

X 射线对酵母菌繁殖的作用*

薛禹谷 尹光琳 張永慶

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由于酵母细胞的大小和繁殖方法等特点, 使它们经射线照射后适于在显微镜下进行细胞生长和分裂过程的详细观察。因此, 很久以来, 酵母就作为放射生物学研究的良好材料之一。Brace^[1] 用双倍体酵母 (LD_{50} 20 kr) 经 X 射线照射后, 发现酵母细胞发生膨大, 在三、四代后, 平均细胞体积, 仍是对照的 2.3 倍。Burns^[2] 研究了不同倍体的出芽和不出芽的单个酵母细胞照射后分裂延迟情况, 指出出芽细胞分裂开始的时间早于不出芽细胞。Beams^[3] 指出出芽细胞照射后形成菌落的能力大于未出芽细胞。Spoerl^[4,5] 用低剂量 X 射线连续照射酵母, 证明分裂受到抑制, 并观察到分裂的抑制包括两种情况: 一种是出芽的抑制, 另一种是细胞分开过程的抑制。前人有关这方面的工作大都是在照射后紧接着的几小时内测定细胞数目、细胞大小和平均细胞重量等作为射线对细胞存活、生长和分裂等效应的指标, 但是这些抑制生长和分裂的效应究竟能维持多长时间, 对数期 K 值是否仍受抑制效应的影响, 尚未见报导。作者等曾证明^[6] 在一定的 γ -射线剂量范围内, 对对数期生长曲线式 $n = n_0 e^{kt}$ 中的 K 值无影响, 各种剂量处理后, 酵母菌的生长曲线主要取决于存活的细胞数; 酵母受 γ -射线照射后存活下来的菌数一旦进入对数期后, 则其分裂能力基本不受影响, 本文目的主要为探究经 X 射线照射后, 这样的规律是否也能适用, 并在同一实验条件下进一步肯定射线对酵母延迟期的作用。

一、材料和方法

菌种 中国科学院微生物研究所保藏的 *Saccharomyces cerevisiae*, 菌系 Я, 菌号: 2.576。

菌悬液制备和干重测定 将培养在 10 Brix 麦芽汁斜面上 48 小时的菌种连续移种两次后接种到含有 10 Brix 麦芽汁洋葱培养基的克氏瓶内, 28°C 培养 48 小时后, 将菌体用无菌自来水洗下, 离心清洗 3 次, 再经抽滤后, 按菌体湿重配成 2% 的悬液, 细胞浓度在 6×10^7 与 1×10^8 之间。

射源和照射方法 射源为 X 射线, 所用 X 光机有两种:

- (1) 电压 172 千伏, 电流 21.5 毫安, 焦距 12 厘米, 剂量率 2870 伦/分, 不加滤片¹⁾。
- (2) 电压 107 千伏, 电流 5 毫安, 焦距 7 厘米, 剂量率 500 伦/分, 不加滤片 (此仅用于不同生长时期的酵母对 X 射线敏感性的实验中)。

照射方法

- (1) 用于上述 X 光机(1), 将摇匀的菌悬液 13 毫升, 放在预先灭菌、上包以玻璃纸的培养皿中 (内径 5.7 厘米, 高度 1.6 厘米) 直接放在射源下在空气中照射, 各种剂量处理用时间长短进行调节。
- (2) 用于上述 X 光机(2), 所用的培养皿为内径 4.6 厘米, 高度 1.3 厘米, 内放菌液 7 毫升。

* 本工作承施履吉先生提供宝贵意见, 特此致谢。

1) 系由中国科学院生物物理研究所代为照射, 特此志谢。

本文 1963 年 8 月 7 日收到。

二、实验结果

(一) 不同生长时期的酵母菌对 X 射线的敏感性

将不同生长时期(5 小时, 17 小时, 48 小时)的2%酵母菌悬液,经 15 kr X 射线照射,稀释到 10^{-5} 后取出 0.05 毫升加在略为晾干的 10 Brix 麦芽汁洋菜培养基上,涂匀,在 28℃ 培养 48 小时后,计算生长菌落数,以平行进行的对照菌数为 100%,计算其存活百分数。出芽率用血球计数板计数,成对细胞中较小细胞直径如大于较大细胞直径 1/2 时,作为两个细胞计数,如小于 1/2,则以出芽数计算,六次重复,结果见表 1。

表 1 不同生长时期的酵母对 X 射线敏感性的比较

培养时间 (小时)	存 活 率		出 芽 率	
	%	差异显著性比较	%	差异显著性比较
5	85.6±8.1		19.1±0.8	$t = 4.24 P < 0.05$
17	79.2±5.1	$t = 2.91 P < 0.05$	11.9±0.6	
48	93.3±4.2	$t = 3.67 P < 0.05$	4.2±0.1	$t = 6.42 P < 0.05$

根据表 1 结果可以见到,不同生长时期的酵母菌对 X 射线的敏感性有显著性差异,酵母菌在培养 17 小时,即在对数分裂时期对 X 射线最敏感,而在培养 5 小时,即延迟期末次之,以培养 48 小时,即停滞期最不敏感,故通常照射时大多采用培养 16—24 小时的菌体较多^[4,7,8],本文以下实验因须与以往结果比较^[6],故仍采用 48 小时的菌体。

(二) X 射线对酵母菌存活率的影响

将受不同剂量 X 射线 (5 kr、15 kr、20 kr、25 kr、75 kr、150 kr) 照射过的 2% 菌悬液进行稀释,如前进行平板测定,重复五次,结果见图 1a、1b。

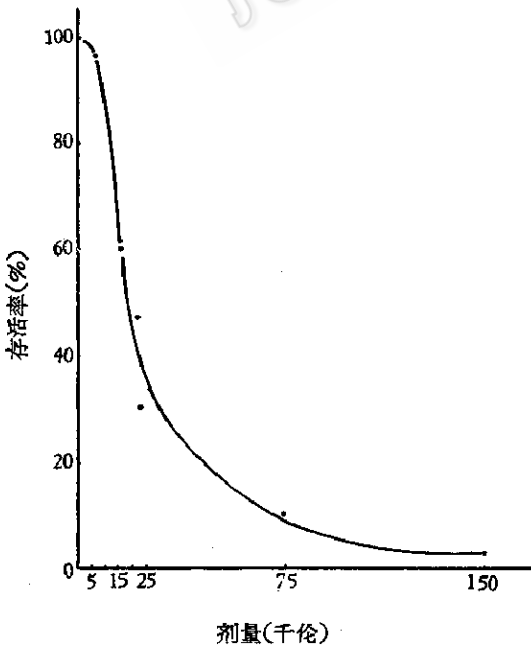


图 1a 不同剂量 X 射线对酵母存活率的影响

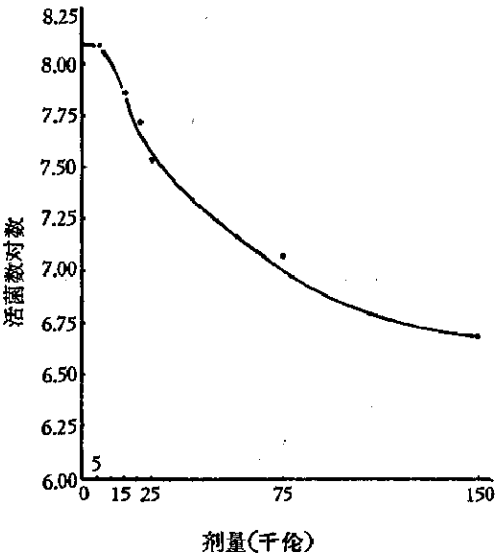


图 1b 不同剂量 X 射线与酵母存活菌数对数的关系

从图 1b 结果可以看到,在本实验条件下经不同剂量 X 射线照射后,酵母菌存活菌数的对数随剂量增加而下降,在我们所用剂量范围内,二者近似于 S 形关系,与前人结果类似^[8,9]。从图 1a 中可测得其 LD_{50} 是 16.5 kr, LD_{63} 是 20.7 kr。

(三) X 射线对酵母细胞繁殖的影响

将不同 X 射线剂量处理的 2% 菌液 1 份,接入 9 份液体麦芽汁中,在 28°C 培养,每隔 2—3 小时取出少量培养液,以无菌自来水稀释,用平板法测定其活菌数,5 次重复,结果见图 2。为了进一步肯定射线对酵母生长曲线影响的本质,在完全相同的条件下,同时进行了未经照射,接种菌量不同时菌数增长的实验,结果见图 3。

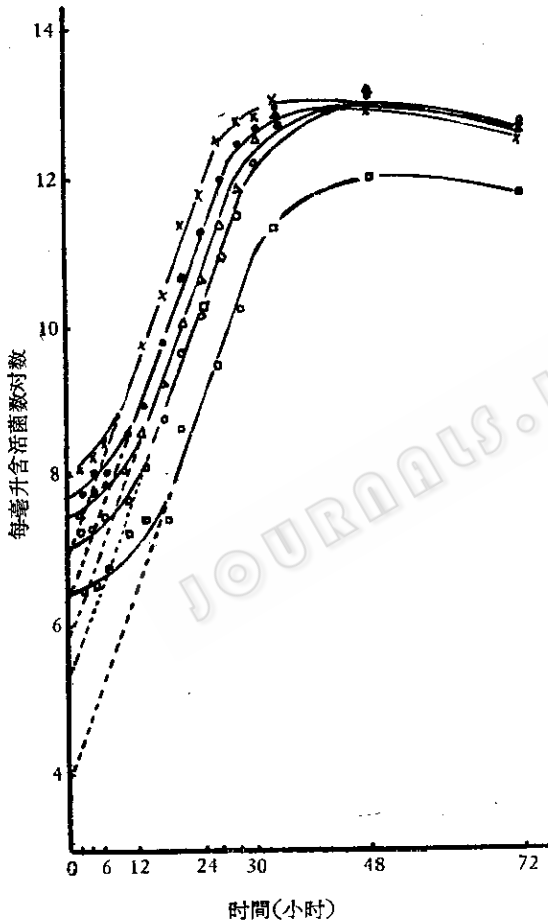


图 2 不同剂量 X 射线对酵母菌生长曲线的影响

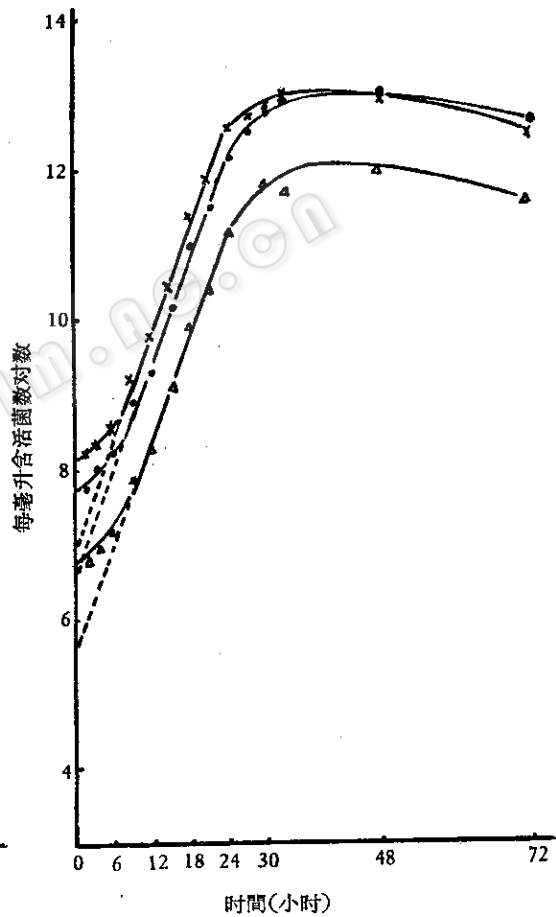


图 3 不同接种量对酵母菌生长曲线的影响

酵母细胞增长曲线中对数期的线段方程式:

$$n = n_{c0} e^{Kt}$$

式中 n 是在时间 t 时的酵母菌个体数, n_{c0} 是理论上生长开始时酵母菌个体数, K 是常数, e 是自然对数底, t 是时间, 由图 2 和图 3, 可以定出对照和各种处理增长曲线中对数期部分的 n 、 n_{c0} 和 t , 从而求得各个对数期部分的方程式。 n_{c0} 是增长曲线的对数线段延伸线在活菌数对数轴上截距的反对数, 各种处理的 n_{c0} 值见表 2。从表 2 可以看出

各种处理的 $\log n_{c0}$ 随 X 射线剂量增加而减少, 并和 $\log n_0$ 有一线性关系, 但由于延迟期的影响, n_{c0} 随剂量增加而减少的数大于 n_0 。K 值是增长曲线的对数线段的斜率, 这些方程式的 K 值列于表 3。统计分析结果表明, 各不同剂量 X 射线处理间, 各不同接种菌量间, 以及上述两组实验之间, 所得 K 值都没有显著差别, 平均 K 值是 0.549 ± 0.003 。

表 2 $t=0$ 时, 不同剂量 X 射线及不同接种菌量对酵母菌的 n_{c0} 的影响

处 理	理论存活菌数对数 ($\log n_{c0}$)	理论存活菌数 (n_{c0})	存活菌数对数 ($\log n_0$)
对照	6.85	7.08×10^6	8.10
10 kr	6.25	1.78×10^6	7.80
25 kr	5.60	3.98×10^5	7.54
75 kr	5.22	1.66×10^5	7.10
150 kr	3.80	6.31×10^3	6.53
40%	6.55	3.58×10^6	7.68
5%	5.50	3.16×10^5	6.73

表 3 不同剂量 X 射线及不同接种菌量对酵母菌对数期 K 值影响差异显著性比较

处 理	K 值	重复次数	与对照间差异显著的比较
对照	0.552 ± 0.002	5	
10 kr	0.542 ± 0.006	5	$t = 1.18 \quad P > 0.05$
25 kr	0.551 ± 0.003	5	$t = 0.32 \quad P > 0.05$
75 kr	0.554 ± 0.003	5	$t = 0.21 \quad P > 0.05$
150 kr	0.544 ± 0.002	5	$t = 1.88 \quad P > 0.05$
40%	0.553 ± 0.002	5	$t = 0.32 \quad P > 0.05$
5%	0.545 ± 0.005	5	$t = 2.11 \quad P > 0.05$

三、讨 论

根据本实验结果, 以培养 5 小时、处于延迟期、出芽率达 19.1% 的酵母照射时, 其存活率为 85.6%; 而以培养 48 小时、处于停滞期、出芽率低达 4.2% 的酵母菌照射时, 则其抗性最大, 存活率高达 93.3%; 如以培养 17 小时、处于对数分裂期、出芽率为 11.9% 的酵母照射时, 则最为敏感, 存活率为 79.2%。这与 Beams^[10] 提出出芽细胞抗性会大大增加的结论不同, 但本实验中因出芽率仅占少数, 且出芽并非生长阶段中唯一指标, 不同生长阶段的大部分不出芽细胞的敏感性并未同时测定, 故尚待进一步研究。本实验所用菌体培养时间为 48 小时, 并非处于对辐射最敏感的阶段。

本实验的结果, 虽然是用的 X 射线, 仍然证实了我们以前用 γ -射线的结果, 即酵母细胞受照射后, 开始分裂的时间延迟了, 从不同剂量处理后的生长曲线中, 可求得延迟期时间的长短^[11], 结果见表 4。

表 4 不同剂量 X 射线及不同接种菌量对酵母菌生长曲线延迟期的影响

处 理	对 照	40%	5%	10 kr	25 kr	75 kr	150 kr
活菌数对数	8.098	7.681	6.726	7.798	7.544	7.095	6.534
延迟期(小时)	5.2	5.3	5.4	6.2	7.4	8.7	11.6

表 4 的结果表明,在我們所用 X 射线剂量范围内,延迟期时间的长短与 X 射线剂量之间有一线性关系,即剂量愈大,延迟期愈长,这种关系可用下式表示:

$$T = 0.039R + 5.5$$

式中 T 为延迟期长短,以小时为单位, R 是 X 射线剂量,以 kr 为单位,从式中可知斜率为 0.039,以前作者在 γ -射线的工作中所得斜率为 0.036,这两者间有一些差别,但这个差别是否有意义,现在尚不能肯定。

随着 X 射线剂量的增加,酵母延迟期的增长可能由于: (1)延迟期的逐渐增长是由于存活细胞的减少; (2)延迟期的增长是由于 X 射线实际上增长了每个细胞的延迟期,也就是说照射过的细胞,其延迟期长于未照射的细胞,和 (3)延迟期的增长是由于上述两种原因的综合作用。

从表 4 资料可以看出,接入菌量的对数虽也与延迟期长短之间成反比,但对延迟期影响较小,前人也有类似的结果^[12],在经射线照射组的实验中的延迟期远较不同接种量实验中的为长,因此,随着 X 射线剂量的增高而增长延迟期的现象显然是由于存活菌数的减少和 X 射线对每个存活细胞的延迟期增长二者综合作用所造成的。其中 X 射线增长了每个存活细胞的延迟期起了主要作用。

本实验结果除证实了我们以往在 γ 射线工作中所得的结论^[6]: 即在所用的剂量范围内, X 射线对对数期生长曲线的 K 值没有显著影响外,并进一步肯定了 X 射线有延长酵母延迟期的作用,经不同剂量 X 射线照射后,菌数增长率与 K 值无关,而仅与存活菌数及延迟期的长短有关。

四、摘 要

1. 酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 在对数生长期对 X 射线最为敏感,延迟期次之,停滞期抗性最大。

2. 其存活菌数与剂量间关系近似 S 形曲线,半致死剂量 (LD_{50}) 是 16.5 kr, 平均致死剂量 (LD_{63}) 是 20.65 kr。

3. X 射线能延迟每个酵母细胞开始分裂的时间。

4. 在所用剂量范围内 (0—150 kr), X 射线剂量对酵母菌的对数期生长曲线式 $n = n_0 e^{Kt}$ 中的 K 值无影响,各种剂量处理后酵母菌的生长曲线主要取决于存活的细胞数和延迟期的长短。

参 考 文 献

- [1] Bracc, K. C.: *Proc. Exptl. Biol. Med.*, **74**:751—755, 1950.
- [2] Burns, V. W.: *Rad. Res.*, **4**:394—412, 1956.
- [3] Beams, C. A., Mortimer, R. K., Wolfe, R. G., and Tobles, C. A.: *Arch. Biophys.*, **49**:110—122, 1954.
- [4] Spoerl, E., Loveless, L. E., Weisman, T. H., and Balske, R. J.: *J. Bacteriol.*, **67**:394—401, 1954.
- [5] Spoerl, E., and Looney, D.: *Exp. Cell. Res.*, **17**:320—327, 1959.
- [6] 薛禹谷、刘心明: *微生物学报*, **8**:429—436, 1962.
- [7] Owen, M. E., Mortimer, R. K.: *Nature*, **177**:625—626, 1956.
- [8] Shirley, E. G., Henry, I. Kohn.: *J. Bacteriol.*, **71**:571—581, 1956.
- [9] Magni, G. E.: *Rad. Res. Suppl.*, **1**:347—356, 1959.

- [10] Beams, C. A.: *Rad. Res. Suppl.*, 1:372—390, 1959.
[11] Cook, A. H.: *The Chemistry and Biology of Yeasts*, N. Y. Academic Press, 260, 1958.
[12] И. Л. Равотнова и Л. А. Минеева: *Микробиология*, 28:352—355, 1959.

THE EFFECT OF X-RAY RADIATION ON THE REPRODUCTION OF YEAST

Y. G. SHIE, G. L. YIN AND Y. Q. ZHANG

(*Institute of Microbiology, Academic Sinica, Peking*)

(1) The logarithmic phase in the life span of *Saccharomyces cerevisiae* Я is the most sensitive, the lag phase, the less, and the stationary phase, the least, to X-ray radiation.

(2) The relation between the number of survival cells and radiation dose is somewhat sigmoid. Both the medial lethal dose (LD_{50}) and the mean lethal dose (LD_{63}) have been determined to be 16.5 Kr and 20.65 Kr, respectively.

(3) One of the effect of X-ray treatment is the delay of the starting time of yeast cell divisions.

(4) Within the range of doses (0—150Kr) used in the experiments, X-irradiation has no significant effect on the constant K of the equation $N = N_0 e^{Kt}$. The differences found among the post-irradiation growth curves are mainly determined by the number of survival cells and the length of lag phase.