

# 在 $\gamma$ -射线( $\text{Co}^{60}$ )作用下 *Candida utilis* 的 维生素 $\text{B}_1$ 缺陷菌株的获得及其与 原始菌株的生物学特性的比较\*

庄增辉 钱稼蓀

(中国科学院微生物研究所)

## 一、引言

电离辐射能够引起微生物在维生素代谢方面极大的变化,有时能提高微生物合成某种维生素的能力<sup>[9,10,11,12]</sup>,或造成微生物在合成某种维生素方面的缺陷<sup>[2,3,13,14]</sup>。

为了测定维生素和进行一些突变机制的工作,我们用 $\gamma$ -射线( $\text{Co}^{60}$ )处理 *Candida utilis* 并加以筛选,获得了一些维生素  $\text{B}_1$  的缺陷菌株。兹将这些缺陷菌株与原始菌种在某些生物学特性上的差别报告于后。

## 二、材料与方法

### (一) 材料来源

试验所用的菌种为 *Candida utilis*, 取自本所保藏组,保藏菌号为 2.120。

### (二) 原始菌种的形态及生理特性

经试验观察,细胞为长椭圆形或卵椭圆形(3.0—5.7)(4.2—7.8)。芽殖。在嫌气条件下产生假菌丝。在麦芽汁琼脂上长出的菌落平滑,圆形,白色无强烈光泽。能在不含维生素及氨基酸等生长因子的基本培养基上生长。

### (三) 试验所用的培养基

1. 保存原始菌种及缺陷菌株,筛选所用的完全培养基,绘制生长曲线时所用的培养基,均采用 10 Brix 的麦芽汁琼脂培养基。

2. 筛选营养缺陷菌株时所用的基本培养基采用 Reader 氏(1927)<sup>[4]</sup>所推荐的无机合成培养基,其成分如下:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3克;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.7克;  $\text{NaCl}$  0.5克;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.4克;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1克;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1克;水洗洋菜 20克;蒸馏水加到 1000 毫升。培养基的原始  $\text{pH} = 6.6$ 。

3. 测定营养缺陷菌株对维生素需要时所用的补料培养基;根据 Burkholder, MacVeigh 和 Moyer (1944)<sup>[5]</sup>研究各类酵母对 B 族维生素需要的结果,决定在 Reader 氏培养基中

本文 1962 年 9 月 7 日收到。

\* 对于在本工作中给予指导的苏联专家 E. H. Сокурова、施履吉先生和薛禹谷先生,和在有些操作方法上给予帮助的徐浩同志等一併致以谢意。前后参加本工作的有刘棣良、吴尧夫、师家福、蒋伯宁、陈洛阳、谷桂珠、赵芳玲和刁本文等同志。

补給下列 6 种維生素, 400 毫升培养基中的用量: 維生素 B<sub>1</sub> 1 微克; 生物素 25 微克; 肌醇 5 微克; 維生素 B<sub>6</sub> 100 微克; 泛酸 1 微克; 菸酸 1 微克。

4. 使产生假菌絲时所用的培养基是馬鈴薯琼脂培养基。

#### (四) 試驗所用方法

1. 照射处理: 处理前将原始菌种接种在 10Brix 麦芽汁琼脂小試管斜面上, 28℃ 培养, 为避免強烈出芽的影响, 取用菌龄为 4—5 天的菌株, 用灭菌蒸馏水配制成悬浮液 (約  $6 \times 10^6$  細胞/毫升), 定量 (9 毫升) 分装于 20×200 毫米的灭菌过的大試管中, 然后将这些装有菌悬浮液的試管置于鈾源四周的一定距离。为保证細胞在悬浮液中均匀分布, 照射处理前将試管内菌液搖匀, 使所受剂量趋于一致。剂量率为 130 伦/秒。照射材料所受的剂量是用时间来控制的。

2. 筛选营养缺陷菌株的方法: 在处理悬浮液中寻找营养缺陷菌株的方法主要根据 Lederberg 和 Tatum<sup>[6]</sup> 的双层培养法的原理加以改进的薄膜滤紙法; 即将照射处理过的悬浮液进行适当稀释 (約到  $10^{-3}$ ) 后, 取 0.05 毫升均匀地涂抹在作为基本培养基的 Reader 氏培养基平板上所鋪的灭菌玻璃紙上, 28℃ 培养 48—72 小时, 然后用灭菌的墨汁标记已长出的菌落。随将带有标记菌落的玻璃紙移鋪到作为完全培养基的 10Brix 的麦芽汁琼脂培养基上, 繼續 28℃ 培养 48 小时, 这时在玻璃紙上可能又长出新的菌落, 由于这些菌落在基本培养基上未能长出, 所以可以初步认为这些菌株可能已丧失合成某种为其生长所需要的化合物能力的营养缺陷型。

将初步认为营养缺陷型的菌落挑接于麦芽汁琼脂試管斜面上, 28℃ 培养 48 小时后, 作为缺陷品系的初篩原种。同时用来配制悬浮液进行对維生素需要的測定。

3. 測定营养缺陷菌株对維生素需要的方法: 基本上根据 G. W. Beadle 和 E. L. Tatum<sup>[7,8]</sup> 在紅色面包霉中获得生化突变种所用的方法, 即将补給的培养基分装于試管中, 逐一測定, 当然这对产生分生孢子的紅色面包霉来说是必要的, 但 *Candida utilis* 是芽殖而形成平鋪在培养基上的菌落, 这样就有条件从节省培养基, 減輕工作量, 加快測定速度出发, 采用改进的快速点滴測定法; 即将 8 种补給培养基 (即全有——补給 6 种維生素, 全缺——未补給, 即 Reader 氏培养基, 缺 B<sub>1</sub>——补給除 B<sub>1</sub> 外的 5 种維生素, 其余以此类推, 缺 B<sub>6</sub>, 缺生, 缺泛, 缺菸, 缺肌) 分別点入 8 个培养皿中, 每皿滴点 16 个点 (按皿的大小, 可适当增減), 每点标号, 在 8 个培养皿的同一号码的点上, 用接种环接上待測定的同一株菌悬浮液 (菌龄为 48 小时), 然后在 28℃ 培养 48 小时, 如果在全缺及某一种缺一組合的培养基上均不生长, 而在其余 6 种不同补給培养基上都能良好生长的菌株, 就可认为該菌株是属于該缺一組合中, 所缺維生素的缺陷菌株了。

4. 測定維生素 B<sub>1</sub> 缺陷菌株对 B<sub>1</sub> 不同剂量及 6 种維生素不同缺一組合的生长反应的方法: 是按 E. Н. Одицова<sup>[15]</sup> 推荐的測定生长的比浊法, 用公私合营沪江仪器厂出产的四用螢光計按比浊进行測定。并在显微鏡下进行細胞形态的观察。

5. 缺陷菌株与原始菌种在形态及生理方面的比較时所用方法如下:

(1) 細胞大小: 取自麦芽汁琼脂培养基上培养 24 小时的培养物, 在 100×10 的放大倍率下, 將該菌細胞分成最大、一般及最小三类, 各測 40 个細胞, 取其平均值。

(2) 菌落直径: 在麦芽汁琼脂平板上生长 72 小时的菌落, 用卡尺 (精密度为 0.05 毫

米) 測量 40 个菌落的直径, 取其平均值。

(3) 假菌絲的产生: 在馬鈴薯琼脂平板上, 划綫接上菌后, 盖上盖玻片以造成嫌气条件,  $28^{\circ}\text{C}$  培养 7—10 天后, 进行鏡检比較。

(4) 氧的吸收: 将培养 48 小时的培养物, 用 pH 为 5.6 的磷酸緩冲液配制成湿重 1% 的菌液 (以后換算成干重), 取菌液 1 毫升; 2% 葡萄糖溶液 1 毫升, 20% KOH 0.1 毫升; 在  $28^{\circ}\text{C}$  恆温, 瓦氏呼吸計的振蕩頻率約 100 次/分钟, 进行缺陷菌株与原始菌株氧吸收的比較。

(5) 生长曲綫: 取用 48 小时的培养物, 定量 (500 个細胞/毫升培养基) 加入 250 毫升的液体麦芽汁 (15 Brix) 培养基中, 搖匀, 定量 (5 毫升) 分装成若干試管,  $28^{\circ}\text{C}$  培养, 定时取 0.1 毫升涂抹在麦芽汁琼脂平板上, 培养 48—72 小时后, 計算长出的菌落数, 取三个重复的平均值, 換算成每毫升菌数的对数, 繪制生长曲綫图。

(6) 細胞色素系統的比較: 取 72 小时的培养物, 配制成 20% 的菌悬浮液, 置于四用螢光計的比色杯中, 以 220V, 40W 的鎢絲灯作光源, 用手持分光光度計, 按吸收光带进行比较。

### (五) 存活率

为了便于今后的篩选工作, 作了剂量与存活率两者間关系的研究, 所得結果见图 1。

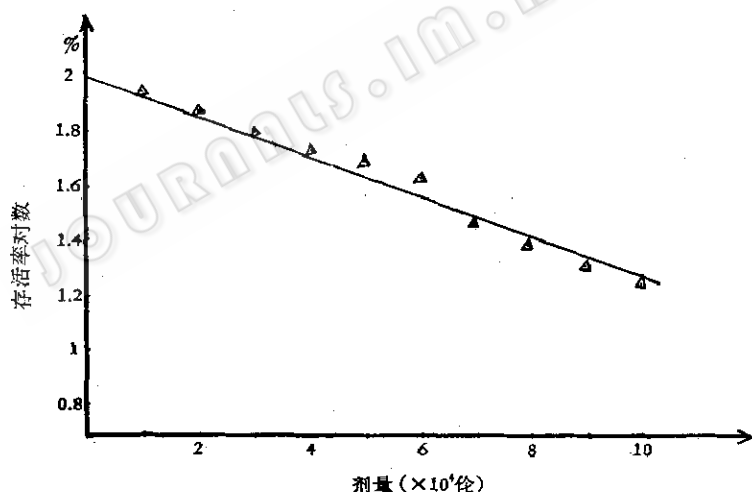


图 1 不同剂量的  $\gamma$ -射綫 ( $\text{Co}^{60}$ ) 与 *Candida utilis* (2—120) 存活率对数的关系

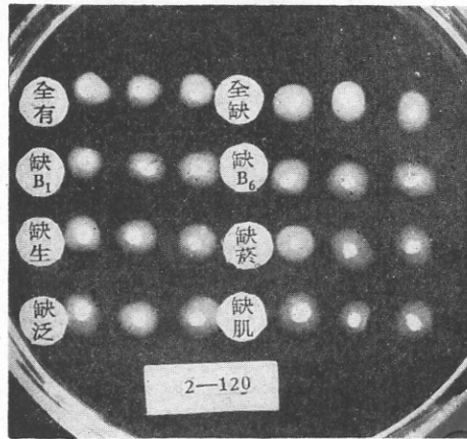
由图 1 可以得出, *Candida utilis* 細胞的存活率随剂量的增加而减小, 其存活率对数与  $\gamma$ -射綫的剂量是指数的关系。这与文献<sup>[1]</sup>中的报导是符合的; 即一般紫外綫与存活率的关系曲綫是 S 型的, 而 X 射綫 (或  $\gamma$ -射綫) 与存活率的关系曲綫則为指数的。經計算得出,  $\gamma$ -射綫对 *Candida utilis* (2—120) 的半致死剂量 ( $\text{LD}_{50}$ ) 是 52,200 伦。

## 三、实 驗 結 果

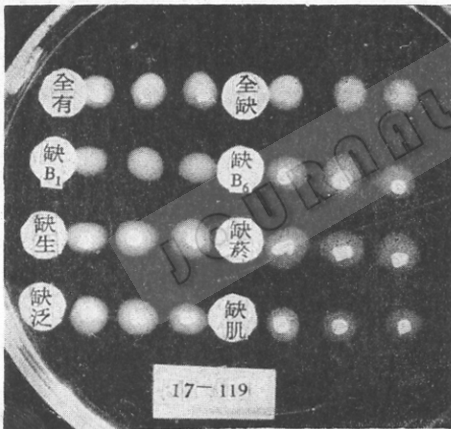
### (一) 維生素缺陷菌株的获得

在 17 次照射处理試驗中, 用薄膜滤紙法在不同剂量下选出了初步認為是营养缺陷菌株共 2,012 株。用快速点滴測定法, 篩选出維生素  $\text{B}_1$  的缺陷菌株共 31 株。这些維生素

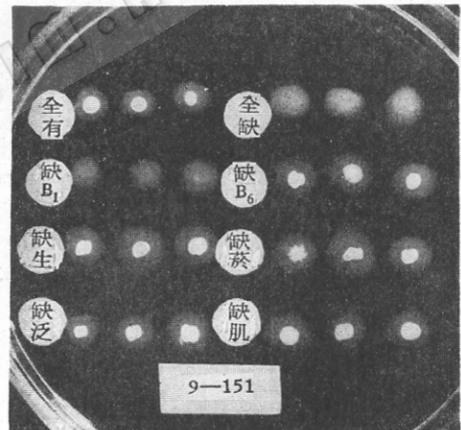
$B_1$  的缺陷菌株在全缺及缺  $B_1$  的培养基上都不显示生长,而在其余的六种补给的培养基上均能生长。原始菌株(2—120)则无论在全缺,缺  $B_1$  的培养基上,或其余六种补给培养基上均显示出生长反应。这可从图 2 中得出更明确的概念:即这些菌株确实是维生素  $B_1$  的缺陷菌株。



(1)



(2)



(3)

图 2 在不同的补给培养基上生长的情形 (1) 2—120——原始菌种; (2) 17—119——维生素  $B_1$  的缺陷菌株; (3) 9—151——同上(28°C, 48 小时)。

采用 E. H. Одинцова 所推荐的酵母生长测定法,测得了维生素  $B_1$  缺陷菌株对维生素  $B_1$  及对不同维生素需要的反应情况,结果列于图 3。

从图 3a 中可以看到:随  $B_1$  剂量的增加,缺陷菌株生长反应的指标随之递升,这就可以作为测定  $B_1$  的测定菌。

由图 3b 可见,维生素  $B_1$  缺陷菌株在补给 6 种维生素的培养基上,生长并不最好,尚须进一步研究。

不同剂量的  $B_1$  对维生素  $B_1$  缺陷菌株的影响不仅反映在生长数量上,还反映在细胞形态上(见图 4)。当每毫升培养基中加入 0.0001 微克  $B_1$  时,可以看到细胞聚集,随  $B_1$  剂量的增加,则细胞聚集程度逐渐降低。

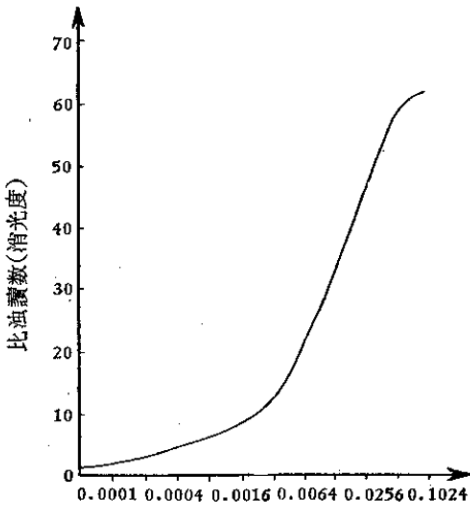


图 3a 維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株 9—151 对不同剂量  $\text{B}_1$  的生长反应

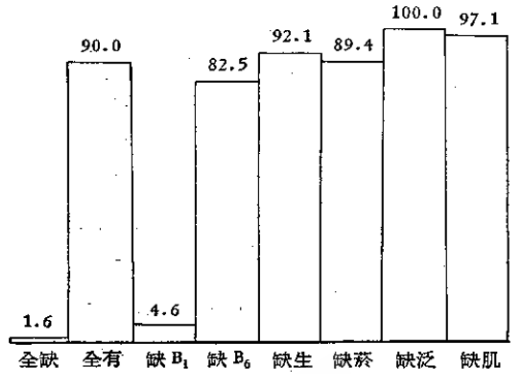


图 3b 維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株 9—151 对維生素的需要情形

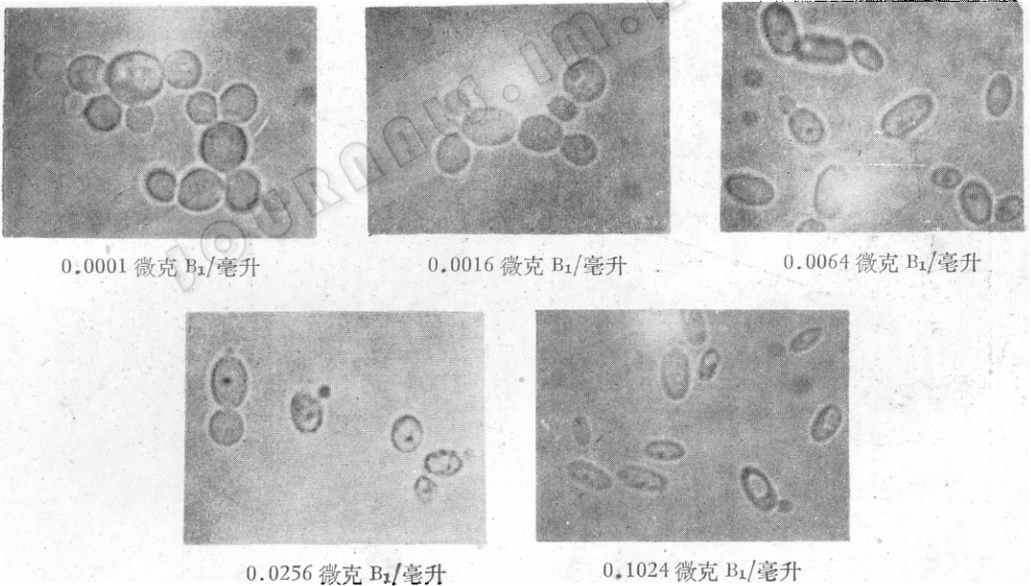


图 4 *Candida utilis* 的  $\text{B}_1$  缺陷菌株(9—151)在含不同剂量  $\text{B}_1$  的液体基本培养基中細胞形态的反应 (28℃, 24 小时, 100×7)

## (二) 缺陷菌株与原始菌株在形态及生理等方面的比較

通常对营养需要发生一定改变的突变种, 可能伴随出現一些其他形态学上以及生理学上的变化, 为此将維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株与原始菌株进行了一些比較, 結果列于表 1。

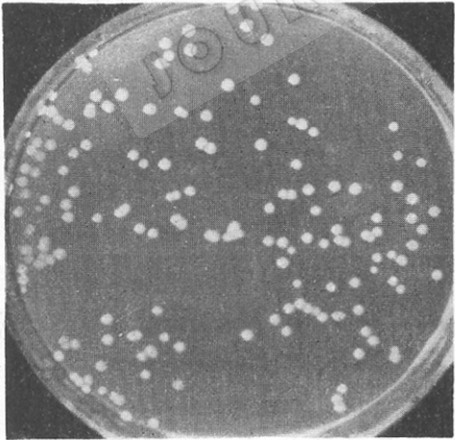
1. 从表 1 可見, 維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株在細胞大小方面, 一般均比原始菌株显得小。
2. 在菌落直径方面(见图 5), 維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株的菌落直径只有原始菌株的 84.3% (17—119)—25.1% (27—112)。

表 1 缺陷菌株与原始菌株在细胞大小,菌落直径及氧的吸收等方面的比较

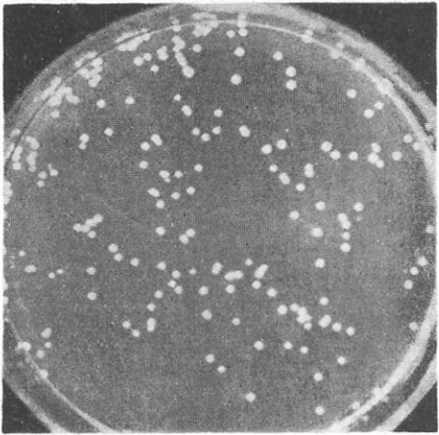
菌 号	细胞大小的平均值 (微米)	菌落直径		Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	
		毫米	%	微升/毫克干 重·小时	%
2—120. (原始菌株)	(3.0—5.7) (4.2—7.8)	5.21	100.0	98.6	100.0
9—151	(2.9—4.5) (4.6—6.5)	3.51	67.5	67.1	67.9
17—119	(2.9—4.5) (4.6—6.5)	4.49	84.3	89.7	91.0
21—38	(2.7—4.0) (4.9—7.0)	3.88	74.5	73.1	74.1
23—109	(2.8—3.9) (4.3—6.9)	4.02	77.2	83.7	84.9
27—112	(3.2—3.9) (4.8—6.8)	1.31	25.1	50.8	51.5



2—120



9—151



17—119

图 5 缺陷菌株与原始菌株在菌落方面的比较

3. 在氧的吸收方面:维生素 B<sub>1</sub> 缺陷菌株的需氧量只有原始菌株的 91% (17—119)—51.5% (27—112)。

4. 从假菌丝形成方面的观察(见图 6), 亦同样存在着一定的差异, 维生素 B<sub>1</sub> 的缺陷菌株(9—151, 17—119)产生的假菌丝均不如原始菌株(2—120)发达, 而 9—151 则更差。

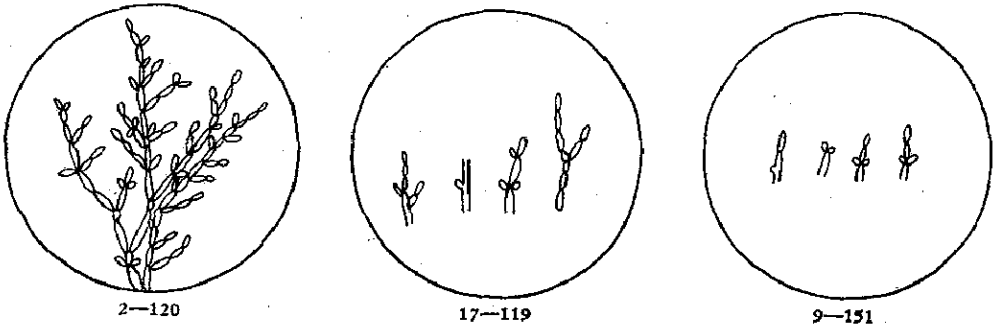


图 6 缺陷菌株与原始菌株在形成假菌絲方面的比較

5. 从生长曲线的比較来看 (图 7), 在延滞期无显著差别, 一般长达 4—5 小时。在对数期, 缺陷菌株与原始菌株的差异就显著了; 原始菌种約在 30 小时就已达到对数期之末, 而 17—119 約在 35 小时, 9—151 約在 40 小时左右才达到对数期之末。所以缺陷菌株的对数期一般均比原始菌株有所延长。

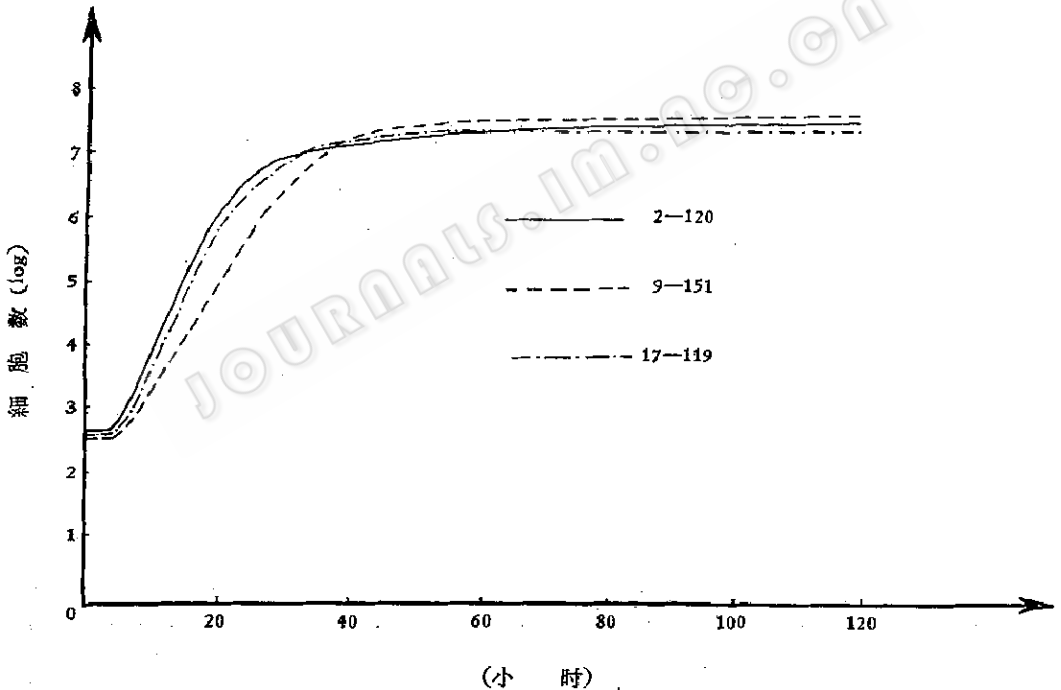


图 7 生长曲线的比較

6. 細胞色素系統的比較: 在用手持分光光度計的觀察比較下, 发现 5 株 (9—151, 11—20, 27—1, 27—112, 27—208) 維生素  $\text{B}_1$  的缺陷菌株, 在細胞色素 a 方面亦是缺陷的。其余維生素  $\text{B}_1$  缺陷菌株在細胞色素方面与原始菌株比較时, 未发现什么差异。

最后必須指出,  $\text{B}_1$  缺陷菌株經两年多、20—50 次左右的轉接保存, 維生素  $\text{B}_1$  的缺陷特性仍牢固地保持着, 說明这种缺陷特性是稳定的。

#### 四、摘 要

1. 試驗确定了 *Candida utilis* 的存活率随照射剂量的增加而减小, 它与  $\gamma$ -射綫 ( $\text{Co}^{60}$ )

剂量之間是成指数曲線的关系。其半致死剂量 ( $LD_{50}$ ) 为 52,200 伦。

2. 在获得的 2,012 株营养缺陷菌株中选出了 31 株維生素  $B_1$  的缺陷菌株, 共占整个营养缺陷型的 1.54%。

3. 在細胞大小, 菌落直径, 氧的吸收以及假菌絲发达程度等方面; 缺陷菌株均比原始菌株显出不同程度的差异。在生长曲線方面, 缺陷菌株的对数期一般均比原始菌株有所延长。

4. 在細胞色素系統方面, 在整个維生素  $B_1$  的缺陷菌株里, 仅发现 5 株是缺細胞色素  $a$  的, 其余的  $B_1$  缺陷菌株与原始菌株沒有差別。

5. 所获得的  $B_1$  缺陷菌株經两年多、20—50 次左右的轉接保存, 它們对維生素  $B_1$  需要的缺陷特性是稳定的。

### 参 考 文 献

- [1] 阿里汗揚, С. И., 加林娜, К. П. 等, 微生物的放射遗传学与选种学。“放射性同位素在农业和生物学上的应用”。苏联专家报告資料汇编之三, 上海科技出版社, 37—63 頁, 1959。
- [2] Caglioti, M. T. and Sermoniti, G. J., A study of the genetics of penicillin-producing capacity in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, 14: 38—46, 1956.
- [3] Wright, R. E., Hendershat, W. F. and Peterson, W. H., Production and testing of yeast mutants of glycerol formation. *Appl. Microbiol.*, 5: 272—279, 1957.
- [4] Reader, Vera., The relation of the growth of certain microorganisms to the composition of the medium. 1. The sythetic culture medium. *Biochem. J.*, 21, 901—907, 1927.
- [5] Burkholder, P. R. McVeigh Ilda and Moyer, Dorothy, Studies on some growth factors of yeasts. *J. Bact.*, 48: 385—391, 1944.
- [6] Lederberg, J. and Tatum, E. L., Detection of biochemical mutants of microorganisms. *J. Biol. Chem.* 165: 381—382, 1946.
- [7] Beadle, G. W. and Tatum, E. L. *Neurospora*. II. Methods of producing and detecting mutation concerned with nutritional requirements. *Am. J. Botany* 32: 678—686, 1945.
- [8] Beadle, G. W., and Tatum, E. L., Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 27: 499—506, 1941.
- [9] Селиверстова, Л. А., Действие лучей  $Co^{60}$  на синтез риб-а—флавина дрожжевыми организмами. *Известия АН СССР*, 37: 412—417, 1959.
- [10] Селиверстова, Л. А., Влияние лучей рентгена на синтез парааминобензойной кислоты культурами *Saccharomyces cerevisiae* и *Torulopsis utilis*. *Микробиология*. Том XXVIII, Вып. 6, 830—834, 1959.
- [11] Селиверстова, Л. А., Увеличение синтеза и накопления инозита дрожжевыми организмами под влиянием рентгеновского облучения. *Микробиология*. Том XXVII, Вып. 5, 577—580, 1958.
- [12] Селиверстова, Л. А., Влияние лучей рентгена на синтез и аккумуляцию пантотеновой кислоты дрожжевыми организмами. *Журнал. Общей Биологии*, Том XVIII, № 5, 360—365, 1957.
- [13] Миндлия, С. З., Алиханян, С. И., Биохимические мутанты *Actinomyces rimosus* (продуцента тетрацикла). *Докл. АН СССР*. № 4, 884—886, 1956.
- [14] Сукурова, Е. Н. и Волкова, Т. М., Биохимические мутации у *Torulopsis utilis* при воздействии ионизирующими излучениями. *Радиобиология*. Том 2, Вып. 1, 36—42, 1962.
- [15] Одинцова, Е. Н., *Микробиологические методы определения витаминов*. Изд-во АН СССР. М. 1959.



## ПОЛУЧЕНИЕ ДЕФИЦИТНЫХ ПО ВИТАМИНУ $\text{B}_1$ ВАРИАНТОВ У *CANDIDA UTILIS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ $\gamma$ -ИЗЛУЧЕНИЯМИ ( $\text{Co}^{60}$ ) И СРАВНЕНИЕ ИХ С ИСХОДНЫМ ШТАММОМ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ

Чжуан Чжэн-хуй и Цень Цдя-сун

(Институт микробиологии АН КНР)

(1) В опытах установлено, что выживаемость клеток у *Candida utilis* уменьшается с увеличением дозы облучения. Их выживаемость носит экспоненциальный характер по отношению к дозе. Полулетальная доза для *C. utilis*—52,200 Р.

(2) Из полученных нами 2012 дефицитных питательных вариантов был отобран 31 дефицитный по витамину  $\text{B}_1$  вариант. Они составляют 1.54% из всех питательных.

(3) При сравнении с исходным штаммом размер клеток, диаметр колоний, скорость поглощения кислорода и степень развития псевдомицелия у вариантов с дефектным витамином  $\text{B}_1$  оказываются различными в большей или меньшей степени. Тем более, фаза логарифмического роста у последних удлиняется.

(4) Данные по изучению цитохромной системы у всех дефицитных по витамину  $\text{B}_1$  вариантов показали, что лишь в 5 дефицитных по витамину  $\text{B}_1$  вариантах отсутствует цитохром а.

(5) Дефицитное свойство в витамине  $\text{B}_1$  у полученных вариантов, подвергающихся пересевам 20—50 раз на суло-агаре, при хранении их в течение более двух лет оказывается неизменным.