

Часть 4. ПРИЛОЖЕНИЕ ВАРИАЦИОННОЙ МОДЕЛИ ПОТРЕБЛЕНИЯ И РОСТА К ОПИСАНИЮ СТАЦИОНАРНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ СООБЩЕСТВА ДИССОЦИАНТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4.1. Объекты и методы экспериментального исследования

Экспериментальным объектом настоящей работы является сообщество диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве ресурсов, способных ограничивать рост культуры, рассматриваются глюкоза, нитраты и фосфаты. Культивирование микроорганизмов проводится без пополнения запаса биогенных элементов, также не происходит добавление или изъятие микроорганизмов. Изучается развитие культуры до остановки роста, вызванного исчерпанием одного из ресурсов, но не какими-либо иными причинами.

*4.1.1. Диссоцианты *Pseudomonas aeruginosa* и их свойства*

Многие бактерии, в том числе псевдомонады, в процессе роста могут расщепляться (диссоциировать) на варианты, различающиеся по генетическим, физиолого-биохимическим и морфологическим признакам (Милько, Егоров, 1991; Милько с соавт., 2007). От случайных мутаций обратимые диссоциативные переходы отличаются высокой частотой и постоянным характером этих изменений. Согласно принятым в настоящее время условным обозначениям, диссоциативные формы обозначаются по некоторым морфологическим признакам их колоний: S (smooth) — гладкие, R (rough) — шероховатые, M (mucoid) — слизистые.

Если бы при диссоциации менялась только морфология колоний, то этот процесс интересовал ограниченное число исследователей. Но одновременно с изменением колоний меняются многие физиолого-биохимические свойства, а также патогенность бактерий. Именно медицинские микробиологи внесли основной вклад в изучение процесса диссоциации. В настоящее время пристальное внимание к диссоциативным переходам связано с бурным развитием биотехнологии. Диссоцианты могут отличаться по количеству и качеству синтезируемых практически ценных веществ, а процесс диссоциации снижает выход целевого продукта и приносит производству большие потери. (подробное описание генетических, физиолого-биохимических и морфологических особенностей диссоциантов бактерий изложено в **Главе 1**).

Объекты данного исследования – R-, S- и M-диссоцианты углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2, выделенного из пластовых вод сибирского

нефтяного месторождения Ван-Еган (рис. 4.1). Варианты отличаются морфологией колоний, скоростью роста (Милько, Мартынкина, 1996), устойчивостью к действию ряда химических и физических факторов: R-диссоциант имеет селективное преимущество при интенсивной аэрации, повышенной температуре культивирования, УФ-облучении, высыхании; M-диссоциант лучше растет при низкой температуре культивирования, повышенном осмотическом давлении, щелочной реакции среды; S-диссоциант наиболее интенсивно окисляет углеводород (Милько, Никитенко, 1998).

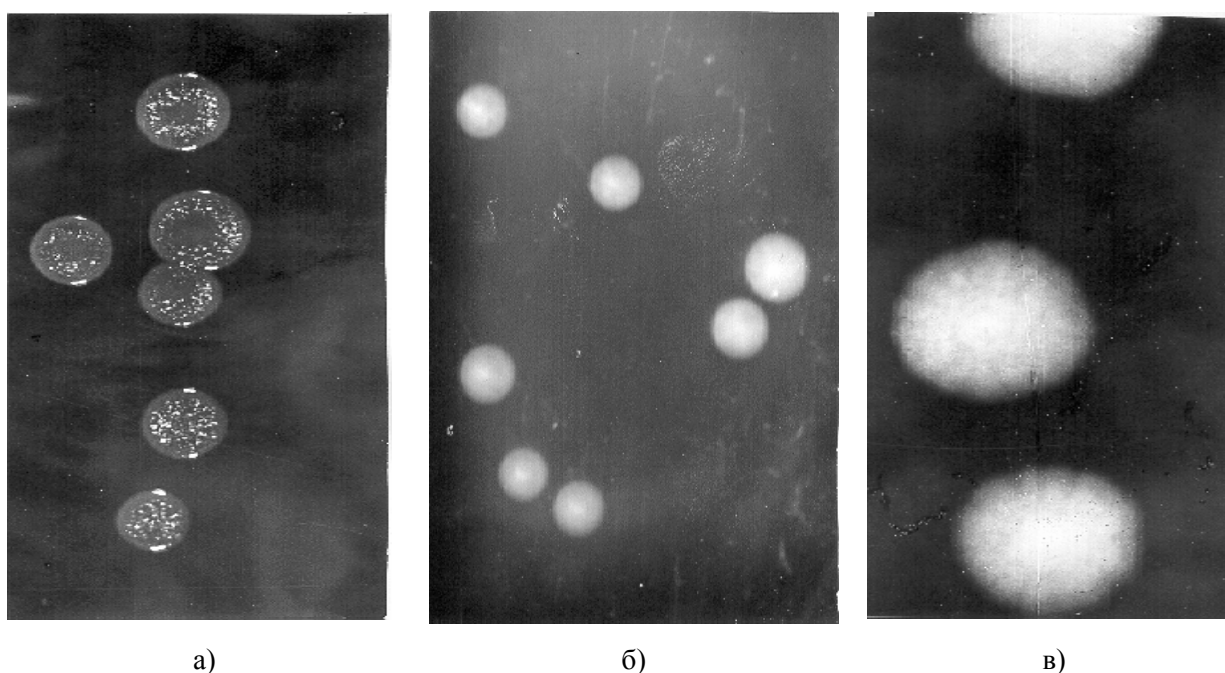


Рис. 4.1. Клетки бактерий *P. aeruginosa*: а) R-диссоциант; б) S-диссоциант; в) M-диссоциант

Представители рода *Pseudomonas* используются в химических производствах, в биогидрометаллургии, в производстве химических препаратов для сельского хозяйства, при получении полимеров, для повышения нефтеотдачи пластов, при переработке и удалении отходов и веществ, загрязняющих среду, в том числе углеводородов, и др. (Калакуцкий и др., 1996; Аношкин и др., 1997; Мордухова и др., 2000).

4.1.2. Методы культивирования и измерений

Экспериментальный материал, являющийся основой для исследований, изложенных в этой главе диссертации, складывается из данных двух этапов проведения опытов: в период с 1999 по 2001 гг. и с 2002 по 2003 гг. Методика проведения экспериментов на разных этапах в целом одна и та же. Некоторые отличия, в основном связанные с

методикой определения уровня содержания биогенных элементов в среде, отражены в тексте соответствующих подразделов.

Культивирование бактерий. Бактерии выращивали на средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов (азотнокислый натрий) и фосфатов (натрий фосфорнокислый однозамещенный). В их состав также входили хлористый калий и сернокислый магний. Исходная среда для R- и S-диссоциантов содержала 2% глюкозы, 1.1% нитратов и 0.055% фосфатов, для M-диссоцианта количество веществ было уменьшено в два раза. Для изучения зависимости роста бактерий от начального содержания ресурса в среде уровень глюкозы варьировали в пределах от 0.03 до 2%, нитратов – от 0.01 до 1.1%, фосфатов – от 0.001 до 0.055%. Количество хлористого калия и сернокислого магния в опытных средах было постоянным и составляло 0.06% и 0.02%, соответственно. Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды (такое соотношение объемов обеспечивает достаточную аэрацию) на качалке (180 об/мин) при температуре 28⁰С в течение полутора-трех суток до достижения стационарной фазы роста. На некоторых средах опыты ставили в нескольких повторностях. Протоколы экспериментов содержатся в таблицах приложения.

В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на агаризированной среде, содержащей мясопептонный бульон и сусло в соотношении 1:1 (БСА). Бактерии со скошенного агара переносили петлей в пробирку с физиологическим раствором. Плотность инокулята каждого из диссоциантов во всех опытах выравнивали по нефелометру или по стандарту мутности до содержания 10⁹ или 10⁷ клеток в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3% объема.

Оценка роста бактерий. Рост бактерий оценивали нефелометрически по клеточной плотности культуры. Измерения проводили на ФЭК 56 М (светофильтр № 6, зеленый, максимум пропускания 540 нм) в кювете с длиной оптического пути 0.5 см. При слабом росте бактерий использовали кювету с длиной пути 2 см, с последующим пересчетом полученных данных. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100.

Определение уровня содержания в среде основных биогенных элементов. На первом этапе экспериментов (в период с 1999 по 2001 гг.) глюкозу определяли с помощью трифенилтетразолия хлорида (Химия углеводов, 1967), азот – с сульфифеноловым реактивом (Поляков, 1950), фосфор – методом Пануша (Малый практикум по биохимии, 1979) (клетки отделяли центрифугированием (6 тыс. об/мин, 20 мин)). На втором (с 2002 по 2003 гг.) – пользовались экспресс-методами.

Определение глюкозы. Для определения концентрации глюкозы использовали 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ), который, восстанавливаясь, превращается в окрашенный трифенилформазан. Последний, растворяясь в органическом растворителе, окрашивает раствор в вишнево-красный цвет (Избранные задачи большого практикума по микробиологии, 1991).

Для анализа в пробирку с 2 мл культуральной жидкости, последовательно приливали 1 мл 0.3%-ного ТТХ (раствор готовили непосредственно перед опытом), 1 мл 2н NaOH. Смесь помещали на 3 мин в кипящую водяную баню. Затем для быстрого прекращения реакции смесь помещали в холодную воду и добавляли 1 мл 2.1н CH_3COOH . После охлаждения из смеси отбирали 1 мл в мерную пробирку и доводили объем этанолом до 5 мл.

Интенсивность окраски измеряли на ФЭКе с зеленым светофильтром (ФЭК 56 М, светофильтр № 6, максимум пропускания 540 нм) в кювете с длиной оптического пути 0.3 см. Концентрацию глюкозы определяли по соответствующей калибровочной кривой. (Для построения последней использовали растворы, содержащие от 40 до 400 мкг глюкозы в 2 мл пробы.)

Экспресс-анализ проводили с помощью индикаторных полосок для полуколичественного определения глюкозы в крови "Диаглюк" (диапазон определяемых концентраций составляет 0.0 – 1000 мг% (0.0 – 55.5 ммоль/л)).

Определение фосфора. Содержание фосфора в культуральной жидкости определяли методом Пануша (Малый практикум по биохимии, 1979), основанного на взаимодействии ортофосфата с молибдатом аммония. В результате этой реакции образуется фосфорномолибденовая кислота, которую восстанавливают метолом (п-метиламинофенол).

Перед опытом уровень кислотности культуральной жидкости доводили до 7.0. Для анализа брали 2.75 мл исследуемого образца и последовательно добавляли 1.25 мл 0.5 %-ного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 4 М ацетатном буфере с $\text{pH} = 4$, затем 0.5 мл 5%-ного водного раствора молибдата аммония $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мл 0.2%-ного раствора метола в 5%-ном водном растворе Na_2SO_3 .

Интенсивность окраски измеряли на ФЭКе (ФЭК 56 М, светофильтр № 8, максимум пропускания 597 нм) в кювете с длиной оптического пути 1.0 см. Концентрацию фосфора определяли по калибровочной кривой. (Калибровку выполняли, используя растворы объемом 2.75 мл, в которых содержалось от 10 до 40 мкг фосфора.)

Экспресс-анализ проводили с помощью фотометрического фосфат-теста фирмы "Merck" (возможно определение концентраций в пределах от 0.010 до 5.00 мг/л).

Определение азота. Взаимодействие солей азотной кислоты с сульфифеноловым реактивом (смесь фенола и серной кислоты) в присутствии щелочи сопровождается интенсивным окрашиванием раствора в желтый цвет (Поляков, 1950). Эта особенность реакции позволяет определять концентрацию нитратного азота.

Для анализа в фарфоровой чашке упаривали такой объем культуральной жидкости, чтобы после выпаривания количество азота составляло от 0.1 до 0.4 мг. После охлаждения в чашку добавляли 0.5 мл сульфифенолового реактива и тщательно растирали в нем остаток от выпаривания стеклянной палочкой. Через 5-10 мин добавляли 7.5 мл 10%-ного раствора NaOH. Окрасившуюся в желтый цвет жидкость переливали в мерную колбу и доводили объем до 50 мл. Интенсивность окраски измеряли на ФЭКе (ФЭК 56 М, светофильтр № 4, максимум пропускания 434 нм) в кювете с длиной оптического пути 0.3 см.

Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор, содержащий 0.1 мг азота в 1 мл, внося в чашки для выпаривания соответствующий объем от 1 до 4 мл.

Экспресс-анализ содержания нитратов в культуральной жидкости осуществляли с помощью аналитических тест-полосок фирмы "Merck" (диапазон определяемых концентраций составляет 10-25-50-100-500 мг/л).

Определение уровня кислотности среды. Для измерения рН среды использовали микропотенциометр Checker фирмы "HANNA Instruments" (Португалия).

Определение количества клеток бактерий. Для определения количества клеток в культуре на стационарной стадии развития для каждого диссоцианта был получен коэффициент, связывающий оптическую плотность с численностью клеток. С помощью люминесцентной микроскопии на фиксированных препаратах считали количество бактерий в суспензии известной оптической плотности. Для этого 48-часовые культуры R- и S-диссоциантов, выросших на исходной среде (см. пункт "*Культивирование бактерий*"), разводили в 100 и 10 000 раз, а 24-часовую культуру M-диссоцианта в 10 и 100 раз. Затем 0.01 мл суспензии каждого разведения наносили на обезжиренное предметное стекло и равномерно распределяли микробиологической петлей по площади 4 см² (квадрат 2x2 см). На одно предметное стекло наносили три таких препарата. Препарат высушивали на воздухе при комнатной температуре. Затем после фиксации легким нагреванием над пламенем газовой горелки окрашивали препарат водным раствором акридина оранжевого

(разведение 1: 10 000; 2-4 мин). Избыток красителя удаляли в процессе промывки, для чего стекла погружали на 10 мин в кювету с водопроводной водой. Окрашенные препараты высушивали при комнатной температуре.

Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (светофильтр Ж-С –19, окуляр х 4, объектив х 90 Л). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 мл исходной суспензии, вычисляли по формуле

$$N = \frac{4an}{S} \cdot 10^{10},$$

где N – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее число клеток в поле зрения; S – площадь поля зрения ($10\,000\text{ мкм}^2$); n – показатель разведения (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

В результате были получены следующие коэффициенты перевода оптической плотности в количество клеток: для R-диссоцианта – 10^8 кл/(мл·ед.неф.х100), для S-диссоцианта – $0.3 \cdot 10^8$ кл/(мл·ед.неф.х100), для M-диссоцианта – $0.17 \cdot 10^8$ кл/(мл·ед.неф.х100).

Оценка погрешностей измерений. При проведении экспериментов по выращиванию бактерий в период с 1999 по 2001 гг. оценивали погрешность измерений концентраций биогенных элементов и оптической плотности (Опарина, 2002). Относительная погрешность измерения оптической плотности при 10 параллельных пробах составила 3.4%. Для оценки погрешностей химических определений измеряли начальные концентрации веществ на трех различных уровнях. В среднем для 6 – 10 параллельных проб относительная погрешность при измерении концентрации углерода составила 10.7%, азота – 10.3%, фосфора – 17.1%.

Кроме того, изучали вопрос о том, насколько отличаются друг от друга биологические повторности опытов (характеристикой являлась достигнутая на стационарной стадии роста оптическая плотность культуры). Результаты представлены в табл. 4.1.

Влияние начального состава смешанной культуры на ее структуру на стационарной стадии роста. Для того чтобы определить, насколько соотношение диссоциантов в посевном материале смешанных культур влияет на результат культивирования, провели специальную серию опытов. На среде, содержащей 0.19% глюкозы, 0.1% нитратов и 0.01% фосфатов выращивали смешанную культуру R- и M-диссоциантов с различными долями этих групп клеток в начале культивирования. Результаты экспериментов содержатся в табл. 4.2.

Таблица 4.1. Оптическая плотность биологических повторностей культур (в единицах нефелометра, умноженных на 100)

Номер опыта	Биологические повторности					
	1	2	3	4	5	6
Оптическая плотность культуры	63	56	101	41	68	55
	72	60	120	41	67	57
	69	55	114	38	71	56
	72	57	116	41	65	60
	64	55	–*	33	67	60
	62	55	–	37	69	57
	62	57	–	39	68	60
	59	56	–	40	71	58
	70	54	–	40	67	59
	67	–	–	36	58	57
	–	–	–	36	–	–
	–	–	–	39	–	–
	–	–	–	39	–	–
	–	–	–	42	–	–
Среднее значение	66	56	113	39	67	58
Максимальное отклонение от среднего значения (в процентах)	11	7	11	15	13	5
Стандартное отклонение	4.62	1.76	8.22	2.49	3.69	1.79

Согласно полученным данным, если доля клеток одного из диссоциантов не превышает 70%, то на стационарной стадии роста на одной и той же среде устанавливается одинаковый, с учетом погрешностей определения, состав культуры.

Таблица 4.2. Влияние начального состава смешанной культуры на ее состав на стационарной стадии роста

Номер опыта	Доли клеток R- и M-диссоциантов в посевном материале (%)		Доли клеток R- и M-диссоциантов на стационарной стадии роста (%)	
	R	M	R	M
1	10	90	65	35
2	30	70	78	22
3	50	50	78	22
4	70	30	78	22
5	90	10	84	16
6	56	44	74	26
7	33	67	66	34

4.1.3. Метод экспериментального определения лимитирующего ресурса (метод добавок)

Для экспериментального определения ресурса, ограничивающего рост культуры, проводили так называемые опыты с добавками. На первом этапе проведения экспериментов в момент предполагаемого достижения стационарной стадии культуру

* Показатель не определен

разделяли на четыре пробирки. В три из них вносили добавки – глюкозу, нитрат или фосфат, – четвертую оставляли без изменений (контроль). Количество добавляемых веществ равнялось их первоначальному содержанию в среде. 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. В более поздних опытах методика эксперимента была несколько изменена. Вносили не три, а семь возможных комбинаций добавок – каждое вещество в отдельности, парные комбинации и все три – для проверки возможности многофакторного лимитирования. Кроме того, было увеличено время экспозиции культуры с добавками с четырех до 12 часов. Это было сделано с целью избежать влияния лаг-фазы.

4.2. Определение потребностей

Под потребностью организма понимается количество ресурса, необходимое для роста вида, в расчете на одну клетку. Таким образом, получить соответствующие величины потребностей диссоциантов в источниках питания можно по формуле $q_i^L = \frac{\Delta L}{\Delta n_i}$, где ΔL – количество потребленного из среды вещества, L – компонент питания, Δn_i – количество вновь образовавшихся клеток за тот же период времени, индекс i характеризует диссоциант (Фурсова с соавт., 2004а).

Потребности R-, S- и M-диссоциантов бактерий *P. aeruginosa* определяли по результатам анализа данных экспериментов с монокультурами, проведенных в период 1999 г. по 2001 г. По данным опытов, в динамике которых определяли концентрации питательных веществ, потребности рассчитывали, исходя из соответствующих измерений величин ΔL и Δn_i . В большинстве экспериментов химическое определение концентраций питательных веществ в динамике культивирования не проводили. Поэтому для определения количества потребленного ресурса, используемого при расчетах потребностей, руководствовались следующим: если остановка роста произошла по причине исчерпания некоторого питательного вещества, то количество потребленного к концу роста культурой этого ресурса можно считать равным его содержанию в среде в начальный момент культивирования. При этом для вычисления потребности необходимо

использовать количество клеток, выросших за тот же период времени, то есть к моменту достижения стационарной фазы. Итак, для расчета потребности диссоцианта в некотором ресурсе необходимо выполнение следующих условий:

- число выросших клеток данного диссоцианта следует определять в стационарной фазе роста;
- остановка роста (достижение стационарной стадии) должна быть обусловлена исчерпанием в среде именно этого ресурса.

Таким образом, экспериментальная задача состояла в необходимости зафиксировать достижение стационарной стадии. Для этого измерения оптической плотности проводили с интервалом в несколько часов в течение двух – двух с половиной суток.

Задача анализа полученных данных состояла в выявлении лимитирующего рост ресурса. Для ее решения были применены три подхода. Первый основан на априорном представлении о том, какой питательный компонент мог бы ограничивать рост культуры на среде с заданным составом. Исходную (указанную в разделе "Культивирование бактерий") среду, основываясь на опыте культивирования *P. aeruginosa*, принимали за сбалансированную (при выращивании бактерий на такой среде все питательные вещества полностью исчерпываются одновременно). А среду, где содержание некоторого ресурса было снижено по сравнению с исходной, считали лимитированной по этому ресурсу. Второй путь – проверка пропорциональности оптической плотности культуры в стационарной фазе начальному количеству ресурса в среде в серии опытов с различными начальными содержаниями ресурса. При этом одна из сред в серии согласно первому подходу могла быть признана лимитирующей по рассматриваемому ресурсу. Третий подход основан на методе добавок (см. п. 4.1.3). Возобновление роста после добавки ресурса принимали за экспериментальное доказательство его лимитирующей роли.

Были проведены 26 опытов с культурой R-диссоцианта, 34 опыта с S-диссоциантом, 28 – с M-диссоциантом. В табл. 4.3 приведены уровни содержания питательных веществ в начале эксперимента (в расчете на элемент), значения оптической плотности культуры (показания нефелометра, умноженные на 100) и уровня pH в стационарной фазе роста (или в конечный момент культивирования). Исходная среда в табл. 4.3 приведена под номером 1. По данным табл. 4.3 судили о наличии пропорциональности оптической плотности культуры начальному количеству ресурса в среде. Среды, при культивировании на которых применяли метод добавок, отмечены символом "*".

Таблица 4.3. Начальный состав сред по углероду, азоту и фосфору, оптическая плотность культуры в единицах нефелометра, умноженных на 100, и уровень кислотности среды (pH) на стационарной стадии роста или в конце опыта. Символом "*" отмечены среды, при культивировании на которых, применяли метод добавок

Номер среды	R-диссоциант			Оптическая плотность	pH
	Содержание ресурсов в среде (мг/мл)				
	Углерод	Азот	Фосфор		
1	7.98	1.81	0.11	473	
2	4	0.9	0.056	430	
3	4	0.9	0.056	342	8.5
4	7.8	0.72	0.056	224	7.3
5	7.8	0.72	0.056	276	8
6	7.8	0.9	0.056	249	7.7
7*	0.78	0.4	0.028	87	8.8
8*	3.18	0.1	0.028	89	4.1
9*	3.18	0.4	0.007	95	4
10*	0.282	0.1	0.008	21	8.4
11*	1.6	0.03	0.008	37	4.4
12*	1.6	0.1	0.002	26	4.1
13	0.4	0.035	0.01	31	8.1
14	1.62	0.14	0.04	120	7.5
15	0.4	0.015	0.01	22	6.8
16	1.6	0.06	0.04	110	7.6
17	0.12	0.035	0.01	17	7.1
18	0.48	0.14	0.04	31	7.2
19	0.12	0.015	0.01	14	7.5
20	0.48	0.06	0.04	52	8.4
21	0.78	0.1	0.01	63	8.8
22	3.24	0.4	0.04	200	5.3
23	1.6	0.2	0.01	120	7.6
24	6	0.8	0.04	225	8.4
25	1.2	0.035	0.01	49	7.1
26	4.8	0.14	0.04	100	4.1

Номер среды	S-диссоциант			Оптическая плотность	pH
	Содержание ресурсов в среде (мг/мл)				
	Углерод	Азот	Фосфор		
1	7.98	1.81	0.11	400	
2	7.98	1.81	0.11	372	
3	4	0.9	0.056	376	
4	4	0.9	0.056	334	7.7
5	7.98	0.72	0.056	350	6.7
6	7.98	0.72	0.056	340	6.2
7	7.98	0.9	0.056	320	8.6
8	7.98	0.9	0.056	243	4.4
9*	0.78	0.4	0.028	51	8.8
10*	0.78	0.4	0.028	74	8
11*	3.18	0.1	0.028	111	4
12*	3.18	0.1	0.028	109	4
13*	3.18	0.4	0.007	106	3.7
14*	3.18	0.4	0.007	90	3.6
15*	0.282	0.1	0.008	22	8.3
16*	0.78	0.03	0.008	60	7.4
17*	0.78	0.1	0.002	34	6.6
18*	0.282	0.1	0.008	25	8.2
19*	0.78	0.03	0.008	63	7.3
20*	0.78	0.1	0.002	30	6.6
21	0.4	0.035	0.01	30	8.4
22	1.62	0.14	0.04	123	8.7
23	0.4	0.015	0.01	28	7.6
24	1.6	0.06	0.04	136	8.8
25	0.12	0.035	0.01	9	7.7
26	0.48	0.14	0.04	30	6.9
27	0.12	0.015	0.01	14	8.2
28	0.48	0.06	0.04	52	8
29	0.78	0.1	0.01	74	8.2
30	3.24	0.4	0.04	177	8.3
31	1.6	0.2	0.01	99	8.6
32	6	0.8	0.04	220	8.9
33	1.2	0.035	0.01	68	7.3
34	4.8	0.14	0.04	160	3.2

Номер среды	M-диссоциант			Оптическая плотность	pH
	Содержание ресурсов в среде (мг/мл)				
	Углерод	Азот	Фосфор		
1	4	0.9	0.056	72	3.3
2	4	0.9	0.056	75	3.3
3	1.62	0.9	0.056	86	5.5
4	1.62	0.9	0.056	76	3.5
5	7.8	0.2	0.056	37	4
6	7.8	0.2	0.056	42	3.9
7	7.8	0.9	0.01	67	4.1
8	7.8	0.9	0.01	44	4.2
9*	0.78	0.4	0.028	111	8.5
10*	3.18	0.1	0.028	95	4.1
11*	3.18	0.4	0.007	77	3.8
12*	0.282	0.1	0.008	27	8.3
13*	0.78	0.03	0.008	58	7.4
14*	0.78	0.1	0.002	31	3.4
15	0.4	0.035	0.01	31	8.5
16	1.62	0.14	0.04	109	8.3
17	0.4	0.015	0.01	29	7.7
18	1.6	0.06	0.04	129	8.8
19	0.12	0.035	0.01	10	8.5
20	0.48	0.14	0.04	35	7.3
21	0.12	0.015	0.01	15	7
22	0.48	0.06	0.04	69	8.6
23	0.78	0.1	0.01	71	8.8
24	3.24	0.4	0.04	142	3.3
25	1.6	0.2	0.01	90	7.8
26	6	0.8	0.04	220	8.8
27	1.2	0.035	0.01	69	7.2
28	4.8	0.14	0.04	155	3.1

Необходимо отметить ряд причин, по которым часть экспериментальных данных исключали из дальнейшего рассмотрения:

- не во всех опытах конечный момент культивирования соответствовал стационарной стадии (это означает, что культура не достигла максимально возможной на данной среде численности клеток);
- в некоторых экспериментах в процессе культивирования вместо исходной монокультуры возникала смесь диссоциантов (Милько, Ильиных, 2004) (эти данные не подходят для определения потребностей, поскольку по ним невозможно определить в каком количестве потребляются ресурсы каждым из диссоциантов).

Таблица 4.4. Значения потребностей диссоциантов (10^{-12} мг/кл), рассчитанные по данным экспериментов. Обозначение: q_i^L – потребность диссоцианта i в ресурсе L ; номера сред соответствуют номерам сред из табл. 4.3

R-диссоциант				S-диссоциант				M-диссоциант			
номер среды	q_R^C	q_R^N	q_R^P	номер среды	q_S^C	q_S^N	q_S^P	номер среды	q_M^C	q_M^N	q_M^P
2	96	–*	0.7	3	342	–	2.3	1	–	–	4.2
3	120	–	–	4	384	–	5.6	2	630	–	3.2
4	156	–	–	5	–	–	5.1	7	384	–	9
6	–	–	1.8	6	384	–	3.1	9	432	–	–
7	90	–	–	7	432	–	6.5	11	–	–	5.3
10	148	–	1.2	9	540	–	–	12	642	–	–
11	–	8	1.1	10	384	–	–	13	–	31	–
12	–	–	0.8	15	433	–	–	14	–	–	4
14	144	–	–	16	–	19	–	17	–	32	–
15	–	6	–	17	–	–	2	18	–	28	–
18	156	–	–	18	381	–	–	21	480	–	–
21	120	–	–	19	–	18	–	22	420	–	–
22	–	–	2	20	243	–	2	23	684	–	–
24	–	–	1.8	23	–	18	–	25	–	–	6.7
25	–	7	–	24	–	15	–	26	–	–	10.6
				25	450	–	–	27	–	31	–
				28	348	–	–				
				29	384	–	–				
				30	612	–	–				
				32	–	–	6				

Таким образом, были выбраны данные тех опытов, по которым можно рассчитывать потребности. Полученные по результатам этих экспериментов значения потребностей приведены в табл. 4.4.

* Показатель не определен

Таблица 4.5. Средние значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом 95% - х доверительных интервалов

Диссоциант	Ресурс		
	Углерод	Азот	Фосфор
R	129 ± 22	7.0 ± 2.5	1.0 ± 0.5
S	409 ± 55	17.5 ± 3.0	4.0 ± 1.5
M	525 ± 114	31 ± 3.0	6.0 ± 2.5

Рассчитанные величины были усреднены, для средних были рассчитаны 95%-е доверительные интервалы (табл. 4.5). Для указанных расчетов применялось стандартное приложение Microsoft Excel 7.0 (анализ – описательная статистика).

В конце 2002 г. – начале 2003 г. на основе рассчитанных потребностей (табл. 4.5) была составлена среда, (0.225% глюкозы, 0.03% нитратов и 0.004% фосфатов), на которой были проведены дополнительные опыты по культивированию R- и S-диссоциантов для экспериментальной проверки полученных величин. Начальные запасы ресурсов были в среднем пропорциональны установленным значениям потребностей диссоциантов (сбалансированная среда). По данным указанного опыта были получены следующие данные: потребность в углероде составила $122 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $345 \cdot 10^{-12}$ мг/кл для R- и S-диссоцианта соответственно; в азоте – $5.75 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $24 \cdot 10^{-12}$ мг/кл; в фосфоре – $0.85 \cdot 10^{-12}$ мг/кл и $3.5 \cdot 10^{-12}$ мг/кл. Сравнение приведенных величин потребностей со значениями в табл. 4.5 показывает их близость в пределах погрешностей определения.

Отметим, что ранее были получены оценки потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах на основе данных 1997-1999 гг. (Максимов с соавт., 2001). Однако, при расчетах этих значений для перевода оптической плотности в численность для всех диссоциантов использовался один и тот же

Таблица 4.6. Ранее полученные значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов (Максимов с соавт., 2001) в пересчете на углерод, азот и фосфор ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом 95% - х доверительных интервалов и индивидуальных коэффициентов перевода оптической плотности культур диссоциантов в количество клеток

Диссоциант	Ресурс		
	Углерод	Азот	Фосфор
R	110 ± 8	8.5 ± 3.1	1.0 ± 0.3
S	366 ± 23	38.3 ± 10.3	3.8 ± 1.0
M	1706 ± 941	144.0 ± 63.5	11.8 ± 5.8

коэффициент. В работе было высказано намерение осуществить "дифференцированную калибровку" показаний нефелометра для каждого из диссоциантов, что и сделано в настоящем исследовании. Уточненные значения потребностей в расчете на элемент содержатся в табл. 4.6. Как видно из сравнения представленных в данной работе величин потребностей и опубликованных раньше, имеет место их взаимное соответствие (с учетом погрешностей вычислений, которые достигают 50% (Максимов с соавт., 2001)), за исключением значений потребностей M-диссоцианта. Это различие можно объяснить

следующим обстоятельством. В опытах 1997-1999 гг. наблюдался очень плохой рост указанного диссоцианта. Так, оптические плотности, которых достигала М-культура в прежних и нынешних опытах, примерно одинаковые, а содержание ресурсов в средах опытов 1997-1999 гг. было в 5-10 раз выше. И наоборот, при одинаковом содержании питательных веществ в более поздних опытах оптическая плотность достигала значений в несколько раз превышающих уровень ранних экспериментов. Вероятно, остановка роста культуры М-диссоцианта в ранних опытах связана с образованием клетками муравьиной кислоты и, как следствие, снижением уровня кислотности среды (указанная особенность клеток М-диссоцианта была обнаружена позднее (Милько, Красильникова, 1999)). Итак, можно сделать вывод о том, что в экспериментах 1997-1999 гг. остановка роста М-диссоцианта происходила по причине, не связанной с исчерпанием ресурса из среды, и предположение о том, что ресурсы были полностью потреблены из среды, было неверным, а рассчитанные величины потребностей оказались завышенными.

4.3. Выявление лимитирующих ресурсов

Данные о величинах потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в основных питательных компонентах (табл. 4.5), позволяют по разработанным алгоритмам (см. пункты 3.5 и 3.6) рассчитать области лимитирования ресурсов. На рис. 4.2 – 4.5 представлены границы полученных стратов, на которые распадается пространство ресурсов, для смешанных культур бактерий. На указанных рисунках изображена стратификация при некотором фиксированном уровне начального содержания фосфора в среде. При других значениях их вид аналогичен приведенному. «Узость» областей многофакторного лимитирования объясняется величинами потребностей, а точнее их «близостью» к пропорциональным значениям (например, в случае двух потребляемых ресурсов область двухфакторного лимитирования близка к вырождению в луч, см. п. 3.6.2).

Для проверки адекватности предсказания вариационной моделью фактора, ограничивающего рост микробиологического сообщества, проводили сравнение расчетных и экспериментальных данных (Фурсова с соавт., 2004б). Основой для получения последних стали результаты опытов с добавками, являющихся реализацией метода экспериментального определения лимитирующего ресурса (см. п. 4.1.3).

В период с 1999 по 2001 гг. 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. 4.7 и 4.8).

Для указанных начальных условий выращивания, исходя из соответствующих каждой из смешанных культур расчетов (рис. 4.2 – 4.5), определяли область лимитирования, которой принадлежит изучаемая среда. Для выявления фактора, ограничивающего рост монокультур, определяли минимальную величину отношения запаса ресурса к соответствующей величине потребности: $\min \left[\frac{L^C}{q^C}, \frac{L^N}{q^N}, \frac{L^P}{q^P} \right]$ (см. пункт 3.6.3).

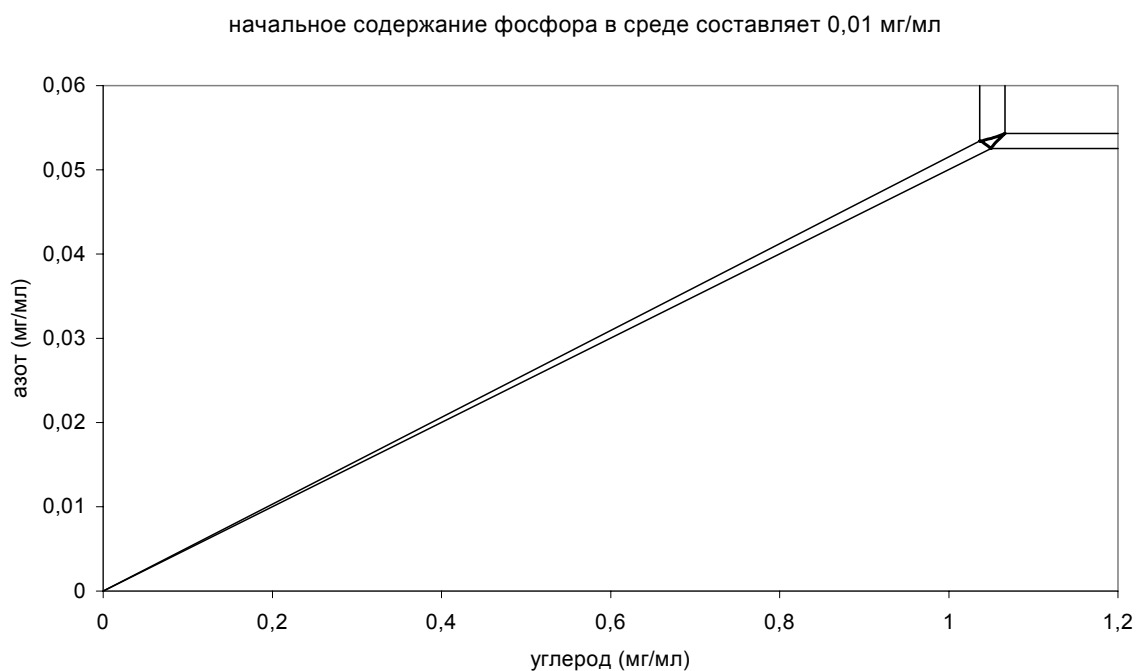


Рис. 4.2. Области лимитирования для смешанной культуры трех диссоциантов *P. aeruginosa*

начальное содержание фосфора в среде составляет 0.01 мг/мл

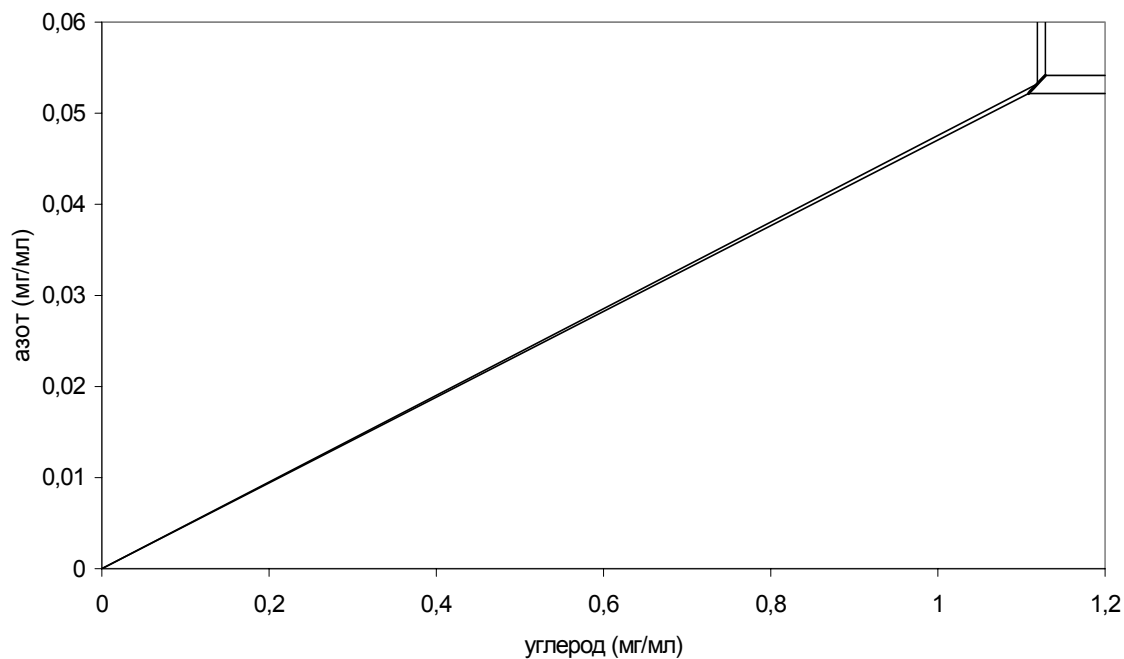


Рис. 4.3. Области лимитирования для смешанной культуры R- и S- диссоциантов *P.aeruginosa*

начальное содержание фосфора в среде составляет 0.01 мг/мл

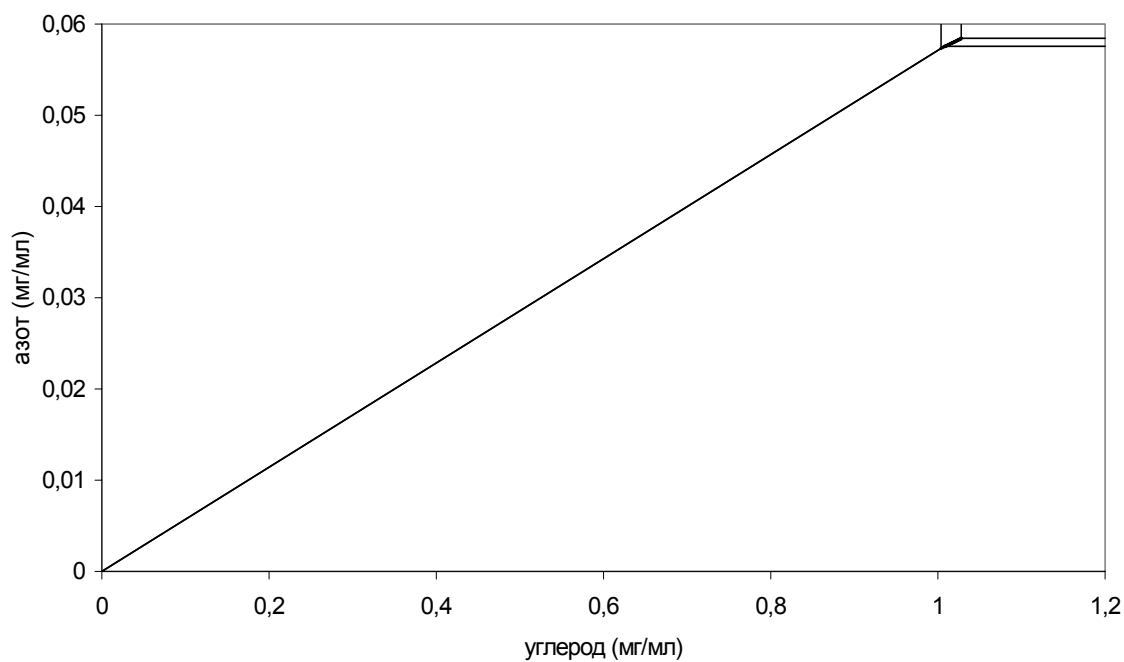


Рис. 4.4. Области лимитирования для смешанной культуры R- и M- диссоциантов *P.aeruginosa*

начальное содержание фосфора в среде составляет 0.01 мг/мл

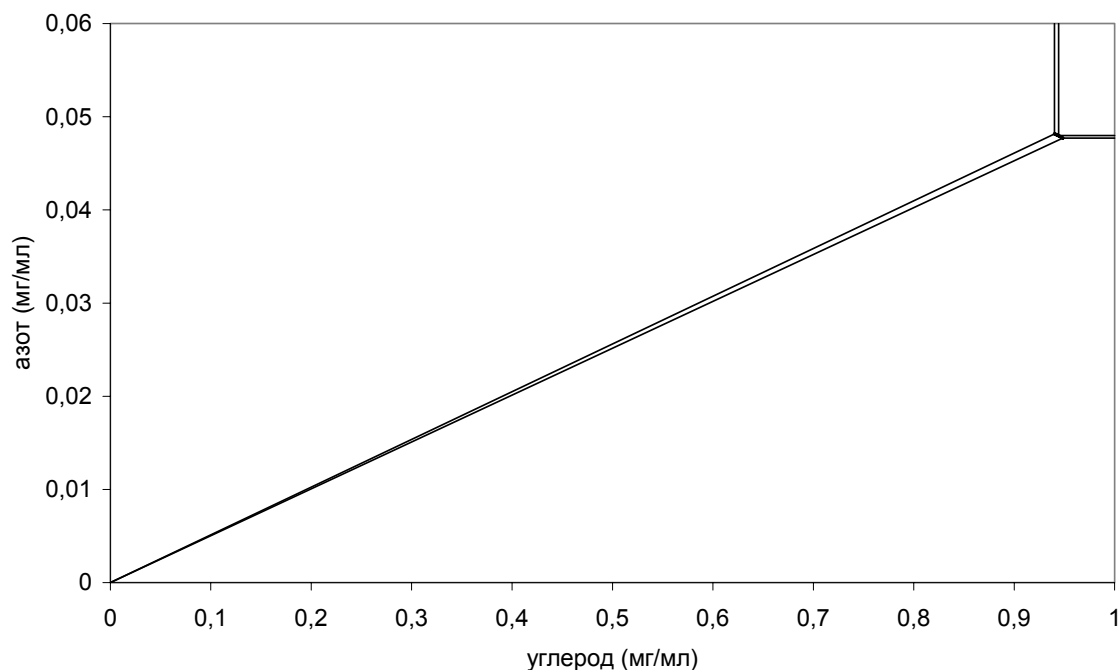


Рис. 4.5. Области лимитирования для смешанной культуры S- и M- диссоциантов *P.aeruginosa*

Таблица 4.7. 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
7	0.4	0.035	0.01	0.4	0.035	0.01
8	1.62	0.14	0.04	1.62	0.14	0.04
9	0.4	0.015	0.01	0.4	0.015	0.01
10	1.6	0.06	0.04	1.6	0.06	0.04
11	0.12	0.035	0.01	0.12	0.035	0.01
12	0.48	0.14	0.04	0.48	0.14	0.04
13	0.12	0.015	0.01	0.12	0.015	0.01
14	0.48	0.06	0.04	0.48	0.06	0.04
15	0.78	0.1	0.01	0.78	0.1	0.01
16	3.24	0.4	0.04	3.24	0.4	0.04
17	1.6	0.2	0.01	1.6	0.2	0.01
18	6	0.8	0.04	6	0.8	0.04
19	1.2	0.035	0.01	1.2	0.035	0.01
20	4.8	0.14	0.04	4.8	0.14	0.04

Перед тем, как сопоставлять модельные предсказания с опытными данными, ряд экспериментов исключили из рассмотрения. Это связано с двумя обстоятельствами:

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

Таблица 4.8. Состав сред по углероду, азоту и фосфору в начале опыта для 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 4.9. Влияние добавок на оптическую плотность монокультур. Номера сред соответствуют номерам из табл. 4.7. Оптическая плотность культуры, достигнутая в результате добавления питательного вещества, выражена в процентах по отношению к контролю (культура без добавки), плотность которого принимается за 100%. Жирным шрифтом выделены показатели, свидетельствующие о возобновлении роста в результате внесения питательного вещества, предсказанного моделью как лимитирующего

Номер среды	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M	Номер среды	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
1	C	C	121	220	110	8	C	C	–	–	–
		N	91	102	96			N	–	–	–
		P	62	100	94			P	–	–	–
2	N	C	–*	–	101	9	N	C	95	100	90
		N	–	–	131			N	143	112	100
		P	–	–	100			P	95	104	97
3	P	C	–	–	117	11	C	C	–	122	160
		N	–	–	119			N	–	100	90
		P	–	–	125			P	–	100	110
4	C	C	220	140	217	12	C	C	212	–	97
		N	97	80	74			N	162	–	66
		P	106	115	109			P	235	–	89
4'	C	C	–	227	–	13	C	C	129	129	143
		N	–	73	–			N	86	100	86
		P	–	100	–			P	86	93	100
5	N	C	93	–	–	15	C	C	131	101	119
		N	93	–	–			N	76	68	81
		P	98	–	–			P	87	57	72
6	P	C	94	62	100	17	P	C	–	–	112
		N	95	100	68			N	–	–	91
		P	134	114	105			P	–	–	108

Вторая повторность опыта с S-диссоциантом

* Показатель не определен

Из 116 проведенных экспериментов 47 удовлетворяли необходимым требованиям.

Результаты расчетов и опытов сведены в таблицы 4.9 и 4.10. В них указаны номера сред (в соответствии с табл. 4.7 и 4.8), предсказываемый модельными расчетами лимитирующий ресурс и показатели оптической плотности культуры, достигнутой в результате добавления питательного вещества, выраженные в процентах по отношению к контролю, плотность которого принимается за 100%.

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 (см. п. 4.5) проверяли наличие или отсутствие возобновления роста не через 4, а через 8-16 часов после внесения добавок. Еще одним уточнением методики в дальнейших опытах с добавками является внесение не только отдельных ресурсов, но и их комбинации для проверки многофакторного лимитирования.

Таблица 4.10. Влияние добавок на оптическую плотность смешанных культур. Номера сред соответствуют номерам из табл. 4.8. Оптическая плотность культуры, достигнутая в результате добавления питательного вещества, выражена в процентах по отношению к контролю (культура без добавки), плотность которого принимается за 100%. Жирным шрифтом выделены показатели, свидетельствующие о возобновлении роста в результате внесения питательного вещества, предсказанного моделью как лимитирующего

Номер среды	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	RS	RM	SM	RSM
2	C	C	–	82	89	87
		N	–	59	84	98
		P	–	100	78	81
3	N	C	92	96	104	96
		N	104	104	116	128
		P	96	92	100	100
5	C	C	142	160	160	150
		N	75	100	90	71
		P	75	100	90	71
6	C	C	–	–	121	–
		N	–	–	79	–
		P	–	–	83	–
7	C	C	120	120	–	113
		N	100	93	–	75
		P	80	87	–	100
9	C	C	103	143	–	–
		N	81	102	–	–
		P	73	92	–	–
11	P	C	103	109	–	129
		N	88	81	–	91
		P	94	95	–	82

4.4. Состав поликультур

В рамках вариационной модели потребления и роста данные о потребностях организмов позволяют определять в зависимости от начального состава среды те ресурсы, которые будут ограничивать рост культуры. Знание лимитирующего фактора, в свою очередь, дает возможность рассчитать состав сообщества (доли каждой из образующих его групп клеток) на стационарной стадии развития (см. пп. **3.2**, **3.3**, **3.5**, **3.6**).

На основании полученных значений потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* (п. **4.2**) и границ областей лимитирования (п. **4.3**) рассчитывали состав смешанных культур бактерий на стационарной фазе роста. Адекватность модельных предсказаний проверяли, сравнивая их с результатами экспериментов (Фурсова с соавт., 2005).

Экспериментальные данные составляют результаты выращивания четырех типов смешанных культур диссоциантов *P. aeruginosa* на 14-ти средах (начальные условия культивирования приведены в табл. 4.11). В процессе роста измеряли оптическую плотность (в начале опыта, через 18-22 часа, затем каждые 4-8 часов до наступления стационарной стадии). В предполагаемый момент остановки роста делали рассев для определения состава культуры. Однако не во всех экспериментах удалось выполнить условие достижения стационарной стадии, поэтому часть опытных данных исключили из дальнейшего рассмотрения. Кроме того, в некоторых экспериментах со смесью двух диссоциантов к концу опыта происходило ее замещение поликультурой из трех диссоциантов, вызванное появлением третьего в результате диссоциации и последующей конкуренцией за ресурсы. Этот факт послужил причиной рассматривать указанные опыты как эксперименты со смесью трех диссоциантов.

Для теоретических расчетов стационарного состава сообщества сначала для каждой опытной среды были определены ресурсы, ограничивающие рост сообщества (этот этап подробно описан в разделе «**4.3. Выявление лимитирующих ресурсов**»). Оказалось, что все векторы ресурсов, определяемые начальным составом среды, принадлежат стратам с однофакторным лимитированием (полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными (см. п. **4.3**)). В области лимитирования одним ресурсом L^k , $k = C, N$, или P относительные численности диссоциантов, обозначаемые r, s, m соответственно, на стационарной стадии роста задаются выражениями $r = x_0^{q_R^k}$, $s = x_0^{q_S^k}$, $m = x_0^{q_M^k}$, где x_0 – корень уравнения $x_0^{q_R^k} + x_0^{q_S^k} + x_0^{q_M^k} = 1$. Аналогично, для культуры, состоящий из двух групп организмов, доли задаются выражениями

$u = x_0^{q_u^k}, v = x_0^{q_v^k}$, причем $x_0^{q_u^k} + x_0^{q_v^k} = 1$, символы u, v обозначают возможные пары диссоциантов (подробное описание алгоритмов расчетов приведено в п. 3.5).

Для модельного определения оптической плотности культуры сначала находили полную численность сообщества по формуле $n = \frac{L^j}{\sum_{i=1}^w q_i^j p_i}$, $j \in J$, где L^j – начальное содержание в среде одного из полностью потребляемых сообществом ресурсов, $p_i, i = 1, \dots, w$ – относительные численности диссоциантов в смешанной культуре. Затем количество клеток каждого диссоцианта (соответствующая доля от общего числа клеток) переводили в оптическую плотность. Для этого использовали коэффициент, полученный при люминесцентном микрокопировании (см. п. 4.1.2). Общую оптическую плотность культуры получали как сумму оптических плотностей диссоциантов, образующих исследуемое сообщество.

Относительную ошибку ε определения оптической плотности рассчитывали по формуле $\varepsilon = \frac{|экс. - расч. |}{экс.} \cdot 100\%$, где *экс.* – экспериментальное значение, *расч.* – предсказание модели.

Таблица 4.11. Состав сред (в расчете на углерод, азот и фосфор, мг/мл) и соотношение диссоциантов (в процентах) в культуре в начале опыта

Номер среды	Углерод	Азот	Фосфор	R:S	R:M	S:M	R:S:M
1	0.4	0.035	0.01	52:48	61:39	63:37	37:42:21
2	1.62	0.14	0.04	52:48	58:42	51:49	23:53:24
3	0.4	0.015	0.01	47:53	59:41	71:29	35:42:23
4	1.6	0.06	0.04	47:53	49:51	54:46	27:34:39
5	0.12	0.035	0.01	52:48	61:39	63:37	37:42:21
6	0.48	0.14	0.04	52:48	58:42	51:49	23:53:24
7	0.12	0.015	0.01	47:53	59:41	71:29	35:42:23
8	0.48	0.06	0.04	47:53	49:51	54:46	27:34:39
9	0.78	0.1	0.01	43:57	49:51	54:46	29:45:26
10	3.24	0.4	0.04	43:57	60:40	55:45	32:42:26
11	1.6	0.2	0.01	42:58	59:41	57:43	43:34:23
12	6	0.8	0.04	43:57	60:40	55:45	32:42:26
13	1.2	0.035	0.01	43:57	49:51	54:46	29:45:26
14	4.8	0.14	0.04	42:58	59:41	57:43	43:34:23

Полученные по модельным расчетам относительные численности диссоциантов сравнивали с данными экспериментов. Результаты представлены в табл. 4.12 (номера сред соответствуют номерам табл. 4.11). Здесь необходимо сделать существенное замечание о

сопоставлении теоретических и опытных данных. Из эксперимента по результатам посева известны доли колонии образующих единиц (КОЕ) диссоциантов, в то время как модель позволяет рассчитывать относительные численности клеток. В рамках данной работы принята следующая гипотеза: на стационарной стадии роста клетки бактерий находятся в одинаковом физиологическом состоянии и доля проросших клеток (КОЕ) среди всех клеток данного диссоцианта одинакова для всех диссоциантов.

Таблица 4.12. Состав смешанных культур на стационарной стадии роста

Номер среды из табл. 4.11	Культура	Состав по результатам эксперимента (в процентах)	Состав по модельным расчетам (в процентах)
2	RS	67:33	69:31
	SM	66:34	54:46
3	RS	62:38	65:35
	RM	71:29	74:26
	SM	50:50	60:40
	RSM	43:41:16	60:29:11
5	RS	70:30	69:31
	SM	50:50	54:46
	RSM	67:11:22	62:23:15
	RSM	58:18:24	62:23:15
6	RM	60:40	73:27
	SM	42:58	54:46
7	RS	61:39	69:31
	RM	62:38	73:27
	SM	50:50	54:46
	RSM	62:36:6	62:23:15
8	RM	78:22	73:27
	SM	43:57	54:46
	RSM	68:17:15	62:23:15
9	RS	79:21	69:31
	RM	87:13	73:27
	SM	52:48	54:46
	RSM	75:12:13	62:23:15
10	RSM	68:19:13	62:23:15
11	RS	60:40	72:28
	RM	86:14	78:22
	SM	65:35	57:43
	RSM	60:27:13	68:22:10
12	RS	62:38	72:28
	RM	84:16	78:22
	SM	72:28	57:43
	RSM	63:22:15	68:22:10
13	RS	70:30	65:35
	RM	80:20	74:26
	RSM	45:31:24	60:29:11
14	RM	75:25	74:26

Таким образом, из 36 наборов данных в 29 предсказанный моделью состав поликультур отличается от экспериментального не более чем на 12 %. Наибольшее отклонение расчетных значений от опытных составляет 17%. Согласно проведенному анализу чувствительности модели к вариациям параметров (см. п. 3.9), полученные различия могут быть объяснены ошибками в значениях потребностей, применявшихся в расчетах (табл. 4.5).

В указанных 36-х опытах произвели модельный расчет общей оптической плотности культуры на стационарной стадии роста. В табл. 4.13 приведены экспериментальные данные об оптической плотности, расчетные значения, уровень кислотности среды в тот момент времени, когда была зафиксирована максимальная оптическая плотность, относительная ошибка, а также указан лимитирующий ресурс (начальное содержание в среде именно этого ресурса используется при расчете полной численности). Номера сред соответствуют номерам из табл. 4.11. За пределы допустимых значений ошибок, связанных с неточностью определения уровня вещества в среде и данных о потребностях, выходят данные на средах № 6 (культура SM), 10, 12 и 14. Эти несоответствия могут быть объяснены следующими образом. В среде № 6 содержалось, например, в четыре раза больше углерода, чем в среде №5, поэтому при полном исчерпании этого ресурса на обеих средах достигаемые оптические плотности должны различаться также в четыре раза. Однако, на среде № 6 измеренный уровень плотности оказался ниже, что позволяет сделать вывод о том, что стационарная стадия в опыте не была зафиксирована. Аналогично, на среде № 10 при полном исчерпании ресурса уровень оптической плотности должен быть выше (исходя из данных для среды № 9, где содержание углерода в четыре раза ниже, плотность должна достигнуть значения 272 единицы, вместо экспериментальных 182). На среде № 14 остановка роста, возможно, была связана не с исчерпанием питательного вещества, а с закислением среды (уровень pH равен 3.4), поэтому культура не достигла возможного уровня оптической плотности при данном содержании азота в среде (142 единицы вместо 240 единиц, которые могли быть достигнуты исходя из данных для среды № 13, где содержание азота в четыре раза ниже). На среде № 12 культура также не достигла своего максимально возможного уровня оптической плотности (215-225 единиц вместо 388-440, по данным для среды №11, где содержание фосфора в четыре раза ниже). То есть остановка роста произошла по причинам, не связанным с исчерпанием питательных веществ из среды, что подтверждается отсутствием возобновления роста после внесения ресурсов в среду (см. п. 4.3). Величины относительных ошибок в определении оптической плотности культуры

в остальных опытах согласно проведенному анализу чувствительности (см. п. 3.9) объясняются неточностью используемых в расчетах значениях потребностей. Проведенный анализ показывает, что вариационная модель адекватно предсказывает оптическую плотность смешанных культур, а некоторые расхождения экспериментальных и расчетных данных связаны с вышеописанными причинами.

Таблица 4.13. Оптическая плотность смешанных культур на стационарной стадии роста (в единицах нефелометра, умноженных на 100). Серым фоном выделены относительные ошибки, превышающие 50%

Номер среды из табл. 4.11	Лимитирующий ресурс	Культура	pH	Оптическая плотность в эксперименте	Расчетная оптическая плотность	Относительная ошибка (в процентах)
2	С	RS	6.9	112	128	14
		SM	7.8	142	158	11
3	N	RS	7.5	24	25.4	6
		RM	7.2	25	25	0
		SM	7.5	26	28.7	10
		RSM	7.4	25	26.6	6
5	С	RS	7.4	12	9.7	20
		SM	7.3	10	11.7	17
		RSM	7.2	14	10.7	24
		RSM	7.5	10	10.7	7
6	С	RM	7.3	37	46.4	25
		SM	7	29	45	55
7	С	RS	7.8	15	9.6	36
		RM	7.8	15	11.8	21
		SM	7.8	14	11.7	17
		RSM	8.1	16	10.6	34
8	С	RM	6.8	63	46.4	26
		SM	7.6-8.7	41	45	10
		RSM	7.5	47	43.1	8
9	С	RS	8.7	63	63.8	1
		RM	9	58	73	26
		SM	8.6	78	77.9	0.1
		RSM	8.8	68	71.7	5
10	С	RSM	7.9	182	287.2	58
11	P	RS	8.6	110	90	18
		RM	8.7	101	99.4	2
		SM	7.2	97	93	4
		RSM	8.7	97	92.1	5
12	P	RS	8.6	215	358.4	67
		RM	8.9	225	395	76
		SM	7.7	225	372.1	65
		RSM	8.4	225	366.1	63
13	N	RS	4.6	54	60	11
		RM	5.3	60	59	2
		RSM	4	74	62	16
14	N	RM	3.4	142	239.9	69

4.5. Культивирование на средах с заданными условиями лимитирования

В период с декабря 2002 г. по ноябрь 2003 г. был проведен следующий этап экспериментальной работы по выращиванию моно и смешанных культур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* (Фурсова с соавт., 2008а). Были поставлены следующие задачи:

- по результатам опытов с монокультурами рассчитать потребности диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре и сравнить их значения с полученными ранее (табл. 4.5);
- опираясь на данные о потребностях, составить среды, ограниченные по каждому из питательных веществ (с точки зрения вариационной модели потребления и роста), и проверить наличие заданного условия лимитирования по результатам опытов с добавками (как для моно-, так и для смешанных культур);
- для каждой среды рассчитать состав смешанных (парных и тройной смесей) культур на стационарной стадии развития, их оптическую плотность к моменту остановки роста, вызванной исчерпанием ресурсов, и сравнить полученные данные с результатами эксперимента.

Культуры выращивали на семи средах (состав приведен в табл. 4.14) по методике, описанной в соответствующем разделе. Надо отметить, что опыт культивирования, накопленный на предыдущем этапе, позволил составить более рациональный график измерений в динамике, и, как следствие, точнее фиксировать момент достижения стационарной стадии роста. Для контроля потребления ресурсов использовали экспресс-методы. Поскольку их точность невысока, то основным результатом измерений считали ответ на вопрос: «присутствует питательный компонент в культуральной жидкости или нет?». Такие знания о составе сред на стационарной стадии развития культуры достаточны для поставленных задач.

Таблица 4.14. Состав сред в опытах 2002-2003 гг.

Номер среды	Углерод (мг/мл)	Азот (мг/мл)	Фосфор (мг/мл)
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

Рассчитанные по данным последних опытов величины потребностей хорошо согласуются с полученными ранее (табл. 4.15). В пределы 95-ых доверительных интервалов не попадает величина потребности M-диссоцианта в углероде, R- и S- диссоциантов в азоте.

Однако, указанные различия не являются существенными с точки зрения чувствительности модели (см. п. 3.9) и возможные поправки не оказали бы влияния на

стратификацию пространства ресурсов и предсказываемую структуру сообщества. По этой причине дальнейший анализ проводили, используя те же значения параметров модели (потребностей), что и раньше.

Таблица 4.15. Средние значения потребностей ($\times 10^{-12}$ мг/кл) по результатам опытов 2002-2003 гг. и полученные ранее (табл. 4.5)

Диссоциант	Ресурс					
	Углерод		Азот		Фосфор	
R	134	129 \pm 22	8.7	7.0 \pm 2.5	1.1	1 \pm 0.5
S	399	409 \pm 55	21.8	17.5 \pm 3.0	3.4	4 \pm 1.5
M	679	525 \pm 114	37	31 \pm 3	5.6	6 \pm 2.5

Указанные семь сред были выбраны по следующим причинам: абсолютные значения начального содержания питательных веществ в среде подбирались так, чтобы длительность опыта составляла около двух суток, а соотношения – чтобы среды были ограниченными по разным ресурсам. В результате на основе данных о границах областей лимитирования, соответствующим используемым величинам потребностей (см. п. 4.3), были составлены: 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. Номера сред соответствуют номерам из табл. 4.14. При культивировании на каждой из сред проводили опыты с добавками. В соответствии с указанными в разделе «4.3. Выявление лимитирующих ресурсов» уточнениями к методике, осуществляли внесение семи возможных комбинаций питательных веществ, доращивание происходило в течение 12 часов. Добавку делали по достижении культурой двух различных возрастов (например, в 30-ти и 34-х часовую культуру) для того, чтобы точнее «угадать» время достижения стационарного состояния и, следовательно, «лучший» момент для внесения добавок. Результаты всех опытов представлены в табл. 4.16.

Таблица 4.16. Результаты опытов с добавками (оптическая плотность указана в единицах нефелометра, умноженных на 100, номера сред соответствуют номерам из табл. 4.14.)

Среда №1													
	Оптическая плотность в момент добавок	Оптическая плотность после доразбавления с добавками питательных веществ							Оптическая плотность после доразбавления без добавок	Содержание вещества в среде на стационарной стадии			рН среды в момент добавок
		С	Н	Р	CN	CP	NP	CNP		Глюкоза мг%	Азот мг%	Фосфор мг%	
R	61	69	62	64	73	64	51	89	59	0	—*	—	7.6
S	47	50	51	48	60	38	80	70	47	80	—	—	4.7
M	диссоциация												
Среда №2													
R	58	91	38	43	—	—	—	72	37	0	2.1	—	8.6
S	70	99	44	58	—	—	—	81	58	0	2.1	—	7.8
M	62	94	47	57	—	—	—	83	51	0	3.4	—	8
RS	71	110	49	58	101	102	55	106	50	0	5.7	1.3	8.1
RM	64	96	45	52	95	109	—	109	48	0	5.7	1.3	8.4
RM	67	121	53	60	128	104	59	90	52	0	5.7	1.6	8
SM	65	95	48	58	105	135	46	132	49	0	5.7	1.5	8.3
RSM	65	109	49	44	102	109	50	102	43	0	5.7	1.3	8
R	60	102	50	62	98	107	48	107	48	—	—	—	8.2
R	51	105	46	55	92	97	54	97	44	—	—	—	8.7
S	60	115	54	65	96	113	65	118	54	—	—	—	8.4
S	55	73	49	64	108	68	63	90	52	—	—	—	8.6
M	60	109	54	62	102	104	59	95	49	—	—	—	7.9
M	44	73	48	56	92	69	60	66	49	—	—	—	8.3
RSM	58	100	45	54	100	115	51	99	45	—	—	—	8.4
RSM	48	101	49	55	—	—	—	—	49	—	—	—	8.5

* Показатель не определен

Таблица 4.16. Продолжение

Среда №3													
	Оптическая плотность в момент добавок	Оптическая плотность после доразивания с добавками питательных веществ							Оптическая плотность после доразивания без добавок	Содержание вещества в среде на стационарной стадии			рН среды в момент добавок
		С	N	P	CN	CP	NP	CNP		Глюкоза мг%	Азот мг%	Фосфор мг%	
R	42	43	39	38	–	–	–	40	40	>300	0	1.5	4.5
S	45	49	46	46	–	–	–	45	39	>300	0	1.6	4.5
M	49	57	55	55	–	–	–	51	51	>300	0	1.9	4.7
RSM	45	55	54	55	48	50	51	52	50	>300	0	1.7	4.9
Среда №4													
RS	41	40	40	39	41	31	36	32	42	120	0	0.5	4.8
RM	42	45	39	40	39	33	30	43	38	120	0	0.4	4.4
RM	58	63	66	53	60	57	61	55	58	–	–	–	5.6
SM	50	59	52	59	50	54	58	56	60	120	0	0.6	4.1
RSM	42	41	38	49	37	37	35	43	37	120	0	0.6	4.2
RSM	57	56	62	51	61	56	60	58	57	–	–	–	5.5
Среда №5													
R	88	135	100	105	115	129	77	165	96	0	0	0.02	6.8
R	115	116	116	110	95	114	90	185	110	0	0	0.01	7.8
S	55	59	82	69	70	58	82	104	60	40	0	0.01	6.6
S	67	87	73	79	83	65	69	72	72	–	–	–	5.6
M	68	74	79	60	83	77	77	78	74	40	0	0.02	3.7
M	88	78	77	78	79	78	75	96	78	–	–	–	3.6
RS	84	105	82	85	79	96	89	95	88	0	0	0.02	6
RS	96	97	110	106	110	105	91	107	95	0	0	0.01	7.6
RM	105	130	113	126	143	120	79	149	115	0	0	0.02	7
RM	133	117	95	104	185	123	80	185	118	0	0	0.02	7.6
SM	99	110	101	108	106	92	100	127	99	0	0	0.02	4.3
SM	105	89	100	100	125	118	105	144	115	0	0	–	7.6
RSM	50	66	62	66	85	63	60	72	62	0	0	0.02	5.2
RSM	70	88	65	72	96	60	62	140	70	–	–	–	6.7

Таблица 4.16. Продолжение

Среда №6													
	Оптическая плотность в момент добавок	Оптическая плотность после доразбавления с добавками питательных веществ							Оптическая плотность после доразбавления без добавок	Содержание вещества в среде на стационарной стадии			рН среды в момент добавок
		С	Ν	Ρ	CN	CP	NP	CNP		Глюкоза мг%	Азот мг%	Фосфор мг%	
R	125	76	84	84	84	105	95	80	87	0	13	0.02	4.2
R	93	72	80	138	90	139		60	105	0	0	0	4.4
S	76	102	58	60	66	56	68	64	51	0	13	0	3.9
S	66	90	62	57	53	69	63	88	95	0	13	0.04	4.6
M	98	45	42	47	44	48	43	40	48	0	13	0.05	3.9
M	55	41	40	43	39	44	75	37	45	–	–	–	4.3
RSM	134	59	125	99	57	50	75	45	60	–	–	–	3.9
RSM	76	61	59	90	50	68	65	50	60	0	13	0	4.2
Среда №7													
R	54	58	39	42	92	58	43	89	43	0	0	0.03	7.9
R	46	59	40	40	57	51	40	80	39	0	0	0	8.3
S	39	79	50	50	110	78	50	102	52	0	0.7	0.04	7.2
S	63	70	48	46	95	72	49	92	47	0	0	0	8.2
M	52	87	50	49	102	90	50	98	50	0	1.4	0.09	7.4
M	63	89	52	50	108	79	46	109	50	0	1.4	0.09	7.7
RS	25	35	51	41	58	34	56	62	43	0	0	0.02	7
RS	48	50	45	50	52	45	46	85	50	0	0	0	7
RM	30	34	50	33	71	33	50	67	39	0	0.3	0.02	7.1
RM	50	53	45	48	61	48	45	80	49	0	0	0	7.3
SM	28	43	60	50	90	43	59	78	53	0	0	0.22	7
SM	53	57	54	55	62	55	50	80	49	0	0	0.07	7.5
RSM	55	64	42	45	97	66	45	87	45	0	0	0	7.9
RSM	58	61	44	45	88	61	42	83	43	0	0	0	8.3

Для сбалансированных сред в соответствии с концепцией опытов с добавками рост культуры должен возобновляться после внесения всех трех компонентов питания. В полной мере это подтверждается в опытах с R-диссоциантом. Для S-диссоцианта скорее можно сделать вывод об ограничении роста азотом и фосфором (при добавке этой комбинации ресурсов возобновление роста более значительно). Однако, необходимо учесть, что кроме ошибок в определении потребностей, оптической плотности, существует также погрешность в составлении сред, роль которой возрастает именно при попытке создать многофакторное лимитирование. Так, для монокультуры областью лимитирования трех ресурсов является луч, двух – плоскость (см. п. 3.6.3), и создать такие начальные условия культивирования, при которых рост остановился бы после исчерпания всех питательных компонентов, достаточно трудно. Таким образом, результаты выращивания S-диссоцианта на среде № 1, можно признать не противоречащими предсказаниям вариационной модели.

Результаты опытов с добавками в моно- и смешанных культурах на среде, ограниченной по углероду, полностью подтверждают заданный характер лимитирования: во всех случаях возобновление роста происходило после внесения в культуру глюкозы или комбинации веществ, ее содержащую.

Получить экспериментальное подтверждение лимитирования по азоту в описываемых экспериментах не удалось. При выращивании всех культур происходило закисление среды, которое, вероятно, приводило к гибели бактерий, поскольку добавки любых комбинаций ресурсов не приводили к возобновлению роста.

Ограничение роста фосфором в эксперименте также не удалось получить. Это видно как из результатов опытов с добавками (рост после добавки фосфора не возобновлялся), так и из показателей содержания фосфатов в среде. Несмотря на снижение относительного содержания фосфатов (за счет увеличения абсолютных значений уровня углерода и азота), полного исчерпания этого ресурса не происходило. Кроме того, измерения состава среды в динамике проведения опыта показывали, что уровень фосфатов не только не снижался, но в некоторые моменты даже превышал первоначальный. В результате анализа указанных экспериментов была сформулирована гипотеза о неоднократном использовании фосфора клетками диссоциантов *P. aeruginosa*. (Подобная идея была высказана ранее на основе биохимических исследований фосфорного обмена у микроорганизмов (Кулаев, 1975).) Причем для этого явления, возможно, существенное значение имеет бедность сред, на которых выращивали культуры на данном этапе (в некоторых опытах периода 1999-2001 гг. было зафиксировано как исчерпание фосфора,

так и возобновление роста после его добавки, что и позволило рассчитать потребности диссоциантов в этом ресурсе).

В опытах с поликультурами на стационарной стадии роста определяли состав сообщества. Данные этих экспериментов приведены в табл. 4.17.

Таблица 4.17. Состав смешанных культур (в процентах) и их оптическая плотность (в единицах нефелометра, умноженных на 100) на стационарной стадии роста по результатам экспериментов 2002-2003 гг. (номера сред соответствуют номерам из табл. 4.14)

Среда №2				
Культура	Состав сообщества		Суммарная оптическая плотность	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
RS	57-43	69-31	71	61
RM	74-26	73-27	64	75
RM	66-34	73-27	67	75
SM	72-28	54-46	65	58
RSM	54-37-12	62-23-15	65	66
RSM	38-23-39	62-23-15	65	66
RSM	61-22-17	62-23-15	58	66
Среда №4				
Культура	Состав сообщества		Суммарная оптическая плотность	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
RS	62-38	65-35	41	68
RM	71-29	74-26	58	69
SM	47-53	60-40	50	76
RSM	53-20-27	60-29-11	57	70
Среда №5				
Культура	Состав сообщества		Суммарная оптическая плотность	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
RS	35-65	72-28	96	55.5
RM	54-46	78-22	133	60
SM	65-35	57-43	105	53.1
RSM	56-24-20	68-22-10	76	56.1
Среда №6				
Культура	Состав сообщества		Суммарная оптическая плотность	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
RSM	—*	—	134	57
Среда №7				
Культура	Состав сообщества		Суммарная оптическая плотность	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
RS	67-33	72-28	50	54
RM	—	78-22	50	60
SM	62-38	57-43	56	54
RSM	76-9-15	68-22-10	58	55.5

* Показатель не определен

Во всех семи опытах на среде, ограниченной по углероду (№2), разница между предсказанием суммарной оптической и экспериментальными данными, не превышает 17%. Отличие в расчетном и экспериментальном составе сообществ в двух из семи случаев превышает 12%. В опытах на среде, ограниченной по азоту (№4), все расчетные величины суммарной плотности несколько завышены по отношению к экспериментальным данным. Подобные различия, видимо, связаны с тем, что произошло закисление среды, вследствие чего культура не достигла максимально возможной плотности при данных начальных условиях культивирования. Максимальная разница в составе сообществ на этой среде не превышает 13%.

При культивировании смешанных культур на средах, ограниченных по фосфору, в пяти из семи случаев предсказываемый модельными расчетами состав сообществ отличается от зафиксированного в эксперименте не более чем на 12%, в двух оставшихся разница составляет 27% и 24%. Сравнение результатов по суммарной оптической плотности дает аргумент в пользу гипотезы об обращении фосфора. Только для экспериментов на среде №7, которая довольно близка к сбалансированной (измерение состава среды свидетельствует об исчерпании всех ресурсов), можно говорить о хорошем соответствии теоретических и опытных данных (ошибка составляет 8, 20 и 4%) с учетом погрешностей измерений и расчетов. В опытах по культивированию бактерий на средах № 6 и 7 модель предсказывает суммарную оптическую плотность в среднем в два раза ниже, чем получено в эксперименте, притом, что по показаниям фосфат-теста этот ресурс полностью не был исчерпан. Если предположить, что за время культивирования запас фосфора был использован дважды (с точки зрения модели это соответствует двукратному увеличению первоначального содержания ресурса в среде), то расчетные величины плотностей культур окажутся близкими к экспериментальным.

Принятие гипотезы об обращении фосфора в процессе роста культуры приводит к необходимости пересмотреть результаты анализа всех проведенных опытов (Фурсова с соавт., 2008а,б; Fursova, Levich, 2007). 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 (см. п. 3.5). Вид стратификации для смешанной культуры трех диссоциантов представлен на рис. 4.6 (для парных смесей рисунки выглядят аналогично). Согласно такому разбиению пространства

ресурсов для всех сред (и опытов 1999-2001, и 2002-2003 годов), которые были ограничены по углероду или азоту, лимитирующий фактор остался тем же. Среды в опытах 1999-2001 гг., ограниченные по фосфору, в соответствии с новыми условиями, стали лимитированными по углероду, а условия культивирования последних экспериментов (среды № 5, 6 и 7 настоящего раздела) задают совместное лимитирование углерода и азота.

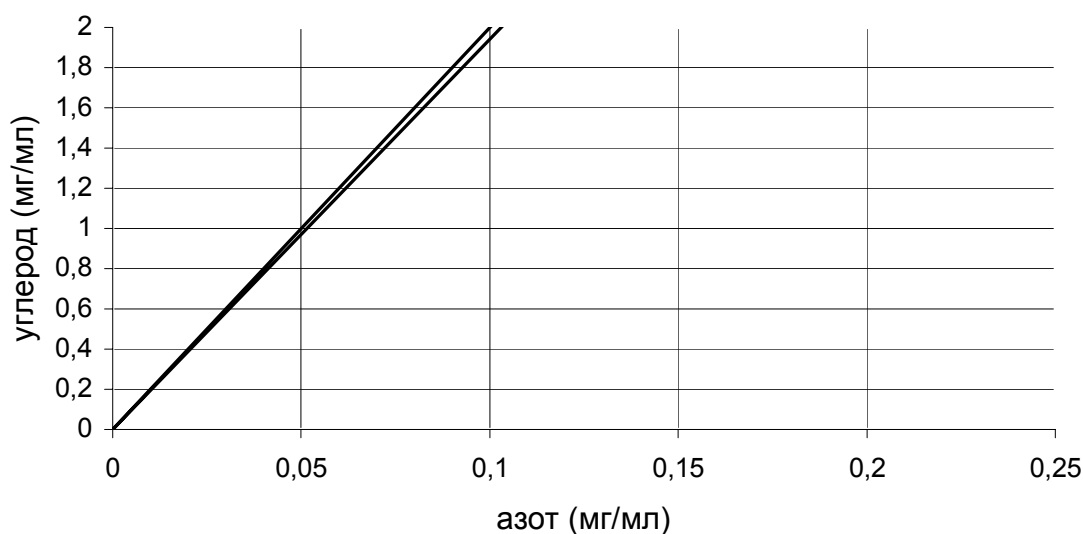


Рис. 4.6. Стратификация пространства двух ресурсов для смеси R-, S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa*

Данные, позволяющие проверить адекватность предсказания вариационной моделью факторов, ограничивающих развитие моно- и смешанных культур, состав смешанных культур и их суммарную оптическую плотность на стационарной стадии роста, приведены в результирующих таблицах (табл. 4.18, 4.19 и 4.20). Для наглядности представления данных реакция культур на добавки выражена в процентах (за 100% принята оптическая плотность после экспозиции без внесения ресурсов): величина, превышающая 100%, свидетельствует о возобновлении роста (табл. 4.18 и 4.19).

Таблица 4.18. Реакция на добавки в монокультурах (процентах). 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

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

Номер опыта	Лимитирующий ресурс по модели	Добавка	R	S	M
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
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

Судить о качестве предсказания состава сообществ удобно по данным столбца «|разность|» (табл. 4.20): в нем записан модуль разности между теоретическими и экспериментальными долями каждого из диссоциантов. Для культуры из двух диссоциантов достаточно указать одно значение, в случае смеси всех трех модуль разности указан для каждой составляющей. В рамках рассматриваемой модели условие полного потребления нескольких ресурсов дает возможность рассчитывать суммарную оптическую плотность сообщества исходя из данных о начальном содержании в среде каждого из этих веществ (см. п. 3.5). По этой причине в ряде случаев в табл. 4.20 приведены два расчетных значения и, соответственно, два значения относительной ошибки. Различия оптической плотности при подсчете «по углероду» и «по фосфору» связаны с ошибками в определении соответствующих потребностей.

* Показатель не определен

Таблица 4.19. Добавки в смешанных культурах (в процентах). 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

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
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

* Показатель не определен

Для анализа опытов с добавками 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. По результатам 45 экспериментов со смешанными культурами возможна проверка адекватности предсказаний структуры и размера сообществ. В семи из них разница в долях диссоциантов составляет 15 и более единиц (24, 32, в остальных случаях менее 20 единиц). В остальных 38 случаях (т.е. в 85%-ах опытов) разность между предсказанными моделью и полученными в эксперименте долями диссоциантов составляет менее 15 единиц. Ошибка в определении суммарной оптической плотности больше. Так, в 15 из 45 опытов, что составляет треть анализируемых данных, относительная ошибка превышает 20%-ый порог, который можно считать приемлемым, учитывая ошибки измерений и расчетов. Возможные причины различий теоретических и экспериментальных данных о суммарной оптической плотности культуры, рост которой ограничивается одним ресурсом (опыты под номером 1-12 в табл. 4.20), приведены в п. 4.4. В областях двухфакторного лимитирования (номера опытов – 13 и 14) уровень ошибок в среднем оказался выше, чем в областях ограничения роста одним ресурсом. Такой результат соответствует данным анализа чувствительности (см. п. 3.9).

В целом, можно сделать вывод о том, что при определении параметров модели (потребностей диссоциантов в основных питательных веществах), более точные значения удалось получить для отношения между ними, а не абсолютные величины. Отношения являются определяющими для расчетов границ областей лимитирования и долей групп организмов, составляющих сообщество. И именно для этапов анализа экспериментальных данных, соответствующих этим компонентам (выявление факторов, ограничивающих рост, и предсказание состава сообщества на стационарной стадии развития), продемонстрировано наилучшее совпадение модельных расчетов и результатов культивирования.

Таблица 4.20. Сравнение расчетных значений и данных эксперимента о составе сообщества и оптической плотности на стационарной стадии развития (состав указан в процентах, оптическая плотность в единицах нефелометра, умноженных на 100, остальные пояснения в тексте)

Номер опыта	Культура	Состав в эксперименте	Состав по расчетам	разность	Оптическая плотность в эксперименте	Расчетная оптическая плотность	Относительная ошибка (проценты)
1	RS	67-33	69-31	2	112	128	14
	SM	66-34	54-46	12	142	158	11
2	RS	62-38	65-35	3	24	25	4
	RM	71-29	74-26	3	25	25	0
	SM	50-50	60-40	10	26	29	12
	RSM	43-41-16	60-29-11	17-12-5	25	27	8
3	RS	70-30	69-31	1	12	10	17
	SM	50-50	54-46	4	10	12	20
	RSM	67-11-22	62-23-15	5-12-7	10	11	9
	RSM	58-18-24	62-23-15	4-5-9	14	11	21
4	RM	60-40	73-27	13	37	46	24
	SM	42-58	54-46	12	29	45	55
5	RS	61-39	69-31	8	15	10	33
	RM	62-38	73-27	11	15	12	20
	SM	50-50	54-46	4	14	12	14
	RSM	62-32-6	62-23-15	0-9-9	16	11	31
6	RM	78-22	73-27	5	63	46	27
	SM	43-57	54-46	11	41	45	10
	RSM	68-17-15	62-23-15	6-6-0	47	43	9
7	RS	79-21	69-31	10	63	64	2
	RM	87-13	73-27	14	58	73	26
	SM	52-48	54-46	2	78	78	0
	RSM	75-12-13	62-23-15	13-1-2	68	72	6
8	RSM	68-19-13	62-23-15	6-4-2	182	287	58
9	RS	60-40	67-33	7	110	128	16
10	RS	70-30	65-35	5	54	60	11
	RM	80-20	74-26	6	60	59	2
	RSM	45-31-24	60-29-11	15-2-13	74	61	18
	RSM	65-19-16	60-29-11	5-10-5	57	61	7
11	RM	75-25	74-26	1	142	240	69
12	RS	57-43	69-31	12	71	61	14
	RM	74-26	73-27	1	64	75	17
	RM	66-34	73-27	7	67	75	12
	SM	72-28	54-46	18	65	58	11
	RSM	54-34-12	62-23-15	8-11-3	65	66	2
	RSM	38-23-39	62-23-15	24-0-24	65	66	2
	RSM	61-22-17	62-23-15	1-1-2	58	66	14
13	RS	35-65	67-33	32	96	128-135	33-41
	RM	54-46	73-27	19	133	157-138	18-4
	SM	65-35	57-43	8	105	154-152	47-45
	RSM	56-24-20	61-26-13	5-2-7	76	142-140	87-84
14	RS	67-33	67-33	0	50	61-68	22-36
	RM	—*	73-27	—	50	75-69	50-38
	SM	62-38	57-43	5	56	73-76	30-36
	RSM	76-9-15	61-26-13	15-17-2	58	67-70	16-21

* Показатель не определен

