



论文

构建限制性培养条件下细菌群体生长模型的探讨

张怀强, 公维丽, 赵越, 高培基*

山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

* 联系人, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-29; 接受日期: 2013-11-21

国家自然科学基金(批准号: 30870080)和山东省自然科学基金(编号: ZR2013CM038)资助项目

doi: 10.1360/052013-238

摘要 依据 *E. coli* 菌株在摇瓶和发酵罐培养条件下菌群增长过程光密度值的变化, 在改进了数据平滑和微分求导方法的基础上, 以瞬时速率和瞬时增量为目标函数表征菌群增长的动力学过程. 瞬时速率表现为指数衰减模式, 而瞬时增量的过程曲线因接种量而异, 由它们所表征的生长动力学过程都不存在延迟期和稳定期. 动力学曲线的形状由接种物中含有的处于分裂状态的细胞数所决定, 它是菌群内源性的增长能力(来自细胞分裂的连续发生)和由增长引发的外源性阻抑力(营养物质的减少和代谢产物的增加)相互作用的结果. 由瞬时速率和瞬时增量还可推导出菌群增长的倍增时间及体积生产效率等参量. 研究结果可为解决 logistic 方程和 Monod 方程在拟合菌群增长过程曲线时遇到的不确定性等难题提供有效的数学分析方法.

关键词瞬时速率
瞬时增量
菌群增长动力学
倍增时间
体积生产效率

怎样测定和表征细菌群体的增长规律, 是一项重要的基础性研究工作, 具有广泛的应用价值. 通常以一定体积内的细胞数或其他生物量(光密度、干重等)的观测值为因变量即响应变量(y), 以对 y 产生的因子 x 为自变量(通常为时间 t), 选择自变量 x 的序列值($x_{i-1}, x_{i-2}, \dots, x_{i-n}$)在一定培养条件下对因变量 y 的影响($y_{i-1}, y_{i-2}, \dots, y_{i-n}$), 得到菌群增长的过程曲线. y 是由与自变量 x 的函数关系表征的, 即 $y=f(x_{i-1}, x_{i-2}, \dots, x_{i-n})$. 可根据曲线的动力学特征类型, 选择或构建生长模型进行拟合, 以相应的动力学参数来表征自变量与因变量间的关系, 或者根据多次数据检测的结果, 沿用统计归纳法, 提出对生长过程机理的推测以及表征生长过程的函数表达式(定义式), 以多种求解方法得到动力学参数.

由于影响菌群增长的因素众多, 而且它们对增长过程的影响也不同步, 所以菌群细胞特征为一随时间而变化的多元函数, 是一个不断变化的动态体系^[1,2], 究竟选择哪一种影响因素为目标函数和怎样构建生长模型才能不失真地反映出菌群增长的动态规律, 则涉及对菌群增长规律分析的策略和相应的实验设计, 应用的测试和表征方法也甚为复杂. 已有多种测试方法和生长模型被应用于菌群增长过程的研究, 但由于菌群组成的异质性, 动力学过程的分析也远较化学反应系统复杂^[1~3]. Ramkrishna^[4]把构建微生物菌群生长模型的方法概括为离散式模型(segregate model)和总体分布式模型(lumped model)两大类, 前者是以细胞个体在增长过程中形态、结构以及生理生化等特征在不同时间序列过程变化的测定

引用格式: 张怀强, 公维丽, 赵越, 等. 构建限制性培养条件下细菌群体生长模型的探讨. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 185–196

Zhang H Q, Gong W L, Zhao Y, et al. A new method for estimating growth behavior of bacterial population under restrictive culture conditions. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 185–196, doi: 10.1360/052013-238

值为依据而设计的结构性模型(structured model)或确定性模型(deterministic model), 后者则是基于对菌群总体动态过程的连续观测值为依据而归纳出的统计模型(statistical/probability model), 该类模型是依据观测值直接建立的, 其数学表达式并不直接涉及动态发生的原因和条件, 因此也被称之为经验性模型(empirical model). 事实上, 离散变量与连续变量之间的区分, 以及经验性和理论性模型的界限, 也都不是绝对的, 如细胞数目是离散型变量, 而细胞体积则为连续变量. Monod 模型是基于酶学研究中经典的

Michaelis-Menten(M-M)方程($v = \frac{v_{\max}[S]}{k_m + [S]}$)并仿照

logistic 方程的定义式而构建的, 即假定菌群的比生长速率 μ 唯一地受营养物质浓度 $[S]$ 所限定, 即

$$\mu = \frac{\mu_{\max}[S]}{(k_s + [S])}, \text{ 式中的 } \mu_{\max} \text{ 为最大比生长速率, } k_s \text{ 为饱}$$

和常数, 即达到 $\mu_{\max}$ 1/2 时的底物浓度. logistic 方程、Monod 方程以及 Michaelis-Menten 方程都可用于描述“S”型增长过程, 但它们所基于的过程机理假设则各不相同. 怎样测定和表征 v 和 μ 却一直存在着争议. 微生物在限制性培养(如摇瓶、发酵罐等)条件下增长时, 菌群生物量(如干重、细胞数, 及光密度值等)的增长速率(growth rate)均随时间序列表现为“S”型曲线, 即增长速率由逐渐增加直至饱和渐近线. logistic 方程是描述单种群增长的“S”型曲线的一元非线性方程, 实验结果表明, μ 是瞬变量而不是常数^[5,6]. 由于时间变量为隐函数, 并不出现在 $\mu = \frac{\mu_{\max}[S]}{(k_s + [S])}$ 方程中,

这就造成解析 $\mu_{\max}$ 和 k_s 甚为困难^[7~9]. 关于在 M-M 方程构建中假设的局限性, 以及解析动力学参数 v 和 $v_{\max}$ 方法中的失误, 文献中已有详尽的评述^[10~14], 这些问题也同样存在于 Monod 方程中, 却很少引起注意. logistic 方程是在表征人口指数增长的 Malthus 方程 $y_t = y_0 e^{k(t-t_0)}$ 中加入群体生长抑制因子 r 而构建的, 以表征增长过程因环境因素的抑制而形成的有限增长, 其微分形式为 $\frac{dy}{dt} = Ky - ry^2$, K 为环境容量,

y 是 t 时刻的种群数量, r 为内禀增长率(intrinsic growth rate), 对其进行积分, 解出 $t=0$ 和 $y=y_0$ 时的特解, 并假定 $e^a = (K - y_0)/t_0$, 得到其标准积分表达式

$$y = \frac{K}{1 + e^{a-rt}}, \text{ 并把 } r \text{ 视为内禀增长率, 但 } a \text{ 取决于 } K$$

和 N_0 即初始条件 $t=0$ 时的 y 值. 在 $t=0$ 时,

$$y_t = \frac{K}{1 + e^a} \neq y_0, \text{ 这与事实相悖, 由此导致参数估计的}$$

错误, 因此, r 不能表征内禀速率^[7,14]. 由此可见, Monod 方程和 logistic 方程都属于存在着一定局限性的确定性模型, 由于它们都未能阐明导致增长过程动力学变化的原因和条件, 所以, 它们也不属于机理性模型(mechanistic model). 在生物学领域中, 已有多对 logistic 方程进行改进的报道, 但它们只能适用于一定的“S”型曲线, 具有固定的拐点, 其结果都不具普适性. 4 参数的 Richard 模型加入了一个可滑动取值的参数 m , 以适应不同形状的曲线, 但 m 取值的选择则依据于经验, 而且不能表征负生长^[1,2,8,14,15]. 动、植物增长时, 个体数目和生物量的实测值易于精确测定, 但对于以 2 分裂方式增长的细菌菌群, 则常遇到很多困难. 细菌菌群在琼脂平板上形成的菌落数 CFU(colony forming units)可表征分裂细胞增长的结果, 但取样和测试的随机误差比较大, 可重现性也相对较差, 涂布不均匀时一个菌落会是多个接种细胞形成的. 光密度法(A_{600} 值)可在线检测, 误差小^[16], 光密度值是分裂细胞和不具分裂能力的休止细胞的加合值, 两者速率的变化并不同步, 如不给予区分, 则会导致动力学机理分析的错误.

本实验室在细菌群体生长动力学^[17~20]和糖苷酶活力测试^[21~25]等方面研究的基础上, 曾提出在未知菌群增长动力学机理的条件下, 以菌群的瞬时速率(instantaneous rate)直接表征菌群动力学过程、区分生长阶段, 以及估算代时^[17]. 但进一步对不同培养条件下菌群生长过程的分析表明, 此方法也存在一定的局限性, 这是由于瞬时速率计算的精度和稳定性取决于对实测数据平滑方法和微分步长的选择^[2,26~29]; 同时, 动力学参数的解析是直接由过程曲线图解的结果, 而不是依据专一性的数学模型, 是对真实状态的比较粗略地估计, 因而, 这一方法仍属于经验性的唯象动力学方法^[30]. 结合对细菌菌群生理和遗传特性分析的报导^[2,5,6,31~35], 本研究对菌群组成和增长过程呈现异质性的原因及相应的检测分析方法, 提出如下假定和分析, 以作为进一步实验设计的依据, 尽量减少随机误差和消除系统误差, 以剖析菌群增长的动力学机理.

(i) 在限制性培养条件下, 增长形成的细菌群体其组成是异质性的^[3,4,17-19,31,32], 是由具分裂能力的细胞和不能再进行分裂的休止细胞组成. 菌群固有的(即内源性的)增长能力(intrinsic reproducing capacity)是由菌株(strains)的遗传特性决定的, 是一潜在的能力, 但它必须在一定的外在环境条件下才能得以表达. 在限制性培养条件下, 由于伴随着菌群的增长, 必然造成营养物质的不断减少和代谢产物的不断增加, 形成对增长的阻抑力量. 潜在的增长能力的表达必然受上述阻力所制约, 观察到的生长量(细胞数目和光密度值等)应是这两类作用力相互作用的结果, 是时间过程的减函数, 也是菌群通过调节代谢途径以适应环境的必然结果^[1-3,17-19,30], 它类似于遗传学上表型是基因型与环境相互作用的结果的情形. 菌群中细胞分裂的发生取决于在任一时刻(t)处于分裂状态的细胞数($y(t)$)^[1-6,31,32]. 但在限制性培养条件下细菌细胞的增长是一周期性(T)变化的过程 $y(t)=f(t+T)$, 因此, $y(t)$ 必然呈现周期性的波动^[33-35], 这与化学振荡现象相似, 但反应物却不会进行分裂而增长. 化学振荡反应是指反应体系如反应物的过程变量(浓度)随时间发生周期性变化的现象, 如果反应体系中存在阻力, 则呈现递减指数阻尼振荡^[36]. 在酵母培养中已观察到此类现象^[37]. 由此推断, 细菌菌群的瞬时速率必为指数衰减模式.

(ii) 应用光密度法(absorbance of optical density, A_{600})可在线实时测定菌群的增长, 细胞的增长数和体积的变化都可在 A_{600} 值中得到反映^[16,38-40]. 但是由于细胞分裂呈周期性的变化, 在限制性培养条件下(摇瓶、发酵罐等)总有一部分细胞会进入不再继续进行分裂的休止状态(static state)^[3-6,31-35]. 直接记录的 A_{600} 数据(UV-Vis 测定值)^[38,39]则包括了正在分裂状态的细胞和不再分裂的休止细胞, 是两者的加合值, 显然, 过程曲线取决于细胞不断分裂形成的增长速率. 遗传学、生理学、生物化学、生物工程学以及药理学等相关学科的研究, 都需要把二者分开来表征, 以进一步分析机理. 但过去的研究工作均未注意此区分, 生长模型(如 logistic 和 Monod 模型等)的构建都是以直接记录的 A_{600} 为据而进行的. 由瞬时速率则可以得到只有分裂细胞增长形成的菌群的净增长量(net increment), 这是由于在计算瞬时速率时

$$\left(v_{inst} = \frac{dy}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta y}{\Delta t} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{f(t_0 + \Delta t) - f(t_0)}{\Delta t} \right)^{[27]}, \text{ 当 } \Delta t \rightarrow 0 \text{ 时, } \Delta y$$

只取决于分裂细胞, 而休止细胞则可近似视为一个不动点, 不会影响 Δy 的变化, 而瞬时增量 dy 是该变量 Δt 的线性函数, 是 Δy 的主要部分, 即 $dy = f'(t)\Delta t$. 在得到瞬时速率过程曲线后, 由 $dy/dt \times \Delta t$ 即可得到瞬时增量. 计算机软件在求导数时, 只能把 Δt 限定为有限最小值, 而不可能以无限小 $\Delta t \rightarrow 0$ 时极限值进行计算, 如 UV-Vis 分光光度计通常以 $\lambda/2$ 为微分步长(约等于 0.125 s), 因此, 以 A_{600} 为依据得到的瞬时增量是一确定值, 与时域有限差分方法计算的结果相近^[26-28].

(iii) 通过数据平滑(smoothing)处理, 得到一个尽量少失真的测量值的平滑曲线, 是微分求导和进一步拟合(fitting)方程的关键^[27,28]. 在常用的 2 类数据平滑处理方法中, 插值法是假定测量值是正确的, 只对数据点间值进行平滑, 平滑曲线都通过所有数据点, 是一个逼近每一对数据点间的曲线. 但观测值总会有误差, 求导数据是一个极限过程, 需要多个数据点的函数值, 任何小的检测误差都可能导致结果上大的偏差^[27]. 非线性回归方法则不必要通过原数据点, 而是求得整体最佳平滑结果. 在实测数据误差比较小的前提条件下, 回归法应可得到不失真的微分导数曲线^[29,40,41]. 本研究设计了不同接种量和相同接种量但含有不同分裂细胞数的样本, 检测了 2 类平滑方法对曲线平滑和方程拟合的影响, 得到的参数并与经典的 logistic 方程进行了比较, 以进一步检验改进方法的有效性^[42,43].

1 材料与方法

1.1 供试菌株

鸡致病性大肠杆菌 *E. coli* CVCC249 菌株, 由中国兽医微生物菌种管理保存中心提供. 分批培养条件下, 对其生理和生化等方面已做过系统性的研究^[17-20].

1.2 实验方法

取大约 1×10^6 CFU 的休止细胞, 接种至含 5L LB(Luria-Bertani)培养基的发酵罐中, 200 r/min 转速搅拌, 通入空气量为 1 vvm, 37℃ 下培养. 每间隔 15 min 取样 3.0 mL, 用生理盐水离心洗涤后, 恢复原体积, 用 GENESYS 6 Spectrophotometer(Thermo, 美国)测定光密度(A_{600})^[39], 测试至少重复 3 次, 变异系数

(coefficient of variation, CV)小于5%^[40,41], 不同接种条件实验用摇瓶法进行培养. 用 Sigma Plot software(2004, version 9.0)和 Prism 5 软件包, 对观测数据进行拟合与分析. 用 AUC(area under curve)表征总的生长量. AUC 是在 $(n-1) \sim n$ 波长范围内光吸收的总强度, 它可由不定积分法直接计算而得到, 即

$$AUC = \int_0^i A_i(\lambda) d\lambda_i, \text{ 式中 } \lambda_i \text{ 是波长}(i=1,2,3,\dots,n), A_i$$

表示波长为 i 时培养物的光吸收^[39]. 应用 Prism 5 软件包进行吸收光谱图的绘制和模型的拟合.

2 结果

2.1 两类计算菌群增长量方法的比较

图 1 和图 2 给出了平板菌落计数法 CFU 与光密度法表征菌群增长量的比较. CFU 方法反映了由分裂细胞形成的菌落数, 光密度法则是反映了由分裂细胞和休止细胞二者共同形成的光密度值. CFU 过程曲线呈指数性逐渐增加, 达到最大值后转为指数性下降, 是一个对数正态分布(log normal)型曲线, 而 A_{600} 则表现为迅速增加, 直至达到饱和渐近线, 表现为 hyperbola 型曲线^[42]. 显然, 直接依据上述 2 类实测值拟合方程必然会得到不同的结果, 选择哪种过程曲线能真实反映菌群增长过程, 这正是应用数学模型方法表征动力学过程时的关键问题^[8,40~43]. CFU 法可表征分裂细胞在数量上的增长过程, 但不能区分细胞的体积, 也很难消除细胞聚集造成的干扰^[31], 而且测试也甚为耗时, 进行大量测试比较困难^[16]. 为减少取样误差, 本研究采用了台式发酵罐进行培养, 在通气和连续搅拌条件下, 由抽样本得到的 CFU 数的误差仍然较大, 多种平滑方法仍难以得到可适于微分求导的结果. 同样条件下, 用 A_{600} 方法得到的观测值误差则较小, 细胞数和体积都可得以反映^[16], 但应用 4 种平滑数据的方法比较时表明, 内差法虽可得到平滑曲线(图 3), 但仍会导致瞬时速率曲线不规则波动(图 4), 这给选择方程拟合以及准确估计参数带来很大困难^[38~40,42,43]. 而非线性回归平滑方法(如 hyperbola 生长曲线型)则可得有规律变化的适于进行拟合瞬时速率的平滑曲线. 当用 FFT (fast fourier transform)方法平滑数据后, 瞬时速率曲线表现为递减性阻尼震荡波, 文献中常把此类周期性的波动现

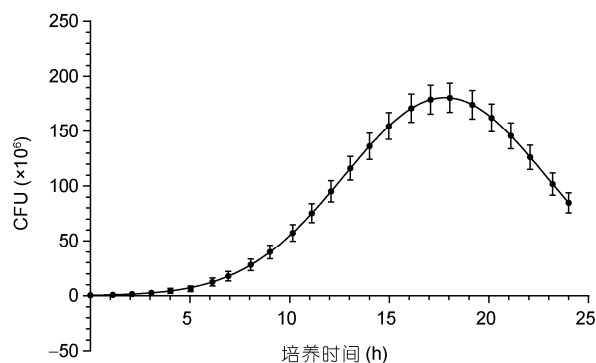


图 1 以 CFU 表征的 *E. coli* CVCC 249 在分批培养条件下菌群增长的过程曲线

1×10^6 细胞接种至含 5 L LB 液台式发酵罐, 37℃ 培养 24 h

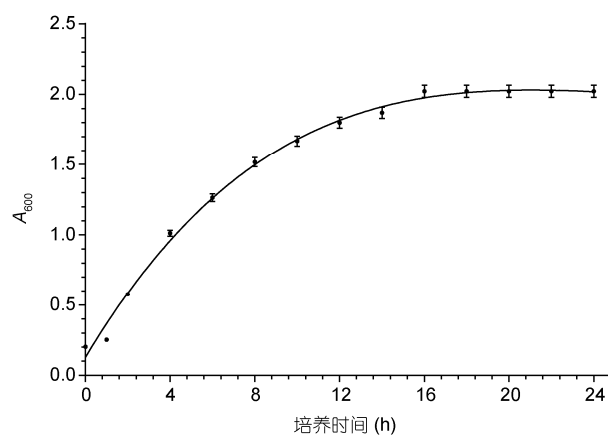


图 2 以光密度值(A_{600})表征的 *E. coli* CVCC 249 在分批培养条件下菌群增长的过程曲线

接种和培养条件与图 1 相同

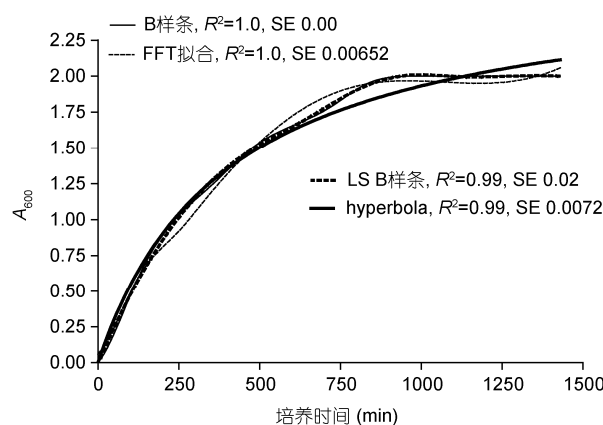


图 3 由 4 种不同平滑方法得到的 *E. coli* CVCC 249 生长曲线的比较

数据来自图 2

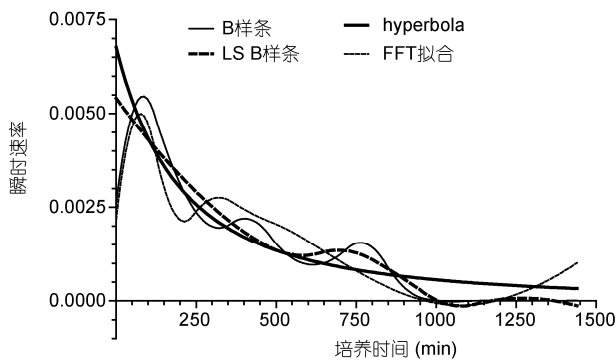


图 4 由 4 种平滑曲线得到的 *E. coli* CVCC 249 瞬时速率的比较

数据来自图 3

象归结为类似于化学震荡过程^[36,37], 但是都还未考虑到这与平滑数据方法的关系, 这是菌群增长过程的特点, 还是 FFT 平滑数据后的失真? 值得进行进一步的研究.

2.2 不同接种量对菌群增长过程曲线的影响

图 5 是用 3 个含不同数量 CFU 但都处于休止状态的接种物进行摇瓶培养的 A_{600} 实测值, 显示了初始接种量对菌群增长过程的影响, 它们都可用 hyperbola 方程 $y = \frac{B_{\max}x}{K_d + x}$ 直接进行拟合, 以求得动力

学参数, 但接种量最小的样本(1×10^3 CFU)的 $B_{\max}$ 值却最大, 表明直接以此方程拟合数据, 由外推法得到的 $B_{\max}$ 为失真的结果. 应用 logistic 方程和 Monod 方程直接拟合数据时, 也存在同样问题, 文献中早已指出生物学实验中沿用外推法的问题^[13], 但很少被研究者注意. hyperbola 方程是用非线性回归方式平滑数据, 平滑曲线是整体上的近似, 而不需通过数据点, 这样, 观测值数据点的误差可得到平滑, 微分求导时不会形成不规则的波动, 在观测值测定误差较小(如 $CV < 5\%$)的条件下, 可近似得到不失真的平滑的微分导数曲线, 可便于选择或构建数学方程去拟合, 如图 6 是用 hyperbola 方程平滑 A_{600} 数据后, 再以单指数衰减方程拟合的结果. 表明衰减速率常数 K 随接种量的增加也呈指数性增加(由 $0.03015 \rightarrow 0.1147 \rightarrow 0.2358$). 图 7 和 8 的瞬时增量过程曲线则把接种量不同的影响更加清楚地表征出来. 接种量为 1×10^3 CFU 时, 为持续性线性增长过程, 这是由于培养瓶内的养分对接种量小的菌群的增长在 24 h 过程中都可得到

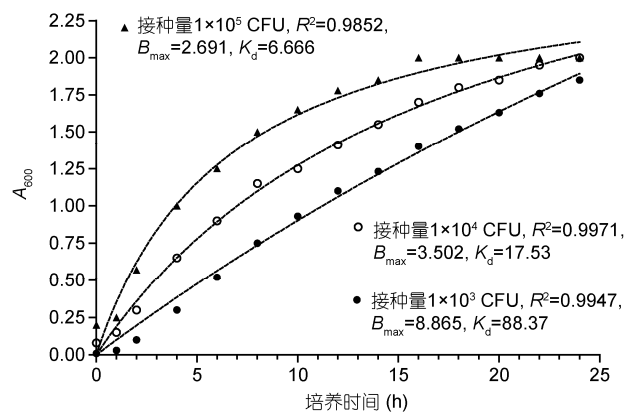


图 5 不同接种量时 *E. coli* CVCC 249 生长曲线的比较

以光密度值为生物量, 用 hyperbola 方程直接拟合 A_{600} 曲线以得到 $B_{\max}$ 和 K_d

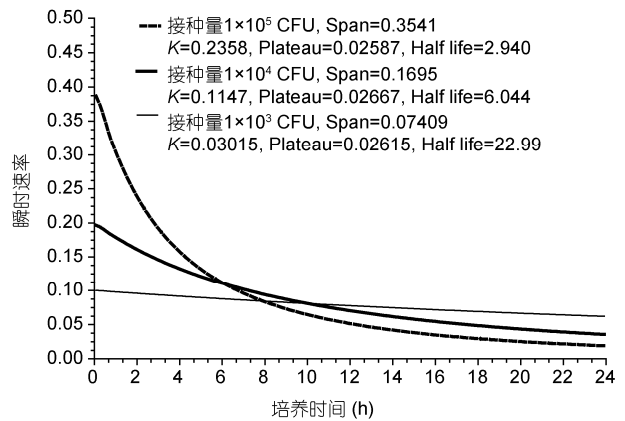


图 6 不同接种量时 *E. coli* CVCC249 瞬速率曲线的比较

数据来自图 5, 用单指数衰减方程: $y = (y_0 - \text{plateau}) \exp(-Kx) + \text{plateau}$ 拟合曲线

充分供应, 表明当接种量低时, 增长形成的菌群主要是由不断分裂的细胞组成, 菌群细胞可持续进行分裂. 而当用 1×10^5 CFU 为接种物时, 由于养分的供应因菌群大量增长而减低, 不能继续支持长时间的增长, 所以, 过程曲线即由指数性增长转变为指数衰减. 以 1×10^4 CFU 为接种物时的过程曲线恰好位于 10^3 和 10^5 中间, 但当它们形成的总细胞数以 AUC 计算时, 则随接种量的增加而递减, 这是一个在过去研究工作中以 logistic 或 Monod 方程直接拟合菌群生长曲线未曾看到的重要特征.

图 7 给出了用单指数衰减方程(one phase exponential decay equation)拟合的不同接种量的瞬时增量过程曲线, 结果表明, 1×10^3 和 1×10^4 CFU 样本适

于用单指数衰减方程拟合(图 7), 而 1×10^5 CFU 样本用单指数方程拟合时, 拟合度系数 R^2 较低, 仅为 0.65, 其增长过程更适于用双指数结合方程(two phase exponential association equation)拟合(图 8). 瞬时速率和瞬时增量分别以不同方程拟合后, 其参数可为分析菌群增长的动力学过程提供准确的信息.

2.3 相同接种量但样本取自不同生长阶段(静止期(steady state)和指数增长期(exponential phase)的接种物对菌群增长过程的影响

静止期样本主要由休止细胞组成, 指数增长期主要由正在进行分裂细胞组成^[1-3]. 在转入摇瓶中连

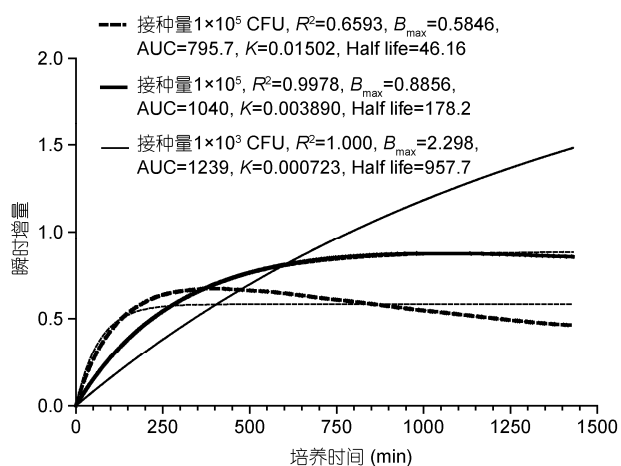


图7 不同接种量时 *E. coli* CVCC 249 瞬时增量曲线的比较
数据来自图 5, 数据用单指数方程: $y=y_{\max}(1-\exp(-Kx))$ 拟合

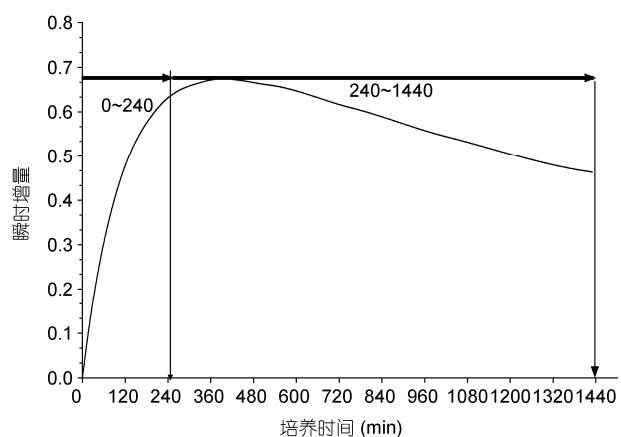


图8 接种量 1×10^5 CFU 时 *E. coli* CVCC 249 瞬时增量曲线
数据来自图 5, 用双指数结合方程: $y=y_{\max 1}(1-\exp(-K_1 x))+y_{\max 2}(1-\exp(-K_2 x))$ 拟合曲线

续培养时, 指数期接种物迅速增长, 但由于营养供给和产物抑制而受限, 生长很快转入衰减期, 而静止期接种物由于含有的处于分裂状态的细胞数较低, 则表现为缓慢增长, 并可保持较长时期. 图 9 是测量值 A_{600} 直接拟合 hyperbola 方程的结果, 出现了静止期 $B_{\max}$ 反而大于指数期的结果. 与图 5 结果相同, 均为由外推法导致的失真. 瞬时速率为目标函数拟合单指数衰减方程则表明, 指数期接种物速率的衰减常数 K 远大于静止期(图 10), 但最大速率值 Span 则大于静止期. 由图 11 可知, 瞬时增量都可用双指数结合方程拟合, 指数期接种物在 2.31 h 即可达最大瞬时增量值, 而静止期则需 5.33 h. 综合图 5~11 的结果表明, 分别以瞬时速率和瞬时增量为目标函数表征菌群在限制性培养条件下的增长过程时, 可表征不同的动力学过程特性. 当其他培养条件如温度、pH 等不变时, 接种物的分裂细胞或休止细胞的比值对过程曲线的形状起决定性作用, 这符合微分导数过程曲线是由初值决定的数学规律^[27]. 但经典的数学分析方法只限定了初值的数量 $N(t_0)=N_0$, 并未涉及 N_0 的性质. N_0 是作为同质性菌群计数的, 即 $1=1$, 但实际上细菌菌群是一处于不同生理状态的异质性群体, 即 $1 \neq 1$ ^[3-6,31,43,44]. 图 9~11 的系统结果可给出清楚的区分, 即接种物的数量和其内含的分裂的细胞数, 对菌群增长过程起决定作用. 上述对菌群增长过程异质性的区分, 由不同接种量或不同生理阶段的接种物增长形成的菌群中, 以瞬时增量为目标函数计算时, 分裂细胞所占比例的不同, 显示出不同的结果, 这可为微生物生理、遗传以及生物工程研究提供重要信息. 表 1 给出了体积生产效率(volumetric productivity)即单位体积单位时间瞬时增量的比较^[44]. 已知一些代谢产物主要由分裂细胞生成, 而另一些则主要由休止细胞生成^[30-37]. 某些药物的靶点只存在于分裂状态细胞, 而另一些药物则为休止细胞^[17-20]. 上述分析则可为生物工程学上提高产率和药物学研究上探索药物抑制机理提供有力工具.

图 12 表明, 瞬时速率与瞬时增量间的相关性因接种量而异, 当接种量低(如 1×10^3 CFU)时, 随瞬时速率的降低, 瞬时增量呈线性增加; 接种量为 1×10^4 和 1×10^5 CFU 时, 则随瞬时速率的降低, 瞬时增量呈线性增加, 但速率不同, 增加至最大值后转为指数性减低, 上述动力学曲线的变化正是指数性方程所描述的动力学特征, 即过程的瞬时存在量与瞬时速率

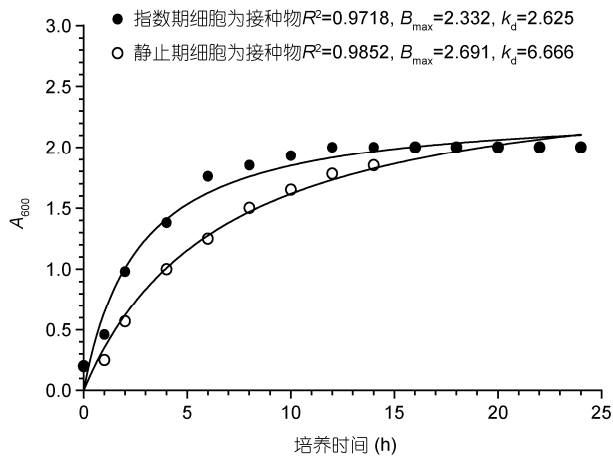


图 9 不同生理状态接种物接种时 *E. coli* CVCC 249 生长过程曲线的比较

曲线用 hyperbola 方程直接拟合

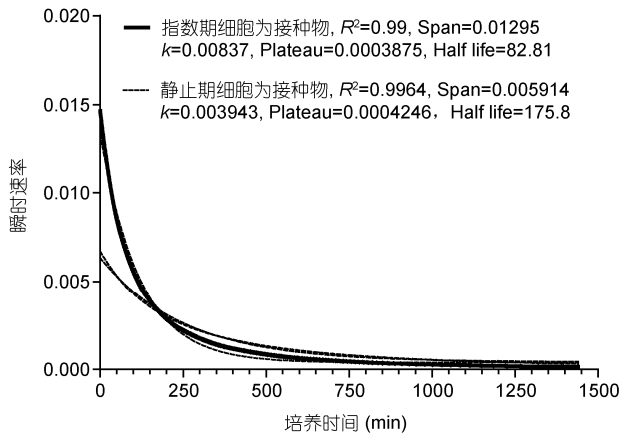


图 10 不同生理状态接种物接种时 *E. coli* CVCC 249 瞬时速率曲线的比较

数据来自图 9, 用单指数衰减方程拟合

呈正相关(指数性增加或衰减过程)^[45], 表明单指数衰减方程拟合瞬时速率(图 10)和二元复合指数方程拟合瞬时增量(图 11 和 12)是符合其动力学过程变化规律的, 不是经验性的选择^[41,42].

流式细胞仪检测菌群不同生长阶段 DNA 含量的研究表明, 在指数生长期分裂细胞占 90%, 而在稳定期仅为 19%. 总结上述结果, 可看出瞬时速率过程曲线是由接种物中含有的分裂细胞数决定的, 瞬时速率的最大值 Span 与分裂细胞数呈指数性正相关, 而与衰减速率常数 K 则呈负相关(图 13). 表 1 给出的以曲线下面积 AUC 统计得到的总的菌群增量和分裂细胞

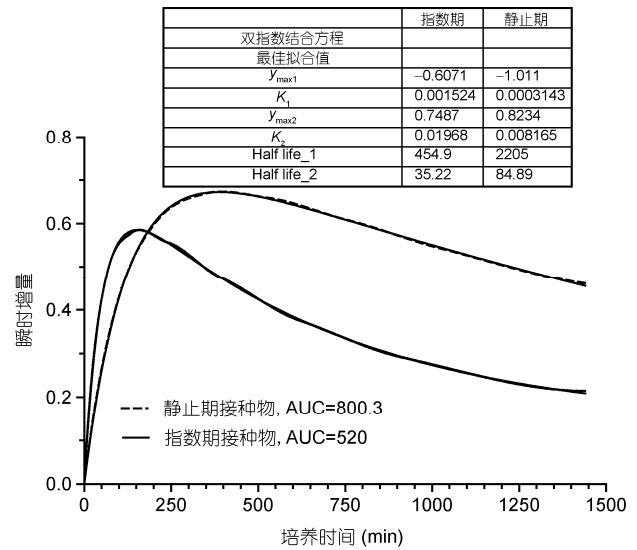


图 11 不同生理状态接种物接种时 *E. coli* CVCC 249 瞬时增量曲线的比较

数据来自图 9, 曲线面积用 AUC 表征

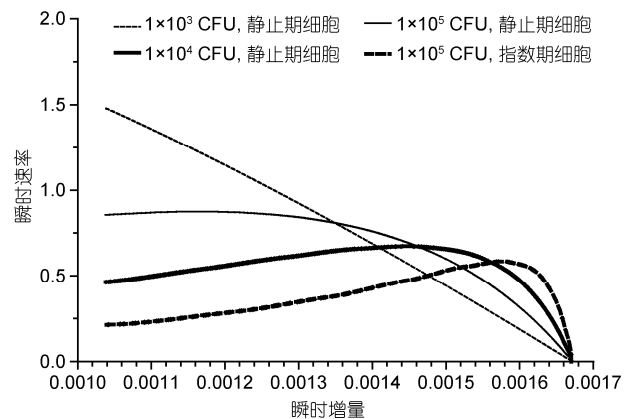


图 12 不同接种条件时 *E. coli* CVCC 249 菌群增长的瞬时速率与瞬时增量的相关性

数据来自图 6 和 7

增量的比较, 表明基于分裂细胞增长形成的生物量以 1×10^3 CFU 接种量最大, 且随接种量增大而降低, 但基于细胞总数形成的生物量计算的结果则恰好相反。

2.4 生长阶段的区分

对在限制性培养条件下菌群增长过程进行阶段区分, 是在微生物学和生物工程学研究中最为基础性的工作之一, 但至今都依然是直接依据光密度和细胞重量等检测值^[16]呈 hyperbola(正切双曲线)的形

表 1 由瞬时增量得到的不同接种条件时的体积生产效率(用 AUC 表示)^[44]

接种物及接种量	净增量(AUC/min mL)	总增量(AUC/min mL)
静止期细胞, 1×10^3 CFU	0.860 (100%)	1.013 (100%)
静止期细胞, 1×10^4 CFU	0.722 (83.9%)	1.294 (127%)
静止期细胞, 1×10^5 CFU	0.552 (64.1%)	1.553 (153%)
指数期细胞, 1×10^5 CFU	0.361 (64.9%)	1.744 (112%)

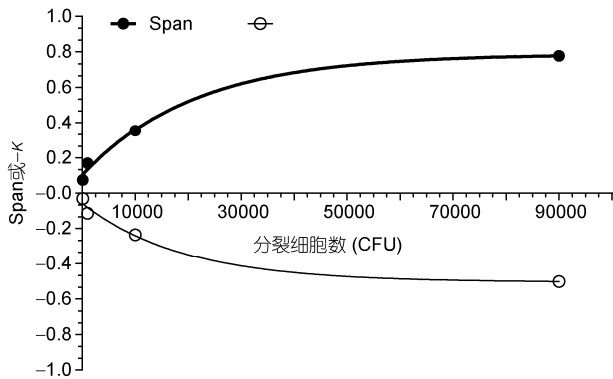


图 13 *E. coli* CVCC 249 接种物中含有的分裂态细胞数与瞬时速率最大衰减速率 Span 和衰减常数 $-K$ 的相关性分析
数据来自图 6 和 10, 用单指数衰减方程平滑数据点

状, 将增长过程划分为延迟期、指数生长期、稳定期和衰亡期 4 个阶段^[1-3,17]. 如上所述, 这类分析是基于菌群的总增长量, 并未区分出分裂细胞和休止细胞形成的增长量. 从动力学观点看, 菌群增长量的增加是细胞不断分裂的积累, 与休止细胞的存在无关. 由于瞬时速率和瞬时增量曲线在不同的初值条件下的动力学过程表现为指数增长或指数递减方式, 以及 2 个方程的量纲不同, 不便于直接进行比较, 进行归一化(normalization)转化后^[40,46], 即把因变量值的变化范围转化为 0~100%, 它不会影响非线性回归的结果, 可得到参数的等价表征(equivalent best fit)和准确间距(confidence intervals)^[40,41]. 图 14 和 15 给出了菌群增长过程阶段区分的结果. 不难看出, 以瞬时速率为目标函数时, 增长过程曲线都呈指数衰减方式, 是一个连续性的单调减函数. 以瞬时增量为目标函数时, 表现为指数性的增加至最大值后转为指数性递减 2 个阶段(与图 11 相同), 也不存在延迟期和稳定期, 只存在一个介于 2 个阶段的转折点(turning point). 显然, 这种基于分裂细胞增长速率和分裂细胞形成的积累量对增长过程的区分, 应能反映出真实地菌群增长的动力学过程.

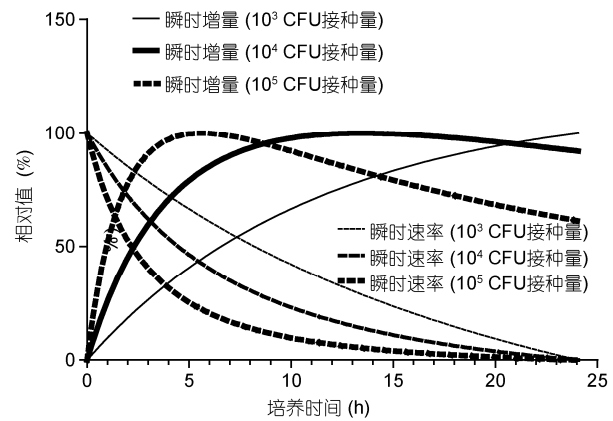


图 14 基于不同接种量时瞬时速率和瞬时增量的变化区分 *E. coli* CVCC 249 菌群增长的生长阶段

数据来自图 6 和图 7. 瞬时速率和瞬时增量用相对值表征

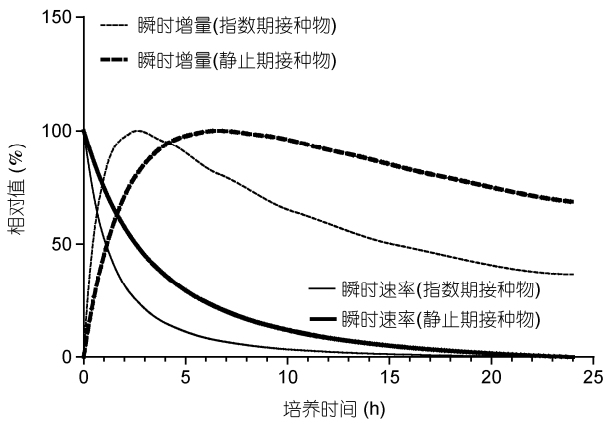


图 15 基于不同状态的接种物时瞬时速率和瞬时增量的变化区分 *E. coli* CVCC 249 菌群增长的生长阶段

数据来自图 10 和 11. 瞬时速率和瞬时增量用相对值表征

由图 14 和 15 可见, 它们都不存在延迟期和稳定期, 由指数性增加转为衰减只有 1 个转折点, 而依据 logistic 方程和 Monod 方程对生长阶段的区分, 由于未能去除休止细胞存在的干扰和对离散观测值直接拟合方程, 因而造成结果的失真.

2.5 计算菌群的倍增时间(doubling time, T_D)

图 16~18 给出了基于瞬时增长量得到的菌群的倍增时间(T_D)(或对同步分裂的菌群应改称之为代时(generation time, TG), 即 1 个细胞分裂成为 2 个细胞经历的时间), 它是表征菌群增长过程的重要特征, 而代时的计算则都假定菌群的分裂是准确依照 2 分裂方式进行, 但菌群中细胞分裂并非同步进行^[3,31,32,43], 对非同步分裂菌群, 其倍增时间 T_D 的计算公式为 $N(t) = N_0 2^{\frac{t}{T_D}}$, 计算其自然对数值^[47], 即可得出在不同接种量和相同接种量不同生理状态阶段的接种物的倍增时间变化曲线. 显然, 倍增时间不是一个常数, 而是由接种物和培养条件确定的变量, 由迅速增加转为近于恒定. 图 16 解释了这 2 种分裂方式计算代时的差别.

菌群增长以非同步方式进行时, 菌数的增加不再以 $2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16$ 的方式进行, 而是分裂次数的指数函数. 倍增时间(doubling time, Dt)的计算公式应为: $\frac{N_{i+1} - N_i}{t_{i+1} - t_i} = e^{Dt}$ ^[47], 取对数得到 $Dt = \ln(N_{i+1}/N_i)/\Delta t$, 即瞬时增加值的对数值. 计算瞬时生成的细胞数, 可准确得到菌群增长的倍增时间. 图 17 和 18 表明, 倍增时间是由接种条件所控制, 又随培养时间变化而变化的变量, 是这 2 个因素的复合函数, 它可以用等值线图进行表征(图 19)^[48].

菌群增长以非同步方式进行时, 菌数的增加不再以 $2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16$ 的方式进行, 而是分裂次数的指数函数. 倍增时间(doubling time, Dt)的计算公式应为: $\frac{N_{i+1} - N_i}{t_{i+1} - t_i} = e^{Dt}$ ^[47], 取对数得到 $Dt = \ln(N_{i+1}/N_i)/\Delta t$, 即瞬时增加值的对数值. 计算瞬时生成的细胞数, 可准确得到菌群增长的倍增时间. 图 17 和 18 表明, 倍增时间是由接种条件所控制, 又随培养时间变化而变化的变量, 是这 2 个因素的复合函数, 它可以用等值线图进行表征(图 19)^[48].

等值线上的数值为 2 个因素(CFU 值和倍增时间) 等值线上的数值为 2 个因素(CFU 值和倍增时间)

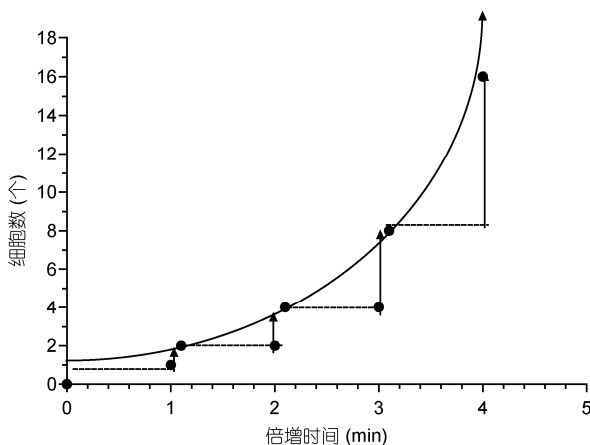


图 16 细菌菌群同步(—)和非同步分裂(---)方式的示意图

同步分裂时细胞数的存在为离散变量, 非同步分裂时为连续变量^[47]

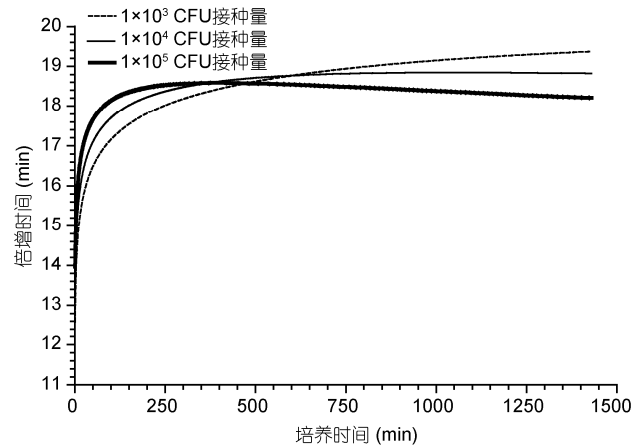


图 17 依据瞬时增量估算不同接种量时 *E. coli* CVCC 249 增长的倍增时间

数据来自图 7

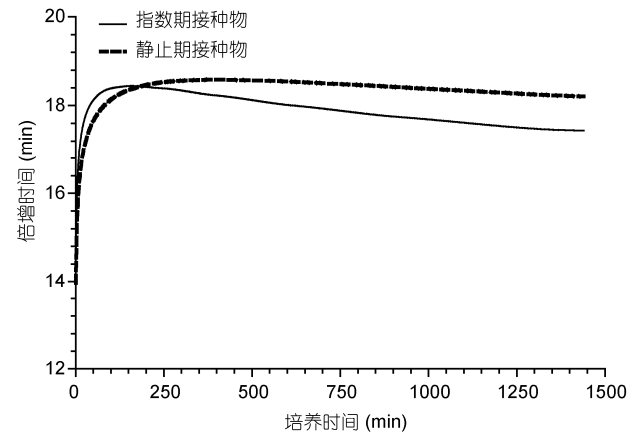


图 18 依据瞬时增量估算不同状态接种物时 *E. coli* CVCC 249 增长的倍增时间

数据来自图 11

的复合作用的定量表征, 可见, 在 450 min 之前, 倍增时间随初始接种量 CFU 呈指数性降低, 450 min 之后变为增加(即延长了倍增时间), 这与瞬时增量的结果呈负相关性, 即增长速率快, 倍增时间短, 450 min 之后, 瞬时增量减低(图 8), 倍增时间相应延长. 等值线的间距密集, 表示相应变量的变化产生的影响导致速率迅速变化, 间距大则相反. 可见, 培养时间(x 轴)的变化在初期对代时的影响最显著, 10 h 后变动在 18 min, 这与在显微镜下进行定位实测的结果相近^[31].

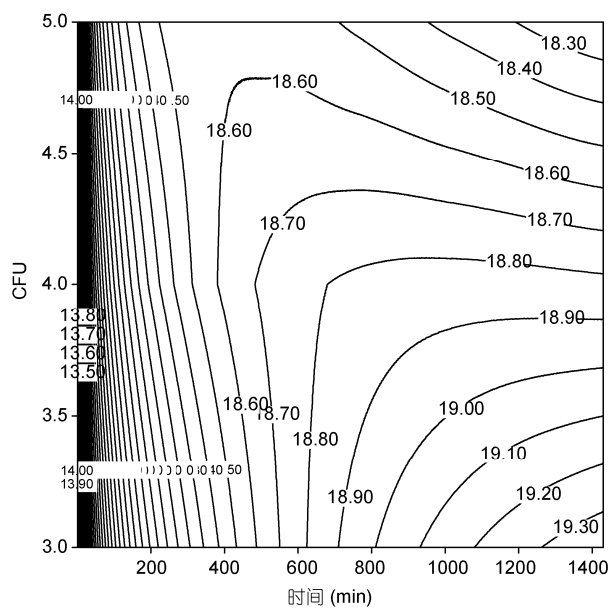


图 19 *E. coli* CVCC 249 增长的倍增时间的等值线图
数据来自图 17

3 讨论

对菌群增长过程机理的分析涉及多个方面, 包括观测值的测定、曲线的平滑、目标函数的选定, 以及方程拟合度的判断(goodness of fit)等^[8,42,43]. 生物学研究中多沿用经典性方程拟合观测值和以 R^2 (coefficient of determination)为依据判断方程选择的结果, 对 logistic 方程和 Monod 方程的众多改进也都是以 R^2 值来判定的. 但是, 适合度分析不能作为模型是否适合的唯一判据. 对模型拟合结果的判断, 习惯用拟合度分析中决定系数 R^2 和离差平方和(sum of square, Q)作为判断的标准, 即以 R^2 最大, Q 最小为准. R^2 值反映了选用的平滑方程确定的理论曲线与实测值曲线的吻合程度. 本文以不同接种量和相同接

种量但菌群组成状态不同的接种物时得到的瞬时速率和瞬时增量进行的比较, 也是选用的模型是否能反映自变量与响应变量生物学含义的一个检验方法. 插值法是在不改变实测值条件下进行的平滑, 非线性回归法则为整体平滑, 应根据随机误差对实测方法的精密度的影响进行选择^[49]. 还有众多的统计学方法用作模型拟合时的检验和比较, 这都基于统计学上估计模型各参数和实测数据的相关性, 这是必要的一步, 但对于一个模型是否适合, 它既不是充分的条件, 更不是唯一的判据. 模型是否适合, 模型/方程都是定量地表达对真实系统的假定和对机理的推测, 它与数据具有的数学规律有关, 还需要根据拟合参数能否真实、充分表达其与建模假定的生物学意义的一致性来做出判断^[8,42,43].

通过对 *E. coli* 菌株在摇瓶培养条件下表现的增长过程的系列研究^[17-20], 本文提出了一系列改进的分析方法, 即以 A_{600} 光密度为观测值, 以 hyperbola 生长方程非线性回归方法平滑数据, 然后微分求得瞬时速率和瞬时增量, 以此 2 个参数为目标函数表征菌群增长动力学过程, 以单指数衰减方程拟合瞬时速率. 瞬时增量的拟合因接种量的不同而异, 接种量小时适于拟合单指数衰减方程, 而接种量大时则适于拟合双指数结合方程, 由此可进一步推导出菌群增长的倍增时间和体积生产效率等参数.

研究表明, 以菌群增长的瞬时速率为目标函数, 可准确表征由分裂细胞形成的生物量, 是分析菌群增长过程曲线的必要条件, 这使得应用传统的 logistic 方程和 Monod 方程拟合菌群增长遇到的主要困难也由此得以解决. 表 2 给出了由本文提出的方法与经典的 logistic 方法表征菌群生长动力学过程的对比. 应用不同菌株和不同培养条件的实验正在进行中, 以进一步证实本方法的普适性.

表 2 表征菌群生长动力学过程的瞬时速率法与经典的 logistic 方程法的比较

	瞬时速率法	logistic 方程法
建模依据	指数衰减方程和指数增长模型拟合瞬时速率和瞬时增量曲线	hyperbola 方程拟合正切双曲线
目标函数	瞬时速率、瞬时增量	$B_{\max}, K_d$
计算方法	观测数据先进行平滑以得到连续可微分的连续曲线	直接以观测值为依据进行拟合
误差来源	观测值的随机误差经平滑后可减低	取决于观测的精密密度
自变量/因变量间的函数关系	自变量为时间过程, 因变量为过程函数, 只作为进一步分析的数据	自变量为底物浓度, 因变量为估测的瞬时速率, 直接导出 $B_{\max}, K_d$ 等参数
应用	生长过程曲线划分为指数增长和指数衰减 2 个阶段, 不存在生长的稳态期, 只有最大瞬时增量时刻的转折点可准确计算出倍增时间及体积生产效率等参量	生长过程分为延迟期、指数期、稳定期以及衰亡期 4 个阶段

参考文献

- 1 Bazin M. Mathematics in Microbiology. London: Academic Press, 1983. Chapter 2
- 2 Turanyi T, Berces T, Vajda S. Reaction rate analysis of complex kinetics systems. *Int J Chem Kinet*, 1989, 21: 83–99
- 3 Tsuchiya H M, Fredrickson A G, Aris R. Dynamics of microbial cell populations. *Adv Chem Eng*, 1966, 6: 125–206
- 4 Ramkrishna D. Statistical model of cell populations. *Adv Biochem Eng*, 1979, 11: 1–47
- 5 Neidhardt F C. Bacterial growth: constant obsession with dN/dt . *J Bacteriol*, 1999, 181: 7405–7408
- 6 Ferenci T. Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res Microbiol*, 1999, 150: 431–438
- 7 杨纪珂, 齐翔林, 陈霖. 生物数学概论. 北京: 科学出版社, 1982. 第 16 章
- 8 Chemov N, Lesort C, Simanyi N. On the complexity of curve fitting algorithms. *J Complexity*, 2004, 20: 484–492
- 9 洪楠. Logistic 曲线参数的一个最佳估算方法. *生物数学学报*, 1994, 9: 148–152
- 10 Zervos C. On the validity of using semilogarithmic plots to determine initial velocity of enzyme-catalyzed reactions. *J Theor Biol*, 1975, 50: 253–258
- 11 Allison R D, Purich D L. Practical considerations in the design of initial velocity enzyme rate assays. *Methods Enzymol*, 1979, 63: 3–22
- 12 Hibino T. Nonfixed relationship of the Michaelis constant and maximum velocity with their corresponding rate constants. *J Biol Chem*, 2005, 280: 30671–30680
- 13 Kuo Y H, Scm M S. Extrapolation of correlation between 2 variables in 4 general medical journals. *JAMA-J Am Med Assoc*, 2002, 287: 2815–2817
- 14 唐启义, 胡国文, 冯明光, 等. Logistic 方程参数估算中的错误与修正. *生物数学学报*, 1996, 11: 135–138
- 15 Hu Z S, Fu W J, Gao P J. Discussion and development on Cui-Lawsons model of single-species population. *J Biomath*, 1990, 5: 94–101
- 16 Norris J R, Robbins D W. *Method in Microbiology*. Volume 1. London and New York: Academic Press. Part I, Part VIII
- 17 张怀强, 刘玉庆, 高培基, 等. 分批培养条件下细菌群体生长阶段的区分及生长参数的确定. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 502–512
- 18 刘玉庆, 张怀强, 高培基, 等. 大肠杆菌群体的生理异质性的对药敏实验的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 524–529
- 19 张怀强, 卢丽丽, 高培基, 等. 细菌群体异质性对生长动态过程的影响及其表征. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 246–256
- 20 张怀强, 赵越, 高培基, 等. 构建大肠杆菌药敏试验新方法的探索. *中国科学: 生命科学*, 2010, 11: 75–85
- 21 Wang L S, Zhang Y Z, Gao P J. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93: 443–456
- 22 Wu B, Zhao Y, Gao P J. Estimation of cellobiohydrolase I activity by numerical differentiation of dynamic ultraviolet spectroscopy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2006, 38: 372–378
- 23 Wu B, Wang L S, Gao P J. The combined effects of temperature and assay time on the catalytic ability and stability of 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase I. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 43: 237–244
- 24 Zhang H Q, Wang L S, Gao P J. Use of the contour approach for visualizing the dynamic behavior of intermediates during O-nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolysis by β -galactosidase. *Process Biochem*, 2009, 44: 1374–1380
- 25 Wang L S, Zhang Y Z, Gao P J. A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China Life Sci*, 2008, 51: 620–629
- 26 Bothe D. Instantaneous limits of reversible chemical reactions in presence of macroscopic convection. *J Differ Equations*, 2003, 193: 27–48
- 27 Bronshtein I N, Semendyayev K A. *Handbook of Mathematics*. 4th ed. New York: Springer-Verlag, 2004
- 28 Parchevsky K V, Parchevsky V P. Determination of instantaneous growth rates using a cubic spline approximation. *Thermochim Acta*, 1998, 309: 181–192
- 29 Maccallum K J, Zhang J M. Curve-smoothing techniques using S-spline. *Computer J*, 1986, 29: 564–569
- 30 丛威, 欧阳藩. 微生物代谢的唯象关系和趋优行为. *化工学报*, 2000, 51: 643–648
- 31 刘实. 液态培养基内跟踪细菌生长和一个新的细菌生命模式. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 1999, 29: 571–579
- 32 Elfving A, LeMarc Y, Baramyi J. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 675–678
- 33 Tyrcha J. Age-dependent cell cycle models. *J theor Biol*, 2001, 213: 89–101
- 34 Henson M A. Dynamic modeling of microbial cell populations. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 460–467
- 35 Spratt B G, Maiden M C T. Bacterial population genetics, evolution, and epidemiology. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 1999, 354: 701–710
- 36 Field R J, Noyes R M. Oscillatory chemical reactions. *Ann Rev Phys Chem*, 1974, 25: 95–119

- 37 Duboc P, Stockar U. Modeling of oscillating cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of population structure and expansion kinetics based on on-line measurements. *Chem Eng Science*, 2000, 55: 149–160
- 38 Mallette M F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: Norris J R, Ribbons D W, eds. *Method in Microbiology*. London, New York: Academic Press, 1969. 552–556
- 39 Perkampus H H, Grinter H C, Threlfall T L. *UV-Vis Spectroscopy and Its Application*. Berlin: Springer-Verlag, 1992
- 40 Motulsky H J, Christopoulos A. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. New York: Oxford University Press, 2004. 134–159
- 41 Quinn G P, Keough M J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologist*. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 2002
- 42 Haefner J W. *Modeling Biological System: Principles And Application*. 2nd ed. New York: Springer Science+Business Media, Inc, 2005. Part 1 and 2
- 43 宋霞, 谭远德, 宋明等. 具有初始效应的 Logistic 方程. *生物数学学报*, 1996, 11: 160–166
- 44 Duan X Y, Liu S Y, Gao P J, et. al. Volumetric productivity improvement for endoglucanase of *Trichoderma pseudokoingii* S-38. *J Appl Microbiol*, 2004, 96: 772–776
- 45 Dym C L. *Principles of Mathematical Modeling*. 2nd ed. San Diego, London, Burlington: Elsevier Academic Press, 2004. Chapter 8
- 46 Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 2002, 32: 496–501
- 47 金建玲, 杨维强, 高培基, 等. 突变率计算中细菌群体生长不同步系数的修正. *微生物学通报*, 2009, 36: 446–452
- 48 Harrington P B, Urbas A, Tandler P J. Two-dimensional correlation analysis. *Chemom Intell Lab Syst*, 2000, 50: 149–174

A New Method for Estimating Growth Behavior of Bacterial Population under Restrictive Culture Conditions

ZHANG HuaiQiang, GONG WeiLi, ZHAO Yue & GAO PeiJi

State Key Laboratory of Microbial Technology, College of life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China

According to the changes in optical density (A_{600}) of *E. coli* population in shake flask-culture and ferment culture and by using an improved data-smoothing method and then differential derivation, the two kinetic parameters, instantaneous rate (v_{inst}) and instantaneous increment (v_{inc}), as response variable were estimated and could be used to accurately characterize the kinetics of bacterial population growth. The v_{inst} showed exponential decay pattern, while the kinetic pattern of v_{inc} varied and depended on the inoculum's size. In either case for v_{inst} or for v_{inc} , the kinetic curves appear neither delay period nor stable period. In fact, the pattern of kinetic growth curve were determined by the number of cells under division status, which was the result of the interaction between endogenous growth ability (which is from the continuous cell-cyclic division) and exogenous growth inhibitory force (caused by the decreased nutrients and increased metabolites). In addition, based on the dividing pattern of bacterial cell, another response variable, doubling time (Q), was also used to express the endogenous kinetic behavior. And then a bioengineering parameter, volumetric productivity, can be calculated according to the instantaneous increment (v_{inc}). This research can provide an effective mathematical analysis to resolve the problems of uncertainty in using logistic and Monod equation to fit the growth curve of *E. coli*.

instantaneous rate, instantaneous increment, kinetics of bacterial growth, doubling time, volumetric productivity

doi: 10.1360/052013-238