

产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 及其营养突变株 的亚显微形态及呼吸活力的比较研究*

江 慧 修 徐 浩
(中国科学院微生物研究所, 北京)

产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 2.120 与其维生素 B₁ 缺陷种 9.151, 还原性硫酸盐缺陷种 18.173 在粒线体的亚显微形态及呼吸活力方面, 均有较大的差别。在氧气充足的平面培养中, 原种 2.120 的粒线体大, 且具有发达的嵴, 而其营养突变株 9.151 和 18.173 的粒线体, 嵴很少且多呈无嵴的环状结构。三个菌株的耗氧率高低也与粒线体的发达程度有平行关系, 即原种 2.120 最高, 营养突变株 18.173 次之, 9.151 最低。在通氮气(无氧)的培养中, 三个菌株都不具有典型的粒线体, 而出现一些环状或网状的膜结构。

在异养的植物型单细胞微生物中, 酵母几乎是唯一的具有粒线体的机体, 同时在有氧和无氧条件下均能生长, 因此它是研究粒线体的发生、功能等很好的材料。从生化和生理的研究中, 早就知道粒线体是呼吸链酶系所在的主要胞器^[1]。从亚显微结构方面, 人们也发现酵母粒线体的发生和发达程度与氧气的供给有关^[2-3], 这些结果指出结构和功能之间有着密切的联系。为了进一步明确结构和功能之间的关系, 我们选择 *Candida utilis* 及其营养突变株, 比较了它们的结构和呼吸之间的联系。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

1. 2.120 是本所保藏的 *Candida utilis* 原株。
2. 9.151 是 2.120 的营养突变株, 属于维生素 B₁ 缺陷种^[4]。
3. 18.173 也是 2.120 的营养突变株, 它是一个还原性硫酸盐的缺陷种^[1]。

(二) 培养条件

为了比较在不同条件下粒线体发达的程度, 将上述三个菌株分别做平面培养(有氧)、深层培养(相对厌氧)及连续通氮培养(厌氧)三种处理。为了抑制酵母细胞内 RNA 的大量合成, 以便切片观察, 依四抑法^[5], 采用含磷量很低的培养基。

(1) 平面培养 在 23×13 厘米的克氏瓶内装一薄层洋菜合成培养基, 接种后在 28℃ 中俯向培养。培养基成分如下:

(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 克
KCl	0.55 克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50 克
葡萄糖	50.0 克
酵母汁(6%)	10.0 毫升
洋菜	20 克

* ① 承庄增辉、钱稼荪等同志提供营养突变株 9.151 及 18.173 (18.173 的研究论文尚未发表)。② 所用的电子显微镜是中国科学院北京生物学实验中心的仪器, 在观察摄影时, 承电镜室冯文慧等同志给予热情的帮助。③ 承生物物理所慨允使用 LKB 和 Niklowitz 切片机, 薛吉年等同志大力帮助。④ 那淑敏同志参加了部分工作。对于以上各单位和各同志致以衷心的感谢。

1) 庄增辉、钱稼荪, 原文尚未发表。
本文 1965 年 11 月 11 日收到。

蒸馏水加至 1000 毫升

pH 5.6, 15 磅 30 分灭菌

(2) 深层培养 在直径 1.6 厘米, 高 20 厘米的试管里, 装 25 毫升液体培养基, 其成分及培养条件同平面培养。

(3) 连续通氮培养 将灭菌的新鲜液体培养基 110 毫升[培养基成分及条件同(2)], 装入 150 毫升的洗气瓶中, 接种后, 洗气瓶的进口端连经焦性没食子酸重复洗过的氮气(北京气体厂出品, 未洗前纯度是 98.5% 以上), 出口端插入水中, 开始用快速通氮 4 小时, 以驱除液面以上的空气, 以后在全部培养过程中, 均以每分钟约 30 个气泡的速度连续通氮。

(三) 切片及形态观察方法

根据作者^[6]及 Afzelius^[7]的工作, Luft 固定液对酵母材料较为适用, 因此在本文中全部采用这种固定液。固定及包埋细节见前文^[6], 简略流程如下:

取刚进入稳定期的培养物(培养 48 小时)用冷开水洗涤(两次)→蒸馏水洗涤→在 0℃ 用 Luft 固定液固定 30 分钟→冷蒸馏水洗涤(三次)→以 30%、50%、70%、95% 乙醇逐级脱水(每次 5 分钟)→100% 乙醇(两次, 每次 10 分钟)→等体积的 100% 乙醇和 1:4 的甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯混合液处理 10 分钟→1:4 的甲基丙烯酸甲酯与甲基丙烯酸丁酯浸润(两次, 每次 20 分钟以上)→同前比例混合酯类的预聚物包埋。包埋液在 58℃ 聚合至硬。深层培养物及连续通氮的培养物, 从收集细胞到固定后的脱水之前, 全部操作在 0℃ 下进行。使用 LKB 或 Niklowitz 型切片机切片, 用日立 HU-11A 电子显微镜观察及摄影。该电镜所用的物镜极靴是作立体观察用的附件 HK-1S 立体装置(stereo device)的物镜极靴, 分辨率为 12.6 Å。原底片又作了 4—6 倍光学放大。部分材料曾用中性福尔马林和 Luft 液双重固定, 并用 RNA 酶处理, 方法及药品同前^[6], 由于双重固定, RNA 酶处理法并没有显著降低电子不透性物质的含量, 故照片未予刊出。

(四) 三菌株耗氧率的比较

取稳定期的平面培养物(培养 48 小时)在 pH 5.6 的磷酸盐缓冲液中 28℃ 饥饿 6 小时, 然后用

葡萄糖作底物依常规的瓦氏测压法测定其耗氧率, 将所得数值除去内源性部分后, 以单个细胞耗氧的微升数表示, 用直线回归的统计方法绘成线性曲线。并依 10.05 水准比较了 60 分钟时的相差显著性。

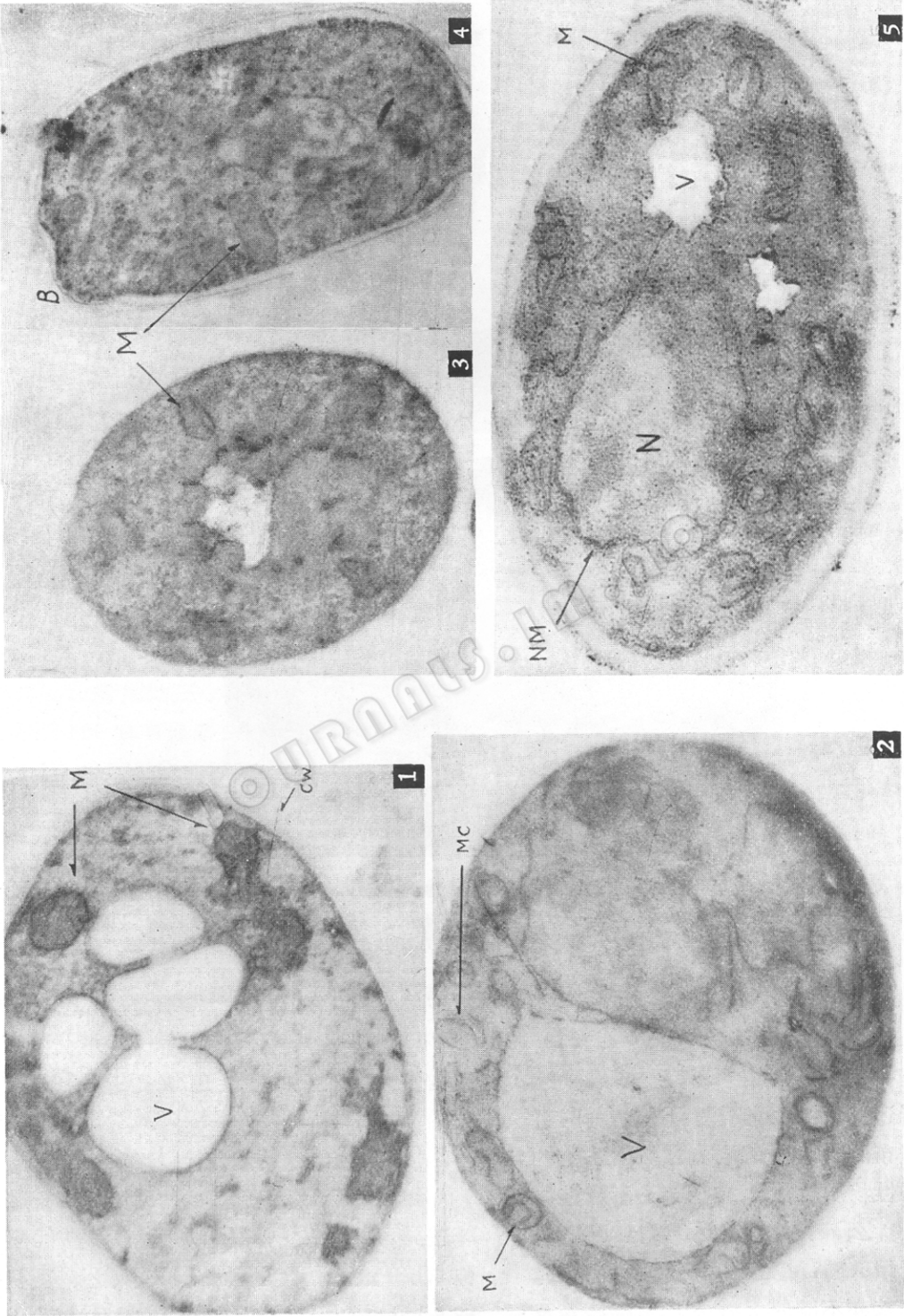
实验结果

(一) 亚显微形态的比较观察

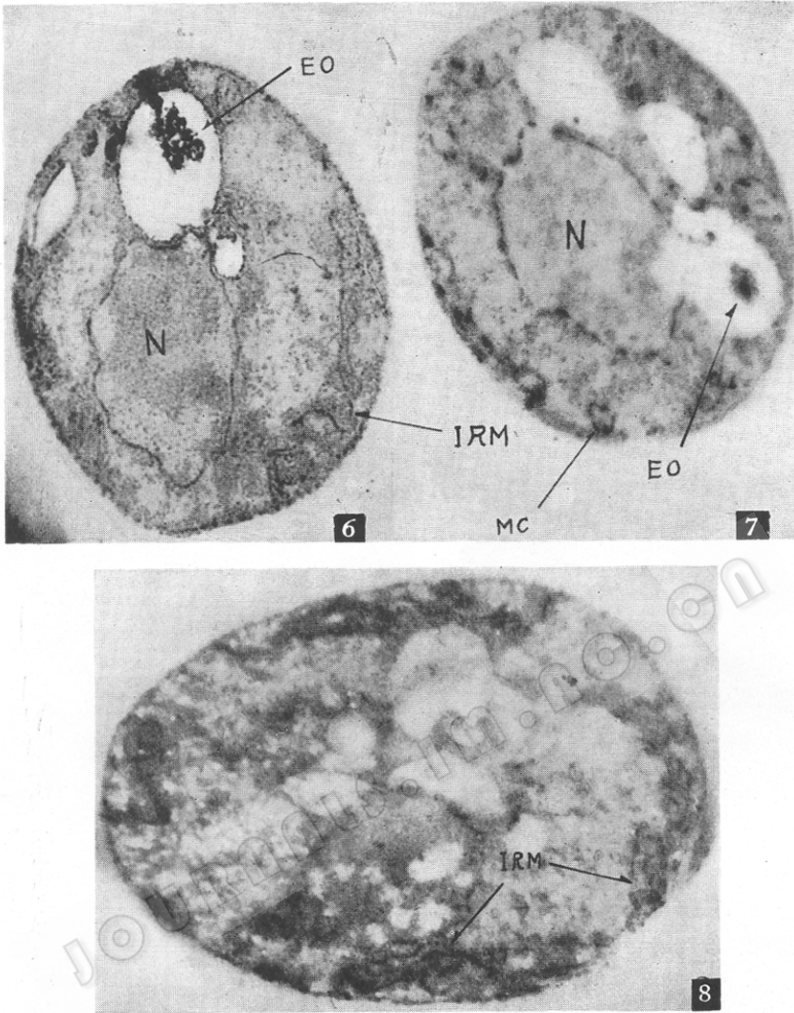
从超薄切片的电镜照片中, 可以观察到在平面培养时, 原种有很发达的粒线体——硕大而具有较多的嵴(照片 1、5)。两株突变株 18.173 和 9.151 的粒线体的嵴很不发达(照片 2、3、4), 多数是呈双膜的环状结构, 数量上 18.173 含这种膜结构较 9.151 多, 在细胞质内分布也较均匀。此外, 原种的细胞壁比两个突变株要厚得多(照片 1、5), 液泡也较大。

从不同培养条件来看, 在深层培养时, 三个菌株都仍然具有平面培养时相同的结构, 值得注意的是粒线体似乎比平面培养时更为发达(照片 5)。根据过去的资料, 尚未见有此报导, 这种现象说明在氧气不充足的条件下, 粒线体不仅能发生, 且为充分利用仅有的氧, 粒线体要执行比正常条件下更为艰巨的功能, 就可能促使结构更为发达, 这种情形显然是一种补偿作用。

在通氮培养(厌氧培养)48 小时后的细胞中能看到一些没有嵴的环状的膜结构(照片 7)及一些简单的不规则的膜结构(照片 6、8)。液泡中含有许多平面培养时液泡中所不具有的电子不透性物质(照片 6、7)。Linnane^[2]曾报导 *Torulopsis utilis* 在厌氧培养中没有粒线体, 但形成一种在细胞质内分布均匀的网膜结构, 液泡里也含有许多电子不透性颗粒。Polakis^[8]报导 *Saccharomyces cerevisiae* 在厌氧培养下也不形成粒线体, 而且大部分细胞不形成液



1. 平面培养的原种 2.120, 可看到液泡 (V), 及颗粒体 (M), 颗粒体的膜很发达, 细胞壁较厚。×30,000; 2. 平面培养的 18.173, 具有稀少的颗粒体 (M), 和许多环状的膜结构 (MC)。×30,000; 3—4. 平面培养的 9.151, 可看到稀少的颗粒体 (M), 及刚要突出母细胞的芽 (B)。×20,000; 5. 深层培养的原种 2.120, 不仅能看到平面培养时看到的全部结构, 且颗粒体更为发达。×30,000



6. 通氮培养的 9.151, 液泡内含有许多电子不透性物质(EO), 细胞质内可看到一些不规则的膜结构 (IRM)。×20,000;
7. 通氮培养的 18.173, 细胞质内分布有环状的膜结构 (MC), 液泡里也有许多电子不透性物质 (EO)。×20,000;
8. 通氮培养的 2.120, 细胞质里分布有不规则的膜结构 (IRM), 无典型的粒线体。×30,000。

泡。这些报导与作者结果不完全符合。此外, 作者还发现深层培养和通氮培养的细胞质中, 布满了比平面培养时更为浓重的电子不透性物质, 关于这些电子不透性物质到底是什么, 有的作者认为是 RNA^[9], 但是作者用 RNA 酶处理并不能将它除去, 低磷培养基亦不能使之减少, 深层培养及通氮培养的出芽繁殖, 从菌体收获量上来看, 显然不如平面培养, 但何以“RNA”反

而增多呢? 他们的看法还值得进一步探讨。

(二) 耗氧率的测定

如图 1 所示, 三个菌株的耗氧率有显著差异, 并与形态观察的情况相对应, 即原种 2.120 最高, 突变种 18.173 次之, 突变种 9.151 最低。表明了酵母粒线体的发达程度与呼吸功能之间确实存有平行的关系。

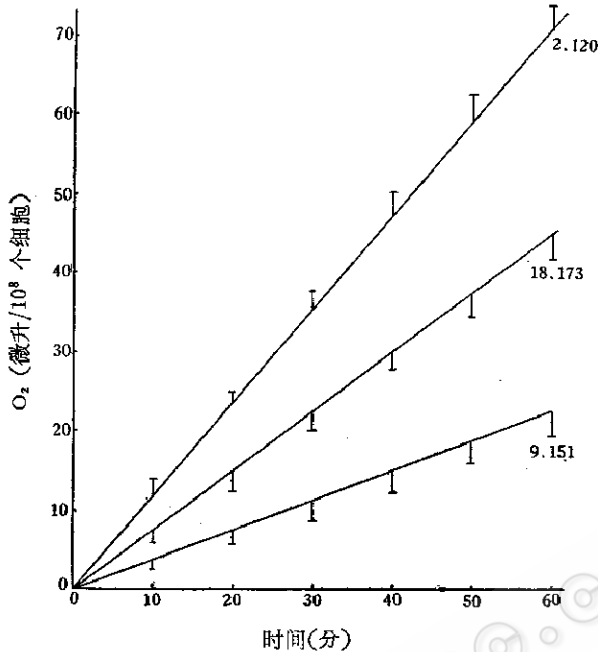


图1 饥饿6小时后以葡萄糖为基质的耗氧率

结 论

1. 所用的三个菌株在平面培养中, 原种 2.120 具有显著发达的粒线体, 营养突变株 18.173 和 9.151 具有不发达的粒线体, 嵴较少。

2. 三个菌株在深层培养(相对厌氧)中均具有平面培养时完全相近的结构, 且因补偿效应, 粒线体似乎比平面培养时更为发达。

3. 无氧培养下, 只具有简单的没有嵴的环膜结构或一些不规则的膜结构, 液泡中含有一些电子不透性物质。

4. 比较三菌株平面培养物的耗氧率, 结果与粒线体的发达程度有平行关系, 即原种 2.120 最高, 营养突变株 18.173 次之, 9.151 最低。

5. 原种具较厚的壁。

6. 酵母细胞内, 尤其是厌氧条件下, 含

有较多的电子不透性物质, 这些物质究竟是什么, 还有待探讨。

参 考 文 献

- [1] Lehninger, A. L.: *The Mitochondrion*, 1—13, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1964.
- [2] Linnane, A. W., Vitols, E. and Nowland, P. G.: *J. Cell Biol.*, 13:345—350, 1962.
- [3] Vitols, E. J., North, R. J. and Linnane, A. W.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9:689—695, 1961.
- [4] 庄增辉、钱稼荪: *微生物学报*, 8:437—445, 1962.
- [5] Yotsuyanagi, Y.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 248:274—277, 1959.
- [6] 徐 浩、江慧修: *微生物学报*, 11:161—173, 1965.
- [7] Afzelius, B. A.: In Harris, R. J. C. (ed.) *The Interpretation of Ultrastructures*, Acad. Press, New York, 1962.
- [8] Polakis, E. S., Bartley, W. and Meek, G. A.: *Biochem. J.*, 90:369—374, 1964.
- [9] Pease, D. C.: *Histological Techniques for Electron Microscopy*, 46, Acad. Press, New York, 1960.

A COMPARATIVE STUDY ON THE SUBMICROSCOPIC MORPHOLOGY AND RESPIRATORY ACTIVITY OF *CANDIDA UTILIS* AND ITS TWO AUXOTROPHS

JIANG HUEY-SHIOW AND HSU HAO

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

A comparison on the submicroscopic morphology and respiratory activity of *Candida utilis* 2.120 with its two auxotrophs 18.173 and 9.151 has been made. The results obtained are as follows.

1. In the aerobic cells of the original strain 2.120 grown on the surface of the medium, the mitochondria cristae are better developed than those of the auxotrophs.

2. The partial anaerobic cells of strain 2.120 are of the same structure as the aerobic cells and owing to the compensatory effect, the mitochondria seem to be more conspicuous than those of the aerobic cells.

3. In the anaerobic cells, there are some circular or irregular apparatus instead of the typical mitochondria. The vacuoles of such cells contain some electron-opaque substances.

4. The oxygen consumption rates of the three strains correspond respectively with the development of mitochondria of these cells.

5. The cell wall of the original strain 2.120 is well developed.

The nature of the electron-opaque substances which occur generally in yeast cells especially in the anaerobic cells needs further study.