

УДК 579.841.11.017.6

УГЛЕРОД И АЗОТ КАК РЕСУРСЫ, ОГРАНИЧИВАЮЩИЕ РОСТ МОНО- И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ДИССОЦИАНТОВ БАКТЕРИЙ *Pseudomonas aeruginosa*

П.В. Фурсова, Е.С. Милько, А.П. Левич

(кафедры биофизики, микробиологии, общей экологии)

В работе продолжено исследование проблемы определения ресурсов, ограничивающих развитие культур диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. В предыдущей публикации (Фурсова с соавт., 2004а) были показаны теоретические возможности прогнозирования лимитирующих веществ на основе вариационной модели потребления и роста для экологических сообществ (Левич, 1980; Левич с соавт., 1997; Levich, 2000). Эксперименты с добавками по выявлению ограничивающих ресурсов в большинстве случаев подтвердили модельные расчеты. Однако, новые данные об особенностях метаболизма диссоциантов *P. aeruginosa* привели к необходимости пересмотреть полученные результаты.

Материалы и методы

Моно- и смешанные культуры R-, S-, и M-диссоциантов бактерий штамма *Pseudomonas aeruginosa* К-2 культивировали без пополнения запаса ресурсов на средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов и фосфатов. Всего было проведено около 200 экспериментов.

Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 28°C до достижения стационарной стадии роста (табл. 1, 2). В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на плотной среде, содержащей мясо-пептонный бульон и сусло в отношении 1:1 (БСА). Бактерии со скошенного агара переносили петлей в пробирку с физиологическим раствором. Плотность инокулятов каждого из диссоциантов во всех опытах выравнивали по нефелометру или по стандарту мутности до содержания клеток 10^9 (для смешанных культур – 10^7) в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3% объема. Рост бактерий оценивали нефелометрически по плотности культуры. Соотношение

диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний расеем на БСА.

Для измерения pH среды использовали микропотенциометр Checker фирмы "HANNA Instruments". Глюкозу определяли с помощью трифенилтетразолия хлорида (Химия углеводов, 1967), азот – с сульфифеноловым реактивом (Поляков, 1950), фосфор – методом Пануша (Малый практикум по биохимии, 1979). В более поздних экспериментах использовали экспресс-методы определения веществ: индикаторные полоски для полуколичественного определения глюкозы в крови "Диаглюк" (диапазон определяемых концентраций составляет 0.0 – 1000 мг% (0.0 – 55.5 ммоль/л)); фотометрический фосфат-тест фирмы "Merck" (возможно определение концентраций в пределах от 0.010 до 5.00 мг/л); аналитические тест-полоски для определения содержания нитратов фирмы "Merck" (диапазон определяемых концентраций составляет 10-25-50-100-500 мг/л).

Методика проведения экспериментов с добавками по определению лимитирующих ресурсов была усовершенствована. В момент предполагаемого достижения стационарной стадии культуру разделяли на семь пробирок. В шесть из них вносили добавки (глюкозу, нитрат или фосфат, их парные комбинации и все три вещества), одну оставляли без изменений (контроль). Количество добавляемых веществ равнялось их первоначальному содержанию в среде. Культуру оставляли расти еще 12 часов, затем проводили измерение оптической плотности. Если добавление компонента питания в среду приводило к возобновлению деления клеток, то этот ресурс (или их комбинация) считали лимитирующим. В случае, если внесение веществ не приводило к росту культуры, считали, что эти факторы не ограничивали развития сообщества. По сравнению с ранее проводившимися опытами (Фурсова с соавт., 2004а) было увеличено время выдержки культуры на среде с добавками, что позволило исключить влияние лаг-фазы. Кроме того, внесение комбинаций ресурсов, в отличие от добавки только отдельных компонентов питания, дало возможность зафиксировать совместное ограничение роста бактерий несколькими веществами.

Согласно результатам исследования математической модели потребления и роста (Левич с соавт., 1994; Фурсова, 2003) пространство первоначальных запасов ресурсов распадается на области, в которых лимитирующей является одна из возможных комбинаций потребляемых веществ (включая каждое в отдельности).

Границы этих областей рассчитываются исходя из экспериментально определяемых потребностей организмов в ресурсах среды (Фурсова с соавт., 2004б).

Результаты и обсуждение

В цитируемой работе (Фурсова с соавт., 2004а) при анализе результатов экспериментов с добавками предполагалось, что основными ресурсами, которые могут ограничивать рост моно- и смешанных культур диссоциантов бактерий *P.aeruginosa* являются углерод, азот и фосфор. Было показано, что для опытных сред данного этапа исследования (табл. 1) задающие их векторы ресурсов принадлежат стратам с однофакторным лимитированием. Экспериментальное ограничение роста культуры веществом, предсказанным моделью, подтвердилось в 75% анализируемых опытов.

В продолжение исследования провели серию экспериментов с заданными условиями лимитирования. Семь сред (табл. 2) были выбраны так, чтобы они были ограниченными по разным ресурсам: сбалансированная среда (№1), в которой содержание каждого ресурса в среднем пропорционально соответствующим потребностям всех диссоциантов (на этой среде выращивали три монокультуры); среда, которая является лимитированной по углероду для всех возможных комбинаций моно- и смешанных культур (№2); лимитированной по азоту для монокультур (№3) и для смешанных (№4); лимитированной по фосфору для всех возможных комбинаций моно- и смешанных культур (№5), для монокультур и смеси трех диссоциантов (№6). Состав среды №7 является сбалансированным для монокультуры R-диссоцианта (содержание ресурсов пропорционально потребностям этого диссоцианта) и ограниченным по фосфору для смешанных культур и монокультур S- и M-диссоциантов.

Анализ данных, полученных в этой серии экспериментов, дал результаты, свидетельствующие о возможном неоднократном использовании фосфора диссоциантами *P.aeruginosa* (Фурсова с соавт., 2007).

Принятие гипотезы об обращении фосфора в процессе роста культуры приводит к необходимости пересмотреть результаты анализа проведенных опытов. Будем считать, что реально ограничивать рост диссоциантов *P.aeruginosa* могут лишь углерод и азот, а все остальные вещества, необходимые для роста, в том

числе и фосфор, содержатся в средах в достатке. В этом случае границы областей лимитирования задают два луча, исходящие из начала координат, и положительные полуоси декартовой плоскости (рис. 1) (Левич с соавт., 1994). Для монокультур эти лучи совпадают. Вид стратификации для смешанной культуры трех диссоциантов *P.aeruginosa* представлен на рис. 2. (для парных смесей рисунки выглядят аналогично).

Согласно такому разбиению пространства ресурсов для всех сред, которые были ограничены по углероду или азоту, лимитирующий фактор остался тем же (среды № 1,2,4,5 в табл. 1а; все, кроме сред № 11,12 в табл. 1б; среды № 1–4 в табл. 2). Среды № 3,6 из табл. 1а, № 11,12 из табл. 1б., первоначально ограниченные по фосфору, в соответствии с новыми условиями, стали лимитированными по углероду. А условия культивирования на средах № 5,6 и 7 табл. 2 задают лимитирование совместно углеродом и азотом.

Результаты опытов с добавками сведены в табл. 3а,б. За 100% принята оптическая плотность культуры без добавок (цифра 1 в обозначении вносимых ресурсов означает дополнительное присутствие фосфора). Жирным шрифтом выделены показатели, свидетельствующие о возобновлении роста в результате внесения питательного вещества, предсказанного моделью как лимитирующего. Для анализа оказались пригодными 71 эксперимент (37 с монокультурами и 34 со смешанными). В 59 из них произошло возобновление роста после внесения ресурса, предсказываемого моделью как лимитирующего. Таким образом, в 83% случаев теоретические и опытные данные совпадают.

Необходимо отметить, что введенные на основе предложений работы (Фурсова с соавт., 2004а) уточнения в методику эксперимента (см. раздел «Материалы и методы»), позволили значительно увеличить количество опытов, результаты которых пригодных для анализа с точки зрения вариационной модели.

Учет особенностей метаболизма диссоциантов бактерий *P. aeruginosa* в модельном подходе, а также усовершенствование методик позволили более точно описать результаты эксперимента. Ранее предсказания модели подтверждались в 75% опытов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 05-04-49238 и № 05-06-80062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Левич А.П. 1980. Структура экологических сообществ. М.

Левич А.П., Алексеев В.Л., Никулин В.А. 1994. Математические аспекты вариационного моделирования в экологии сообществ // Математическое моделирование. **6**, № 5. 55–76.

Левич А.П., Максимов В.Н., Булгаков Н.Г. 1997. Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ. Учебное пособие. М.

Малый практикум по биохимии / Под ред. проф. В.В. Юркевича. 1979. М.

Поляков Г. 1950. Пособие по гидрохимии для рыбоводов. М.

Фурсова П.В. 2003. Алгоритмы расчетов в вариационной модели экологического сообщества // Математическое моделирование. **15**, № 5. 115–128.

Фурсова П.В., Левич А.П. 2007. Количественные закономерности развития сообщества диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Изв. РАН. Сер. биол. №1. С.1-10.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. 2004а. Выявление компонентов питания, ограничивающих рост моно- и смешанных культур диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. № 1. 19–23.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Максимов В.Н., Левич А.П. 2004б. Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в угле, азоте и фосфоре // Микробиология. **73**, № 1. 45–50.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Левич А.П. 2007. Культивирование диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в условиях заданного лимитирования // Микробиология (в печати).

Химия углеводов / Под ред. Н.К.Кочеткова и др. 1967. М.

Levich A.P. 2000. Variational modelling theorems and algocoenoses functioning principles // Ecological Modelling. **131**. 207–227.

Таблица 1а

**Состав сред по углероду, азоту и фосфору в начале опыта для монокультур
(мг/мл) (Фурсова с соавт., 2004а)**

номер среды	R-диссоциант			S- и M- диссоцианты		
	углерод	азот	фосфор	углерод	азот	фосфор
1	0.78	0.4	0.028	0.78	0.4	0.028
2	3.18	0.1	0.028	3.18	0.1	0.028
3	3.18	0.4	0.007	3.18	0.4	0.007
4	0.282	0.1	0.008	0.282	0.1	0.008
5	1.6	0.03	0.008	0.78	0.03	0.008
6	1.6	0.1	0.002	0.78	0.1	0.002

Таблица 1б

**Состав сред по углероду, азоту и фосфору
в начале опыта для моно- и смешанных
культур (мг/мл) (Фурсова с соавт., 2004а)**

номер среды	углерод	азот	фосфор
1	0.4	0.035	0.01
2	1.62	0.14	0.04
3	0.4	0.015	0.01
4	1.6	0.06	0.04
5	0.12	0.035	0.01
6	0.48	0.14	0.04
7	0.12	0.015	0.01
8	0.48	0.06	0.04
9	0.78	0.1	0.01
10	3.24	0.4	0.04
11	1.6	0.2	0.01
12	6	0.8	0.04
13	1.2	0.035	0.01
14	4.8	0.14	0.04

Таблица 2.

**Состав сред по углероду, азоту и фосфору в
начале опыта для моно- и смешанных
культур на средах с заданными условиями
лимитирования (мг/мл) (Фурсова с соавт.,
2007)**

номер среды	углерод	азот	фосфор
1	0.9	0.05	0.008
2	0.76	0.165	0.02
3	2.4	0.04	0.02
4	1.6	0.04	0.006
5	1.6	0.08	0.006
6	4.8	0.25	0.006
7	0.76	0.04	0.006

Таблица За.

Реакция на добавки в монокультурах (процентах) (Фурсова, Левич, 2007). Пояснения см. в тексте.

Номер опыта	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
1	C	C	121	220	110
		N	91	102	96
2	N	C			101
		N			131
3	C	C			117
		N			119
4	C	C	220	140	217
		N	97	80	74
5	C	C		227	
		N		73	
6	N	C	93		
		N	93		
7	C	C	94	62	100
		N	95	100	68
8	N	C	95	100	90
		N	143	112	100
9	C	C		122	160
		N		100	90
10	C	C	212		97
		N	162		66
11	C	C	129	129	143
		N	86	100	86
12	C	C	131	101	119
		N	76	68	81
13	C	C			112
		N			91
14	C	C	246	171	184
		N	103	76	92
		CN			
		C1			
		N1			
		CN1	195	140	163
15	C	C	213	213	222
		N	104	100	110
		CN	204	178	208
		C1	223	209	212
		N1	100	120	120
		CN1	223	219	194

Таблица 3а.

Продолжение

Номер опыта	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
16	CN	C	105		
		N	105		
		CN	86		
		C1	104		
		N1	82		
		CN1	168		
17	CN	C	135	149	178
		N	91	102	104
		CN	214	202	216
		C1	135	153	158
		N1	100	104	92
		CN1	207	196	218

Таблица 3б.

Добавки в смешанных культурах (в процентах) (Фурсова, Левич, 2007).

Пояснения см. в тексте.

Номер опыта	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	RS	RM	SM	RSM
1	C	C		82	89	87
		N		59	84	98
2	N	C	92	96	104	96
		N	104	104	116	128
3	C	C	142	160	160	150
		N	75	100	90	71
4	C	C			121	
		N			79	
5	C	C	120	120		113
		N	100	93		75
6	C	C	103	143		
		N	81	102		
7	C	C	103	109		129
		N	88	81		91
8	C	C	220	200	194	254
		N	98	94	98	114
		CN	202	198	214	237
		C1	204	227	276	254
		N1	110	114	94	116
		CN1	212	227	270	237

Таблица 3б.

Продолжение

Номер опыта	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	RS	RM	SM	RSM
9	C	C		233		
		N		102		
		CN		246		
		C1		200		
		N1				
		CN1		173		
10	C	C				222
		N				100
		CN				222
		C1				256
		N1				113
		CN1				220
11	CN	C	102	99	77	126
		N	116	81	87	93
		CN	116	157	107	137
		C1	111	104	103	86
		N1	96	68	91	89
		CN1	113	157	125	200
12	CN	C	100	108	116	142
		N	90	92	110	102
		CN	104	125	127	205
		C1	90	98	112	142
		N1	92	92	102	98
		CN1	170	163	163	193

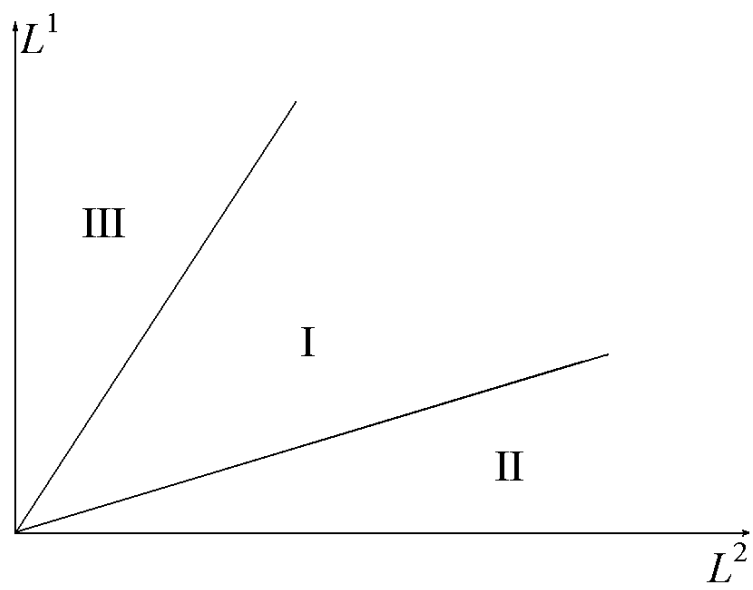


рис. 1

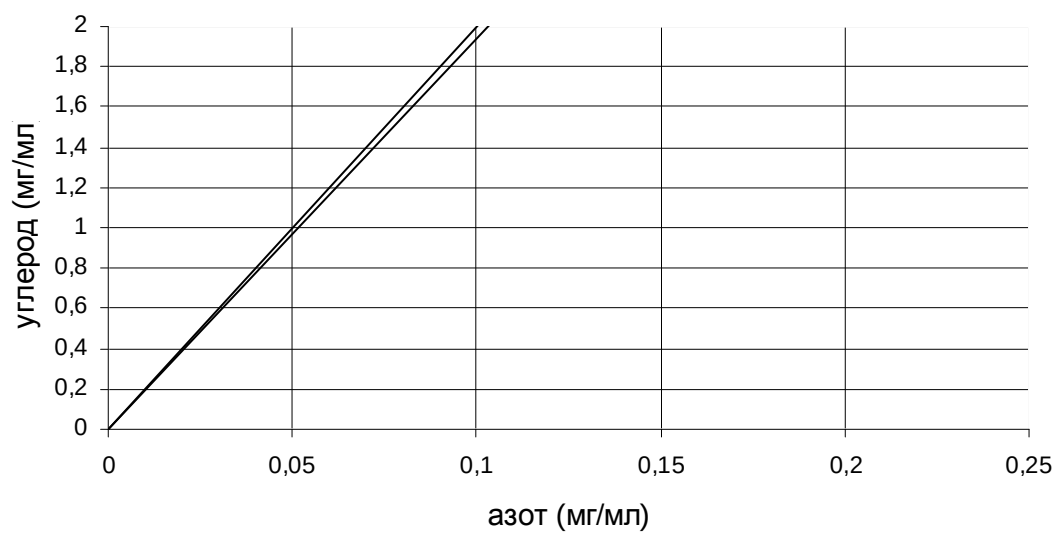


рис. 2

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

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

Рис. 2. Стратификация пространства двух ресурсов для смеси R-, S- и M-диссоциантов *P.aeruginosa*

**УГЛЕРОД И АЗОТ КАК РЕСУРСЫ, ОГРАНИЧИВАЮЩИЕ РОСТ
МОНО- И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ДИССОЦИАНТОВ БАКТЕРИЙ
*Pseudomonas aeruginosa***

П.В. Фурсова, Е.С. Милько, А.П. Левич

Проведены новые эксперименты по выявлению ресурсов, ограничивающих рост моно- и смешанных культур диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa*. Анализ результатов осуществлен на основе вариационной модели потребления и роста в соответствии с полученными данными об особенностях метаболизма диссоциантов. В 83% случаев получено совпадение теоретических расчетов с опытными данными.

**CARBON AND NITROGEN AS LIMITING RESOURCES OF MONO- AND
MIXED *Pseudomonas aeruginosa* DISSOCIANTS CULTURES GROWTH**

P.V. Fursova, E.S. Mil'ko, A.P. Levich

New experiments for revealing the limiting resources of growth of mono-and mixed *Pseudomonas aeruginosa* dissociants cultures were carried out. The results were analyzed on the base of variational model of consumption and growth. This analyze took into account new data about particular feature of dissociants metabolism. In 83 % of cases the theoretical calculation were confirmed by experimental results.