

限制性条件下药物对细菌抑制作用微量量热法研究

刘永军 南照东 孙海涛 张洪林 高培基¹

(曲阜师范大学化学系 曲阜 273165)

(山东大学微生物研究所 济南 250100)¹

摘要 用微量量热计测定了福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) 中 7 株菌 (6、2b、3b、5b、1a、x、y) 在合成药物抑制作用下生长的热谱图, 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 (μ), 由此确定了各细菌比生长速率 (μ) 与药物浓度 (c) 之间的定量关系, 求出了比生长速率 (μ) 为零时的用药浓度, 并对该合成药对各细菌的抑菌效果进行了分析。

关键词 比生长速率, 细菌, 抑菌作用, 微量量热

用微量量热计连续测定细菌代谢过程中的热量变化, 可获得反映细菌代谢规律的完整热谱图^[1,2]。按限制性条件下微生物生长的模型进行数学处理, 可得出细菌正常生长的比生长速率^[3,4]。若在培养基中加入合成药物, 使细菌在药物抑制作用下生长, 也可获得细菌代谢的热谱图并可求得细菌在药物抑制作用下的比生长速率, 进而可得出比生长速率与药物浓度之间的定量关系式, 并计算出比生长速率为零时的用药浓度即最小抑菌浓度 MIC (*Minimum inhibitory concentration*)。此项工作的开展对于深入研究药物对细菌的抑制作用, 筛选特效药提供了一种可靠的定量方法。本文报道新合成药 N-甲基-N-1, 3, 4-噻二唑水杨醛缩氨基硫脲合钴 (I) 对福氏志贺氏属的中 7 株细菌的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 菌株

福氏志贺氏菌的 (*Shigella flexneri*) 6、2b、3b、5b、1a、x、y 型菌株, 均由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 培养基

牛肉浸膏液体培养基 (g): 蛋白胨 2, 氯化钠 1, 牛肉浸膏 1, 蒸馏水 200ml, 调节 pH7.40~7.60。

1.3 药液配制

称取新合成药 28mg, 加 10ml N, N-二甲基甲酰胺溶解后用蒸馏水稀释至 50ml 容量瓶中, 摇匀可得原药液的浓度为 0.56mg/ml。

1.4 实验仪器

采用瑞典 Thermometric AB 公司产热活性检测系统 (2277 Thermal Activity Monitor)。关于此仪器的原理、操作按参考文献 [5]。该仪器热稳定性能好, 可检测出 10^{-6}°C

的温度变化, 恒温器的工作范围在 $10\sim 90^{\circ}\text{C}$ 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, 其最小检测基线为 $1.5\times 10^{-7}\text{W}$, 24h 基线漂移不大于 $2\times 10^{-7}\text{W}$ 。

1.5 实验方法

采用停流法, 见图 1。首先清洗和消毒流动池: 以 30ml/h 流速的无菌蒸馏水清洗 30min ; 以 30ml/h 流速的 0.1mol/L HCl 溶液清洗 30min ; 以 30ml/h 流速的 75% 酒精清洗 30min ; 再以 30ml/h 流速的无菌蒸馏水清洗 30min ; 清洗完毕后, 以 10ml/h 流速的无菌蒸馏水走基线, 待基线稳定后, 以相同流速泵入混悬液 (取灭菌后的盛有 10ml 培养基的试管一支, 先以无菌手续接种标准菌种, 然后加入不同量的原药液, 摇匀后即混悬液), 确认混悬液已充满流动池后停泵, 仪器即开始记录流动池内细菌代谢过程中的热谱曲线, 当记录笔返回基线后, 即认为实验结束。

2 原理

用热活性检测器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, 产物反馈抑制作用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。对限制性条件下的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, 即生物群体有限增长方程^[6]即:

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

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

设细菌总发热功率与细菌群体的数目成正比, 则:

$$P_t = P_0 N(t) \quad (2)$$

(2) 式代入 (1) 式得:

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

积分 (3) 得:

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

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

$$\text{其中} \quad a = 1/P_0 - \beta/\mu P_0, \quad b = \beta/\mu P_0$$

这样, 细菌在限制性条件下生长时, 在生长前期瞬时总放热功率 P_t 与时间关系满足 (5) 式。根据实验所测热谱曲线的上升段的 $P_t \sim t$ 数据用计算机拟合可得细菌生长期的生长方程, 从而可求得比生长速率。

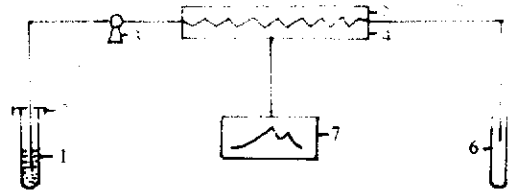


图 1 停流法操作示意图

Fig. 1 Schematic diagram of operation for stopped flow measurement

1. Bacterial solution, 2. Cover, 3. Pump, 4. Calorimeter,
5. Reaction vessel, 6. Waste solution, 7. Recorder

3 结果与讨论

3.1 实验结果

首先测定了在 37℃ 时各细菌正常代谢的热谱图, 而后又测定了在药物抑制作用下各细菌生长的完整热谱图。实验表明, 同一细菌用药浓度不同, 热谱图形状相似, 但生长期的斜率不同。见图 2。

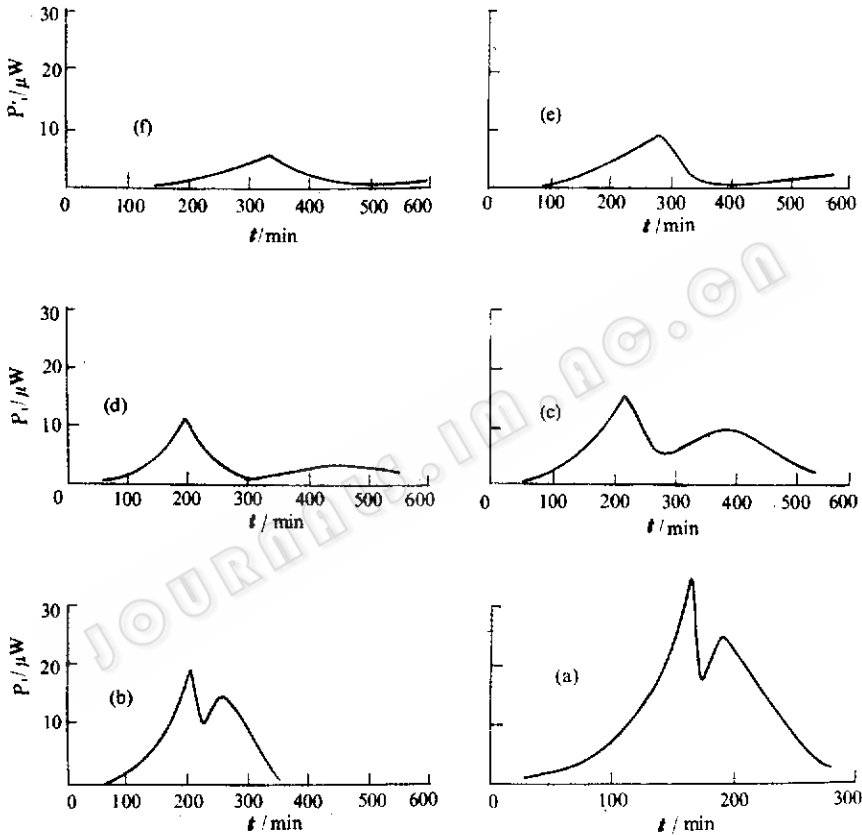


图 2 37℃ 时福氏志贺氏 5b 型菌在不同浓度药物下的热谱图

Fig. 2 Thermograms of strain 5b of *Shigella flexneri* at 37°C in different concentration of the medicine/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

(a) $c_0=0$, (b) $c_1=0.028$, (c) $c_2=0.056$, (d) $c_3=0.112$, (e) $c_4=0.168$, (f) $c_5=0.196$

根据图 2 中热谱曲线生长期的 $P_t \sim t$ 数据可根据方程 (5) 拟合出福氏志贺氏 5b 型菌的 $P_t \sim t$ 方程, 从而得到其比生长速率 μ , 同理可得出其它各菌的比生长速率 μ , 见表 1。由表 1 中数据可拟合出 $\mu \sim c$ 关系式, 并可求得各细菌在比生长速率为零时的用药量, 即最小抑菌浓度, 见表 2。

表 1 各细菌在 310K, 不同浓度药物抑制作用下的比生长速率

Table 1 Specific growth rates (μ) of *Shigella flexneri* at 37°C with the bacteriostatic action of the synthetic medicine

$c/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	μ/min^{-1}						
	6	3b	2b	5b	1a	x	y
0.000	0.04211	0.03305	0.03494	0.03571	0.02933	0.02815	0.03580
0.028	0.02929	0.02268	0.03317	0.03375	0.02503	0.02562	0.03195
0.042	0.02221	0.01764					
0.050	0.01844	0.01437					
0.056	0.01637	0.01216	0.03035	0.02873	0.02148	0.02257	0.02941
0.067	0.0095						
0.112			0.02762	0.02362	0.01437	0.01804	0.02397
0.140					0.09810	0.01643	
0.196			0.02206	0.01533			0.01738
0.280			0.01532	0.00681			0.00996

表 2 各菌中的 $\mu \sim c$ 关系式及最小抑菌浓度Table 2 The equation of $\mu \sim c$ and MIC

Seven strain of <i>Shigella flexneri</i>	$\mu \sim c$ equation	Coefficient of relativity (r)	$c/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
6	$\mu = 0.04231 - 0.4746C$	-0.9993	0.0891
3b	$\mu = 0.03309 - 0.3715C$	-0.9999	0.0891
2b	$\mu = 0.03491 - 0.06847C$	-0.9978	0.5099
5b	$\mu = 0.03461 - 0.09928C$	-0.9947	0.3486
1a	$\mu = 0.02915 - 0.01361C$	-0.9991	0.2142
x	$\mu = 0.02787 - 0.08487C$	-0.9964	0.3284
y	$\mu = 0.03480 - 0.08975C$	-0.9979	0.3877

3.2 讨论

表 2 结果表明, 细菌生长的比生长速率与用药浓度之间的关系为线性关系式, 不同菌型其 $\mu \sim c$ 关系式的斜率不同。对于福氏志贺氏 6 型菌和 3b 型菌其斜率绝对值相对较大 (分别 0.4746 和 0.3715), 所得最小抑菌浓度值也较小 (都为 0.0891mg/ml), 这说明此药对这两种菌的抑制效果比较好; 反之, 对福氏志贺氏 2b 菌来说, 其 $\mu \sim c$ 关系式斜率绝对值较小 (为 0.06847), 所得最小抑菌浓度, 值也较大, 说明此药对该菌的抑制效果较差。

用微量量热法研究药物对细菌的抑制作用: 可为筛选特效药和确定用药量提供定量依据。这项工作的开展将对药理学、医学、临床学等交叉研究药物及筛选特效药具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Boling E A, Blanchard G C, Russcal W J. *Nature*, 1973, 241, 472~473.
- [2] 谢昌礼, 汤厚宽, 屈松生等. *微生物学报*, 1989, 29 (2), 149~151.
- [3] Zhang H L, Liu Y J, Sun H T. *Thermochimica Acta*, 1993, 216, 19~23.
- [4] 张洪林, 刘永军, 南照东等. *生物工程学报*, 1994, 10 (4), 333~337.
- [5] 谢昌礼, 徐桂端, 屈松生等. *物理化学学报*, 1986, 2 (4), 363~370.
- [6] 高培基, 屈音波, 钱新民等. *微生物生长及发酵工程*, 济南: 山东大学出版社, 1990, pp. 27, 49.

A Study of the Optimum Bacteriostatic Action of a Synthetic Medicine on Bacteria Using a Microcalorimetric Method

Liu Yongjun Nan Zhaodong Sun Haitao Zhang Honglin Gao Peiji¹

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

(*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*)

Abstract The bacterial growth thermograms curves under inhibitory conditions were determined and the bacteriostatic action of a synthetic medicine were studied using a thermal activity monitor. From these thermograms curves, the specific growth rate (μ) at different concentration (c) were calculated and the liner equation μ - c could be established.

Key words Specific growth rate, bacteria, bacteriostatic action, microcalorimetry