

# 应用微量热法构建限制性条件下微生物生长模型

张洪林 刘永军 南照东 孙海涛

(曲阜师范大学化学系, 曲阜 273165)

高培基

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

**摘要** 用微量热计测定了金黄色和白色葡萄球菌在给定条件下生长的热谱图, 按限制性条件下微生物生长的模型进行了数学处理, 得出了比生长速率, 还测定了在不同温度和不同酸度下的热谱曲线, 确定了最适生长温度和酸度。

**关键词** 热谱图, 葡萄球菌, 比生长速率, 模型

微生物在代谢过程中总会伴随着一定的热效应产生, 用微量热计连续测定微生物代谢过程中的这种热量变化, 可测得热谱图<sup>[1,2]</sup>。这些热谱曲线可以提供微生物生长的丰富信息, 对热谱曲线按指数生长模型<sup>[3-5]</sup>进行处理, 可获得反映微生物生长规律的一些数据, 包括一些动力学参数<sup>[6]</sup>和最适生长温度<sup>[7]</sup>等。本文报道根据热谱图应用生物群体有限增长模型的处理方法和由此对两株葡萄球菌的热谱图进行的分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。均由中国药品生物制品检定所提供。

### 1.2 培养基

1.2.1 培养基 A: 蛋白胨 2g, 氯化钠 1g, 牛肉浸膏 1g, 蒸馏水 200ml, 调节 pH 至 7.30。

1.2.2 培养基 B: 蛋白胨 2g, 氯化钠 1g, 牛肉浸膏 1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.36g, 蒸馏水 200ml, 用 0.1mol/L HCl 和 0.1mol/L NaOH 调节至设定 pH。

### 1.3 实验仪器

1.3.1 热活性检测系统: 本实验采用瑞典 AB 公司新产热活性检测系统 (2277 Thermal Activity Monitor, Thermometric AB, Sweden)。该仪器热稳定性能好, 可检测出  $10^{-6}^{\circ}\text{C}$  的温度变化, 恒温器的工作范围在  $10-90^{\circ}\text{C}$  之间, 温度可维持在  $\pm 2 \times 10^{-4}^{\circ}\text{C}$  不变; 该仪器灵敏度高, 检测极限为  $0.15\mu\text{W}$ , 24 小时基线飘移不大于  $0.2\mu\text{W}$ 。

1.3.2 酸度计: TOA 酸度计, 型号 HM-20S, pH 0.00—12.00, 日本东亚电波工业株

参加本项工作的还有景志红、李佳芝等同志。

本文为山东省自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 7 月 8 日收到。

式会社生产。

#### 1.4 实验方法

实验采用停流法,首先清洗和消毒测量池:以 30ml/h 流速的无菌蒸馏水清洗 30 分钟;再以 30ml/h 流速的 0.1mol/L HCl 溶液清洗 30 分钟;以 30ml/h 流速的 75%酒精液清洗,消毒 30 分钟;以 30ml/h 流速的无菌蒸馏水清洗 30 分钟;然后,以 10ml/h 流速的无菌蒸馏水走基线,待基线稳定后,以相同流速泵入以无菌手续接种标准菌悬液的培养基混悬液,确认已充满流动测量池后停泵,仪器即开始测量记录流动池内细菌在限制性条件下代谢的热谱曲线,当记录笔回到基线后,即认为实验结束。

## 2 结果与讨论

**2.1 数学模型的应用** 微生物在均匀的液体培养条件下,营养物质的供应和环境条件都能满足微生物群体所有成员需要,而代谢产物的抑制作用又可忽略不计进行的生长称为非限制性条件下的生长。这类生长可用指数生长方程来拟合,但这种生长只能短暂存在。

一般来说,微生物总是在限制性条件下生长,在一有限的环境下生长时,由于营养物质的供应不足或生存空间受限或代谢产物积累造成对生长的抑制作用等原因,使微生物群体的生长速率逐渐减小直至趋于零。对限制性条件下生长过程进行动力学分析,我们选用比利时数学家 Verhulst 提出的 Logistic 方程<sup>(3)</sup>,即生物群体有限增长方程。该方程是在指数生长方程的基础上,增加了一个反馈项,即

$$dN(t)/dt = \mu N(t) - \beta N^2(t) \quad (1)$$

式中  $\mu$  为比生长速率,  $\beta$  为衰减速率常数,  $N(t)$  表示瞬时细菌数目。

这个方程中最后一项  $-\beta N^2(t)$  永为负值。这样群体生长就不能像指数方程描述的那样,无限增长,在代谢过程的上升段,  $N(t)$  的增大,必然会使  $dN(t)/dt$  逐渐减少直至趋于零,这和实验测得的热谱曲线是完全符合的。

设细菌总发热功率与细菌群体的数目成正比,则  $P(t) = P_0 N(t)$  (2)

(2)式代入(1)式中

$$dP(t)/dt = \mu P(t) - (\beta/P_0)P^2(t) \quad (3)$$

积分(3)式

$$1/P(t) = (1/P_0 - \beta/\mu P_0)\exp(-\mu t) + \beta/\mu P_0 \quad (4)$$

$$\text{或 } 1/P(t) = a\exp(-\mu t) + b \quad (5)$$

其中  $a = 1/P_0 - \beta/\mu P_0$      $b = \beta/\mu P_0$

用热活性检测系统测得的细菌代谢的热谱曲线实际上是在恒温恒容条件下,各种营养物质(包括溶解氧)的供应是有限的,产物反馈抑制效应同样存在的情况下测定的,这属于限制性条件下的生长过程。因此一些研究者用指数生长方程来拟合热谱图则不能准确地反映细菌代谢过程,而我们用生物群体有限增长方程来处理热谱曲线的上升段完全符合实验结果。关于这方面的工作国内外尚未见报道。

#### 2.2 温度对微生物生长的影响

我们对两株葡萄球菌在相同培养基(A),不同温度下的生长过程的热谱图进行了测

定,按(4)式求出了在不同温度下的比生长速率,然后用计算机拟合出  $\mu-t$  关系的非线性方程,对方程进行处理,找出了特征温度。细菌生长过程中比生长速率为最大所对应的温度为最适生长温度。

本文在 31℃下对白色和金黄色葡萄球菌的代谢过程进行了测定,其完整的热谱图见图 1,在相同条件下,对这两株细菌进行多次测定,其重现性很好。

根据(4)式,对细菌代谢过程的上升段的热谱曲线拟合了下列方程:

对金黄色葡萄球菌

$$1/P(t) = 2.8528\exp(-0.01654t) + 0.01264 \quad t < 175 \text{ min} \quad (6)$$

$$\mu = 0.01654$$

对白色葡萄球菌

$$1/P(t) = 2.3746\exp(-0.02300t) + 0.01421 \quad t < 172 \text{ min} \quad (7)$$

$$\mu = 0.01654$$

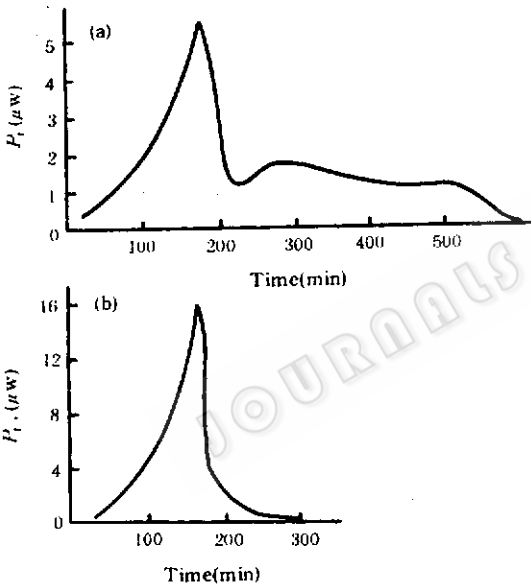


图 1 31℃各细菌的热谱图

Fig. 1 Thermograms of two bacteria at 31℃

(a) *S. aureus*, (b) *S. albus*

表 2 细菌在不同温度下的比生长速率  $\mu(\text{min}^{-1})$

Table 2 Specific growth rate  $\mu(\text{min}^{-1})$  of *S. aureus* and *S. albus* at different temperature

Temperature(K)	<i>S. aureus</i>	<i>S. albus</i>
304	0.01654* (0.01654)**	0.02300(0.02300)
307	0.02620(0.02620)	0.03000(0.03000)
310	0.03288(0.03288)	0.03510(0.03510)
313	0.02640(0.02640)	0.03100(0.03100)

\* Data are calculated from equation (5)

\*\* Data are calculated from  $\mu = a + bT + cT^2 + dT^3$

两株细菌生长过程中热谱曲线上升段的实验数据与通过方程(4)式模拟计算数据十分相近,其数据见表 1。

同理,我们还对另外温度下细菌生长的热谱曲线进行了处理,得出了不同温度下的比生长速率,其数据见表 2。

表 1  $P(t), \hat{P}(t), t$  在 31℃时的数据

Table 1 Data of  $P(t), \hat{P}(t), t$  at 31℃

<i>S. aureus</i>			<i>S. albus</i>		
$t, (\text{min})$	$P(t)^*, (\mu\text{W})$	$\hat{P}(t)^{**}, (\mu\text{W})$	$t, (\text{min})$	$P(t), (\mu\text{W})$	$\hat{P}(t), (\mu\text{W})$
50	0.8	0.79	50	1.3	1.31
75	1.2	1.19	75	2.3	2.29
100	1.8	1.79	100	4.1	3.96
125	2.8	2.68	125	6.9	6.75
150	4.0	3.98	150	11.2	11.16
175	5.6	5.87	172	16.5	16.76

\*  $P(t)$  is experimental data

\*\*  $\hat{P}(t)$  is calculated data from equation (6), (7).

对金黄色葡萄球菌

$$\mu_a = 1803.42474 - 17.6801078T_a + 0.0577659246T_a^2 - 6.29003326 \times 10^{-5}T_a^3$$

当  $\mu_a$  为最大值时,  $T_a = 310.39\text{K}$

对白色葡萄球菌

$$\mu_b = 1278.69008 - 12.5332246T_b + 0.040941308T_b^2 - 4.4571058 \times 10^{-5}T_b^3$$

当  $\mu_b$  为最大值时,  $T_b = 310.52\text{K}$

于是,由热谱图分析得到了金黄色和

白色葡萄球菌的最适生长温度, 分别为 310.39K 和 310.52K。

### 2.3 pH 对微生物生长的影响

pH 对微生物生长的影响很大, 对两株细菌在最适生长温度、不同 pH 下的热谱图进行了测定, 按 (4) 式求出了它们在不同 pH 下的比生长速率, 然后用计算机拟合出  $\mu$ -pH 的非线性方程式, 对方程式进行了处理, 得出最适生长酸度即  $(\text{pH})_0$ 。我们定义: 细菌的比生长速率为最大时所对应的 pH 为最适生长酸度  $(\text{pH})_0$ 。

对金黄色和白色葡萄球菌在不同 pH 的培养基下的热谱图进行了测定。在相同条件测定多次, 其重复性很好。对其热谱曲线进行处理, 得出了不同 pH 下的比生长速率, 其数据见表 3。按  $\mu$ -pH 方程式, 找出了最适生长酸度  $(\text{pH})_0$ 。

对金黄色葡萄球菌

$$\mu_a = -0.232300416 + 0.0608716421 \text{ pH} - 0.00359402514 \text{ pH}^2$$

当  $\mu_a$  为最大值时,  $(\text{pH})_{a0} = 8.47$

对白色葡萄球菌

$$\mu_b = -0.258758931 + 0.0687158572 \text{ pH} - 0.00419171334 \text{ pH}^2$$

当  $\mu_b$  为最大值时,  $(\text{pH})_{b0} = 8.20$

于是由热谱图分析, 也得到了最适生长酸度  $(\text{pH})_0$ 。

表 3 细菌在最适生长温度时, 在不同酸度培养基 (B) 下的比生长速率  $\mu$ , ( $\text{min}^{-1}$ )

Table 3 Specific growth rate  $\mu$ , ( $\text{min}^{-1}$ ) of *S. aureus* and *S. albus* at different acidities

pH	<i>S. aureus</i>	<i>S. albus</i>
6.51		0.01060(0.01090)
7.00	0.01750(0.01769)*	0.01730(0.01690)
7.60	0.02300(0.02273)	
7.67		0.02187(0.02170)
8.23	0.02530(0.02524)	
8.65		0.02155(0.02200)
9.86	0.01800(0.01848)	0.01150(0.01130)
10.28	0.01400(0.01360)	0.00460(0.00467)

\* is calculated from the  $\mu$ -pH equation

根据实验测得的热谱曲线的数据用 Logistic 方程计算了不同温度下的比生长速率, 并拟合了  $\mu$ -T 关系式。此关系式对研究细菌生长和温度的关系提供了一个定量的函数式, 由此而得到的最适生长温度无疑是研究细菌生长规律的重要参数。我们还对多株致病细菌进行了研究, 结果表明, 各细菌的最适生长温度都趋于常数 310K, 与人体正常体温十分相近, 它不受菌种的影响, 是一个具有特征的参数, 此参数的获得对于微生物生长规律的深入研究具有重要意义。

对两株葡萄球菌在最适生长温度和不同 pH 的培养基下热谱曲线的测定, 按 Logistic 方程进行处理, 求出了不同 pH 下的比生长速率, 并用计算机拟合了  $\mu$ -pH 关系式, 此式对研究细菌生长与 pH 的关系提供了定量的函数式, 由此而得出的最适生长酸度  $(\text{pH})_0$ ,

## 3 结 论

生物群体有限增长模型比指数生长模型更能反映热谱曲线的实际情况。在一定时间内, 微生物群体内不是所有的个体都能发生分裂。实际上, 能进行分裂增殖的细胞是以一定的概率而发生的。此外, 要保持一个绝对不变的环境条件也是做不到的。环境条件的波动会影响到群体的增殖。考虑到上述影响而选取了生物群体有限增长模型即 Logistic 方程, 由于考虑到了反馈作用而增加了一个参数, 因此, 结果更接近于微生物生长的真实情况。

同样是研究细菌生长的重要参数。

总之，有限增长模型为研究微生物生长规律提供了一个很好的处理模式。由此而获得的最适生长温度和酸度是细菌代谢中的重要参数，此参数的获得对研究细菌代谢的规律和中西药物对细菌的抑制作用具有重要的学术意义和实际应用价值。

### 参 考 文 献

- (1) Boling E A *et al.* Nature (London), 1973, 241: 472—473.
- (2) 屈松生等. 微生物学报, 1989, 29 (21) : 149—151.
- (3) Daw E A. "Quantitative Problems in Biochem (6 th ed)" Longman Group, Limited London 1980, 278.
- (4) 屈松生等. 物理化学学报, 1987, 2: 113.
- (5) 张洪林等. 山东科学, 1992, 3.
- (6) Xie Changli *et al.* Thermochimica Acta, 1992, 195: 297—302.
- (7) Zhang Honglin *et al.* Thermochimica Acta, 1993, 19—23.
- (8) 高培基等, "微生物生长和发酵工程", 济南: 山东大学出版社, 1990.

## Establishment of the Microorganism Growth Model at an Inhibitory Condition by Microcalorimetric Method

Zhang Honglin    Liu Yongjun    Nan Zhaodong    Sun Haitao

(Department of Chemistry, Qufu Normal University, Qufu 273165)

Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** The thermograms of microorganism growth of *Staphylococcus albus* and *Staphylococcus aureus* were determined using the 2277 Thermal Activity Monitor. With these thermogram curves, the microorganism growth models at an inhibitory condition have been established. From these models, the specific growth rate  $\mu$ , identified optimum growth temperature ( $T_0$ ) and optimum growth acidity ( $\text{pH}$ )<sub>0</sub> were determined. For *Staphylococcus aureus*;  $T_0=310.39\text{K}$  and  $(\text{pH})_0=8.47$ , for *Staphylococcus albus*;  $T_0=310.52$  and  $(\text{pH})_0=8.20$

**Key words** Thermograms, *Staphylococcus*, specific growth rate, model