

УДК 579.841.11.017.6

**ВЫЯВЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАНИЯ, ОГРАНИЧИВАЮЩИХ
РОСТ МОНО- И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ДИССОЦИАНТОВ
БАКТЕРИЙ *Pseudomonas aeruginosa***

П.В. Фурсова, Е.С. Милько, И.А. Опарина, А.П. Левич

(кафедра общей экологии и кафедра микробиологии)

Актуальной проблемой экологии сообществ, в частности микробиологических, является задача определения фактора, ограничивающего их рост. В настоящей работе представлена модель, в рамках которой возможно предсказание лимитирующих ресурсов, их экспериментальное определение и сравнение полученных результатов.

Материалы и методы

В период с 1999 по 2001 гг. были проведены 116 опытов по культивированию R-, S-, и M-диссоциантов штамма *Pseudomonas aeruginosa* К-2. Моно- и смешанные культуры бактерий культивировали без пополнения запаса ресурсов на средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов и фосфатов. Уровень глюкозы в средах варьировали в пределах от 0.03 до 1.6%, нитрата – от 0.01 до 0.577%, фосфата – от 0.001 до 0.04%.

1. Методы культивирования. 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. 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%. Рост бактерий оценивали нефелометрически по плотности культуры. Соотноше-

ние диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний рассевом на БСА.

Для экспериментального определения ресурса, ограничивающего рост культуры, проводили опыты с добавками. В момент предполагаемого достижения стационарной стадии культуру разделяли на четыре пробирки. В три из них вносили добавки – глюкозу, нитрат или фосфат, – четвертую оставляли без изменений (контроль). Культуру оставляли расти еще четыре часа, затем проводили измерение оптической плотности. Если добавление компонента питания в среду приводило к возобновлению деления клеток, то этот ресурс считали лимитирующим. В случае, если внесение вещества не приводило к росту культуры, считали, что этот фактор не ограничивал развития сообщества.

2. Метод расчета лимитирующего ресурса для поликультур. Для описания стационарной стадии развития культуры диссоциантов применяли вариационную модель, которая ранее успешно была использована при изучении структуры фитопланктонных сообществ (Левич, 1980; Левич с соавт., 1997; Levich, 2000)

$$\begin{cases} H(n_1, \dots, n_w) = \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) \ln \left(\sum_{i=1}^w n_i \right) - \sum_{i=1}^w n_i \ln n_i \rightarrow \text{extr}; \\ \sum_{i=1}^w q_i^k n_i \leq L^k, \quad k = \overline{1, m}; \\ n_i \geq 0, \quad i = \overline{1, w}, \end{cases}$$

где n_i – конечные искомые численности каждой из групп организмов, образующих сообщество, q_i^k – количество k -го ресурса, необходимое для роста клетки группы i , в расчете на одну клетку (потребность организма группы i в ресурсе k), m – общее количество взаимонезаменимых ресурсов, потребляемых сообществом, w – число групп в сообществе, L^k – начальное содержание ресурса k в среде ($L^k \geq 0$).

Для описанной модели имеет место теорема стратификации (Левич с соавт., 1994; Levich, 2000): все пространство ресурсных факторов $\prod_{k=1}^m L^k$ распадается (стратифицируется) на $2^m - 1$ непересекающихся областей (стратов), каждая из которых соответствует одному из подмножеств мно-

жества потребляемых сообществом ресурсов. В страте S^J , где J – непустое подмножество множества ресурсов $\{1, 2, \dots, m\}$, выполняется:

- 1) решение вариационной задачи $n_i(\vec{L})$, где $\vec{L} \equiv \{L^1, L^2, \dots, L^m\}$, зависят только от тех L^k , для которых $k \in J$;
- 2) на этом решении нестрогие неравенства $\sum_{i=1}^w q_i^k n_i \leq L^k$ обращаются в строгие равенства для всех $k \in J$ и в строгие неравенства для всех $k \notin J$.

Биологическая интерпретация теоремы стратификации задаёт правило лимитирующего звена для многовидовых сообществ, популяции из которых конкурируют за несколько ресурсов (Левич с соавт., 1993). Лимитирующими называются ресурсы, потребляемые сообществом из среды полностью, т.е. те, для которых балансовые неравенства сформулированной задачи превращаются в равенства. Согласно теореме стратификации, из заданной совокупности ресурсов $\vec{L}$ полностью потребляются, т.е. лимитируют рост сообщества, ресурсы из набора J , идентифицирующего страт S^J , которому принадлежит заданный вектор $\vec{L}$. Таким образом, теорема стратификации позволяет строго предсказывать ресурсы, лимитирующие рост сообщества с заданным набором потребностей q_i^k .

3. Метод расчета лимитирующего ресурса для монокультур. Для монокультур, т.е. в случае $w = 1$, целевая функция $H(n_1, \dots, n_w)$, является тождественным нулем и численность группы определяется системой ресурсных ограничений. В ситуации, когда питательная среда содержит три компонента, имеет место система:

$$\begin{cases} q^C n \leq L^C; \\ q^N n \leq L^N; \\ q^P n \leq L^P; \\ n \geq 0. \end{cases}$$

Здесь верхние индексы C, N, P обозначают, соответственно, углерод, азот и фосфор. Решение системы имеет вид: $0 \leq n \leq \min \left[\frac{L^C}{q^C}, \frac{L^N}{q^N}, \frac{L^P}{q^P} \right]$. Достижение культурой стационарной стадии означает исчерпание ресурса или ресурсов, для которого или которых реализуется указанный минимум. На математическом языке пол-

ное потребление выражается обращением соответствующего неравенства в равенство: $n = \frac{L^r}{q^r}$, где индекс r обозначает исчерпанный ресурс. Таким образом, для аналитического выявления лимитирующего питательного компонента необходимо найти минимальное из отношений начального содержания потребляемых ресурсов и соответствующих потребностей. Возможна следующая геометрическая интерпретация. В трехмерном пространстве ресурсов вектором потребностей $\vec{q} = \{q^C, q^N, q^P\}$ задается прямая. Участки трех плоскостей, проходящих через прямую q и координатные оси ресурсов, делят это пространство на 3 области лимитирования (рис.1). В каждой из этих областей рост культуры ограничен одним из трех ресурсов, а именно тем, координатная ось которого не лежит в данной области (Максимов с соавт., 2001).

Разбиение пространства трех ресурсов на области, в которых лимитирующими являются один, два или три фактора, представлено на рис.2.

Для выявления ресурсов, ограничивающих рост смешанных культур, сначала на основе полученных ранее алгоритмов (Левич с соавт., 1994; Фурсова, 2003) рассчитывали границы областей лимитирования, а затем проверяли, к какой из них относится опытная среда.

Результаты и обсуждение

Были проведены опыты с добавками по выращиванию монокультур диссоциантов на 20-ти средах, а по выращиванию смешанных культур (попарные смеси и поликультура всех трех диссоциантов) – на 14 средах (состав сред в расчете на элемент представлен в табл.1а, б).

Для указанных сред было проведено модельное выявление лимитирующих ресурсов. В расчетах использовали ранее определенные (Фурсова с соавт., 2004) значения потребностей (табл.2).

Затем полученные данные сравнивали с результатами опытов с добавками. Необходимо отметить, что ряд экспериментов исключили из рассмотрения. Это связано с двумя обстоятельствами:

- 1) не удалось добавлять питательные вещества именно на стационарной стадии роста культуры;

- 2) в некоторых опытах из-за диссоциации и дальнейшего конкурентного взаимодействия к стационарной стадии изменялся состав культуры, что вызывало изменение потребления ресурсов из среды, и как следствие – характера лимитирования.

Из 116 проведенных экспериментов 47 удовлетворяли необходимым требованиям. В табл.3а,б указаны номера сред (в соответствии с табл.1а,б), предсказываемый модельными расчетами лимитирующий ресурс и процентное изменение оптической плотности культуры в результате добавления питательного вещества по отношению к контролю. В 35-ти экспериментах рост возобновился после добавки вещества, определенного моделью как лимитирующего.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что теорема стратификации в 75% случаев дает адекватное предсказание ресурсов, ограничивающих рост микробиологического сообщества.

Возможной причиной отсутствия влияния добавок на рост бактерий является недостаточный четырехчасовой срок экспозиции культур с добавками. Чтобы избежать влияния лаг-фазы, в дальнейших экспериментах следует проверять наличие или отсутствие возобновления роста не через 4, а через 8-16 часов после внесения добавок. Еще одним уточнением методики дальнейших опытов с добавками была бы необходимость вносить не только отдельные ресурсы, но и их комбинации для проверки многофакторного лимитирования (т.е. по достижении стационарной стадии разделять культуру не на 4, а на 7 пробирок).

Авторы выражают глубокую благодарность В.Н.Максимову и Н.Г.Булгакову за плодотворные обсуждения материалов и помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 02-04-48085).

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., Замолотчиков Д.Г., Алексеев В.Л. 1993. Правило лимитирующего звена для многовидовых экологических сообществ // Журн. общ. биологии. **54**, № 3. 282–297.

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

Максимов В.Н., Милько Е.С., Левич А.П. 2001. Потребности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах. Лимитирующие рост концентрации веществ при культивировании без пополнения запаса ресурсов // Изв. АН. Сер. биол. № 5. 607–612.

Фурсова П.В. 2003 (в печати). Расчеты видовых обилий и областей лимитирования в вариационной модели экологического сообщества // Математическое моделирование.

Фурсова П.В., Милько Е.С., Опарина И.А., Максимов В.Н., Левич А.П. 2004 (в печати). Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре по результатам культивирования без пополнения запасов ресурсов // Микробиология.

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)**

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)**

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

**Значения потребностей (10^{-12} мг/кл) диссоциантов
P.aeruginosa в ресурсах среды (Фурсова с соавт., 2004)**

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	129	7	1
S	409	17	4
M	525	31	6

Таблица 3а

Влияние добавок на оптическую плотность монокультур

номер среды	лимитирующий ресурс по модели	добавка	R	S	M
1	C	C	121	220	110
		N	91	102	96
		P	62	100	94
2	N	C			101
		N			131
		P			100
3	P	C			117
		N			119
		P			125
4	C	C	220	140	217
		N	97	80	74
		P	106	115	109
4*	C	C		227	
		N		73	
		P		100	
5	N	C	93		
		N	93		
		P	98		
6	P	C	94	62	100
		N	95	100	68
		P	134	114	105

*Вторая повторность опыта с S-диссоциантом

Таблица 36

Влияние добавок на оптическую плотность моно- и смешанных культур

номер среды	лимитирующий ресурс по модели	добавка	R	S	M	RS	RM	SM	RSM
2	C	C					82	89	87
		N					59	84	98
		P					100	78	81
3	N	C	95	100	90	92	96	104	96
		N	143	112	100	104	104	116	128
		P	95	104	97	96	92	100	100
5	C	C		122	160	142	160	160	150
		N		100	90	75	100	90	71
		P		100	110	75	100	90	71
6	C	C	212		97			121	
		N	162		66			79	
		P	235		89			83	
7	C	C	129	129	143	120	120		113
		N	86	100	86	100	93		75
		P	86	93	100	80	87		100
9	C	C	131	101	119	103	143		
		N	76	68	81	81	102		
		P	87	57	72	73	92		
11	P	C			112	103	109		129
		N			91	88	81		91
		P			108	94	95		82

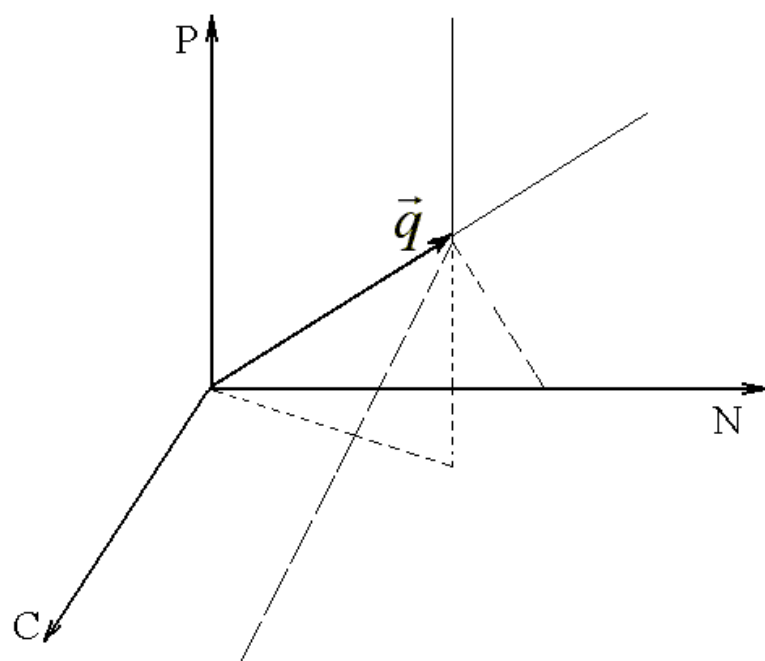


Рис.1.

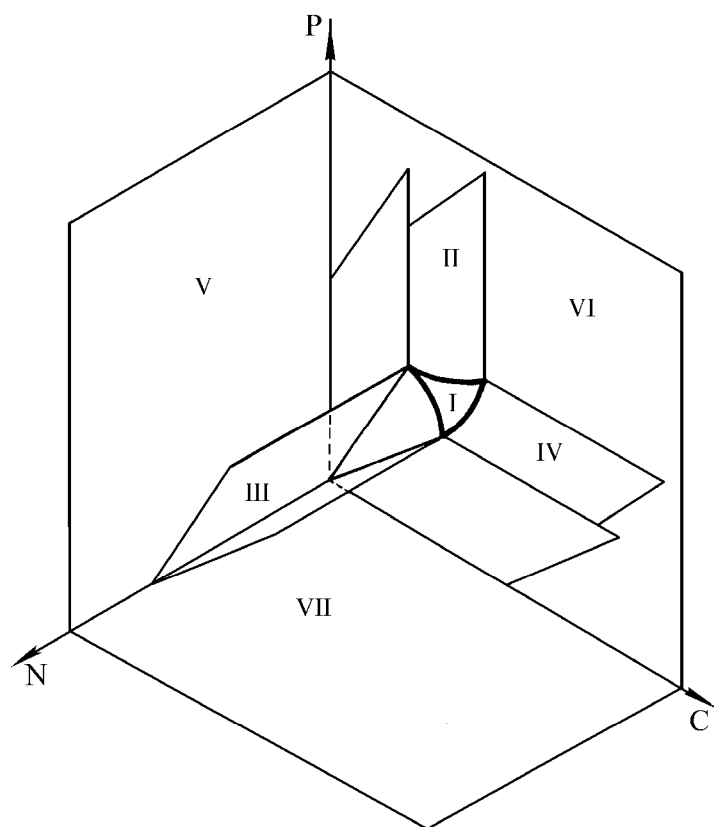


Рис.2.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Разбиение пространства ресурсов на области лимитирования роста монокультуры.

Рис. 2. Разбиение пространства ресурсов на области лимитирования: в области I лимитирующими являются три ресурса, в области II – L^1 и L^2 ; в III – L^1 и L^3 ; в IV – L^2 и L^3 ; в V – L^1 ; в VI – L^2 ; в VII – L^3 .

ВЫЯВЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАНИЯ, ОГРАНИЧИВАЮЩИХ РОСТ МОНО- И СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ДИССОЦИАНТОВ *Pseudomonas aeruginosa*

По данным опытов с моно- и смешанными культурами диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* проведено модельное и экспериментальное выявление лимитирующих ресурсов. В 75% случаев получено совпадение теоретических расчетов с независимыми опытными результатами. Предложены возможные объяснения несоответствий результатов, а также уточнения к методике проведения последующих экспериментов.

REVEALING OF THE RESOURCES, LIMITING MONO- AND MIXED *Pseudomonas aeruginosa* DISSOCIANTS CULTURES GROWTH

The model and experimental revealing of limiting resources on the data of experiments with mono- and mixed *Pseudomonas aeruginosa* dissociants cultures carried out. In 75 % of cases the theoretical calculation tally with independent experimental results. The probable explanations of results discrepancies, and also specification to methods of the subsequent experiment realization are offered.