DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.033
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
78 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0078-03

细菌波动生长过程中代谢活性与环境变化的统一性研究

黄春基[1],董解菊[1],黄 辉[2],徐启旺[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院检验科,重庆 400037;[2]生物波研究中心,重庆 400038)

提 要 目的:阐明波动条件下细菌自身代谢与周围环境变化的关系。方法:通过 Lowry 法检测蛋白质含量,邻甲苯胺法检测葡萄糖含量,聚邻苯二胺 pH 修饰电极检测 pH 值来观察环境条件的变化;以显色法检测波动环境内、外细菌的 TTC-脱氢酶活性。结果:细菌群体在靠近中央位置形成封闭环境,在远离中央位置出现浓度梯度现象。伴随着封闭环境的形成,细菌代谢近乎停止;伴随着浓度梯度的出现,细菌代谢趋于旺盛。结论:细菌的波状生长是生物耗散与生态环境相统一的具体表现。

关键词 波动生长;细菌代谢;环境变化
中图法分类号 Q937 文献标识码 A

The unity between environmental changes and metabolic activity in bacterial wave growth

HUANG Chun-Ji, DONG Jie-ju, HUANG Hui, XU Qi-wang (Research Center of Biological Wave, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To elucidate the relationship of environmental changes with metabolic activity in bacterial wave growth. **Methods**: The protein and glucose content and pH were analyzed quantitatively in different areas of bacterial wave growth and the bacterial TTC-dehydrogenase activity was also determined inside and outside the wave areas. **Results**: Bacterial metabolism nearly ceased after the formation of a sealed environment and when the substance gradient occurred, bacterial metabolism tended to be vigorous. **Conclusion**: Bacterial wave growth embodies the harmony between bacterial dissipation and ecological environment.

Key words wave growth; bacterial metabolism; environmental change

细菌的生长代谢是开放系统条件下的生命活动过程,它一方面导致着周围环境条件的变化,另一方面又受到环境条件变化的制约。许多学者把环境因素纳入了微生物学研究的范畴,运用环境条件变化与细菌生长代谢改变的关系来预测菌群间相互作用的结果[1]、食品中细菌的生长状况[2]并建立预测模型[3]。不同环境条件下细菌的生长方式及生理状态都有所不同,这在细菌生长的群体、周期和波动变化中可得以体现[4]。目前,对细菌波动生长过程的研究主要集中在对细菌自身变化的探讨上,对环境因素变化与细菌自身变化的关系研究得较少。研究细菌波动过程中环境因素的菌变化及细菌代谢活性的变化,有助于对细菌波动发生机制的解释。

本实验以变形杆菌波动模型为研究对象,定量检测了波动模型形成过程中不同波动环中的营养物质含量,酸碱堆积情况及细菌代谢活性,以期为细菌波动的发生机制提供环境因素及细菌代谢方面的实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

奇异变形杆菌(*P. mirabilis*),由生物波研究中心保存。

1.2 波动培养基

按照刘俊康等[5]报道的方法制备。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370008)
作者简介:黄春基(1972-6),男,广东省龙川市人,硕士,助教,主要从事微生物学诊断方面的研究,发表论文4篇。电话:(023)65427592
收稿日期:1999-03-10;修回日期:1999-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　聚邻苯二胺 pH 修饰电极

由本校化学教研室提供。

1.4　细菌波动生长过程中各环蛋白质及葡萄糖含量的测定

每次用 5 块波动Ⅰ号平板,重复 4 次。每块平板中心点种奇异变形杆菌, 37℃培养 24 h 后, 细菌波状生长形成 5 个红环, 5 个黄环,在按红黄环区域在平皿背面做好标记后,用无菌生理盐水洗去平板表面菌体并晾干。从中央红环开始, 依次向外红黄相间的每环取 0.3 g 培养基成分, 取相同培养条件下放置 24 h 未点种细菌的波动Ⅰ号平板中的 0.3 g 培养基成分作为标准对照。将 0.3 g 培养基加热溶于 3 ml 蒸馏水中,各取0.1 ml按 Lowry 法及邻甲苯胺法进行蛋白质含量及葡萄糖含量的测定。

1.5　细菌波动生长过程中不同区域 pH 值测定

同上法波动培养 24 h 后,自中心环向外, 每环取 3 点,用聚邻苯二胺 pH 修饰电极测定各环的 pH。

1.6　TTC-脱氢酶标准曲线的制作

按牛志卿等[6]提供的方法,用直线回归方程表示。

1.7　细菌波动过程中各环 TTC-脱氢酶活性的测定

同上法波动培养 24 h 后, 每环取定量细菌振荡混匀于 5 ml 蒸馏水中, 然后用 5 ml 三氯甲烷进行萃取, 其余步骤同标准曲线制作。

1.8　各环细菌波动环境外的 TTC-脱氢酶活性测定

用未加氯化三苯基四氮唑(TTC)的波动Ⅰ号培养基同上法波动培养 24 h 后, 每环取定量细菌配成 1 ml 菌液, 各加入 Tris-HCl 缓冲液 2 ml 和 TTC-葡萄糖标准溶液 2 ml, 置于(37±1)℃恒温培养箱中,反应 4 h 显色后,其余步骤同标准曲线制作。

1.9　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用本校数理统计教研室提供的医学统计程序包中单因素方差分析 (PDA-2) 程序处理分析数据资料。

2　结果

2.1　细菌波动生长过程中各环蛋白质含量、葡萄糖含量、pH 值及两两间差异的检验

结果见表 1, 波动的前 6 环之间数值比较接近, 后 4 环出现较大变化, 经 Newman-Keuls 法对各组数据进行了多重比较,结果显示, 在 $\alpha=0.05$ 水平下, 蛋白质含量、葡萄糖含量及 pH 值在细菌波动的前 6 环之间差异均不显著, 在后 4 环之间及后 4 环与前 6 环之间差异均显著。

表 1　各波动环中蛋白质、葡萄糖含量及 pH 值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Protein, glucose content and pH of different bacterial wave loop($\bar{x}\pm s$)

	Bacteral wave loop									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein(ρ_B/g·L^{-1})	3.990±0.025	3 884±0.018	3 972±0.017	3 932±0.052	3 926±0.058	4 002±0.017	5 024±0.058	6.372±0.017	7.828±0.067	8.968±0.037
Glucose(ρ_B/g·L^{-1})	0 226±0.008	0.248±0.002	0.238±0.002	0.254±0.004	0 254±0.001	0 364±0.001	0 470±0.003	0 588±0 007	0.754±0 001	0 863±0 004
pH	8 580±0.007	8.0640±0.003	8 610±0.013	8.440±0.008	8.460±0.003	8.520±0.002	8 260±0.003	7.940±0 003	7.660±0 003	7 440±0 003

2.2　细菌波动过程中各细菌环的 TTC-脱氢酶活性

结果见表 2。经 Newman-Keuls 法对同一环不同时间 TTC-脱氢酶催化反应的 TTC 量进行两两间比较, 结果显示, 在 $\alpha=0.05$ 的水平下, 前 6 环在不同时间的 TTC 消耗量差异不显著, 后 4 环在不同时间的 TTC 消耗量差异显著。

表 2　不同波动环中的细菌 TTC-脱氢酶活性(mg,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Bacterial TTC-dehyogenase activity in different wave loop(mg,$\bar{x}\pm s$)

	The reduction quantity of TTC in different bacterial wave loop									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 h	0.0406±0.0013	0 0228±0.0047	0.0438±0 0017	0 0210±0.0035	0.0454±0 0048	0.0232±0.0037	0.0381±0.0025	0.017±0.0016	0.0394±0 0013	0 0156±0.0013
2 h	0 0414±0.0016	0.0232±0.0028	0.0426±0.0024	0 0231±0.0019	0.0466±0.0027	0.0228±0.0022	0 0408±0 0034*	0.0204±0 0023*	0.0412±0.0007*	0.0173±0.0024*
3 h	0 0409±0.0032	0.0229±0.0016	0.0431±0.0017	0 0224±0.0022	0.0457±0.0043	0.0234±0.0025	0 0433±0 0021*△	0.0226±0.0018*△	0 0442±0.0027*△	0.0212±0.0032*△

*: $P<0.05$ *vs* 1 h; △: $P<0.05$ *vs* 2 h

2.3　波动环境外各环细菌的 TTC-脱氢酶活性

结果见表 3。用 Newman-Keuls 法对数据进行了两两比较, 在 $\alpha=0.05$ 的水平下,两两间差异均不显著。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 波动环境外各环细菌的 TTC-脱氢酶活性(mg,$\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Bacterial TTC-dehydrogenase acticvity in different wave loop outside of the wave environment(mg,$\bar{x} \pm s$)

Bacterial wave loop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reduction quantity of TTC	0.0368±0.0017	0.0368±0.0025	0.0374±0.0008	0 0390±0 0018	0 0374±0 0017	0 0364±0 0020	0 0404±0 0020	0 0380±0 0010	0 4000±0 0009	0 0360±0.0010

3 讨论

细菌的生命活动在不同的环境条件下发生潜 - 生序适应性变化，宏观上表现为不同的生长方式，Rascle 等[7]建立了细菌的趋化性生长模型，徐启旺等[4]也建立了细菌波动生长模型并揭示出细菌的波状生长方式可能是一种普遍现象。实验研究已经发现细菌在波状生长过程中会发生短杆菌与长条菌之间的潜 - 生序交替变化，两者在细胞结构及抵抗力方面存在着一些差别[8]，这些都初步提示细菌在潜 - 生序微观变化基础上产生的宏观波动可能是细菌的一种自我保护和生存机制，本实验选取培养基中蛋白质和葡萄糖含量作为衡量环境营养状况的指标，以 pH 值作为衡量环境酸碱堆积情况的指标，通过测定细菌的 TTC-脱氢酶活性来反映细菌的代谢活性，将这些指标相结合，有助于精细分析周围环境压力与细菌自身变化间的相互作用。

表 1 的实验结果显示，随着细菌由中心向外波动的延伸，培养基中营养物质的消耗情况和酸碱物质的堆积情况在前 6 环中基本上是形成了一个平台，在最后 4 环中才逐渐形成了一个减少或增加的梯度。经单因素方差分析结果显示，前 6 环中各环之间营养物质含量及环境 pH 值差异不显著，后 4 环之间的差异及各环与标准对照之间的差异均显著（$P<0.05$）。从实验结果中可看出，前 6 环中营养物质含量甚少，且相互间无显著差异，表明这 6 环中已几乎形成了一个封闭环境，如果将这个封闭环境中的所有细菌都移去，细菌波动仍然能够继续延伸，这表明封闭环境内由于营养物质的耗散，细菌生命活动极度减弱，对细菌波动的延续已不起主导作用；而后 4 环中环境的营养物质还存在一定的梯度，即还存在着一个非平衡环境，因此当封闭环境中的细菌移去后，由于非平衡动力的存在，细菌波动仍然能够延续下去。

为了进一步观察封闭环境及非平衡环境对细菌生命活动的影响，我们还测定了各环中细菌的 TTC-脱氢酶活性及各环细菌移出各自的波动环境后的 TTC-脱氢酶活性，从第 9 环（即第 5 个红环）初步形成开始到第 9 环完全形成的 3 h 中，每隔 1 h 测定一次各环细菌的 TTC-脱氢酶活性，结果显示第 5 环以前的各环细菌 TTC-脱氢酶活性几乎没变化，而第 6 环以后的细菌 TTC-脱氢酶活性均逐渐有所增加。但我们把中心环直至最外环的细菌均定量取到试管中测定它们各自的 TTC-脱氢酶活性时，结果则显示各环间相差不显著（$P>0.05$）。这些都强烈地提示在细菌波动过程中，一旦形成了封闭环境，细菌生长便近乎停止，留下来的是生命活动的载体和残迹，当进入一个开放系统后，波动又沿着单一方向进行下去。

细菌波动是生物波的一个简单模型，本实验结合一些先前研究结果从一个方面提示，细菌波动过程是一个生物耗散与生态环境相统一的过程。而两者的因果关系及细菌波动生长过程的调控机制，尚有待进一步的研究。

参考文献

[1] Chapuis C, Flandrois J. Mathematical model of the interactions between Micrococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa on agar surface[J]. J Appl Bacteriol, 1994, 77(6): 727—732.

[2] Baranyi J, Poberts T A. A dynamic approach to prediting bacterial growth in food[J]. Int J Food Microbiol, 1994, 23(3~4): 277—294.

[3] Van Impe J F, Nicolai B M, Schellekens M, *et al*. Predictive microbiology in a dynamic environmental system theory approach [J]. Int J Food Microbiol, 1995, 25(3): 237—249.

[4] 徐启旺, 刘俊康, 郭 刚, 等. 微生物生长的群体、周期和波[J]. 自然杂志, 1992, 15(3): 195—196.

[5] 刘俊康, 郭 刚, 徐启旺, 等. 生物波理论的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1994, 6(6): 40—44.

[6] 牛志卿, 刘建荣, 吴国庆. TTC-脱氢酶活性测定法的改进[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 59—61.

[7] Rascle M, Ziti C. Finite time blow-up in some models of chemotaxis[J]. J Math Biol, 1995, 33(4): 388—414.

[8] 郭 刚, 黄春基, 王 源, 等. 抗生素 Sub-MIC 诱导纤细菌与潜生体的比较研究[J]. 中华流行病学杂志, 1996, 17(3-C): 120—123.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net