

УДК 57.02.001.57

## ПОТРЕБНОСТИ В ГЛЮКОЗЕ, НИТРАТАХ, ФОСФАТАХ И ИХ ВАРИАЦИИ В АНАЛИЗЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ ДИССОЦИАНТОВ *Pseudomonas aeruginosa*

© 2003 г. П. В. Фурсова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119992 Москва, Воробьевы горы

E-mail: polina\_fursova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.08.2002 г.

В работе представлены результаты калибровки и анализа чувствительности вариационной модели смешанной культуры R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa*. Модель с откалиброванными параметрами (потребностями диссоциантов в глюкозе, нитратах и фосфатах) адекватно описывает результаты эксперимента. Наименьшее изменение показателей чувствительности (видовых обилий и общей численности) при варьировании значений параметров происходит в областях однофакторного лимитирования. Доли диссоциантов в поликультуре реагируют на колебания значений потребностей сильнее, чем численность сообщества.

Существенным свойством бактерий, в том числе и *P. aeruginosa*, является диссоциация, т.е. расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими особенностями (Милько, Егоров, 1991). Появление в популяции неактивных диссоциантов может приводить к снижению эффективности производства (Милько, Егоров, 1991). В связи с этим актуальной становится проблема прогнозирования поведения бактериального сообщества в зависимости от условий культивирования и управления его структурой.

Для описания смешанной культуры диссоциантов на стационарной стадии развития предлагается использовать вариационную модель, которая ранее успешно применялась в изучении структуры фитопланктонных сообществ (Левич, 1980; Левич и др., 1997; Levich, 2000)

мое для роста вида  $i$ , в расчете на одну клетку (потребность вида  $i$  в ресурсе  $k$ ),  $m$  – общее количество взаимонезаменимых ресурсов, потребляемых сообществом,  $w$  – число видов в сообществе,  $L_k^0$  – начальное содержание ресурса  $k$  в среде ( $L_k^0 \geq 0$ ). Полученные к настоящему моменту теоретические результаты исследования сформулированной задачи позволяют указывать те ресурсы, которые будут полностью потреблены в зависимости от их начального содержания в среде, и рассчитывать доли каждого вида и общую численность сообщества на стационарной стадии роста (Левич и др., 1994). Важно отметить, что относительные численности остаются инвариантными при преобразованиях потребностей вида  $q_i^k \rightarrow \alpha q_i^k$ ,  $\alpha > 0$ ,  $i = \overline{1, w}$ ,  $k = \overline{1, m}$  (Левич и др., 1994). Одной из целей данной работы является проверка адекватности модели в применении к микробиологическим сообществам диссоциантов *P. aeruginosa*, для чего была проведена калибровка модели. Параметры модели (потребности видов), определяемые из эксперимента как отношение потребленного вещества к количеству образовавшихся за то же время клеток, известны с большой погрешностью (Максимов и др., 2001), складывающейся из погрешности определения вещества и численности, которая в свою очередь складывается из погрешностей в измерении оптической плотности и в построении калибровочной кривой. В связи с этим возникает вопрос о том, как эти неточности влияют на модельные расчеты. Для решения указанной проблемы была проведена оценка чувствительности модели к изменениям ее параметров.

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

где  $n_i$  – конечные искомые численности каждого из видов,  $q_i^k$  – количество  $k$ -го ресурса, необходи-

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе были использованы экспериментальные данные, полученные в результате изучения влияния углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* К-2 в смешанных культурах (Максимов и др., 1999а). Опыты ставили по плану полного факторного эксперимента  $3^3$ , в котором концентрации глюкозы варьировали от 0.5 до 7.5%, нитратов от 0.2 до 2%, фосфатов от 0.005 до 0.105%. Рост бактерий оценивали нефелометрически по плотности культуры. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100. Одна единица показаний нефелометра соответствует численности  $10^8$  кл/мл (Максимов и др., 2001).

Модельные расчеты проводили, опираясь на результаты исследования указанной вариационной задачи (Левич и др., 1994). На основании данных о потребностях строят области лимитирования, по которым, в зависимости от начального содержания ресурса в среде  $\lambda$  определяют те вещества, которые будут полностью потреблены организмами на стационарной стадии роста. Затем, исходя из характера лимитирования, вычисляют видовые обилия и общую численность. Используемые в настоящей работе значения потребностей и составы опытных сред позволяют говорить только об ограничении роста культуры одним веществом. В этом случае видовые обилия R-, S-, M-диссоциантов ( $r$ ,  $s$ ,  $m$ ) соответственно находятся по формулам  $r = \frac{q_r^k}{x_0^k}$ ,  $s = \frac{q_s^k}{x_0^k}$ ,  $m = \frac{q_m^k}{x_0^k}$ , где  $x_0^k$  — корень уравнения  $x_0^k + x_0^k + x_0^k = 1$ , а индексе  $k$  обозначает лимитирующий ресурс, т.е. глюкозу, нитрат или фосфат. Общая численность вычисляется как  $n = \frac{L^k}{q_r^k r + q_s^k s + q_m^k m}$ , где  $L^k$  — начальное содержание в среде лимитирующего ресурса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Калибровка модели.** Для проверки адекватности модели была предпринята попытка подобрать значения потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах так, чтобы решение вариационной задачи, в которой в качестве параметров использованы найденные потребности, описывала реальные данные. В качестве экспериментальных результатов были взяты данные из работы (Максимов и др., 1999а), состоящие из 27 наборов сред и соответствующих значений оптической плотности и долей диссоциантов. Опытные среды содержали 0.5, 4 и 7.5% глюкозы; 0.2, 1.1 и 2% нитратов; 0.005, 0.055 и 0.105% фосфатов. Качественное

изучение данных, в частности характера изменения оптической плотности культуры при увеличении процентного содержания в среде каждого из ресурсов, позволило сделать ряд выводов. Так, при увеличении содержания глюкозы при неизменных значениях уровня нитратов и фосфатов с 0.5 до 4% происходит рост оптической плотности, а изменение глюкозы с 4 до 7.5% вызывает уменьшение оптической плотности. Увеличение доли нитратов в среде при постоянных уровнях остальных ресурсов приводит лишь к незначительному по сравнению с ростом содержания нитратов увеличению оптической плотности культуры. На основании указанных особенностей роста, а также предшествующих данных (Максимов и др., 1999б), согласно которым уровни глюкозы в среде 7.5% и нитратов 2% являются ингибирующими, результаты опытов с соответствующими средами в дальнейшем не рассматривались, поскольку модель не описывает процессов подавления роста. Таким образом, изучаемый массив данных составил 12 наборов (табл. 1).

Было взято начальное приближение набора потребностей (табл. 2), пропорциональное экспериментально измеренным величинам (Максимов и др., 2001) (напомним, что, как уже отмечалось, модель инвариантна к преобразованию подобию потребностей), и в соответствии с предложенными методами (Левич и др., 1994) были рассчитаны области лимитирования, доли диссоциантов на стационарной стадии развития и общая численность, которая затем была переведена в показатель оптической плотности (табл. 3). Поскольку процентное содержание каждого диссоцианта в культуре известно с большой ошибкой, то подбор потребностей проводился с опорой на данные об уровне оптической плотности, который известен точнее и воспроизводится в повторностях. Так, исходя из того, что в области лимитирования фосфатом расчетная оптическая плотность ниже, чем экспериментальная, потребности организмов в этом ресурсе были уменьшены. В областях лимитирования глюкозой и нитратами расчетные оптические плотности оказались выше, чем по результатам опытов, из чего был сделан вывод о необходимости увеличить потребности диссоциантов в этих питательных веществах. Кроме того, на всех средах, кроме сред с номером 8 и 12, доля M-диссоцианта была выше доли R-диссоцианта. Для отражения данного факта потребности подбирались так, чтобы потребности M-диссоцианта были меньше, чем у R-диссоцианта. В результате был получен следующий набор потребностей (табл. 4).

Исходя из указанных значений потребностей, вновь были рассчитаны области лимитирования, уровни оптической плотности и доли диссоциантов в культуре (табл. 5). Согласно результатам вычислений при всех составах сред, кроме сред

Таблица 1. Экспериментальные данные культивирования смешанной культуры R-, S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa*

№	Концентрация, %			Оптическая плотность	Доля диссоциантов, %		
	глюкоза G	нитрат N	фосфат P		m	s	r
1	0.5	0.2	0.005	44.5	70.3	25.9	4.4
2	4	0.2	0.005	67.0	71.8	26.7	1.5
3	0.5	1.1	0.055	40.0	46.3	52.2	1.6
4	4	1.1	0.055	61.0	52.3	33.6	14.1
5	0.5	0.2	0.005	41.0	36.3	36.6	27.5
6	4	0.2	0.005	107.7	37.1	40.5	22.0
7	0.5	1.1	0.055	52.3	43.9	34.7	21.4
8	4	1.1	0.055	119.3	25.7	31.5	42.8
9	0.5	0.2	0.005	41.7	35.0	41.8	23.2
10	4	0.2	0.005	108.0	35.1	31.1	33.4
11	0.5	1.1	0.055	47.7	44.9	33.6	21.5
12	4	1.1	0.055	117.3	35.7	27.6	36.7

№ 8 и № 12, с учетом неточностей измерений модель предсказывает оптическую плотность культуры, ранги диссоциантов (наиболее многочисленный, наименее многочисленный вид и вид со средней численностью), а в некоторых случаях и доли диссоциантов (среды № 6, 7, 10, 11). Очень высокая расчетная оптическая плотность по сравнению с экспериментальной на средах № 8 и 12, по-видимому, говорит о том, что в эксперименте показания снимались до достижения культурой стационарной фазы (так, по сравнению со средой № 7 и 11/соответственно/уровень глюкозы возрос в 8 раз, а экспериментальные данные дают увеличение численности лишь примерно в 2 раза). Этим же обстоятельством можно объяснить и различия в составе культуры, который в процессе достижения стационарной фазы может измениться.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что модель с подобранными потребностями адекватно описывает результаты эксперимента.

Как видно из табл. 2 и экспериментально измеренные и откалиброванные потребности до-

Таблица 2. Начальное приближение потребностей

Вид	Ресурс		
	G	N	P
R	55	10	1
S	50	15	1.2
M	145	35	2

статочно сильно различаются. Этот факт заставляет в последующих исследованиях обратиться как к усовершенствованию методики определения потребностей, так и к дальнейшей проверке адекватности модели. Кроме того, данные табл. 2 соответствуют значениям, полученным из опытов с монокультурами, а калибровка проводилась по данным изучения смешанных культур. Последнее замечание позволяет выдвинуть гипотезу о различиях потребностей в моно- и поликультурах, которая требует специальной проверки.

2. Анализ чувствительности модели. Был проведен анализ чувствительности модели сообщества, состоящего из трех видов, потребляющих три ресурса. Каждое значение потребности (каждого вида в каждом веществе) изменялось в отдельности на 10, 25, 50 и 100% при неизменных остальных величинах. В качестве показателя для оценки чувствительности модели к изменению параметров использовались относительные численности каждого вида на стационарной стадии роста, общая численность сообщества, а также величины, характеризующие границы областей лимитирования: координаты вершин криволинейного треугольника в сечении  $P = \text{const}$  (рисунок).

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы. Наименьшие изменения показателей оценки чувствительности происходят в областях однофакторного лимитирования. Относительная величина отклонения значений видовых обилий не превышает относительной величины изменения параметра. Исключения составляют случаи, когда колебание значения потребности вызывает изменение ранга требовательности вида к ресурсу (т.е. изменяется порядок видов от самой

Таблица 3. Откалиброванные потребности

№	Концентрация, %			Лимитирующий ресурс	Доли диссоциантов, экспериментальные и расчетные (*)							
	G	N	P		n	n*	m	m*	s	s*	r	r*
1	0.5	0.2	0.005	P	44.5	39.6	70.3	19	25.9	37	4.4	44
2	4	0.2	0.005	P	67	39.6	71.8	19	26.7	37	1.5	44
3	0.5	1.1	0.005	P	40	39.6	46.3	19	52.2	37	1.6	44
4	4	1.1	0.005	P	61	39.6	52.3	19	33.6	37	14.1	44
5	0.5	0.2	0.055	G	41	79.9	36.3	11	36.3	46	27.5	43
6	4	0.2	0.055	N	107.7	139	37.1	10	40.5	38	22	52
7	0.5	1.1	0.055	G	52.3	79.9	43.9	11	34.7	46	21.4	43
8	4	1.1	0.055	P	119.3	39.6	25.7	19	31.5	37	42.8	44
9	0.5	0.2	0.105	G	41.7	79.9	35	11	41.8	46	23.2	43
10	4	0.2	0.105	N	108	139	35.1	10	31.1	36	33.4	52
11	0.5	1.1	0.105	G	47.7	47.9	44.9	11	33.6	46	21.5	43
12	4	1.1	0.105	G	117.3	639	35.7	11	27.6	46	36.7	43

большой потребности в данном ресурсе к самой маленькой). На общую численность изменение потребностей оказывает меньшее влияние. Так, варьирование параметров на 10% приводит к изменению общей численности сообщества максимум на 5%, варьирование в пределах 25% – на 16%, в пределах 50% – на 44%. Увеличение потребности в два раза вызывает уменьшение численности не более, чем на 24%. Чем выше потребность вида в данном ресурсе, тем большее изменение происходит с относительной численностью этого вида при варьировании соответствующей потребности. На общую численность наибольшее влияние оказывает изменение самого низкого значения потребности в данном ресурсе.

В области двухфакторного лимитирования влияние изменений параметров более значительно. Варьирование потребностей приводит к изменениям относительных численностей видов в три, а в некоторых случаях и в пять раз превышающих относительную величину изменения параметра. Однако можно выявить следующую закономерность: самым чувствительным является диссоциант с наибольшими потребностями (в нашем случае это R-диссоциант), наименьшие изменения происходят с относительной численностью вида с самыми маленькими потребностями (M-диссоциант). Как и в области однофакторного лимитирования общая численность сообщества в меньшей степени откликается на изменения параметров. При этом варьирование потребностей видов в глюкозе, т.е. в ресурсе, который потребляется диссоциантами в самых больших количествах, вызывает наибольшее колебание общей численности. Самое большое изменение последней со-

ставляет примерно два раза, что соответствует уменьшению одной из потребностей на 50%.

В области трехфакторного лимитирования сохраняется свойство меньшей чувствительности общей численности сообщества по сравнению относительными обилиями видов. Причем здесь относительные величины изменения численности не превышают относительных величин изменения параметров, наименьшее влияние оказывает варьирование потребностей в глюкозе, наибольшее – потребностей в фосфатах, т.е. в ресурсе, потребляемом в самых маленьких количествах по сравнению с другими биогенными элементами. Как и в области двухфакторного лимитирования, изменения параметров приводят к довольно значительным отклонениям относительных численностей видов. Границы этих отклонений находятся в пределах пятикратного изменения относительной величины варьирования потребностей.

Кроме того, в областях двух- и трехфакторного лимитирования изучали чувствительность указанных показателей к одновременному изменению потребностей во всех ресурсах каждого из

Таблица 4. Откалиброванные потребности

Вид	Ресурс		
	G	N	P
R	220	23	1.1
S	120	18	0.83
M	99	18	0.69

Таблица 5. Результаты модельных расчетов с откалиброванными потребностями

№	Концентрация, %			Лимитирующий ресурс	Доли диссоциантов, экспериментальные и расчетные (*)							
	G	N	P		n	n*	m	m*	s	s*	r	r*
1	0.5	0.2	0.005	G	44.5	39.2	70.3	45	25.9	38	4.4	17
2	4	0.2	0.005	P	67	60.3	71.8	41	26.7	34	1.5	24
3	0.5	1.1	0.005	G	40	39.2	46.3	45	52.2	38	1.6	17
4	4	1.1	0.005	P	61	60.3	52.3	41	33.6	34	14.1	24
5	0.5	0.2	0.055	G	41	39.2	36.3	45	36.3	38	27.5	17
6	4	0.2	0.055	N	107.7	104	37.1	36	40.5	36	22	27
7	0.5	1.1	0.055	G	52.3	39.2	43.9	45	34.7	38	21.4	17
8	4	1.1	0.055	G	119.3	314	25.7	45	31.5	38	42.8	17
9	0.5	0.2	0.105	G	41.7	39.2	35	45	41.8	38	23.2	17
10	4	0.2	0.105	N	108	104	35.1	36	31.1	36	33.4	27
11	0.5	1.1	0.105	G	47.7	39.2	44.9	45	33.6	38	21.5	17
12	4	1.1	0.105	G	117.3	314	35.7	45	27.6	38	36.7	17

видов и изменению потребностей в каждом из ресурсов у всех видов. Как и в описанных выше ситуациях, общая численность сообщества в меньшей степени откликается на изменения параметров, хотя ее колебания оказываются более существенными, чем при варьировании одной из потребностей. Изменение потребностей одного вида приводит к меньшим отклонениям значений общей численности и долей диссоциантов, чем изменение потребности в одном питательном веществе у всех видов. Наиболее чувствительным в

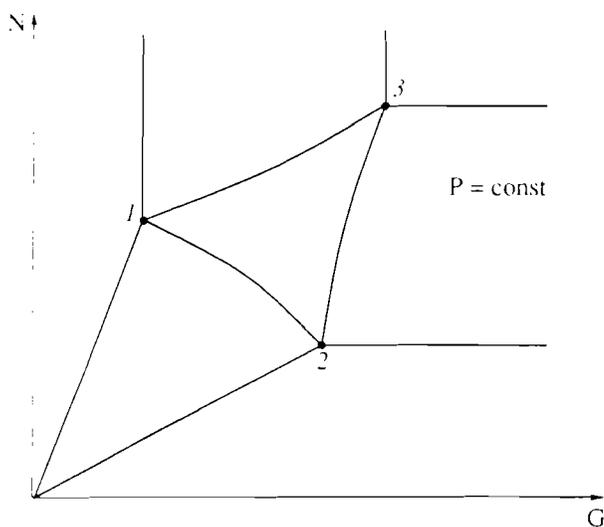
указанных случаях является вид с наибольшими значениями потребностей (R-диссоциант), наименее чувствительным – самый нетребовательный вид (M-диссоциант). Что касается относительных величин отклонений, то они довольно значительные и в некоторых случаях более чем десятикратно превышают относительные величины варьирования параметров.

Координаты вершин криволинейного треугольника при варьировании параметров модели изменяются незначительно. Так, изменение потребностей на 25% приводит к сдвигу вершин вдоль координатных осей не более чем на 15%, а увеличение параметра в 2 раза вызывает изменение координат в пределах 40%.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 02-04-48085 и № 02-04-06044).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Левич А.П. Структура экологических сообществ. М.: Изд-во МГУ, 1980. 181 с.
- Левич А.П., Алексеев В.Л., Никулин В.А. Математические аспекты вариационного моделирования в экологии сообществ // Математическое моделирование. 1994. Т. 6. № 5. С. 55–76.
- Левич А.П., Максимов В.Н., Булгаков Н.Г. Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ. Учебное пособие. М.: Изд-во НИЛ, 1997. 184 с.
- Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeru-*



Границы областей лимитирования в сечении  $P = \text{const}$ . Координаты точек 1, 2, 3 являются одними из показателей чувствительности модели.

*genosa* в смешанных культурах // Микробиология. 1999а. Т. 68. № 4. С. 485–490.

Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999б. Т. 68. № 2. С. 206–210.

Максимов В.Н., Милько Е.С., Левич А.П. Потребности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах. Лимитирующие рост кон-

центрации веществ при культивировании без пополнения запаса ресурсов // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 607–612.

Милько Е.С., Егоров Н.Г. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ. 1991. 142 с.

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