

УДК 579.841.11.017.6

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДИССОЦИАНТОВ *Pseudomonas aeruginosa*
В УСЛОВИЯХ ЗАДАННОГО ЛИМИТИРОВАНИЯ**

© 2008 г. П. В. Фурсова*, Е. С. Милько, А. П. Левич

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Поступила в редакцию 12.06.2006 г.

На основании экспериментально определенных значений потребностей в основных питательных веществах R-, S- и M-диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* проведено исследование возможности управления развитием сообществ микроорганизмов. На средах с заданными (в соответствии с модельными предсказаниями) условиями лимитирования экспериментально подтверждено истощение глюкозы для всех моно- и смешанных культур, а также сбалансированное потребление глюкозы, азота и фосфора R-диссоциантом при соответствующих начальных составах сред. Исследование состава смешанных культур показало соответствие результатов эксперимента модельным расчетам. Получены данные, свидетельствующие о возможности неоднократного использования фосфора бактериями *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: диссоциация, *Pseudomonas aeruginosa*, потребность в основных источниках питания, лимитирующие факторы, состав сообщества

Прогноз развития многовидового сообщества микроорганизмов, а также возможность им управлять являются чрезвычайно важной задачей, имеющей большое прикладное значение. Один из приемов для формирования структуры сообществ (изменение видового состава и доминирования видов, целенаправленное увеличение или уменьшение численности выбранных групп организмов) состоит в варьировании отношения компонентов минерального питания в среде [1, 2].

Для описания микробных культур с точки зрения указанной задачи прогноза развития культур и управления их составом нами использована вариационная модель потребления источников питания и роста для экологических сообществ [3, 4]. Эта модель позволяет по известным потребностям физиологически различающихся групп организмов рассчитывать как области лимитирования для любых сочетаний ресурсных факторов в среде, так и численности популяций сообщества на стационарной стадии развития как функции лимитирующих рост ресурсов.

Экспериментально определяемыми параметрами модели являются так называемые потребности организмов в основных питательных веществах. Под потребностью организма понимается количество ресурса, необходимое для роста, в расчете на одну клетку.

В предыдущей работе были определены потребности бактерий *P. aeruginosa* в углеводе, азоте

и фосфоре [5]. В настоящем исследовании поставлены следующие задачи:

- по результатам новых опытов с монокультурами рассчитать потребности диссоциантов в углеводе, азоте и фосфоре и сравнить их значения с полученными ранее [5];

- опираясь на данные о потребностях, составить среды, ограниченные по каждому из питательных веществ (с точки зрения вариационной модели потребления и роста), и экспериментально проверить наличие заданного условия лимитирования;

- для каждой среды рассчитать популяционный состав смешанных (парных и тройной) культур на стационарной стадии развития, их оптическую плотность к моменту остановки роста, вызванной истощением ресурсов, и сравнить полученные данные с результатами эксперимента.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

Были проведены 65 опытов по культивированию R-, S-, и M-диссоциантов штамма *P. aeruginosa* К-2. Бактерии выращивали в моно- и смешанных культурах на семи средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов и фосфатов (табл. 1). Культивирование проводили в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 28°C в течении двух суток до достижения стационарной фазы роста. В качестве посевого материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенные на агаризированной среде, содержащей мясо-

* Адресат для корреспонденции (e-mail: fursova@bio-physics.msu.ru).

Таблица 1. Состав сред в начале опытов

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

пептонный бульон и сусло в отношении 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 клеток 10^9 в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3% объема.

Во время проведения эксперимента проводили измерения оптической плотности культуры, уровня кислотности, отмечали появление в монокультурах клеток других диссоциантов, определяли уровень питательных веществ в среде в процессе культивирования. Пробы отбирали в начале эксперимента, а затем каждые четыре часа в течение вторых суток.

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.

Для определения количества клеток в культуре на стационарной стадии развития для каждого диссоцианта был получен коэффициент, связывающий оптическую плотность с численностью [5].

Для измерения pH среды использовали микропотенциометр Checker фирмы "HANNA Instruments".

Для контроля потребления ресурсов использовали экспресс-методы. Содержание глюкозы определяли с помощью индикаторных полосок для количественного определения глюкозы в крови "Диаглюк" (диапазон определяемых концентраций составляет 0.0–1000 мг % (0.0–55.5 ммоль/л). Экспресс-анализ содержания фосфатов проводили с помощью фотометрического фосфат-теста фирмы "Merck" (возможно определение концентраций в пределах от 0.010 до 5.00 мг/л). Содержание нитра-

тов определяли с помощью аналитических тест-полосок фирмы "Merck" (диапазон определяемых концентраций составляет 10–25–50–100–500 мг/л). Поскольку точность подобных методов 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.

Потребности в источниках питания рассчитывали 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 (подробнее см. [5]). Для расчетов средних значений потребностей и доверительных интервалов применялось стандартное приложение Microsoft Excel 7.0 (анализ – описательная статистика).

Для экспериментального определения ресурса, ограничивающего рост культуры, проводили так называемые опыты с добавками [6]. В момент предполагаемого достижения стационарной стадии культуру разделяли и помещали в семь пробирок. В шесть из них вносили добавки (глюкозу, нитрат или фосфат, их парные комбинации или все три вещества), одну оставляли без изменений (контроль). Количество добавляемых веществ равнялось их первоначальному содержанию в среде. Культуру оставляли расти еще 12 ч, 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 клеточного сообщества.

Модельные расчеты областей лимитирования (стратификации) и численностей диссоциантов на стационарной стадии развития проводили по разработанным авторами алгоритмам [2, 6, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчитанные по данным последних опытов величины потребностей хорошо согласуются с полученными ранее (табл. 2). В пределы 95%-ых доверительных интервалов не попадает величина потребности M-диссоцианта в углероде, а R- и S-диссоциантов – в азоте. Однако указанные различия не являются существенными с точки зрения чувствительности модели [8], и возможные поправки не оказали бы влияния на стратификацию пространств ресурсов и предсказываемую структуру сообщества. По этой причине дальнейший анализ проводили, используя те же значения параметров модели (потребностей), что и раньше.

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, соответствующих используемым величинам потребностей [6], были составлены: сбалансированная среда (№ 1), в которой содержание каждого ресурса в среднем пропорционально соответствующим потребностям всех диссоциантов (на этой среде выращивали три монокультуры); среда, лимитированная по углероду для всех возможных комбинаций моно- и смешанных культур (№ 2); лимитированная по азоту для монокультур (№ 3) и для смешанных (№ 4); лимитированная 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 в табл. 1. При культивировании на каждой из сред проводили опыты с добавками. Питательные вещества вносили по достижении культурой двух различных возрастов (например, в 30- и 34-часовую культуру) для того, чтобы точнее “угадать” время достижения стационарного состояния и, следовательно, “лучший” момент для внесения добавок. Результаты всех опытов представлены в табл. 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 (табл. 2), оптической плотности, существует также погрешность в составлении сред, роль которой возрастает именно при попытке создать многофакторное лимитирование. Поэтому создать такие начальные условия культивирования, при которых рост остановился бы после исчерпания одновременно 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 содержащих.

Таблица 2. Средние значения потребностей ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом 95% доверительных интервалов (А) в сравнении с полученными ранее средними значениями (В) [5]

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

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 [9]). При этом для этого явления, возможно, существенное значение имеет бедность сред, на которых выращивали культуры на данном этапе (в некоторых ранних опытах было зафиксировано как исчерпание фосфора, так и возобновление роста после его добавки, что и позволило рассчитать потребности диссоциантов в этом ресурсе [5]).

В опытах с поликультурами в стационарной фазе роста определяли популяционный состав. Данные этих экспериментов приведены в табл. 4.

Во всех семи опытах на среде, ограниченной по углероду (№ 2), разница между предсказанной оптической плотностью и экспериментальными данными, не превышала 17%. Отличие в расчетном и экспериментальном составе смеси диссоциантов в двух из семи случаев превышало 12%. В опытах на среде, ограниченной по азоту (№ 4), все расчетные величины оптической плотности несколько завы-

Таблица 3. Результаты опытов с добавками (оптическая плотность указана в единицах нефелометра, умноженных на 100, номера сред соответствуют номерам в табл. 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			pH среды в момент добавок
		C	N	P	CN	CP	NP	CNP		Глюкоза, мг %	Азот, мг %	Фосфор, мг %	
Среда № 1													
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
Среда № 3													
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 3. Окончание

	Оптическая плотность в момент добавок	Оптическая плотность после доращивания с добавками питательных веществ							Оптическая плотность после доращивания без добавок	Содержание вещества в среде на стационарной стадии			pH среды в момент добавок
		C	N	P	CN	CP	NP	CNP		Глюкоза, мг%	Азот, мг%	Фосфор, мг%	
Среда № 6													
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

* Показатель не определяли.

шены по отношению к экспериментальным данным. Подобные различия, видимо, связаны с тем, что произошло закисление среды (№ 4), вследствие чего культура не достигла максимально возможной плотности при данных начальных условиях культивирования. Максимальная разница в составе смесей диссоциантов на этой среде не превышает 13%.

При культивировании смешанных культур на средах, ограниченных по фосфору, в пяти из семи случаев предсказываемый модельными расчетами популяционный состав отличался от зафиксированного в эксперименте не более чем на 12%, в двух оставшихся разница составляла 27% и 24%. Сравнение результатов по оптической плотности дает аргумент в пользу гипотезы об обращении фосфора. Только для экспериментов на среде № 7, которая довольно близка к сбалансированной

(определения изменений состава среды свидетельствуют 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 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.

Таблица 4. Состав смешанных культур (в процентах) и их оптическая плотность (в единицах нефелометра, умноженных на 100) на стационарной стадии развития (номера сред соответствуют номерам в табл. 1)

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

* Показатель не определяли.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-49238).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фурсова П.В., Левич А.П. О регулировании состава экологического сообщества с помощью изменения отношения концентраций ресурсов в среде // Биофизика. 2004. Т. 49. № 5. С. 912–919.
2. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. Подходы к управлению составом сообщества диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa*: экспериментальные данные и модельные расчеты // Биотехнология. 2005. № 1. С. 73–82.
3. Levich A.P. Variational modelling theorems and coenoses functioning principles // Ecol. Modelling. 2000. V. 131. P. 207–227
4. Левич А.П., Алексеев В.Л., Никулин В.А. Математические аспекты вариационного моделирования в экологии сообществ // Мат. моделирование. 1994. Т. 6. № 5. С. 55–76.
5. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Максимов В.Н., Левич А.П. Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 45–50.
6. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. Выявление компонентов питания, ограничивающих рост моно- и смешанных культур диссоциантов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2004. № 1. С. 19–23.
7. Фурсова П.В. Алгоритмы расчетов в вариационной модели экологического сообщества // Математическое моделирование. 2003. Т. 15. № 5. С. 115–128
8. Фурсова П.В. Потребности в глюкозе, нитратах, фосфатах и их вариации в анализе смешанной культуры диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Изв. АН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 122–127.
8. Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль // 30-е Баховское чтение. М.: Наука. 1975. 33 с.

CULTIVATION OF *Pseudomonas aeruginosa* DISSOCIANTS ON SPECIFIED LIMITING CONDITIONS P.V. Fursova, E.S. Mil'ko, A.P. Levich

Lomonosov Moscow State University On the basis of experimentally determined values of requirements for basic nutrients of R-, S- and M-dissociants *Pseudomonas aeruginosa* the research of an opportunity to manage development of communities of microorganisms is carried out. On environments with set conditions of limitation (based on the modelling predictions) the exhaustion of glucose for all mono- and the mixed cultures is experimentally confirmed, and also the balanced consumption of glucose, nitrogen and phosphorus by R-dissociant at corresponding initial structures of environments is confirmed. Research of the structure of mixed cultures has shown conformity of results of experiment to modelling calculations. The data testifying to an opportunity of cyclic consumption of phosphorus by bacteria *P. aeruginosa* are obtained.