

地衣芽孢杆菌原生质体最佳形成和再生条件的研究

冯清平 薛林贵

(兰州大学生物系 兰州 730000)

近年来,微生物原生质体融合及诱变受到广泛重视,实验方法日趋完善,实践证明它是一种有效的育种方法。在微生物原生质体制备和再生过程中,各种微生物所需的最佳条件差别很大。我们研究了地衣芽孢杆菌 53-A₆ 菌株原生质体形成和再生的各种因素及最佳条件,并用光学显微镜和电镜观察了原生质体形成、再生和原生质体的聚集现象,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)53-A₆ 菌株,由本实验室筛选。

1.2 培养基

完全培养基(CM)(%):葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.25, pH9.5(固体培养基加 2%琼脂)。

再生培养基(DM₃):参照文献[1]进行。

鉴别培养基:参照文献[2]进行。

酪素琼脂培养基(%):酪素 0.4, CaCl₂ 0.0002, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, Na₂HPO₄ · 7H₂O 0.107, KH₂PO₄ 0.036, ZnCl₂ 0.0014, NaCl 0.016, FeSO₄ 0.0002; 酪素水解液 0.005, 琼脂 1.8, pH9.5。

双基质平板培养基(%):酪蛋白 1, 白明胶 1, 琼脂糖 1.5, pH10。

1.3 试剂

高渗稀释液(DF):参照文献[3]进行; 1%磷酸缓冲液(pH7.5)。

1.4 方法

1.4.1 原生质体的制备及再生:按文献[1]进行。

1.4.2 分析方法:用 pH5-29A 型酸度计测定 pH 值。

1.4.3 计数观察方法:原菌和原生质体的计数用血球计数板在显微镜下以及在平皿上用活菌计数法进行。用 Olympus 相差显微镜对原生质体形成和再生进行常规观察。电镜观察通过负染色技术制片,在 Philips EM400T 型电镜下进行。

2 结果和讨论

2.1 青霉素对 53-A₆ 菌株原生质体形成及再生的影响

2.1.1 不同生长时期加入青霉素对原生质体形成的影响:在 53-A₆ 菌株的不同生长时期加入青霉素测定其原生质体的形成率。从结果看出,在对数期的中期(6h)加入亚适量的青霉素比对数期前期(3h)加入,其原生质体的形成率高。53-A₆ 菌株在对数生长中期,菌体的生理状态相对一致,代谢旺盛,对青

本文于 1995 年 12 月 15 日收到。

霉素的敏感性强，此时加入适量的青霉素作用到对数生长末期，可以抑制细胞壁的合成，有利于原生质体的形成。

2.1.2 不同浓度的青霉素作用不同时间对菌株生长的影响：当 53-A₆ 菌株 42℃ 摇瓶培养 6h 时，分别加入不同浓度的青霉素作用不同时间，测定 53-A₆ 菌株对青霉素的敏感性，结果如图 1 所示。从图 1 可看出：随着青霉素浓度的增大和作用时间的延长，53-A₆ 菌株的敏感性逐渐增强，当青霉素浓度为 1.6U /ml，作用时间超过 4h，开始出现抑制菌株生长的趋势。

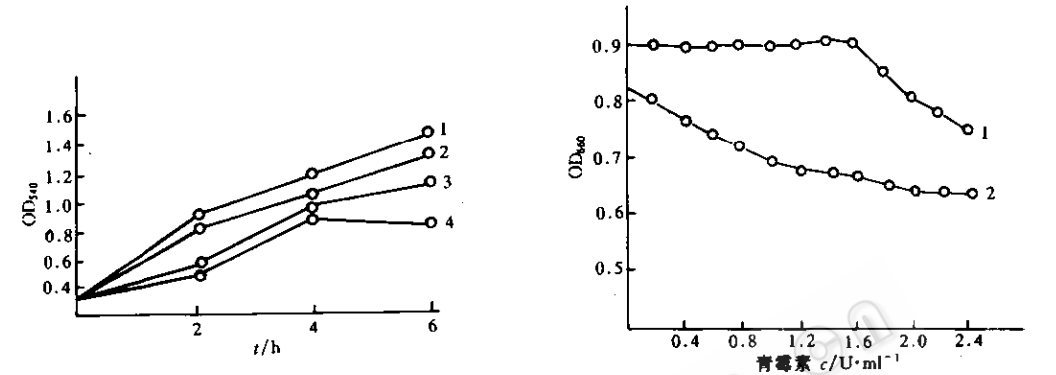


图 1 53-A₆ 菌株对青霉素的敏感性

青霉素浓度 ($c/U \cdot ml^{-1}$): 1. 0.4 2. 0.8 3. 1.2 4. 1.6.

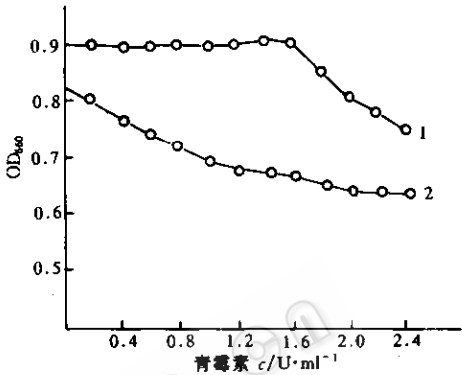


图 2 青霉素浓度与 53-A₆ 菌株对溶菌酶的敏感性

1. 酶解前; 2. 酶解后.

在 53-A₆ 菌株 42℃ 摇瓶培养 6h 后，分别加入不同浓度的青霉素作用 4h，然后加入 2mg /ml 的溶菌酶，34℃ 下静置作用 17h，测其酶解前后菌体的生物量。由图 2 看出：随着青霉素浓度的增大，53-A₆ 菌株对溶菌酶的敏感性逐渐增强。当青霉素浓度超过 1.6U /ml 时，53-A₆ 菌株对溶菌酶的敏感性更强，但开始出现抑菌现象。在青霉素浓度为 1.6U /ml 时，既无抑菌现象，又可提高 53-A₆ 菌株对溶菌酶的敏感性。综合图 1 与图 2 结果，确定青霉素对 53-A₆ 菌株作用的最佳浓度为 1.6U /ml，最佳作用时间为 4h。

2.2 甘氨酸对 53-A₆ 菌株原生质体形成的影响

在 53-A₆ 菌株生长的延滞期加入适量的甘氨酸 (1mg /ml)，然后在对数中期和末期分别加入青霉素和溶菌酶，最后测定原生质体的形成率，结果见表 1。

表 1 甘氨酸对原生质体形成的影响

序	原生质体形成率 / (%)	
	加入甘氨酸	不加甘氨酸
1	97	59.8
2	96.8	62.3
3	97.2	60.8
4	97	60.9

注：序号代表重复实验的顺序

从表 1 结果可以看出：在 53-A₆ 菌株生长的延滞期加入甘氨酸比不加甘氨酸原生质体的形成率平均提高 36.1%。在细胞生长的延滞期加入适量的甘氨酸，可促进原生质体的形成，主要是因为细胞破壁过程中，加入适量的甘氨酸，可促使肽聚糖中的丙氨酸残基被甘氨酸所置换，由此干扰细胞壁的网状结构，引起细胞壁的缺失。

2.3 溶菌酶作用的最佳条件

2.3.1 不同浓度溶菌酶对原生质体形成率和再生率的影响：将 53-A₆ 菌株在延滞期和对数中期分别加入适量的甘氨酸和青霉素，42℃ 摇瓶培养 10h，然后加入不同浓度的溶菌酶作用 4h，测定其原生质体的形成率和再生率。试验结果证明，原生质体形成率随酶浓度的增加而提高，但再生率则呈下降趋势。当溶菌酶的浓度为 2.0mg / ml 时，其原生质体形成率达 99.7%，再生率为 30.9%，说明在此浓度时，53-A₆ 菌株对溶菌酶很敏感，原生质体的形成率很高，再生率也较高，故 53-A₆ 菌株的酶解浓度为 2.0mg / ml。

2.3.2 溶菌酶的作用时间对原生质体形成和再生的影响：53-A₆ 菌株在 42℃ 培养 10h，加入 2.0mg / ml 溶菌酶分别作用不同的时间后测定其原生质体的形成率和再生率。结果表明，53-A₆ 菌株原生质体形成率随酶解时间的延长而增加，而再生率呈下降趋势，因此选择 4h 为酶作用的最佳时间。

2.3.3 EDTA 对溶菌酶作用效果的影响：53-A₆ 菌株 42℃ 培养至对数生长末期(10h)，加入 EDTA (3.72mg / ml) 作用 4h(不加 EDTA 作对照)，然后测定其原生质体的形成率，结果见表 2。

表 2 EDTA 对溶菌酶作用的影响

序号	原生质体形成率 / (%)	
	溶菌酶 - EDTA	溶 菌 酶
X ₁	84	97
X ₂	85.6	97.8
X ₃	87.3	98.2
X	85.6	97.7

注：X 代表重复实验的顺序。

2.4 原生质体形成和再生的显微观察

2.4.1 53-A₆ 菌株细胞及其原生质体的显微观察：将 53-A₆ 菌株及其原生质体制片、染色、于 Olympus 显微镜下观察，形态如图版 I - 1 和图版 I - 2 所示。由图可见，53-A₆ 菌株细胞为细长型杆菌，而其原生质体已完全脱壁，呈球形，往往相互堆积成团(图版 I - 3)。

2.4.2 53-A₆ 菌株原生质体及其再生菌的电镜观察：将 53-A₆ 菌株原生质体及其再生菌用悬滴法置于铜网上，进行负染色，于 Philips EM400T 电镜下观察，其形态如图版 I - 4、I - 5。由图可见 53-A₆ 菌株的原生质体为球形，完全失去了细胞壁，而其再生菌又重新生成细胞壁，恢复成杆状。

参 考 文 献

- [1] 王 弘, 齐秀兰, 李福德, 生物工程学报, 1990, 6(1): 32 ~ 38.
[2] 邱秀宝, 袁 影, 戴 宏, 等. 微生物学报, 1990, 30(2): 129 ~ 133.
[3] 乔宝义, 徐 浩. 微生物学报, 1983, 23(1): 33 ~ 43.
[4] 董金兰, 金 刚, 杜文翠, 等. 生物技术, 1994, 49(1): 40 ~ 44
[5] Weiss R L. *J Bacteriol*, 1976, 128: 668 ~ 670.

STUDY ON THE OPTIMUM CONDITION OF FORMATION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS OF *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Feng Qingping Xue Lingui

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract some factors for formation and regeneration of protoplasts of *Bacillus licheniformis* were studied, Under the optimum condition of formation and regeneration of protoplasts. Protoplasts of primitive strain *Bacillus licheniformis* 53-A₆ were prepared. The rate of formation and regeneration of protoplasts of strain 53-A₆ had reached to 99.7 and 30.9 percent respectively. The formation and regeneration and the phenomenon of forming dusters were observed by optical and electron microscope.

Key words *Bacillus licheniformis*, Protoplasts

图 版 说 明

1. 53-A₆ 菌的形态(×3900); 2. 53-A₆ 菌的原生质体形态(×3900); 3. 示 53-A₆ 菌的原生质体簇(×3900); 4. 53-A₆ 菌的原生质体形态(×46000); 5. 53-A₆ 菌的再生株形态(×100000)。