利用细菌孢子数量变化检测利福霉素的研究*

林文娜　孙炳寅　李新人　赵长清　黄金生**
（南京大学生物系）

孢子形成是枯草杆菌生长发育过程中的一个重要阶段．环境因子的变化可直接或间接地影响枯草杆菌的孢子形成．因此它的孢子数量变化与环境因子可能有一定的因果关系．孢子的数量变化是可以通过常规方法，非常方便地加以测定的，枯草杆菌又容易培养，对人畜无害，如果能够利用枯草杆菌的孢子数量变化作为指标来检测某些药物甚至环境中的某些微量化学物质，是有一定意义的．

我们采用利福霉素作为一种环境因子，观察枯草杆菌在其作用下，孢子数量的变化规律，以探讨利用这种规律作为检测指标的可能性．与此同时，我们还利用电镜观察了它的形态变化．

材料和方法

一、菌株：枯草杆菌 168 (*B. subtilis* 168)，由中国科学院遗传研究所提供．

二、培养基：

1. 肉汤培养基，采用一般配方：

蛋白胨 1%　　牛肉膏 1%

氯化钠 0.5%　　pH　　7.0

2. 生孢培养基，采用中国科学院遗传所配方(表 1)，系根据 2 × SG 培养基配方[1] 略作修改而成．

三、方法：首先将枯草杆菌 168 菌株进行同步培养．试验时，将利福霉素（浓度为 0.5 微克/毫升)与经过同步培养的菌液(接种量为 5%)同时加入生孢培养基中，进行 37℃ 振荡培养．第一批试验使用的菌液是最后一次同步培养为 6 小时的同步菌液，试验从零时（即利福霉素加入的时间）开始至 22 时结束；第二批试验使用的菌液是最后一次同步培养为 12 小时的同步菌液，试验从 11 时(即利福霉素加入后 11 小时)开始至 21 时结束．除了零时取样以外，每隔 2 小时取样一次，测定各时相的残存孢子数．残存孢子数的测定方法是：将菌液置 75℃ 恒温水浴中维持 20 分钟，以杀死营养体，然后进行 36℃ 肉汤平板培养．根据菌落数统计残存孢子数．对照组除不加利福霉素以外，其它处理均与加药组相同．以零时的孢子数为 100%，求出各时相残存孢子数的百分数．按各时相孢子数百分数的对数值作图，对比加药组和对照组之间的差异．在统计残存孢子数的同时，将振荡培养不同时间的菌悬液离心，取其沉淀，用 5% 戊二醛固定，再用 2% 琼脂包埋，使成细胞团块，然后按常规方法制成超薄切片，用 phillips 400 电镜观察加药组和对照组孢子的

表 1　生孢培养基配方

A　液		B　液	
牛肉膏	6.4 克	葡萄糖	0.1%
蛋白胨	6.4 克		
NaCl	3.2 克	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	10^{-3}M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 克		
KCl	2.0 克	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10^{-4}M
水	1000毫升		
pH	7.0--7.2	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10^{-6}M
灭菌 1.5 公斤	30 分钟	灭菌 0.8 公斤 30 分钟	

A 液、B 液分别灭菌后混合．

* 南京医学院协助电镜观察和拍片，特此致谢．

** 现在南京林产工业学院电镜室工作．

形态变化.

结 果

残存孢子数统计的结果分别绘于图 1 和图 2. 从图 1 可以看出，加药组从零时以后不久，孢子数就开始下降. 至 14 时左右回升，以后即趋向直线上升. 但是，直到 20 时左右，孢子数才达到或超过零时水平. 对照组在零时至 4 时之间孢子数保持稳定. 从 6 时开始孢子数直线上升. 12 时左右孢子数

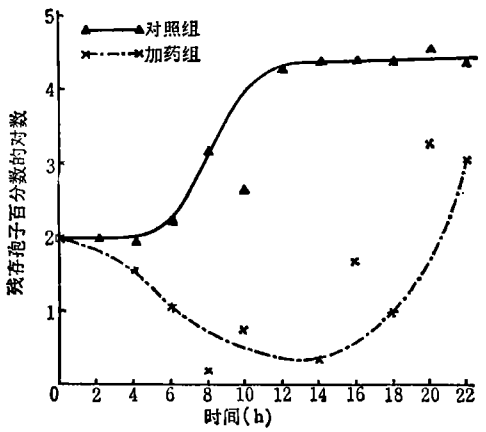

图 1 加入利福霉素后不同时间残存孢子数的变化
(第一批试验)

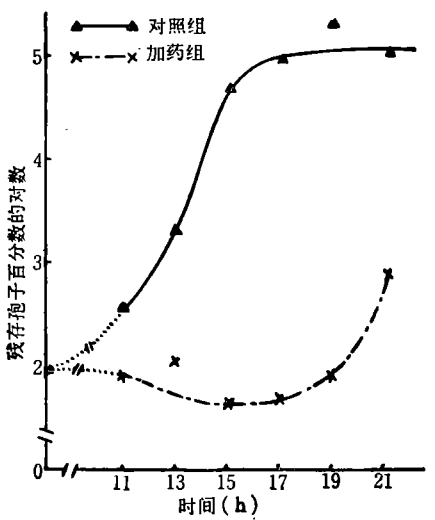

图 2 加入利福霉素后不同时间残存孢子数的变化
(第二批试验)

又开始趋于稳定. 图 2 孢子数升降趋势与图 1 相似. 该试验从 11 时开始统计. 结果表明，在 11 时，孢子数与零时相比已经下降. 15 时左右开始回升，19 时左右直线上升. 19 时至 21 时之间达到零时水平. 对照组 11 时的孢子数已超过零时水平，并开始直线上升，17 时左右已趋向稳定.

电镜观察结果与残存孢子数的统计结果是一致的，加药组的孢子数比对照组少得多(图 3 和图 4). 还发现两组的孢子形态分别处于不同时相. 例如，振荡培养 19 小时，加药组孢子只处于孢子形成的 I 期(出现 DNA 轴丝)和 II 期(质膜凹入形成孢子隔膜)(图 3)；而对照组已处于孢子形成的 IV 期(皮层形成)至 VI 期(皮层层次成熟)，个别处于

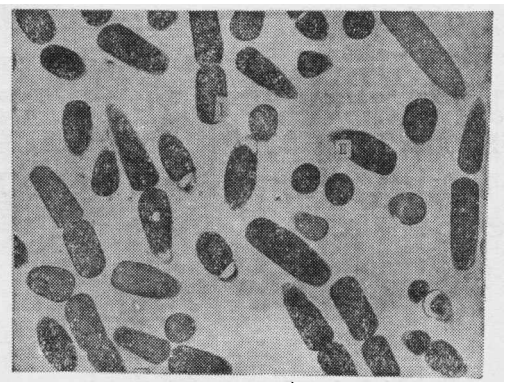

图 3 加药后培养 19 小时枯草杆菌的超微结构
I、II 表示孢子形成期 ×7000

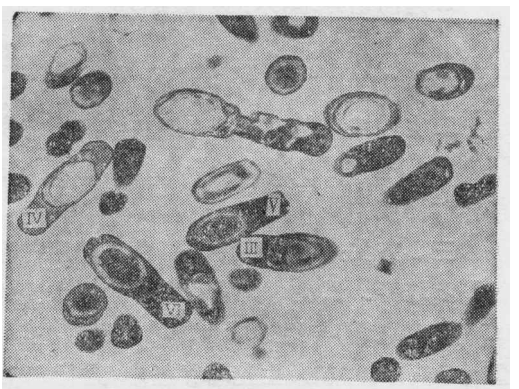

图 4 对照组培养 19 小时枯草杆菌及其孢子的超微结构
III、IV、VI 表示孢子形成期 ×6000

III 期（孢子外膜及内膜形成）（图 4）. 孢子形成的分期参考 Brock 资料[2]. 此外，电镜观察还表明，加药组的营养体大小整齐，胞质均匀，没有明显的被破坏现象（图 3）. 这些现象都说明利福霉素抑制了孢子的形成.

讨　论

实验结果表明，在利福霉素作用下，枯草杆菌的孢子形成数明显减少. 从图 1 和图 2 图形相似这一点来看，实验的数据还是可靠的.

根据图 1 和图 2 数据，在实验的 21 或 22 小时之内，加药组各个测定时相的孢子形成数均明显地低于对照组. 这一事实似乎说明，当环境中存在某种有毒物质时，枯草杆菌孢子数的明显减少可能是一种指标；此外，我们采用的利福霉素浓度为 0.5 微克/毫升，枯草杆菌孢子形成数已有如此明显的减少，看来，以此作为指标，灵敏度还是比较高的；又因这种实验的操作简单易行，不需特殊的设备和药品；枯草杆菌对人畜也无危害性. 因此，我们认为，以枯草杆菌孢子形成数的变化作为指标，来初步检测某些药物甚至环境中的某些微量化学物质，似乎是可以采用的一种方法.

至于第二批对照组达到相应孢子数的时间（见图 2）比第一批（见图 1）延迟，可能与该批实验所用菌液的最后一次同步培养时间有所延长有关. 已有文献报道，孢子形成在对数生长的末期开始[3, 4]，37℃ 震荡培养条件下，形成 80% 的孢子需 7—9 小时[5]. 因为第一批实验接种的菌体大约处于对数期初期，在转入新鲜培养基后能缩短延迟期，所以较早形成炮子；而第二批实验接种的菌体可能已处于稳定期，转接后会有一个延迟期，因此形成孢子的时间较迟. 这是符合一般的生长规律的. 而两批实验的加药组达到相应孢子数的时间相似这一点则说明，无论加入的菌体处于那一个生长阶段，利福霉素对它们都能产生明显的抑制作用. 至于到一定时间以后，加药组的孢子形成数直线上升的原因可能是药效降低，或者是细胞适应了这种环境，也可能和这两者都有关系.

参 考 文 献

[1] Leighton, T. J. and Doi, R. H., *J. Biol. Chem.*, **246**, 3189 (1971).
[2] Brock, T. D., *Biology of Microorganisms* p. 16, 1974.
[3] Kaneko, I., In *Growth and Differentiation in Microorganisms* Eds, Ishikawa, T. et al., p. 133, 1975.
[4] Kay, D. and Warren, S. C., *J. Biochem.* **109**, 819 (1968).
[5] Waites, W. M. et al., *J. Biochem.*, **118**, 667 (1970).

蘑菇中汞的污染途径的初步研究*

虞锁富　　赵美芝

（中国科学院南京土壤研究所）

蘑菇中有时含有少量的汞，影响质量. 本文研究蘑菇中汞的污染，为减少其含汞量提供科学依据. 我们先后选择了几个地区，分别采集了土壤、复土、培养料（即牛、猪粪混合在一起的肥料，有条件的地方掺入少量的马粪），用水以及蘑菇等系列样品，分析了试样

* 参加此工作尚有吴沟、陈定一两同志.