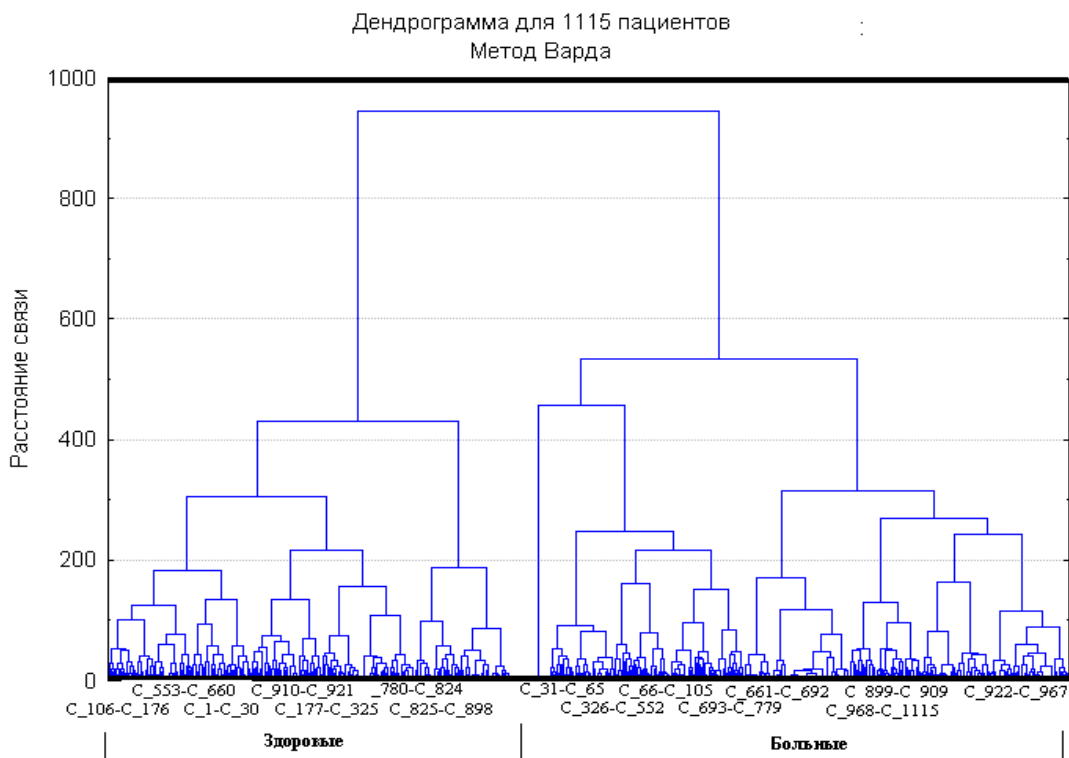


Рис. 1. Многомерный кластерный анализ методом Варда сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки жителей (n=1115) г. Н.Новгорода за период 1981–2007 гг.

Таблица 2

**Расшифровка результатов многомерного кластерного анализа методом Варда
микрофлоры толстой кишки жителей (n=1115) Н. Новгорода
за период 1981–2007 гг.**

Возрастные группы	Здоровые	Больные
1 час–7 суток	C_1 – C_30	C_31 – 65
8 суток–1 месяц	C_106 – C_176	C_66 – C_105
2 месяцев–1 год	C_177 – C_325	C_326 – C_552
2–5 лет	C_553 – C_660	C_661 – C_692
6–15 лет	C_780 – C_824	C_693 – C_779
18–30 лет	C_825 – C_898, C_910 – C_921	C_899 – C_909, C_922 – C_967
31–60 лет	–	C_968 – C_1115
61–80 лет	–	

Кроме того, на дендрограмме (рис. 1) видно, что внутри каждого из двух крупных кластеров (здоровые и больные) выделяются более мелкие кластеры, которые соответствуют определенным возрастным группам здоровых и больных людей (табл. 2).

Таким образом, многомерный кластерный анализ не только подтвердил, что микрофлора толстой кишки различается у здоровых и больных людей по *фиксированному набору клинически значимых культивируемых видов*, но также позволил разбить и упорядочить объекты (пациенты) микробиологических данных на непересекающиеся подмножества – кластеры.

Дискриминантный анализ. На следующем этапе работы путем удаления из исходной матрицы строк с пропусками была сформирована полная матрица без пропусков, включающая в себя данные, сгруппированные по трем параметрам: возрастные группы, 9 приоритетных показателей (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*,

Escherichia coli, *Klebsiella spp.* и др.), характеризующие микрофлору толстой кишки человека, а так же классификационная переменная. В качестве градаций классификационной переменной были приняты категории «здоровые», «больные» и «пожилые». На рис. 2 видно, что дискриминантным анализом выделяются три области соответствующие здоровым, больным и пожилым людям. Значение лямбды Уилкса составило 0.026, что указывает на хорошую дискриминацию функций, $p=0.03$, F-статистика Фишера имеет значение 1.72.

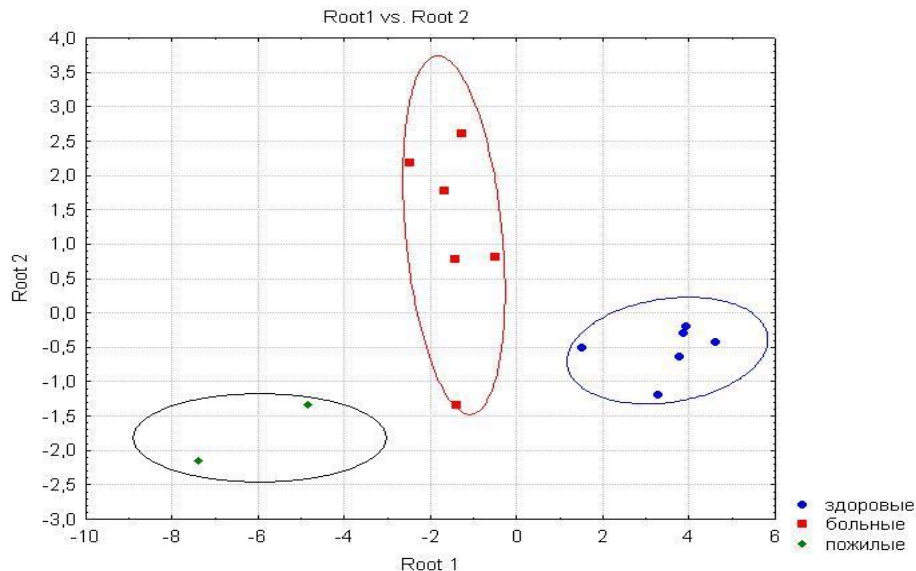


Рис. 2. Степень дискриминации сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных жителей г. Н. Новгорода разных возрастных групп за период 1981–2007 гг.

Таким образом, дискриминантный анализ позволил получить классификационное правило отнесения людей к категориям «здоровые», «больные» и «пожилые» в факторном пространстве признаков симбиотических микроорганизмов (показателей).

Приведенные результаты кластерного и дискриминантного анализов были подтверждены кластеризацией методом К-средних. Эти материалы изложены в тексте диссертационной работы.

3.2. Возрастные аспекты различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных людей

Статистический анализ возрастных различий в численности представителей кишечной микрофлоры толстой кишки отдельно у здоровых и больных людей, относящихся к различным возрастным группам, в соответствии с дизайном исследования, проводился у здоровых людей в 6 возрастных группах, а у больных – в 8 группах. В анализ были включены 22 показателя, встречающиеся одновременно во всех анализируемых возрастных группах у здоровых и больных людей. С помощью непараметрического критерия Крускала–Уоллиса было установлено, что статистически значимые различия между исследованными возрастными группами наблюдались у здоровых людей по 6-ти, а у больных – по 7-ми показателям (табл. 3), которые в контексте их информационной значимости будем называть «лимитирующими». Обращает на себя внимание, что у больных людей эти показатели включают в себя *Escherichia coli* (гем+), *Staphylococcus epidermidis* и *Citrobacter spp.*, относящиеся к условно патогенным микроорганизмам толстой кишки человека.

Различия в численности представителей микрофлоры толстой кишки между всеми возрастными группами у здоровых и больных людей с помощью непараметрического критерия Крускала–Уоллиса

№ п/п	Показатели	Уровень статистической значимости (p)	
		Здоровые	Больные
1	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<0,001	<0,001
2	<i>Lactobacillus spp.</i>	<0,001	<0,001
3	<i>Streptococcus lactis</i>	0,999	0,999
4	Анаэробные кокки	0,999	0,999
5	<i>Bacteroides spp.</i>	0,999	0,999
6	<i>Escherihia coli</i> (лак+)	<0,001	<0,001
7	<i>E. coli</i> (л /д)	0,206	0,999
8	<i>E. coli</i> (лак–)	0,949	0,042
9	<i>E. coli</i> (гем+)	0,999	0,001
10	<i>E. coli</i> (всего)	<0,001	<0,001
11	<i>Enterococcus spp.</i>	<0,001	0,001
12	<i>Ent. spp.</i> (гем+)	0,999	0,018
13	<i>Staphylococcus epidremidis</i>	0,022	<0,001
14	<i>St. aureus</i>	0,016	0,079
15	<i>Klebsiella spp.</i>	<0,001	0,100
16	<i>Enterobacter spp.</i>	0,999	0,999
17	<i>Citrobacter spp.</i>	0,078	<0,001
18	<i>Proteus mirabilis</i>	0,999	0,999
19	<i>Morganella morganii</i>	0,999	0,999
20	<i>Proteus vulgaris</i>	0,999	0,999
21	<i>Providencia spp.</i>	0,999	0,999
22	<i>Candida albicans</i>	0,999	0,999
Кол-во статистически значимо различающихся показателей, абс. (%)		6 (27)	7 (32)

Таким образом, с применением критерия Крускала–Уоллиса, являющегося непараметрическим аналогом дисперсионного анализа, выявлено наличие статистически значимых межгрупповых возрастных различий в численности только ряда (лимитирующих) видов микроорганизмов толстой кишки человека, как у здоровых, так и у больных людей.

3.3. Функциональные аспекты различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных людей

Для ответа на вопрос о наличии или отсутствии различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки между здоровыми и больными людьми, относящимися к одной возрастной группе, был проведен статистический анализ попарных различий с применением критерия Манна-Уитни. В соответствии с дизайном исследования в анализ были включены 20 видов (показателей) симбиотических микроорганизмов толстой кишки, встречающиеся одновременно у здоровых и больных людей 6-ти возрастных групп. В ходе анализа в каждой возрастной группе пациентов были выявлены лимитирующие виды микроорганизмов (показатели), которые статистически значимо различались по численности между здоровыми и больными людьми (табл. 4). Было установлено, что число статистически значимо различающихся показателей достигает максимума в третьей возрастной группе (дети в возрасте от 2 месяцев до 1 года). Этот факт может объясняться тем, что микрофлора новорожденных и детей младшего возраста до 1 года проходят в своем развитии ряд этапов, обусловленных естественной сукцессией кишечной микрофлоры. По многочисленным литературным

данным известно, что процесс сукцессии кишечной микрофлоры ребенка проходит в 4 стадии: 1 – до начала прикорма, 2 – после начала прикорма, 3 – после начала дачи твердой пищи, 4 – после прекращения грудного вскармливания (Дисбиоз кишечника..., 2009; Соколова, Соловьева, 1999; Соколова и др., 1991). Таким образом в течение периода до 1 года происходит естественный процесс формирования микробиоты, в том числе и биопленки толстой кишки.

Таблица 4

Лимитирующие виды (показатели) микрофлоры толстой кишки человека, выявляемые при попарном сравнении на основе критерия Манна-Уитни между больными и здоровыми людьми, относящимися к одной возрастной группе

№ п/п	Возрастные группы	Показатели и значения уровня значимости
1	1 час–7 суток	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (p<0,001)
2	8 суток–1 месяц	Лимитирующий показатель не выявлен
3	2 месяца–1 год	<i>Bifidobacterium spp.</i> (p<0,001); <i>Lactobacillus spp.</i> (p=0,004); <i>Enterococcus spp</i> (гем+) (p<0,001); <i>Enterobacter spp.</i> (p=0,002); <i>Proteus mirabilis</i> (p<0,001)
4	2 года–5 лет	<i>Lactobacillus spp.</i> (p=0,001); <i>Citrobacter spp.</i> (p=0,009)
5	6–15 лет	<i>Bifidobacterium spp.</i> (p<0,001), <i>Lactobacillus spp.</i> (p<0,001); <i>Escherichia coli</i> (всего) (p=0,007)
6	18– 30 лет	<i>Lactobacillus spp.</i> (p=0,004), <i>Enterococcus spp.</i> (p<0,001)

Приведенные в главе 3 результаты свидетельствуют, что статистический анализ различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп позволил: верифицировать классификационные решения по разбиению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве признаков; продемонстрировал необходимость его применения в процедурах скрининга и диагностики. Кроме того, определены лимитирующие виды микроорганизмов (показатели), численности которых статистически значимо различаются у здоровых и больных людей одного возраста.

ГЛАВА 4. ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

Экологический анализ перестройки видовой структуры (видового богатства и видового разнообразия) сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп был проведен с применением индексов сходства (Жаккара и Коха), параметров ранговых распределений и индексов разнообразия Шеннона, Симпсона, Маргалефа и Пиелу.

4.1. Анализ сходства видового состава сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп

На начальном этапе было проведено изучение возрастных различий в видовом составе микрофлоры толстой кишки отдельно у здоровых и больных людей с использованием коэффициента Жаккара (C_j) и индекса биотической дисперсии Коха (I_k). Анализ показал, что у здоровых людей коэффициент сходства Жаккара видового состава

микрофлоры толстой кишки людей разных возрастных групп находится в интервале 0.41÷0.89. При этом максимальное сходство видового состава микрофлоры толстой кишки у здоровых людей по коэффициенту Жаккара наблюдается между возрастными группами «8 сут. –1 мес.» и «2 мес. – 1 год». У больных людей коэффициент сходства Жаккара видового состава микрофлоры толстой кишки людей разных возрастных групп находится в перекрывающемся со здоровыми людьми интервале 0.52÷0.94, однако максимальное значение C_j имеет место при сравнении старших возрастных групп: «2 – 5 лет» и «6 –15 лет». С помощью индекса биотической дисперсии Коха было оценено сходство видового состава микрофлоры толстой кишки отдельно у здоровых и больных людей, по всем возрастным группам, участвующим в анализе. Было установлено, что у здоровых людей разных возрастов число общих видов микроорганизмов оставляет 45%, тогда как у больных это значение достигает 58%. Подробно результаты данного анализа представлены в тексте диссертации.

В завершение было проведено попарное сравнение списков видов микрофлоры толстой кишки между здоровыми и больными людьми одной возрастной группы по индексу Жаккара, которое показало, что на фоне достаточно высокого сходства (около 70%) максимум сходства ($C_j=0.84$) наблюдается в возрастной группе «6–15 лет» (табл. 5).

Таблица 5

Сходство видового состава сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных жителей г. Нижнего Новгорода одной возрастной группы за период 1981–2007 гг., оцениваемое коэффициентом Жаккара

Показатели	Возрастные группы людей					
	1 час–7суток	8 суток–1 месяц	2 месяца–1 год	2–5 лет	6–15 лет	18–30 лет
Коэффициент Жаккара	0,67	0,71	0,78	0,71	0,84	0,70
Число общих видов микроорганизмов	12	15	18	15	17	15

4.2. Анализ ранговых распределений численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп

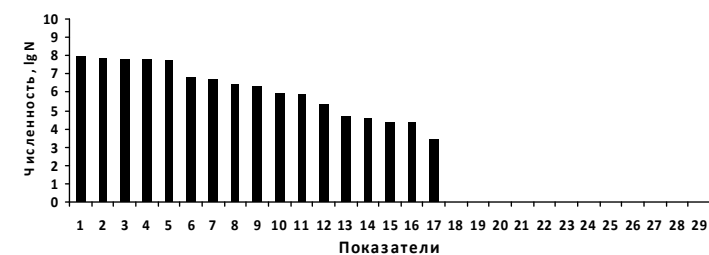
Следующим этапом измерения видового разнообразия стало построение ранговых распределений численностей представителей микрофлоры толстой кишки человека.

Канонический анализ ранговых распределений. Каноническая модель рангового распределения представляет собой формальную зависимость численности вида от его ранга, а параметры моделей представляют собой показатели видового разнообразия (Левич, 1980). В работе апробированы две модели ранговых распределений: экспоненциальная $n_i = n_1 z^{i-1}$ и гиперболическая $n_i = n_1 / i^\beta$. Полученные параметры обеих моделей (z и β), для всех возрастных групп здоровых и больных людей, были использованы для расчета теоретических значений численностей микроорганизмов толстой кишки человека и оценки адекватности исследованных моделей.

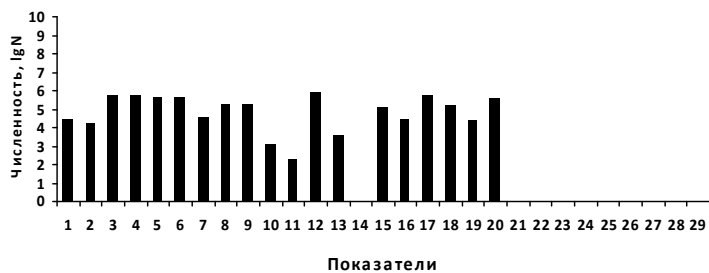
Проверка адекватности исследованных моделей производилась при помощи коэффициента детерминации (R^2). Несколько более высокий коэффициент детерминации характерен для параметра β гиперболической модели – доля случаев, где $R^2_\beta - R^2_z > 0$, составила 86 %. В качестве примера приведем ранговое распределение симбиотических микроорганизмов толстой кишки для второй возрастной группы здоровых новорожденных детей в возрасте от 8 суток до 1 месяца, имеющее характерную убывающую форму (рис. 3а). В тексте диссертации приведены аналогичные ранговые распределения для всех изученных возрастных групп здоровых и больных людей. Таким образом, видовая структура сообщества симбиотических микроорганизмов толстой

кишки человека, представленных *фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов*, может быть описана в рамках экологического анализа при помощи ранговых распределений.

Ранговые профили. Для сравнительного анализа перестройки ранговых распределений численностей микрофлоры толстой кишки человека в онтогенетическом или функциональном аспекте был использован прием с фиксацией последовательности показателей, задаваемой вектор-строкой «эталонной» группы и сохраняемой для всех последующих групп сравнения. Так, например, если последовательность показателей для «эталонной» группы здоровых детей в возрасте от 8 суток до 1 месяца (рис. 3 а) сохраняется и для больных детей этого же возраста (рис. 3 б), то можно получить наглядную картину (ранговый профиль), демонстрирующей как перестройку численностей показателей (количественный аспект), так и появления новых, либо исчезновения имевшихся показателей (качественный аспект). Например, в данном случае у здоровых новорожденных присутствуют дрожжевые клетки (рис. 3 а, позиция 14), тогда как у больных эти микроорганизмы не обнаружены (рис. 3 б). Кроме того, у больных новорожденных появляются условно-патогенные микроорганизмы *Escherichia coli* (гем+), *Enterococcus spp.* (гем+) и *Morganella morganii* (позиции 18-20, соответственно). Подобные выпадения или появления новых микроорганизмов наблюдается во всех возрастных группах людей и соответствующие ранговые профили приведены в тексте диссертации.



а



б

Показатели

1. *Lactobacillus spp.*
2. *Bifidobacterium spp.*
3. *Escherichia coli* (всего)
4. *E. coli* (лак+)
5. *Enterococcus spp.*
6. *Streptococcus lactis*
7. *Escherichia coli* (лак-)
8. *Proteus mirabilis*
9. *Klebsiella spp.*
10. *Staphylococcus epidermidis*
11. *Candida albicans*
12. *Escherichia coli* (л/д)
13. *Staphylococcus aureus*
14. Дрожжевые клетки
15. *Enterobacter spp.*
16. *Proteus vulgaris*
17. *Citrobacter spp.*
18. *Escherichia coli* (гем+)
19. *Enterococcus* (гем+)
20. *Morganella morganii*
21. *Providencia spp.*
22. *Hafnia spp.*
23. *Pseudomonas aeruginosa*
24. НГОБ (Неферментирующие грамотрицательные бактерии)
25. *Shigella spp.*
26. *Salmonella spp.*
27. ЭПКП (Энтеропатогенная кишечная палочка)
28. *Bacteroides spp.*
29. Анаэробные кокки

Рис. 3. Сравнение профилей 29 показателей, характеризующих микрофлору толстой кишки у здоровых (а) и больных (б) детей в возрасте от 8 суток до 1 месяца, жителей г. Н. Новгорода. Порядок показателей задается вектор-строкой для группы здоровых детей и сохраняется для больных.

Анализ зависимости численности вида микроорганизмов от его ранга методом кусочно-линейной регрессии. Известно, что реальные ранговые распределения видовой структуры чаще всего являются квазигиперболическими и их особенностью является наличие немногих обильных видов и большого числа редких видов. Это дает основание

применить для аппроксимации кусочно-линейную регрессию с точкой разрыва (Халафян, 2007). Такая модель удобна в том случае, когда зависимая переменная (в данном случае численность вида) при достижении некоторого критического значения меняется достаточно резко. Тогда оценивание до критической точки (точки разрыва) производится по одной модели, а после достижения – по другой. С помощью модуля *Piecewise linear regression* (STATISTICA 8.0) такие оценки можно получить как для наблюдаемых, так и предсказанных значений.

В качестве примера приведем графики предсказанных зависимостей численности видов симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных детей в возрасте от 1 часа до 7 суток от ранга показателя (рис. 4). Проекция точки пересечения графиков – «пойнтер-точка» (Кудрин, 2007) на ось ординат (шкалу численности микроорганизмов) делит демаркационным числом D_N анализируемое сообщество на две совокупности видов с относительно высоким и низким обилием. В свою очередь, перпендикуляр, опущенный из точки разрыва на ось абсцисс, делит сообщество микроорганизмов демаркационным числом D_S на две совокупности видов с разной скоростью изменения численности при увеличении числа видов. Таким образом, координатная плоскость оказывается разделенной на 4 области. В области 1 находится совокупность видов микроорганизмов, характеризующихся сравнительно высоким обилием и низкой скоростью изменения численности при увеличении числа видов. В области 4 – совокупность видов с относительно низкой численностью микроорганизмов и более быстрым убыванием численности при увеличении размеров сообщества. Каждая совокупность видов микроорганизмов удовлетворительно аппроксимируется линейной функцией с различными коэффициентами наклона для здоровых детей (рис. 4 а) область 1 (y_{h1}), область 4 (y_{h2}):

$$y_h = -0,15x + 8,12$$

$$y_h = -0,42x + 9,91$$

для больных детей (рис. 4 б) область 1 (y_{d1}), область 4 (y_{d2}):

$$y_d = -0,16x + 7,64$$

$$y_d = -0,49x + 10,76$$

Однако принципиальным является установленный для всех возрастных групп факт, что у здоровых людей демаркационное число (D_{Nh}) всегда статистически значимо больше, чем у больных людей (D_{Nd}), так что $D_{Nd} > D_{Nh}$ (табл. 6).

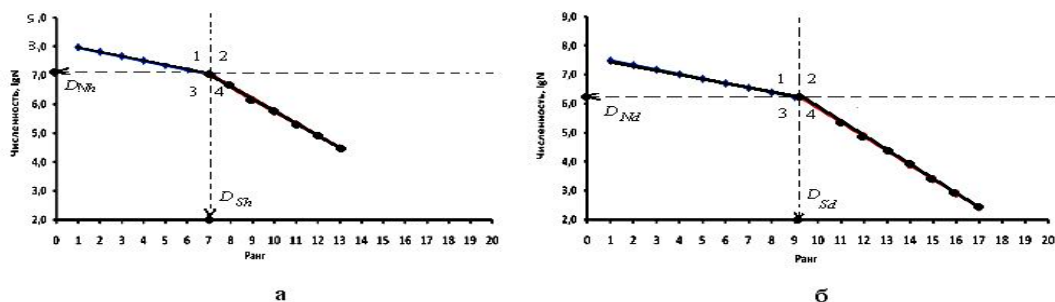


Рис. 4. Ранговые распределения предсказанных значений численностей симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых (а) и больных (б) детей в возрасте от 1 часа до 7 суток методом кусочно-линейной регрессии.

Эта закономерность сохраняется и при переходе к так называемым «инвертированным ранговым распределениям» - зависимости ранга показателя от

численности микроорганизмов толстой кишки человека, предложенные Булгаковым и др. (2003) и подробно рассмотрены в тексте диссертации.

Таблица 6

Наблюдаемые и предсказанные значения демаркационного числа (D) сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп

Возрастные группы	Наблюдаемые значения D		Предсказанные значения D	
	Здоровые, D_{Nh}	Больные, D_{Nd}	Здоровые, D_{Nh}	Больные D_{Nd}
1 час – 7 суток	7,7	6,4	7,04	6,1
8 суток – 1 месяц	7,7	5,4	6,1	5,01
2 месяцев – 1 год	7,5	7,25	7,49	7,15
2 – 5 лет	7,3	6,3	6,7	5,6
6 – 15 лет	7,5	6,9	7,11	6,2
18 – 30 лет	6,4	5,7	7,3	5,6
Критерий Манна-Уитни	p=0,04		p=0,01	
Парный критерий Стьюдента	p=0,01		p=0,002	

4.3. Анализ видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп

Видовая структура сообщества характеризуется не только показателями видового богатства, но и видового разнообразия, учитывающего представленность каждого вида. Левич (1980) подчеркивает, что видовая структура представляет собой экологическую «систему отчета», поскольку именно изменения в численностях видов дают информацию о структуре и функционировании сообщества. Удобной формой свертывания информации о сообществе представляют собой индексы разнообразия: видового разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, видового богатства Маргалефа и выравнимости Пиелу. Результаты анализа, представленные в табл. 7, показывают, что, начиная со второй недели жизни и до 30 лет, во всех изученных возрастных группах значение суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых людей (N_h) по критерию Манна–Уитни статистически значимо превышает таковую у больных (N_d) (табл. 8).

По-видимому, с этим обстоятельством можно связать устойчивый сдвиг по шкале численности значений демаркационных чисел (D_N) на графиках кусочно-линейной регрессии. Следует подчеркнуть, что во всех возрастных группах, как у здоровых, так и больных людей при увеличении видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, закономерно снижается доминирование (индекс Симпсона) и возрастает выравнимость (индекс Пиелу). Эти факты полностью согласуются с основными положениями теоретической синэкологии.

**Показатели видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки
здоровых и больных людей разных возрастных групп жителей г. Н. Новгорода за период с 1981–2007 гг.**

Показатели	Формула (обозначение)	Здоровые						Больные							
		Возрастные группы						Возрастные группы							
		1 час–7 суток	8 сут.– 1 мес.	2 мес.– 1 год	2–5 лет	6–15 лет	18–30 лет	1 час–7 сут.	8 сут.– 1 мес.	2 мес.– 1 год	2–5 лет	6–15 лет	18–30 лет	31–60 лет	61–80 лет
Общая численность	$N \cdot 10^{10}$	11,14	55,28	462,26	151,22	27,27	143,29	11,03	47,3	70,89	5,91	4,98	133,09	6,07	21,08
Видовое богатство	S	13	17	22	20	17	21	17	19	19	16	18	15	13	14
Индекс видовой разнообразия Шеннона	$H = -\sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i$	1,64	0,79	1,03	0,81	1,00	0,64	1,54	1,60	2,03	0,95	1,83	0,98	1,63	1,56
Индекс доминирования Симпсона	$C = \sum_{i=1}^S p_i^2$	0,25	0,65	0,47	0,56	0,44	0,72	0,35	0,25	0,17	0,51	0,18	0,43	0,23	0,27
Индекс видовой богатства Маргалефа	$d = \frac{S-1}{\ln N}$	0,47	0,59	0,72	0,68	0,61	0,71	0,63	0,67	0,66	0,60	0,69	0,50	0,52	0,49
Индекс выравнивания Пиелу	$e = H / \ln S$	0,64	0,28	0,33	0,27	0,35	0,21	0,54	0,54	0,67	0,34	0,63	0,36	0,62	0,59

Таблица 8

Наличие и отсутствие статистически значимых различий значений суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки между здоровыми и больными людьми всех возрастных групп с помощью критерия Манна-Уитни

Возрастная группа	Значение критерия Манна-Уитни	Уровень значимости (p)
1 час – 7 суток	0,69	0,55
8 суток – 1 месяц	2,03	0,005
2 месяца – 1 год	3,45	0,001
2 – 5 лет	4,21	0,001
6–15 лет	2,11	0,004
18–30 лет	3,12	0,002

Далее был проведен статистический анализ различий в видовом разнообразии сообществ микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, у здоровых и больных людей разных возрастных групп. Анализ проводили в два этапа. На первом этапе изучались межгрупповые различия, обусловленные возрастом, отдельно у здоровых и больных людей. Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони в группе больных людей были выявлены между несколькими возрастными группами. В то же время в группе здоровых людей статистически значимых различий в видовом разнообразии сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки по индексу Шеннона выявлено не было.

На втором этапе проведен статистический анализ различий в видовом разнообразии сообществ микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, между здоровыми и больными людьми в одних и тех же возрастных группах. Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони в видовом разнообразии сообществ микроорганизмов толстой кишки между здоровыми и больными людьми выявлены только у детей в возрасте до 1 года в двух возрастных группах: «8 суток–1 месяц» и «2 месяца–1 год» (табл. 9).

Таблица 9

Различия по индексу Шеннона (H) в видовом разнообразии сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных жителей г. Нижнего Новгорода по возрастным группам за период 1981– 2007 гг.

Варианты опыта/показатели	Возрастные группы					
	1 час– 7 суток	8 суток– 1 месяц	2 месяца– 1 год	2 – 5 лет	6–15 лет	18–30 лет
Здоровые, H	1,64	0,79	1,03	0,81	1,00	0,64
Больные, H	1,54	1,60	2,03	0,95	1,83	0,98
Уровень значимости, p	0,6	0,002*	0,001*	0,6	0,02	0,5

Примечание: *- статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони

Таким образом, видовая структура сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека представленных *фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов*, может быть описана в рамках синэкологического анализа при помощи канонических индексов и показателей экологического разнообразия.

**ГЛАВА 5. ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ
СООБЩЕСТВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ КИШЕЧНИКА
ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*A. MELLIFERA*) В ОНТОГЕНЕЗЕ**

Из кишечника медоносных пчел разного возраста было выделено 11 видов энтеробактерий, представителей 10 родов сем. *Enterobacteriaceae*. Видовое богатство энтеробактерий объясняется способностью пчел в процессе медосбора посещать большие территории, контактируя с различными медоносными растениями, микрофлора которых весьма разнообразна. Следует подчеркнуть большую частоту обнаружения микроорганизмов – «лидеров» в структуре современной кишечной инфекционной бактериальной патологии человека, таких как *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*. При этом обращает на себя внимание тот факт, что своего максимума суммарная численность достигает в весенний период (в апреле), а основной вклад в нее вносят *Citrobacter spp.*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella oxytoca*. Анализ данных, приведенных в табл. 10, свидетельствует, что, несмотря на низкие значения показателей видового богатства по месяцам наблюдений, сообщества симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной могут быть корректно охарактеризованы показателями видового разнообразия. В качестве примера рассмотрим наиболее показательную в этом отношении майскую возрастную группу. При имеющем место теоретическом минимуме видового богатства ($S=2$) наблюдается каноническое соотношение между остальными показателями видового разнообразия: выраженному доминированию ($C=0.99$) соответствуют минимальные значения видового разнообразия по Шеннону и выравниванию по Пиелу (табл. 10). Отметим, что своеобразие видовой структуры сообщества симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной майской возрастной группы находит отражение и в статистических характеристиках. Так, именно для майской возрастной группы установлены статистически значимые различия со всеми возрастными группами в видовом разнообразии сообщества симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной, оцениваемые по индексу Шеннона, (табл. 11).

Таблица 10

**Показатели видовой структуры сообщества симбиотических микроорганизмов
кишечника пчелы медоносной (*A. mellifera*) в онтогенезе (2009–2010 гг.)**

Показатели	Формула (обозначение)	Сроки наблюдений					
		Декабрь	Февраль	Апрель	Май	Июнь	Июль
Общая численность	$N \cdot 10^6$	2,34	44,52	842	48,26	10,35	7,14
Видовое богатство	S	3	4	3	2	3	3
Индекс видового разнообразия Шеннона	$H = -\sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i$	0,69	0,38	0,37	0,002	0,47	0,47
Индекс доминирования Симпсона	$C = \sum_{i=1}^S p_i^2$	0,51	0,18	0,80	0,99	0,70	0,77
Индекс видового богатства Маргалефа	$d = \frac{S-1}{\ln N}$	2,35	0,79	0,30	0,25	0,86	1,02
Индекс выравнивания Пиелу	$e = H / \ln S$	0,63	0,27	0,34	0,003	0,43	0,42

Уровень статистической значимости (p) различий в видовом разнообразии сообществ симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной (*A. mellifera*) по индексу Шеннона (2009–2010 гг.)

Месяцы	Декабрь	Февраль	Апрель	Май	Июнь	Июль
Декабрь		0,006*	0,06	0,001*	0,01	0,01
Февраль			0,06	0,002*	0,03	0,03
Апрель				0,001*	0,04	0,03
Май					0,001*	0,002*
Июнь						0,06
Июль						

Примечание: * - статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони

В работе также апробировано каноническое ранговое распределение видов симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной за весь период наблюдений. Построены ранговые профили с фиксацией порядка микроорганизмов для «эталонного» месяца наблюдений и сохранение его для последующих месяцев.

Таким образом, видовая структура сообществ энтеробактерий кишечника медоносной пчелы (*A. mellifera*) может быть описана в рамках экологического анализа при помощи канонических индексов и показателей экологического разнообразия.

ГЛАВА 6. ФРАКТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИДОВОГО БОГАТСТВА СООБЩЕСТВ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В настоящей главе приведены результаты применения фрактального формализма (Мандельброт, 2002) к описанию видового богатства сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп, проживающих на территории г. Н. Новгорода, а также природных резервуаров: сообществ энтеробактерий кишечника пчелы медоносной и муравейников.

При построении монофрактальных зависимостей основывались на модели Маргалефа (1992), связавшего накопление видового богатства сообщества (S) при росте объема выборки (N) степенной зависимостью,

$$S = N^k$$

Здесь показатель степени k – индекс разнообразия Маргалефа, $0 \leq k \leq 1$. Этот индекс выражает фрактальную самоорганизацию внутри системы, указывая на ее структурное самоподобие. Степенная зависимость в ортогональных координатах натуральных значений S и N легко преобразуется в линейную в билогарифмических координатах

$$\lg S = k \cdot \lg N, \quad (1)$$

где: $k = \lg S / \lg N$. Выражение (1) показывает, что видовая структура сообщества (в данном случае в виде его компонента – видового богатства) инвариантна относительно преобразования его численности, т.е. самоподобна. Величину k можно трактовать как соответствующую фрактальную размерность: число элементов видовой структуры – число видов сообщества – меняется по степенному закону с показателем k при увеличении размеров системы, т.е. с ростом численности сообщества (Гелашвили и др., 2007).

6.1. Микроорганизмы толстой кишки человека

Гипотеза о самоподобии видового богатства сообщества симбиотических микроорганизмов толстой кишки была проверена на примере здоровых и больных людей разных возрастных групп. Поскольку темп нарастания видового богатства при

увеличении объема выборки зависит от порядка выбора пациентов, был применен метод перестановок без повторов ($M!$) последовательности пациентов с последующим усреднением по первым 100 реализациям. В качестве примера приведем графики зависимости скорости накопления видового богатства (S) от объема выборки (числа пациентов, N) для здоровых и больных детей в возрасте от 1 часа до 7 суток (рис. 5 а, б). На рисунке видно, что, как у здоровых, так и у больных детей, зависимость накопления видового богатства (S) от объема выборки (N) в билогарифмических координатах удовлетворительно аппроксимируется уравнениями:

$$\lg S = \lg 6,99 + 0,19 \lg N; R^2 = 0,98$$

$$\lg S = \lg 6,99 + 0,30 \lg N; R^2 = 0,96$$

соответственно, т.е. отвечает степенному закону. Аналогичные результаты получены для всех возрастных групп и приведены в диссертации. Выполнение степенного закона свидетельствует о самоподобии видового богатства сообщества симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека, или, другими словами подтверждает монофрактальную гипотезу. Поскольку значения фрактальной размерности k (табл. 12) для первых 6-ти возрастных групп статистически значимо не различались по критерию Манна–Уитни между группами здоровых и больных людей ($p=0,06$), можно предположить, что самоподобие в организации видового богатства симбиотических микроорганизмов толстой кишки людей разного возраста является инвариантным структурным показателем и сохраняется при различном функциональном состоянии организма.

Таблица 12

Значения фрактальной размерности k для здоровых и больных жителей г. Нижнего Новгорода разных возрастных групп за период 1981 – 2007 гг.

Возрастные группы	1 час–7 суток	8 суток–1 месяц	2 месяца–1 год	2–5 лет	6–15 лет	18–30 лет	31–60 лет	61–80 лет
Здоровые	0,19	0,26	0,22	0,33	0,31	0,28	–	–
Больные	0,30	0,31	0,24	0,27	0,31	0,31	0,25	0,36

6.2. Микроорганизмы природных резервуаров: кишечник пчелы медоносной (*A. mellifera*) и муравейников (*F. aquilonia* и *F. pratensis*)

Для сообществ симбиотических микроорганизмов кишечника пчелы медоносной показана линейная зависимость скорости накопления видов (S) от числа проб (N), удовлетворительно аппроксимируемая в билогарифмических координатах уравнением $\lg S = \lg 1,77 + 0,58 \lg N; R^2 = 0,95$ (рис. 5 в). Выполнение степенного закона свидетельствует о самоподобии видового богатства сообществ симбиотических микроорганизмов (энтеробактерий) кишечника пчелы медоносной.

Аналогичная закономерность установлена для сообществ симбиотических микроорганизмов муравейников (*F. aquilonia*, *F. pratensis*). Скорость накопления видового богатства (S) симбиотических микроорганизмов муравейников при увеличении числа обследованных муравейников (N) также удовлетворительно аппроксимируется степенным законом в билогарифмических координатах $\lg S = \lg 3,08 + 0,61 \lg N; R^2 = 0,99$ (рис. 5 з), что верифицирует монофрактальную гипотезу.

Таким образом, видовое богатство сообществ симбиотических микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae* толстой кишки человека и природных резервуаров может быть охарактеризовано в рамках концепции самоподобия как монофрактал.

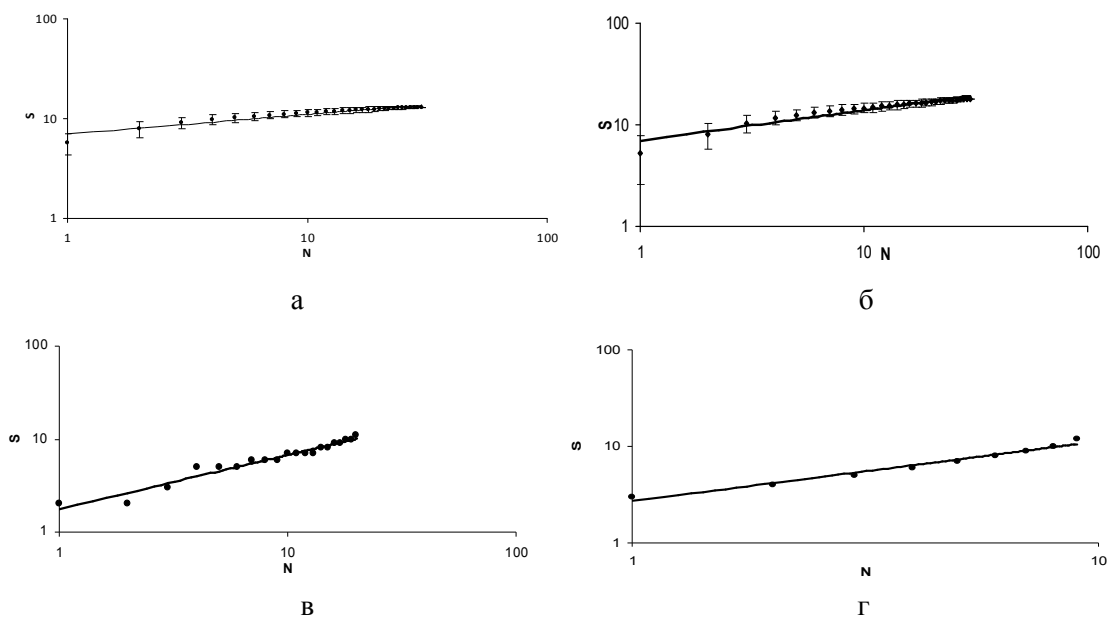


Рис. 5. Зависимость накопления видового богатства (S) симбиотических микроорганизмов от объема выборки (числа проб, N) в билогарифмических координатах: толстая кишка здоровых (а) и больных (б) детей возрасте от 1 часа до 7 суток; кишечник пчелы медоносной (в), муравейники (г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подведем основные итоги работы, которые при кажущейся очевидности некоторых полученных результатов потребовали корректной доказательной базы. Во-первых, предварительное экспертное разбиение пациентов на «здоровых» и «больных» на основе клинического анамнеза, получило свое теоретическое обоснование с применением методов математической статистики. Многомерный кластерный и дискриминантный анализ различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп впервые позволил не только верифицировать классификационные решения по разбиению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве признаков, но и показал необходимость применения при решении подобных задач методов многомерного анализа. Кроме того, были выявлены лимитирующие виды микроорганизмов (показатели), численности которых статистически значимо различаются у здоровых и больных людей одного возраста.

В отличие от сообществ свободноживущих организмов, видовое богатство которых является хотя и конечным, но на практике приблизительно определяемым числом видов, видовое богатство сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека представлено *фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов*. Наше исследование показало, что такие редуцированные сообщества также можно корректно описать в рамках синэкологического анализа при помощи канонических индексов и показателей экологического разнообразия, включая ранговые распределения. Для человека важным является установленный для всех возрастных групп факт, что у больных людей демаркационное число численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки всегда меньше, чем у здоровых людей. Это может быть связано с тем, что, начиная со второй недели жизни и до 30 лет значение суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых людей статистически значимо превышает таковую у больных. Таким образом, применение кусочно-линейной регрессии для анализа как для канонических, так и «инвертированных» ранговых распределений имеет диагностическую перспективу.

Наконец, рассмотрение видového богатства сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека и природных резервуаров с позиций концепции самоподобия, продемонстрировавшей свою перспективность для сообществ свободноживущих и некоторых симбиотических организмов, показало, что изученные в работе сообщества симбионтов так же могут быть охарактеризованы как монофрактал. Полученные результаты дают веское основание предположить, что самоподобие в организации видového богатства симбиотических микроорганизмов толстой кишки людей разного возраста является инвариантным структурным показателем и сохраняется при различном функциональном состоянии организма.

Итак, статистические, экологические и фрактальные методы анализа позволили не только расширить имеющиеся, но и получить новые сведения о структурно-функциональной организации сообществ симбиотических микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Методами многомерного кластерного и дискриминантного анализа получено разбиение и упорядочение обширной эмпирической матрицы клинических микробиологических данных, включающей 29 фиксированных клинически значимых культивируемых видов симбиотических микроорганизмов толстой кишки 1115 пациентов разных возрастных групп, на непересекающиеся подмножества – кластеры, а также верифицировано классификационное правило отнесения людей к категориям «здоровые», «больные» и «пожилые».

2. Методом Манна–Уитни показано, что у здоровых людей начиная со второй недели жизни (возрастная группа 8 сут.–1 мес.) и до 30 лет (возрастная группа 18–30 лет) значение суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки статистически значимо превышает таковую у больных людей.

3. Методом кусочно-линейного регрессионного анализа зависимости численности вида микроорганизмов от его ранга установлено, что значение демаркационного числа численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых людей всех возрастных групп всегда статистически значимо больше такового у больных людей ($D_{Nh} > D_{Nd}$).

4. Возрастные статистически значимые различия в видовой разнообразии симбиотических микроорганизмов толстой кишки по индексу Шеннона (с учетом поправки Бонферрони) выявлены только у больных людей. В то же время у здоровых людей подобные различия не обнаружены.

5. В сообществах симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека и природных резервуаров (кишечника пчелы медоносной *A. mellifera* и муравейников *F. aquilonia*, *F. pratensis*) рост видového богатства при увеличении объема выборки удовлетворительно аппроксимируется степенным законом, что позволяет охарактеризовать видовой богатство как монофрактал.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Варичев, А.Н.** Статистический анализ видového состава сообществ симбиотических микроорганизмов биопленки толстого кишечника здоровых и больных людей разных возрастных групп / **А.Н. Варичев**, Д.Б. Гелашвили, И.В. Соловьева // Вестник ННГУ. Сер. общая биология. – 2010. – №2(2). – С. 383–387.

2. Соловьева, И.В. Видовая структура биопленки толстой кишки здоровых и больных детей разных возрастных групп / И.В. Соловьева, Д.Б. Гелашвили, **А.Н. Варичев**,

Л.А. Солнцев, Г.И. Григорьева, И.В. Белова, А.Г. Точилина, А.С. Пожидаева // Медицинский альманах. – 2011. – № 4(17). – С. 89–93.

3. Гелашвили, Д.Б. Видовая структура сообществ симбиотических микроорганизмов биопленки толстой кишки здоровых и больных детей разных возрастных групп / Д.Б. Гелашвили, **А.Н. Варичев**, И.В. Соловьева, Л.А. Солнцев // Экология человека. – 2011. – № 6. – С. 55–60.

4. **Варичев, А.Н.** Самоподобие видового богатства сообществ энтеробактерий общественных насекомых / А.Н. Варичев, А.И. Речкин, Н.И. Евтеева, У.Е. Четкина, Д.Б. Гелашвили // Вестник ННГУ. Сер. общая биология. – 2011. – №. 2(2). – С. (в печати).

Статьи, тезисы и материалы докладов региональных и всероссийских конференций и семинаров:

5. **Варичев, А.Н.** Монофрактальная структура микробоценозов кишечных бактерий детей / **А.Н. Варичев**, И.В. Соловьева // Современное состояние и пути развития популяционной биологии: материалы X Всерос. популяционного семинара/ отв. ред. Н.В. Глотов. Ижевск, Россия, 17 – 22 ноября 2008. – Ижевск: Книгоград, 2008. – С. 389 – 391.

6. Гелашвили, Д.Б. Фрактальные аспекты популяционной экологии / Д.Б. Гелашвили, Д.И. Иудин, Г.С. Розенберг, В.Н. Якимов, Л.А. Солнцев, М.С. Снегирева, **А.Н. Варичев** // Вестник Удмуртского университета. Сер. Биология. «Науки о Земле». – 2009. – Вып. 1. – С. 15–22.

7. **Варичев, А.Н.** Многомерный кластерный анализ видового состава симбионтных организмов на примере микробной флоры кишечника человека / **А.Н. Варичев**, И.В. Соловьева, И.В. Белова // Биологические системы: устойчивость, принципы, и механизмы функционирования: сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Нижний Тагил, Россия, 1 – 5 марта 2010. – С. 123–126.

8. **Varichev, A.N.** Monofractal analysis of communities of symbiotic microorganisms of the biofilm of thick intestines of newborns healthy and sick children / **A.N. Varichev** // Types of Strategy and Not Only... (Materials of the Fourth Russian-Polish School of Young Ecologists; Togliatti, September, 6-12th, 2010). – Togliatti: Kassandra, 2010. – P. 19-20.