

细菌群体异质性对生长动态过程的影响及其表征

张怀强 卢丽丽 阎雪岚 高培基*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 在经典的表征群体生长的 Logistic 方程中, 假定群体中每个个体都是同质的. 解方程时的初值仅限定为 $N(t_0) = N_0$, 因此, 对 N_0 相同而生理状态不同的接种物的生长动态不能区分. 事实上, 在菌群生长的任一时刻, 只有一定比例的细胞在进行分裂(设为 θ), 这样, $\frac{dN}{dt}$ 不仅由 N , 而且

实际上由 N 和 θ 共同决定. 因此, 解方程的初值条件还应加入 $\theta(t_0) = \theta_0$, 而这又被在构建生长方程时所忽略, 但这一附加条件使 Logistic 方程的求解甚为复杂. 基于细菌生长过程的瞬时生长速率 V_{inst} 的时间过程曲线都呈 Gauss 分布形状这一特点, 在用瞬时生长速率成功地表征限制性条件

下区分群体生长阶段的基础上, 进一步用 Gauss 分布近似函数表达式 $\left(Y_i = ae^{\left[-0.5 \left(\frac{x_i - x_0}{b} \right)^2 \right]} \right)$ 以求得异质性群体的生长参数, 这些参数可真实地表征不同生理状态细菌群体的生长动态, 为微生物学基础研究和在生物工程等方面的应用提供了一个新方法. 在此基础上提出了一个估算细菌群体生长延迟期和群体倍增时间的新方法.

关键词 Logistic 方程 瞬时生长速率 生长动态 延迟期 倍增时间

已有的研究工作表明, 在营养和生存空间受到限制的培养条件下, 细菌群体均表现为动态的生长行为. 瞬时生长速率能精确地表征出群体生长的动态信息 [1]. 我们的前期工作依据分批培养条件下 *E. coli* 生长的瞬时速率, 可将细菌生长的动态过程划分为加速生长期、恒速生长期、减速生长期和衰亡期 4 个阶段 [2].

Holmström 和 Tolker-Nielsen 近来的研究表明, 不同生长状态下鼠沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 细胞中, 特异性 mRNA 含量不同, 它们的不同表达造成了群体组成的异质性 [3,4]. 众多实验也发现, 以相同数量但不同生理状态的细胞接种培养时, 其群体生长的动力学过程不同 [5~7]. 但因为广泛应用的经典生长模型都把单种群细菌群体视为均质体系 [8~10], 因

此, 菌群异质性对生长动态过程的影响及其表征一直被忽视. 事实上, 均质性细菌群体仅是假定的理想化状态, 真正的均质细菌群体并不存在. 单种群细菌群体的异质性源于基因突变、局部生存环境的改变, 以及细胞周期的运行等诸多方面 [11]. 在实验室和工业发酵培养条件下, 即使是同基因型细菌产生单种群的细菌群体在组成上都是异质的 [12,13]. 但这种差别对菌群生长过程造成的影响都很少引起注意, 这与缺少一个准确表征群体生长动力学的方法有关.

在一定的生存环境中, 细菌会选择特定的生存方式与生存环境的变化协调一致 [6], 所以在限制性培养条件下细菌群体规律性地表达出不同的生理状态, 正是群体组成异质性的集中反映. 因此, 我们选择处于不同生理状态下的 *E. coli* 的群体, 研究造成细菌群

收稿日期: 2006-10-16; 接受日期: 2006-11-06

国家自然科学基金项目(批准号: No30370013)和国家重大基础研究项目(973) (批准号: CB719702)资助

* 联系人, E-mail: gaopi@sdu.edu.cn

体生长动态差异的机制和对其准确表征的方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

鸡致病性大肠杆菌 *E. coli* CVCC249, 由中国兽医微生物菌种管理保存中心提供。

1.2 实验方法

(1) 悬滴培养法测定活细胞数(colony forming units, CFU)^[14,15]: 菌株 *E. coli* CVCC249 接种于含 5 L LB 液体培养基的 10 L 发酵罐中, 37℃ 条件下培养, 每间隔 1 h 取样, 样品稀释液 10 μL 悬滴至预先干燥的 LB 琼脂平板, 将平板 37℃ 倒置培养 12 h, 统计各悬滴形成的菌落数。样品测试至少为 3 次重复, 变异系数(coefficient of variation, CV) 小于 5%(对此, 图、表中不再标注)。

(2) 激光共聚焦扫描显微镜观察菌群内的死/活细胞: 取培养物 3 mL, 装于 5 mL 离心管, 用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液离心洗涤 10 min 后, 制成菌悬液。取 500 μL 菌悬液, 加入 5 μL 噻唑橙(TO)染液和 5 μL 碘化丙啶(PI)染液, 置于暗处染色 15 min 后涂片, 并用 TCS-SP2(Leica)型激光共聚焦显微镜分别在 488 和 543 nm 激发下扫描观察。

(3) 流式细胞仪检测群体中死活细胞比例的变化^[16]: 将定时取样的细胞悬液 3 mL 分装于 5 mL 的离心管中, 离心 10 min 后, 用 PBS 缓冲液洗涤, 制成菌悬液。取 500 μL 菌悬液于流式细胞仪专用的塑料管中, 加入 5 μL 噻唑橙(TO)染液和 5 μL 碘化丙啶(PI)染液, 再加入 50 μL 液体荧光微球计数珠, 置于暗处染色 15 min 后, 用 BD FACS™ 型流式细胞仪测定。

(4) 噻唑蓝(MTT)比色法测定群体细胞还原 MTT 的活性^[17,18]: 将定时取样的细胞分装 3 组试管, 每管 0.4 mL。每组管分别加入 40 μL 噻唑蓝(5 mg/mL), 轻轻振荡, 并置于 37℃ 下保温 2 h 后, 每管加入二甲亚砜(DMSO) 1.3 mL, 轻轻振荡, 37℃ 保温 30 min, 每管添加生理盐水 1.5 mL, 混合均匀, 用 GENESYS™ 6 Spectrophotometer 测定 $A_{510\text{ nm}}$ 。用等体积的 5% 的甲醛处理 30 min 灭活的细胞悬液作为对照。酶活力单位定义为: 37℃ 下, 60 min 内 1 mL 细胞还原噻唑盐形成的甲臍在 510 nm 下的光吸收定义为 1

个酶活单位。

1.3 用样条插值法光滑观测实测数据以逼近生长过程的真值

通常用生长模型拟合实验数据时, 对分段采集的数据, 并未进行数据光滑处理, 而是把观测值作为真值来对待, 直接用求得残差平方和最小的非线性回归拟合方法, 这类整体拟合方法, 为得到最小残差平方和, 拟合曲线则不必通过原数据点, 以此为据求其 1 阶导数(即瞬时生长速率)会失真, 这样菌群快速生长阶段的特点也易于被“平滑”掉^[2]。

本实验应用 3 次样条法对观测数据进行平滑, 即对相继数据点之间进行 3 次多项式回归, 结点值的误差不会因插值计算而扩散, 因而能真实地反映波动, 表征的信息也比较丰富和完整。样条插值计算采用 MATLAB 计算软件中的 Spline 程序^[19], 为减少误差, 增加了采样密度。

2 结果

2.1 接种物生理状态的差异对生长动态的影响

图 1 给出了以相同 N_0 (以活细胞数 $\text{CFU}=1\times 10^5$ cfu/mL 计)的指数生长期和稳定期细胞为接种材料时, 菌群瞬时生长速率图谱。由图示可看出, 两菌群有近于相同的最大瞬时增殖速率。但所不同的是当接种材料为指数生理状态时, 群体初始生长速率明显高于稳定期为接种物的菌群, 且菌群达到最大瞬时速度的时间也较短, 但结束生长的时间也较快。

以相同浊度接种量(以浊度值 $A_{600\text{ nm}}=0.04$ 计)但生理状态分别为指数生长期和稳定期的培养物作为接种材料时, 它们的瞬时生长速率图谱见图 2。不难看出, 通过浊度法求得的瞬时速度的生长过程曲线的变化趋势与图 1 相似, 但指数期细胞为接种物的菌群最大生长速率却低于稳定期细胞为接种材料的结果。同时稳定期接种物的生长过程明显滞后。因 CFU 统计的是可分裂细胞的数量, 而 $A_{600\text{ nm}}$ 浊度值则代表菌液总菌数, 包括已不能进行分裂的细胞, 这种差异显然是造成菌群生长动力学曲线不同的原因。

由于活细胞数的检测比较费时, 误差也较大, 得到变异系数 $\text{CV}<5\%$ 的结果更需要熟练的操作技术。而浊度法的测定却易于进行, 且误差也较小, 因此, 对细菌菌群生长动力学的研究多沿用浊度测定方法。

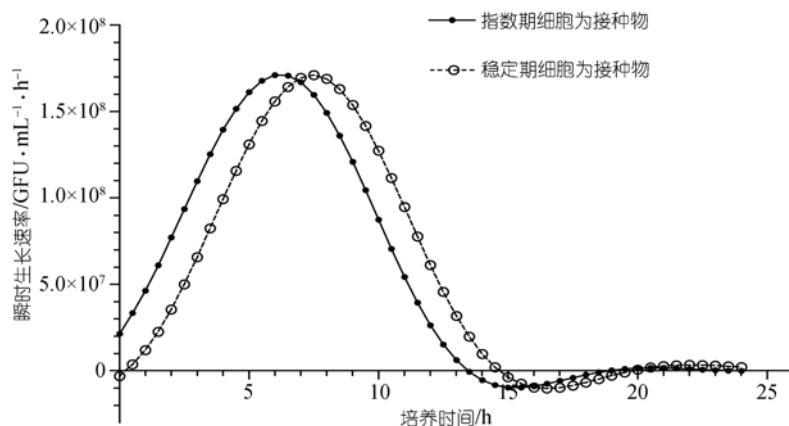


图 1 N_0 相同的 2 种接种物(以 CFU 计)瞬时生长速率的比较

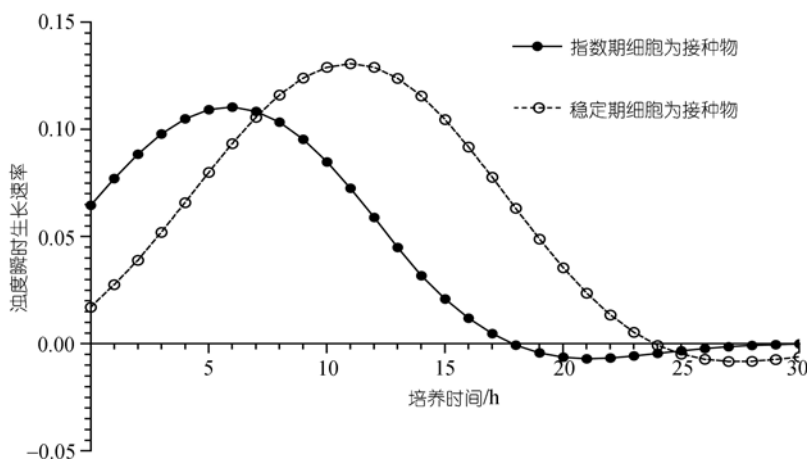


图 2 2 种接种物(以浊度计)瞬时生长速率的比较

以相同 N_0 值(以 $A_{600\text{ nm}} = 0.04$ 计)但生理状态分别为加速、恒速、减速和衰亡 4 个动态生长阶段上的细胞为接种材料进行分批培养时^[2], 它们的瞬时生长速率图谱见图 3. 图示表明, 加速生长期细胞进入和结束分裂的时间都最早, N_0 为衰亡期细胞时, 群体生长的起始和结束的时间最迟, N_0 为恒速期细胞和减速生长期细胞时, 菌群增殖速率则处于中间位置. 加速期细胞再增殖的最大生长速率明显低于其他几种情况. 用指数生长期细胞、稳定期细胞及二者混合液(1:1)为接种材料时, 也得到上述类似的结果, 但菌群的最大瞬时生长速率也以指数期细胞为接种物的群体时最低, 见图 4.

2.2 菌群内活细胞/死细胞共存的激光共聚焦扫描观察

图 5 给出了菌群内活细胞/死细胞共存的激光共

聚焦扫描观察的结果. 如图所示, 红色荧光点代表被 TO 染色的活细胞, 而绿色则表示被 PI 着色的死细胞. 不同生理状态下的样品都存在这两类着色不同的细胞, 这是细菌菌群内的细胞都具异质性特点的一个确证. 但此直接观察法只能显示两类细胞的存在, 却不能对菌群内活/死细胞的相对比例进行定量测定.

2.3 菌群内活细胞/死细胞比率的定量测定及其与生长动态过程相关性的分析

图 6 给出了 *E. coli* CVCC 249 加速、恒速、减速和衰亡 4 个不同生长阶段上的菌群内活细胞/死细胞的流式细胞仪检测的散点图(FL1 对 FL3 作图^[16]). 如图所示, R1 为荧光微球, 为设定的参比对照, R2 为 TO 染色区, 该区代表活细胞, R3 为 PI 染色区, 该区由死细胞组成. 散点图上各区间界限较为清晰, 这说明通过 TO 和 PI 两种不同的荧光染料染色, 可辨别菌

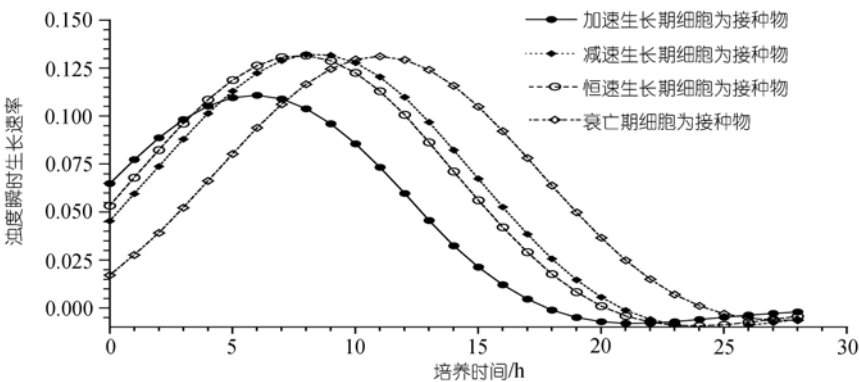


图 3 4 种不同接种物(以浊度计)瞬时生长速率的比较

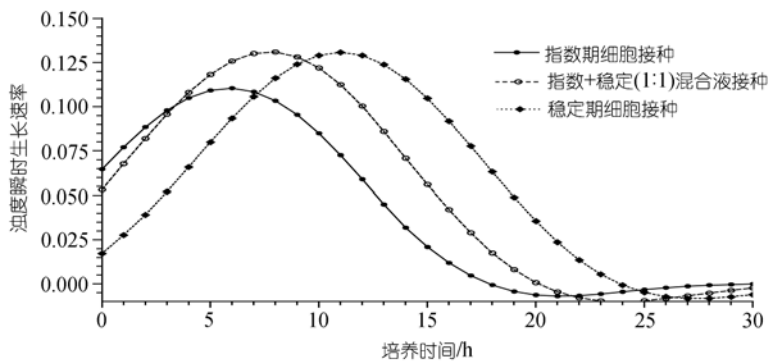


图 4 3 种不同接种物(以浊度计)瞬时生长速率的比较

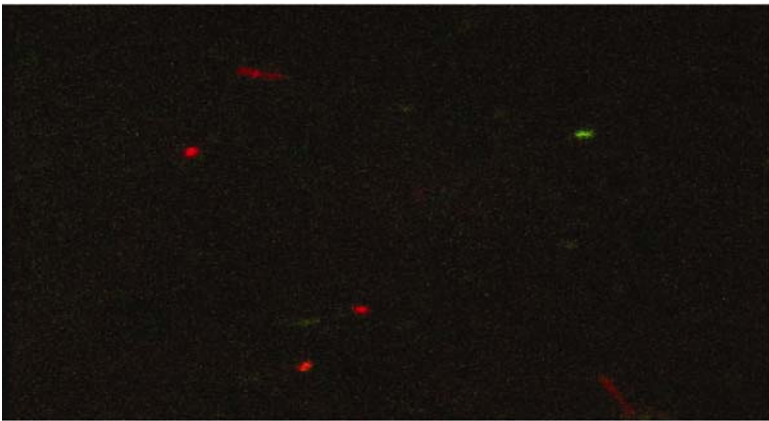


图 5 *E. coli* CVCC 249 菌群内活/死细胞激光共聚焦扫描观察图
红色区域为 TO 染色区, 代表活的细胞; 绿色区域为 PI 染色区, 代表死细胞

群内的活细胞和死细胞. 流式细胞仪可给出活细胞、死细胞数量的统计结果(表 1), 由此可算出菌群内活细胞、死细胞的相对比率. 图 7 给出了菌群内活细胞/死细胞的比率与生长动态过程间的相关性分析图谱, 结果表明, 菌群瞬时生长速率与菌群活细胞/死细胞的比率呈高度正相关性($P<0.001$), 即群体中死细胞的比率越小, 瞬时增殖速率则越快.

2.4 菌群内脱氢酶活性与生长动态过程的相关性分析

已有的研究表明, 细菌群体的脱氢酶(DHE)活力与生长过程有关, 但尚未见其相关性分析的报道 [\[17\]](#). 图 8 和 9 的结果表明, 无论是指数期细胞为接种物还是休止细胞为接种物, 菌群脱氢酶比活性的动态变化与菌群瞬时生长速率都呈高度正相关性($P<0.001$).

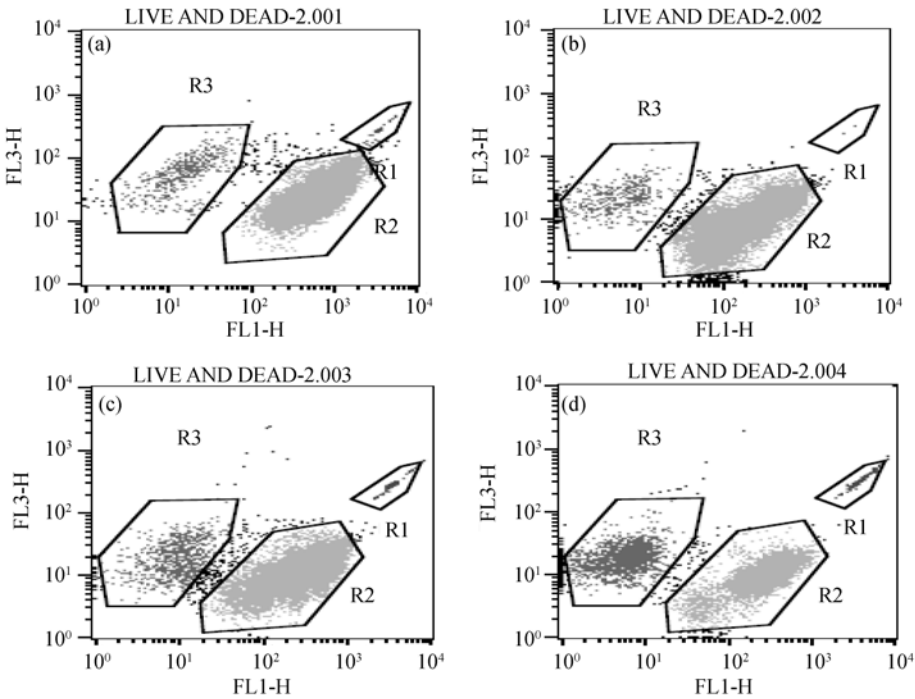


图 6 不同生长速率时, *E. coli* CVCC 249 群体中死活细胞的流式细胞仪检测的散点分布图
(a) 加速生长的培养物; (b) 恒速生长的培养物; (c) 减速生长的培养物; (d) 零速生长的培养物. R1 为荧光微球, R2 为被 TO 染色的活细胞区域, R3 为被 PI 染色死细胞区域

表 1 流式细胞仪给出的群体内活细胞/死细胞的统计结果(仅列出图 6(a)中的培养物数据(b)~(d)略去)

区域	区域内颗粒数	设门内含颗粒百分数/%	占总颗粒数的百分比/%	FL1-H 平均值	FL3-H 平均值
R1	86	0.57	0.57	3516.94	267.43
R2	14279	95.19	95.19	658.01	28.60
R3	476	3.17	3.17	19.57	67.27

R1 为荧光微球, R2 为被 TO 染色的活细胞区域, R3 为被 PI 染色死细胞区域

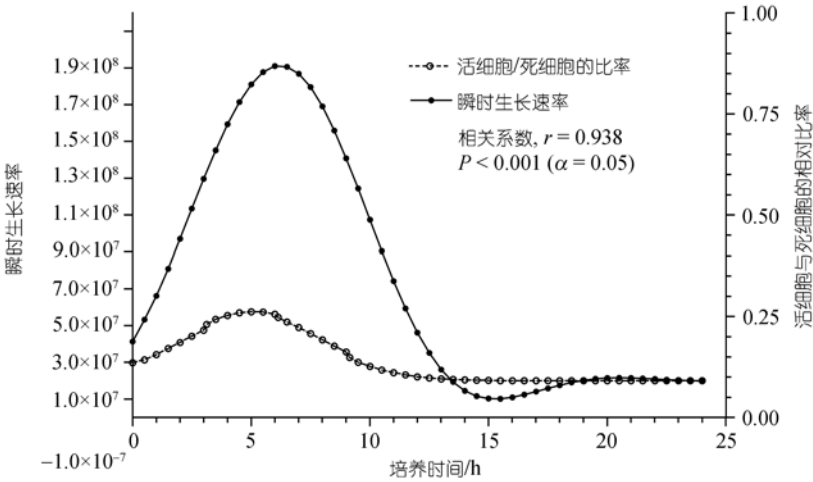


图 7 菌群瞬时生长速率与菌群内活细胞/死细胞比率的相关性分析

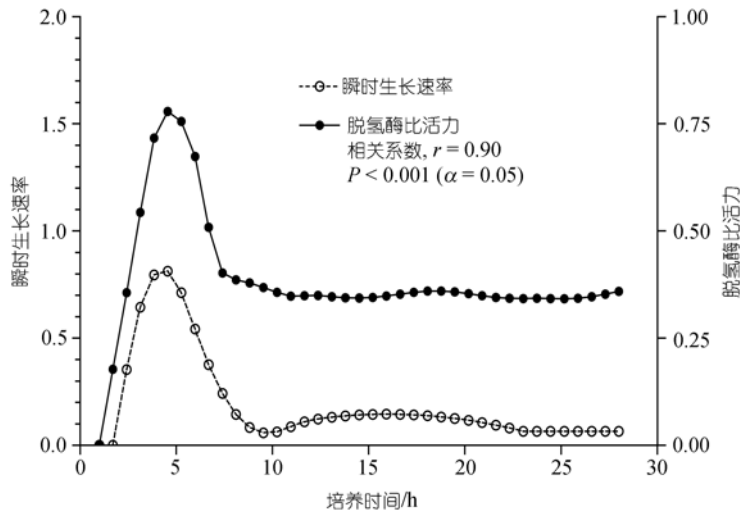


图 8 稳定期细胞增殖后的菌群瞬时生长速率与菌群内脱氢酶比活力的相关性

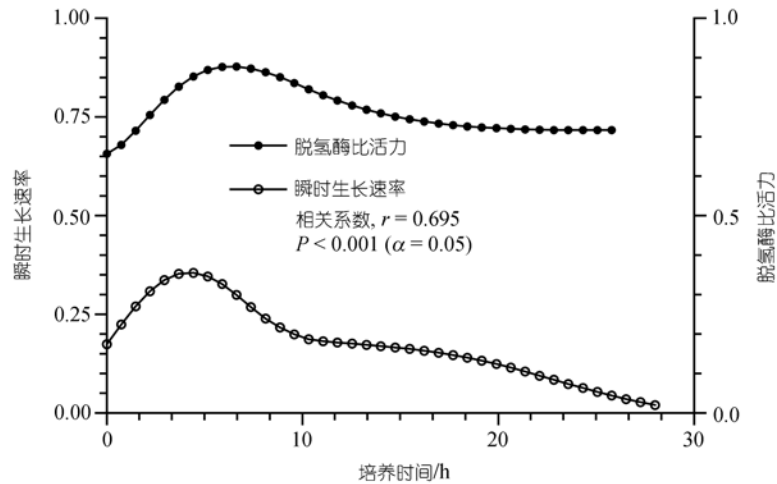


图 9 指数期细胞增殖后的菌群瞬时生长速率与菌群内脱氢酶比活力的相关性

因脱氢酶活性检测的灵敏性较高, 这为分析异质性细菌群体生长动力学提供了更为方便的方法。

2.5 估测群体生长的延迟期

张怀强等人^[21]依据瞬时生长速率(V_{inst})曲线上拐点的位置, 对细菌群体生长过程给出了不同生理阶段的精确区分, 但并未给出细菌群体增殖的延迟时间, 即生长的延迟期。与其他群体生长参数相比, 延迟期的估测一直是较为难以解决的问题^[20~22]。无论从微生物学的理论研究还是生物工程的应用需要, 都希望提出一个解决这一难题的方法。从数学分析上看, 把 V_{inst} 出现大于零的时刻视为延迟期的结束应是合理的。但由于受检测灵敏度的限制, CFU, 浊度

等生物量的起初增长都不易被观察到, 且测定误差也较大。由于指数期细胞为接种材料时的 V_{inst} 在时间 $t = 0$ 时, 菌群已表现出增长, 所以, 用菌群增长的开始点来表征延迟期结束的方法, 既不符合菌群增殖过程, 也无法进行生长延迟时间的准确测算。根据 V_{inst} 随时间不断变化的特点, 我们认为选择达到最大 V_{inst} 1/4 的时刻(即最大加速生长速率 V_{acce} 的 1/2)作为延迟期的结束点, 应是可行而又准确的方法。它既有明确的生物学含义, 即表明群体由此时已确定进入指数生长期, 又易于测算(即对 V_{inst} 再求导得到 V_{acce} 即可)。如图 10 所示, 以指数期细胞为接种材料时, 其延迟期的结束在 1.2 h 左右, 而以稳定期细胞为接种材料时, 其延迟期的结束在 2.5 h 左右。

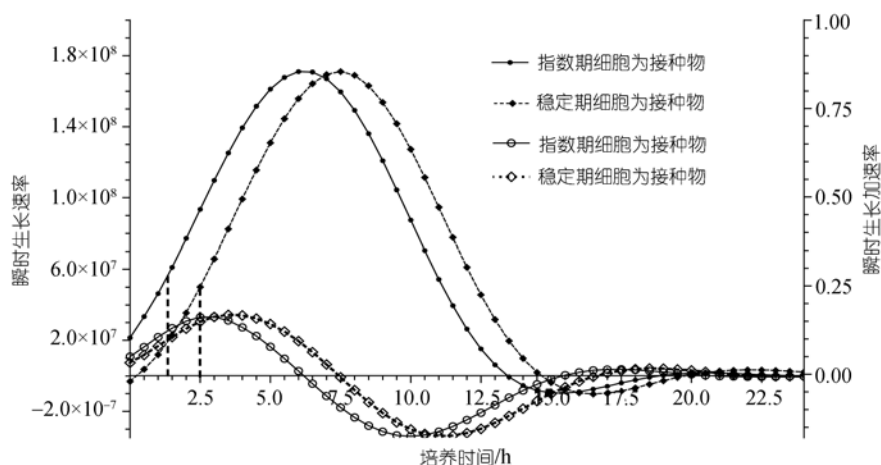


图 10 不同接种材料时 *E. coli* CVCC249 菌群增殖的延迟时间

2.6 群体倍增时间或代时的估算

从单细胞角度考虑, 代时(T)为一个细菌分裂的周期, 在表征群体生长时, 代时被定义为群体量的倍增时间, 用 $T = \frac{\ln 2}{\mu}$ 计算代时则是通常例行的方法.

但由于对比生长速率(μ)含义认识的分歧, 导致估算代时的方法也各异. 经典生长方程中 μ 为群体的生长速率常数, 或称为“内禀增长率”, 它为一均值, 应是一个经验性的参数 [23]. 实际上是 $1/2 B_{\max}$ 点的斜率, 由于 $B_{\max}$ 通常为外推值, 这样, μ 的真实性就常常被质疑 [2]. 事实上, 群体的倍增时间是不断变化的, 它是时间的函数 [24].

根据细菌群体在分批培养条件下生长速率不断变化的特点, 高培基等人把 μ 定义为“单位菌体的瞬时生长速率”, 即 $\mu = \frac{V_{\text{inst}}}{N_{\text{net}}}$, 其中 N_{net} 为群体瞬时增量,

与经典方程中定义的“生物种群增殖率” $\frac{dX}{Xdt}$ 同义 [10],

X 为种群密度. 由此可把群体的倍增时间表征为

$$T = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{N_{\text{net}}}{V_{\text{inst}}} \times 0.693. \quad \text{图 11 和 12 给出了用上式计算的}$$

的 *E. coli* CVCC 249 的生理状态对菌群倍增时间影响, 结果表明, 菌群生长的倍增时间是培养时间的函数, 而并非是一般认为的常数.

CFU 法估计群体倍增时间的结果与 V_{inst} 过程曲线的变化趋势基本相符, 即在培养初始阶段, 指数期细胞为接种材料的样品, 群体倍增时间(T)较短, 10 h

后逐渐延长. 而稳定期为接种材料的样品, 在 10 h 前 T 的变化不大, 10~15 h 期间 T 减小, 15 h 后则逐渐延长, 显示了生长增速过程滞后的特点(图 11), 这与 V_{nst} 和 V_{acce} 的时间过程曲线的变化趋势基本一致(图 10). 但用 $A_{600 \text{ nm}}$ 法检测和估算时, 指数期细胞接种的结果与 CFU 法接近, 而稳定期材料的 T 则显著增长(图 12), 显然, 这正是由于大量无分裂能力的细胞也进入分析数据的结果. 所以, 用浊度法测定 T 将无法得到真实的结果.

2.7 异质性细菌群体生长过程动态性的准确表征

上述实验结果表明, 处于不同生理状态下, 菌群内可分裂细胞的比值和脱氢酶(DHE)的比活力是各不相同的. 但它们与菌群的瞬时生长速率(V_{inst})有高度的正相关性. 然而, 当用广泛应用的 Logistic 方程拟合实测实验数据时, 尽管可以得到很好的拟合效果($R^2 > 0.95$), 但这两种不同生理状态的接种材料的最大生长量 k 和生长速率 μ 都显示不出差别来, 如图 13 和表 2 所示, 这恰是微生物群体生长模型构建时常被忽略的问题. 用 Gompertz 和 Richards 方程拟合时, 所得结果与 Logistic 方程相似(图表略).

分析导致 Logistic 方程中的各参数无法准确表征异质性群体生长动态差异性的原因如下: Logistic 方程构建时, 假定 $\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{k}\right)$, $N(t_0) = N_0$, 其解

$$\text{则为: } Nt = \frac{k}{1 + ae^{-\mu t}}, \text{ 反映了 } Nt \text{ 随时间呈 S 型曲线}$$

变化的关系, 式中的 a 为积分常数, $a = IN \left(\frac{k}{N_0} - 1\right)$.

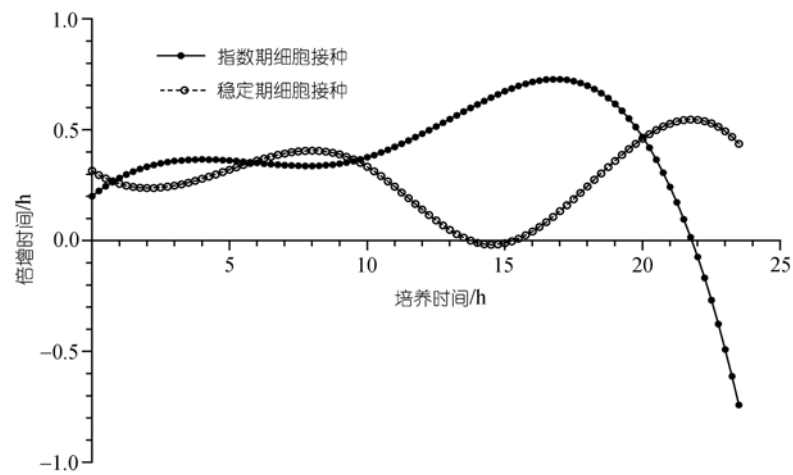


图 11 CFU 法估测 *E. coli* CVCC249 菌群的倍增时间

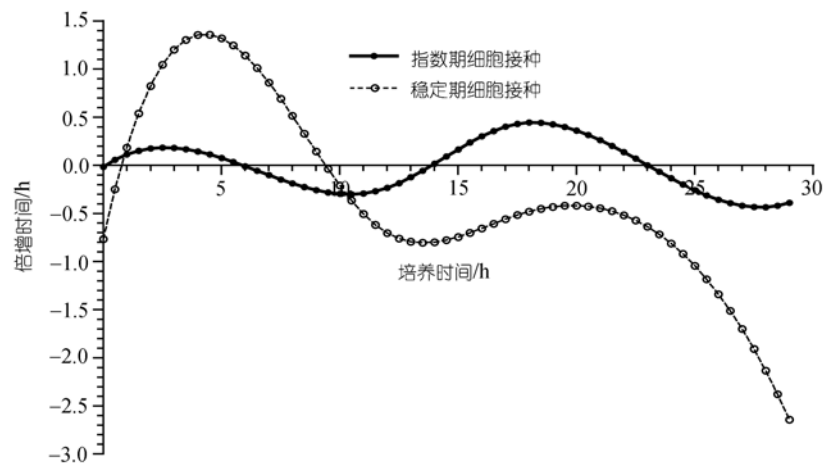


图 12 菌液浊度法估测的 *E. coli* CVCC249 菌群增殖的倍增时间

表 2 *E. coli* CVCC 249 生长参数的比较(Logistic 方程拟合的结果)

生长参数	指数期细胞为接种物	稳定期细胞为接种物	<i>t</i> 测验
R^2	0.993	0.993	
k	116325588±10198022	1161772396±10995293	$t = 0.67 < t(49)_{0.05} = 2.006$ 无差异
μ	1.18262±0.0979	1.16372±0.09925	$t = 0.68 < t(49)_{0.05} = 2.006$ 无差异
a	1488±901	5154±3754	$t = 4.75 > t(49)_{0.01} = 2.668$

R^2 为拟合度检验系数, k 表示最大饱和生物量(cfu/mL), a 为积分常数, μ 为比生长速率. 所有参数来自于 Logistic 方程($N = k/(1 + ae^{-\mu t})$)对生长过程曲线的拟合, 数据来自图 13

这样, 当初值 N_0 的值确定之后, 参数 k 和 μ 也就被决定了, 但 N_0 的异质状态则没有体现. 对 Logistic 方程修正后得出的众多方程, 恰好也在初值的选定这一点上都采取了同样的策略, 即把 N_0 作为同质群体对待. $N(t_0) = N_0$ 的初值仅考虑 N_0 的数值, 而忽略了可影响生长动力学过程的初值的状态. 如在 Gompertz 方程($\frac{dN}{dt} = \mu N e^{-st}$)中加入衰减参数 s , 以

及在 Richards 方程($\frac{dN}{dt} = \mu N^m - kN$)中加入调整曲线曲率的参数 m 等都是如此. 上述经典方程中的 s, m 等参数的加入仅增加了模型的柔性, 可使模型有更为广义的形状以适合 Nt 的变化, 它们同样也都未能对 N_0 的异质性做出描述, 这必然导致不能真实描述 N_0 相同但生理状态不同的菌群的生长特性.

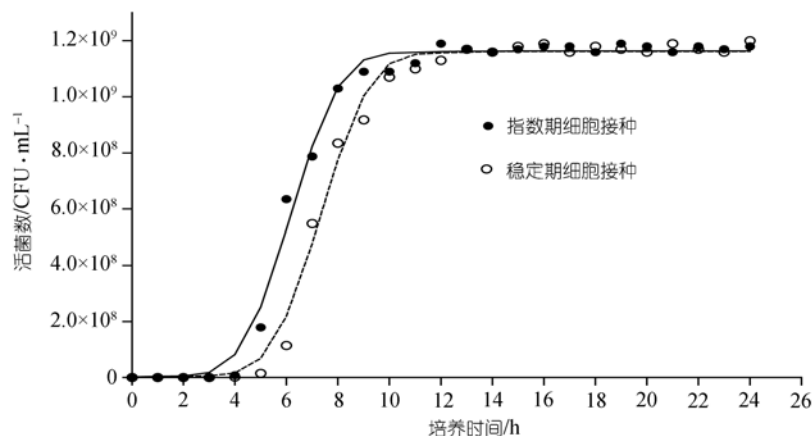


图 13 Logistic 方程拟合的 *E. coli* CVCC249 生长过程曲线
实线代表指数细胞为接种物, 虚线代表稳定期细胞为接种物, 接种量都为 1×10^6 CFU/mL

图 6~9 的结果清楚表明, $\frac{dN}{dt}$ 不仅取决于群体存在量 Nt , 而且取决于正在进行分裂的细胞数, 或者脱氢酶的比活力, 或其他与 $\frac{dN}{dt}$ 同步变化的生理指标.

如果用 θ 代表 Nt 中正在进行分裂的细胞比值, 而 $(1-\theta)$ 则为不能进行分裂的细胞比例数, 且 θ 是瞬时改变的. 因此, $\frac{dN}{dt} = \frac{dN\theta}{dt} + \frac{dN(1-\theta)}{dt}$, 该方程的积分条件为:

$\begin{cases} N(t_0) = N_0 \\ \theta(t_0) = \theta_0 \end{cases}$. Logistic 等方程却未考虑 θ ,

或默认 $\theta = 1$, 于是初值积分条件就只有 $N(t_0) = N_0$.

这样, $Nt = \frac{k}{1 + ae^{-\mu t}}$.

考虑加上另一初值 $\theta(t_0) = \theta_0$ 时, 由于 Nt 和 θ 的量纲不一致, 方程的解则十分复杂, 即 $N = N\theta - N(1-\theta) + C$, $N\theta = a(1 + C_1e^{-\mu t})^{-1}$, $N(1-\theta) = b(1 + Ce^{-\mu t})^{-1}$. 与其类似, 宋霞等人观察到植物原生质体细胞增长有初值效应, 是由培养条件造成的细胞的逐渐死亡

过程而引起, 并用 $Nt = \frac{k}{1 + e^{(a-gt)}}(1 - e^{-\frac{gt}{b}}) +$

N_0e^{-gt} 来描述, 但参数的求解也很复杂 [26].

由实验数据直接得到的结果表明, 在不同生理状态下, 菌群的活细胞比值和脱氢酶的比活力都与其瞬时生长速率呈高度正相关(图 7~9), θ 值的不同对菌群生长过程的影响, 已体现于群体瞬时生长速率的变化中. 因此, 群体的异质性和对生长过程的影响完

全可用瞬时生长速率 V_{inst} 来表征.

图 1~4 都表明瞬时生长速率均为典型的 Gauss 分布曲线. 标准 Gauss 方程是以密度分布函数对 σ (标准差) 的函数, 所以, 用其近似函数表达式

$Y_i = ae^{-\left[\frac{-0.5\left(\frac{x_i - x_0}{b}\right)^2}{b}\right]}$ 来拟合瞬时生长速率, 则可得到

生长的参数值. 解析式中 a , b 和 x_0 3 个参数都有明确的生物学意义 [2]. 选择 CFU 或浊度相同但生理状态不同的 3 个实验组, 由实验结果求得瞬时速率, 再用 Gauss 函数方程拟合, 可给出各参数值(表 3). 3 组结果都表明, 当接种量 N_0 的数值相同但生理状态不同时, 参数 b , x_0 等都有差别, a/x_0 比值的差别更为显著, 这显然是 Logistic 方程无法表征出的结果.

3 讨论

(1) 细菌群体中进入分裂细胞数的非同步性(即随机性)既是群体生长速率的决定性因素, 也是形成群体生理状态异质性的原因: 通常认为细菌群体生长速率的变化取决于接种量和环境条件的限制性作用. 由于把 N_0 视为同质性群体, 而且仅用平均生长速度 V_{mean} 表征生长和把生长速率 μ 视为常数, 使上述看法得以“顺理成章”, 这正是用 Logistic 等确定性生长方程表征细菌群体生长造成的误区. 本文的研究结果表明, 细菌群体的生长速率是由接种量和群体中能进行分裂的细胞数共同决定的. 而且, 显然是能进行分裂的细胞所占的比值起到的决定性作用. 图 10~12 和表 3 的检测结果, 对此给出了证实: 即在限制性培养条件下, 对同一菌株来说, 培养条件决定了

表 3 *E. coli* CVCC 249 菌群生长参数的比较(Gauss 方程拟合的结果)

接种物	R^2	a	b/h	x_0/h	a/x_0
I. 指数期细胞	0.99	$1.758e+8 \pm 2.098e+6$ (CFU/mL)	3.126 ± 0.045	6.135 ± 0.043	$0.286e+9$
稳定期细胞	0.99	$1.760e+8 \pm 2.359e+6$ (CFU/mL)	3.047 ± 0.047	7.425 ± 0.008	$0.237e+9$
II. 指数期细胞	0.961	0.139 ± 0.0019 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.152 ± 0.13	5.764 ± 0.17	0.024
稳定期细胞	0.969	0.131 ± 0.00214 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.57 ± 0.106	10.8 ± 0.102	0.120
稳定+指数(1:1)	0.949	0.134 ± 0.0025 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.412 ± 0.137	7.57 ± 0.124	0.017
III. 加速生长的细胞	0.952	0.114 ± 0.0022 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.152 ± 0.152	5.78 ± 0.136	0.019
恒速生长的细胞	0.955	0.135 ± 0.0024 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.415 ± 0.133	7.57 ± 0.121	0.018
减速生长的细胞	0.932	0.135 ± 0.0026 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.542 ± 0.135	8.25 ± 0.124	0.015
衰亡期的细胞	0.983	0.134 ± 0.00176 ($A_{600\text{ nm}}$)	5.616 ± 0.086	10.88 ± 0.085	0.012

R^2 为拟合度检验系数, a 为最大瞬时生长速率, x_0 为瞬时速率达到 a 时的时刻, b 为达到最大瞬时生长速率 a 的 1/2 时所需要的时间, a/x_0 代表

平均生长速率. 表中数据来自 Gauss 方程: $Y_t = ae^{\left[-0.5\left(\frac{x_t-x_0}{b}\right)^2\right]}$ 的拟合结果

它的最大净瞬时生长速率, 而接种材料中可进行分裂的细胞数, 则决定了达到最大生长速率的时间.

(2) 活细胞数(CFU)和菌液浊度($A_{600\text{ nm}}$)两种生物量表征细菌群体生长的重要差别: 活细胞数所表征的是具有分裂能力个体形成的菌落数, 而浊度法反映的不仅有可分裂细胞的浊度值, 也包括了不具分裂能力的细胞的浊度值. 当不能分裂的细胞比值愈大时这部分的影响也愈大, 因此它不能确切地表征“净生长”. 比较图 1 和 2 则可看出, 相同接种量时, CFU 法表明, 分别以指数期和稳定期细胞为接种材料时, 培养物的 V_{inst} 过程曲线近于相同(图 1), 其差别仅是指数期材料接种的培养物的增殖提前了近 2 h, 而用 $A_{600\text{ nm}}$ 检测法所表征的结果(图 2)则是稳定期接种材料的瞬时生长量及最大生长量都高于指数期. 显然这是由于不能进行分裂的细胞在每次求导时, 都被看作生长量而进行计算的结果. 图 10 结果更进一步表明, 以浊度值来估算群体的倍增时间会造成更大误差.

(3) 瞬时生长速率是表征生长动态过程的重要指标: 通常都认为细菌以“一分为二”的方式进行分裂增殖, 即 $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \cdots 2^n$, 菌数呈指数性增长. Malthus 方程是基于 $\frac{dN}{dt} = \mu N$ 的假定而得到的指数增长模型 $Nt = N_0 e^{-\mu t}$, 它描述了这一增长规律, 这是一个确定性生长模型, 即 Nt 唯一地由 N_0 和 μ 确定. 众多生长模型的构建也是从这一基本假定出发, 只是将由于环境因子对 $\frac{dN}{dt}$ 的变化趋势的影响做了某些修正, 但仍然假定群体内所有个体都具有相同的生

物学特性 [10].

早在 1970 年 Shehata 和 Marr 就观察到 *E. coli* 即使在同步培养条件下个体的倍增时间也各不相同, 而是呈 Gauss 分布 [27]. 刘实 [12] 用限制菌体运动的方法, 发现 *E. coli* 分裂后的 2 个子细胞并不同步进行分裂, 一个细胞可经过很多世代的时间后才分裂. 图 11 和 12 也显示出群体的倍增时间是时间的函数, 而且显然有近似于周期性的变化趋势. 以上结果都表明, 群体中细胞分裂的发生是一随机过程 [28], 这样, 若用一个确定性方程来描述, 自然会有一定程度的失真. 从理论上来看, 构建一个菌群生长的随机模型从数学上并不困难, 如假定在时间 t 有 N 个细胞, 在时间区间 $(t, t+\Delta t)$ 内, 群体增加 1 个细菌的概率为 $\mu N \Delta t + Q(\Delta t)$, 群体增加 2 个或更多细胞的概率为 $Q(\Delta t)$, 本处 $Q(\Delta t)$ 为 $\Delta t \rightarrow 0$ 时的一个高阶无穷小量, 由此可建立一个随机生长方程: $\frac{dP_N(t)}{dt} = -\mu N P_{(N)}(t) + \mu(N-1) P_{N-1}(t)$, 它的解为:

$P(N) = C_{N-1}^{N_0-1} - \mu N_0 t (1 - e^{-\mu t})^{(N-N_0)}$. 可见, 与确定性模型不同, 当 μ 和 N_0 给定时, 在任一时间 t 的菌数 N 不是一个确定值, 而为一随机变量, 即 $N_0, N_0+1, N_0+2, \cdots$ 各个值的概率, 它描述了菌群生长波动性的变化. 而确定性模型描述的是均值的变化 [29]. 但是, 逐个求“ $N_0 + i$ ”个菌的概率的计算过程是甚为复杂的, 这仅能作为机理分析而很少为实用.

细菌群体的增长速率 $\left(\frac{\Delta N}{Vt}\right)$ 是群体与环境相互作用的结果, 在限制性培养条件下呈现了多种曲率不断变化的生长曲线. 选定一个模型去适合生长曲线从数学分析角度来看, 是使实测数据向模型限定

的参数期望值“逼近”的结果^[30]. 而 Nt 对时间的关系都是呈S型曲线(Sigmoid), 或者近于双曲线(hyperbola), 多种生长过程曲线也只是曲率的变化有所不同, 而瞬时生长速率则可精确地把这一差别表征出来. 对一光滑的S型曲线或双曲线求其 1 阶导数即瞬时生长速率(V_{inst}), V_{inst} 对时间作图都呈Gauss分布方程曲线形状, 只是具有不同的均值 μ 和标准差 σ . 曲率不相同的S型或双曲型生长曲线的特点都可由此得到一个普适性的表达, 这也是细菌分裂随机发生表现为Gauss分布的一个证实^[24].

我们提出了用 V_{inst} 和 V_{acce} 表征生长过程的方法, 正是基于上述分析, 它避免了预先设定 $\frac{dN}{dt}$ 遵从何种规律的假设, 而以实测数据的 $\frac{dN}{dt}$ 对时间过程曲线作图, 即以 $\frac{dN}{dt}$ 与时间的函数关系为依据, 来表征群体组成异质性对整个生长过程的影响. 用 V_{inst} 区分生长阶段^[2]和得到生长参数, 成功地区分了不同生理阶段培养物生长动力学过程和估计了生长参数, 以及提出了估算延迟期和群体倍增时间的新方法, 都表明这一方法的有效性. 它所需要的条件只是对生长量 Nt 的准确测定. 同一样品 3 次检测值的CV%应小于5%, 以及取样间隔时间应不大于 30 或 60 min等, 这样由B-spline插值处理可得到一条近于真值的光滑曲线, 而这正是求得 V_{inst} 所必需的.

参 考 文 献

- Neidhardt F C. Bacterial growth: Constant obsession with dN/dt . *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 7405—7408
- 张怀强, 刘玉庆, 刘 波, 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(6): 502—512
- Holmström K, Tolker-Nielsen T, Molin S. Physiological states of individual *Salmonella typhimurium* cells monitored by in situ reverse transcription-PCR. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 1733—1738
- Tolker-Nielsen T, Holmström K, Molin S. Visualization of specific gene expression in *Salmonella typhimurium* by in situ PCR. *Appl Env Microbiol*, 1997, 63: 4196—4203
- 金志华, 林建平, 岑沛霖. 替考游动放线菌发酵生产替考拉宁的动力学模型. *生物数学学报*, 2004, 19: 103—108
- 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[DOI]
- McKellar R C, Lu X. Development of a global stochastic model relating the distribution of individual cell and population physiological states. *International J of Food microbiology*, 2005, 100: 33—40 [DOI]
- 胡作生, 傅维洁, 高培基. 关于崔-L 单种群增长模型的讨论及其推广. *生物数学学报*, 1990, 5(3): 94—101
- Pearl R, Read L J. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Prec Nat Acao Sc*, 1920, 6: 275—288
- 李文灿. 对 Logistic 方程的再认识. *北京林业大学学报*, 1990, 12(2): 121—127
- Davey H M, Kell D B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*, 1996, 641—696
- 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
- 张汉波, 丁骅孙. 细菌群体的异质性. *微生物学通报*, 2001, 28(2): 93—96
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microb Meth*, 2001, 44: 121—129 [DOI]
- Hoben H J, Somasegaran P. Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 1246—1247
- Rana Alsharif, William Godfrey. Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry. *BD Biosciences*. www.bdbiosciences.com. 3—5
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods*. 1983, 65(1): 55—63 [DOI]
- Tade H, Ahiho O, Kuroshima K I, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*, 1986, 93: 157—159[DOI]
- 肖树铁. 数学实验. 北京: 高等教育出版社, 2002. 51—76
- McMeekin T A, Olley J N, et al. Predictive microbiology: Theory and Application. Taunton. UK: Research Studies Press, 1993. 32—340
- Augustin J C, Carlier V. Mathematical modeling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 2000, 56: 29—51[DOI]
- Robunson T P, Aboaba O O, Kaloti A, et al. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70: 163—173[DOI]
- 刘家冈. 崔启武-Lawason 模型的意义. *北京林业大学学报*, 1987, 9: 400—407
- Hooke A M, Soedelli D M, Cerquetti M C, et al. Quantitative determination of bacterial replication in vivo. *Infection and Immunity*, 1985, 424—427
- 高培基, 曲音波, 钱新民. 微生物生长与发酵工程. 济南: 山东大学出版社, 1990. 26
- 宋 霞, 谭运德, 宋 明. 具有初值效应的 Logistic 方程. *生物数学学报*, 1996, 11: 160—166
- Shehata T E, Marr A G. Synchronous growth of enteric bacteria. *J Bacteriol*, 1970, 103: 789—792
- Elfving A, Le Marc Y, Baranyi J, et al. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 675—678[DOI]
- 周怀梧. 数理医药学. 上海: 上海科技大学出版社, 1983. 9—13
- Yang K. Basic properties of mathematical population models. *J Biomathematics*, 2002, 17: 129—142