

环境因子对发光细菌的生长和发光的影响

杨颐康 唐法尧 叶履平 吴自荣 朱文杰
(华东师范大学)

海洋发光细菌 (*Photobacterium phosphoreum* A₂) 的萤光酶和萤光酶应用的研究, 首先需要确定发光细菌生长和萤光酶合成的最适环境和营养条件, 明确其生长与发光之间的关系, 使菌体能以最快的速度合成大量的萤光酶。有关环境和营养条件对发光细菌生长和发光的影响, Harvey 等已作了较为详细的评述^[1,6]。不同的菌种或同一菌种的不同菌株, 在已知环境条件下, 其发光变化亦不尽相同。近年来, 对发光细菌的萤光酶的生物合成和酶活性的细胞调节作用方面的研究已有报道^[2,5,7,10]。发光细菌在对数生长早期阶段, 发光强度未见增加, 到中期其发光强度骤然上升, 后期达到高峰, 此后即逐渐下降。Eley 等^[4,9] 实验结果表明在最适条件下, 萤光酶的合成与细菌总的可溶性蛋白质成比例, 细菌细胞内的发光强度又与细胞提取物中萤光酶的活性有直接的相关性。因此, 我们就以细菌发光的强度为依据, 寻找萤光酶的合成和反应的最适条件。

本文报道了各种温度、pH 值、无机盐类和营养成分对 *P. phosphoreum* A₂ 的生长和发光的影响。

一、材料和方法

1. 培养基 固体培养基: 牛肉膏 10 克, 蛋白胨 20 克, 甘油 10 克, NaCl 30 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1000 毫升。用 1N NaOH 调至 pH 6.9, 加 CaCO₃ 5 克。液体培养基^[4]: 酵母膏 5 克, 胰蛋白胨 5 克, NaCl 30 克, Na₂HPO₄ 5 克, KH₂PO₄ 1 克, 甘油 3 毫升, 蒸馏水 1000 毫升, 用 1N NaOH 调至 pH 6.5。

2. 菌种 *P. phosphoreum* A₂^[3] 通常保存在冰箱中, 每周转接一次。测试前将菌种接种在固体斜面上, 在 15—20°C 下培养 22—24 小时。

3. 液体培养 用 3% NaCl 溶液将菌种制成菌悬液, 用血球计数板计数, 接种于含有 50 毫升液体培养基的, 容量为 250 毫升的三角烧瓶中。使培养基最终含菌量为 3 万/毫升左右, 用八层纱布包扎瓶口。在 120 次/分的振荡器或摇床上振荡培养。

4. 发射光的测定 利用光谱敏感范围为 3800—6500 Å, 最大敏感波长为 4400 ± 330 Å 的 GDB-10M 型光电倍增管制成的测光仪, 测定细菌的发光强度。光电倍增管密封在一个暗盒内, 样品放在比色杯中, 对准暗盒的窄缝, 使光电倍增管感光, 工作电压为 1000 伏。光强度的输出信号在晶体管毫伏表上读出, 以电压表示。测光仪的测定范围在 0.03—15.00 伏范围内有线性关系。因此, 培养液的发光强度如大于 15 伏时, 必须稀释到 15 伏以下; 发光强度低于 0.03 伏时, 测出的数值不可靠。细菌的密度大时, 对光的测定有

干扰,所以一般用含3% NaCl的pH 6.5的磷酸缓冲液(Na_2HPO_4 5克, KH_2PO_4 1克,蒸馏水 1000毫升)稀释10倍后测定。

5. 菌数的测定 在细菌生长过程中,每隔一定时间从摇瓶中取出部分样品,用3% NaCl溶液稀释,在琼脂平板上进行活菌计数;同时在721型分光光度计上用670毫微米波长测定其光密度。

二、实验内容和结果

1. 温度对细菌生长和发光的影响 在12°C时,细菌的世代时间是112.1分钟,未见有迟缓期出现,对数期可延迟至20小时。开始时发光强度的增加缓慢,到接近对数生长中期骤然上升,在对数生长末期发光强度达到高峰(见图1)。

在15°C时,细菌的世代时间是117.7分钟,生长和发光的曲线基本上和培养在12°C时相似(见图2)。

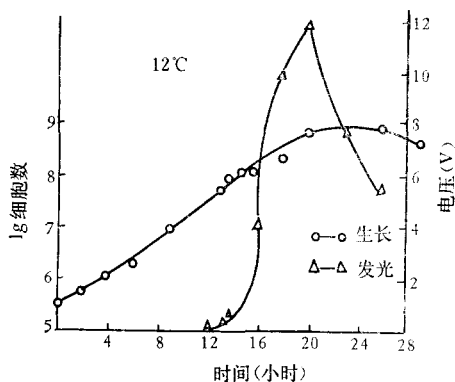


图1 在12°C *P. phosphoreum* A₂的生长和发光的关系

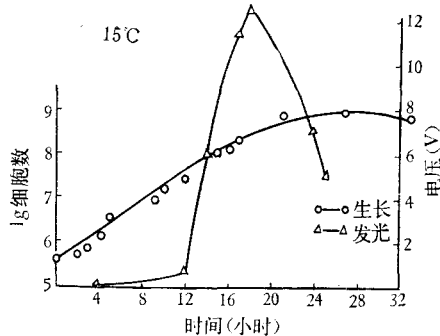


图2 在15°C *P. phosphoreum* A₂的生长和发光的关系

在20°C时,细菌的世代时间是67.6分钟,对数期延至11小时,发光高峰出现在对数期以后(见图3)。

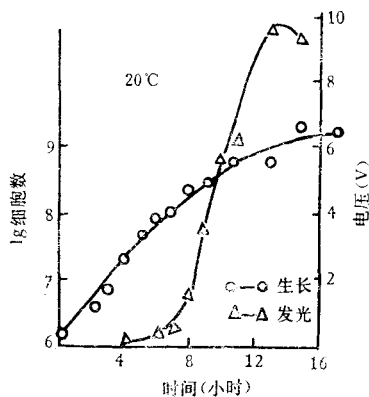


图3 在20°C *P. phosphoreum* A₂的生长和发光的关系

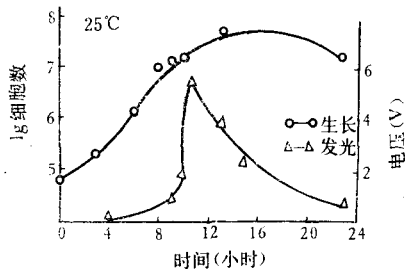


图4 在25°C *P. phosphoreum* A₂的生长和发光的关系

在 25°C 时,细菌的世代时间是 60.0 分钟,对数期延至 10 小时,菌数和发光强度均较低(见图 4)。

2. pH 值对细菌的生长和发光的影响 发光细菌生长的最适 pH 值为 7.5, 最适发光的 pH 值为 6.5, 与 Eely 等人^[4,7]结果一致(见图 5)。

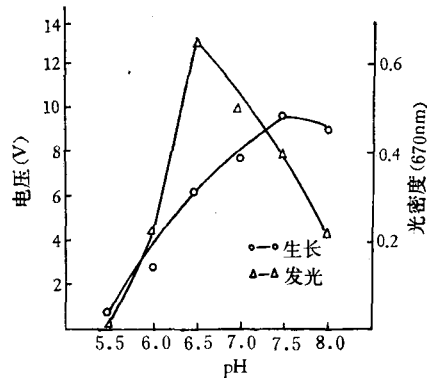


图 5 pH 值对 *P. phosphoreum* A₂ 的生长和发光的影响

3. 营养成分和浓度对细菌的生长和发光的影响 甘油和酵母膏的浓度为 0.3% 时,对细菌的生长和发光都最好。胰蛋白胨的浓度为 0.5% 时,对发光细菌的生长最好。在 0—0.7 的范围内,随胰蛋白胨浓度的增加发光强度逐渐增加。如用鱼蛋白胨代替胰蛋白胨时,则对细菌的生长和发光都不利(见图 6 和图 7)。

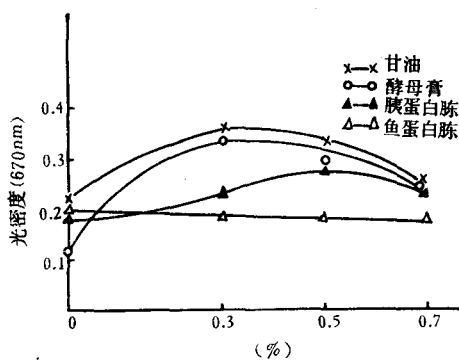


图 6 各种营养成分和浓度对 *P. phosphoreum* A₂ 的生长影响

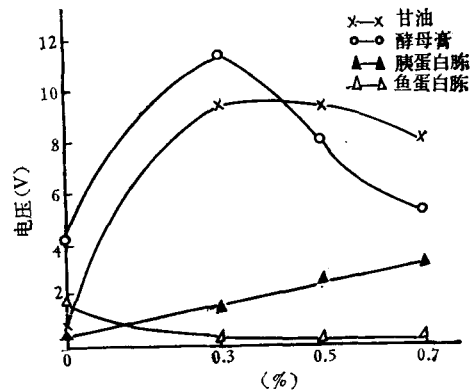


图 7 各种营养成分和浓度对 *P. phosphoreum* A₂ 发光的影响

4. 无机盐类和浓度对细菌的生长和发光的影响 无机盐的不同种类和浓度对细菌的生长和发光都有明显的影响。对细菌生长盐类的最适浓度 KCl 为 0.4M, NaCl 为 0.5M, KNO₃ 为 0.6M。其中以 0.4M 的 KCl 对细菌的生长最好(见图 8)。

对细菌发光盐的最适浓度, NaCl 和 KCl 均为 0.4M, 而 KNO₃ 为 0.5M。其中以 0.4M 的 NaCl 为最好(见图 9)。

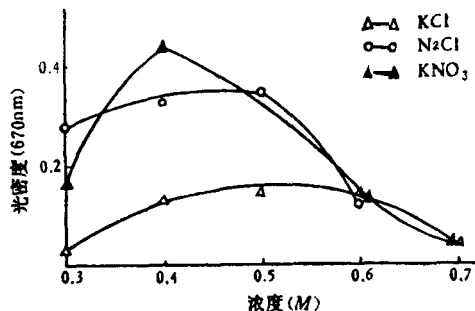


图8 各种无机盐浓度对 *P. phosphoreum* A₂ 的生长的影响

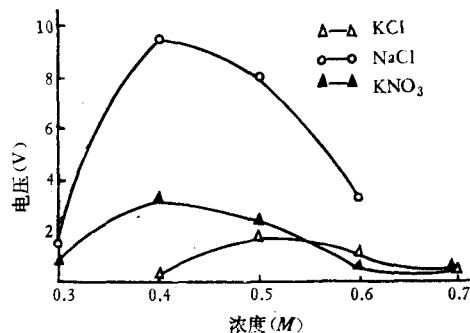


图9 各种无机盐浓度对 *P. phosphoreum* A₂ 发光的影响

三、讨论及提要

从实验结果来看,发光细菌的生长和发光的曲线不一致,说明细菌生长和发光所需要的外界条件不同。在 12°C 和 15°C 时,生长速度基本相似;而在 20°C 和 25°C 时,生长速度则大于 12°C 和 15°C。从生长曲线来看,都没有出现迟缓期,而与对数生长期的长短和培养温度有关。在 12°C 时,对数生长期延至 20 小时。在 25°C 时,则对数生长期缩短为 10 小时。除在 25°C 时生长较差外,在其他各种温度下对数生长期末期的菌数则基本相同。因此,可以认为在 20°C 下培养对细菌生长有利。

温度对细菌发光的影响也有类似的情况。在 12°C, 15°C, 20°C 和 25°C 时,发光高峰分别出现在 20 小时, 18 小时, 13 小时和 11 小时,说明培养温度高则发光高峰出现早。但发光高峰期的发光强度则在 12°C 和 15°C 时高;在 20°C 时,发光强度略低于前者,而在 25°C 时,发光强度最低。一般来讲,培养初期,发光强度并不是随细菌的生长而增强,而是生长到对数生长期的中期,细菌的发光强度迅速上升,到细菌的对数生长期的末期达到最高峰。

细菌生长的最适 pH 值为 7.5, 低于 pH 6.0 或高于 pH 8.0 仍能生长。在 pH 6.5 时对细菌发光最好,它比 pH 6.0 时高 1.77 倍,比 pH 7.0 时高 0.3 倍。从图 5 来看,酸对发光的影响比碱要大。

0.3% 的甘油对细菌生长和发光最好。发光细菌可以利用酵母膏, 胰蛋白胨为碳源、氮源,但不能取代甘油的作用。缺少甘油,对细菌的生长和发光影响极大。鱼蛋白胨明显不能取代胰蛋白胨。鱼蛋白胨对细菌的生长和发光都不利。

各种盐类对细菌的生长的影响是以 0.4M 的 KCl 最好。其次为 0.5M 的 NaCl, 再次为 0.6M 的 KNO₃。各种盐类对细菌发光的影响则以 0.4M 的 NaCl 为最好。其次为 0.4M 的 KCl, 再次为 0.5M 的 KNO₃。

参 考 文 献

- [1] 薛廷耀, 1962。海洋细菌学。科学出版社, 109—113 页。
- [2] 薛廷耀, 1964。海洋生物发光的比较生化。海洋与湖沼 6 (4): 423—432。
- [3] 杨颐康、叶履平、唐法尧, 1980。发光细菌的分离培养和鉴定。上海师范大学学报 3: 87—92。

- [4] Eley, M. H., 1972. optimal environmental conditions and nutrient concentrations for the synthesis of bacterial luciferase in photobacterium phosphoreum. *J. Gen. Microbiol.* 72: 415—417.
- [5] Hastings, J. W., and K. H. Nealson, 1977. Bacterial Bioluminescence. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 549—595.
- [6] Harvey, E. N., 1952. Bioluminescence. Academic press, New York, pp. 15—95.
- [7] Hareu Walanabe, Naotoshi Mimura, Atsushi Takimoto and Takao Nakamura, 1975. Luminescence and Respiratory of photobacterium phosphoreum. *J. Biochem.* 77: 1147—1155.
- [8] Johnson, F. H., 1947. Bacterial Bioluminescence. *Advance in Enzymology* 7: 215—264.
- [9] Kempner, E. S., and F. E. Hanson, 1968. Aspects of light production by photobacterium fischeri. *J. Bacteriol.* 95(3) 975—979.
- [10] Nealson, K. H., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104(1): 313—322.

THE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH AND LUMINESCENCE OF *PHOTOBACTERIUM* *PHOSPHOREUM A₂*

Yang Yikong Tang Fayao Ye Lüping Wu Zirong and Zhu Wenjie
(East China Normal University)

ABSTRACT

In this paper, the effects of several environmental factors on the growth and luminescence of *photobacterium phosphoreum A₂* are reported. When this strain was grown in liquid medium, the most favorable temperature for growth and luminescence was found at 20°C and 12—15°C respectively. pH 7.5 gave the maximum growth, and at pH 6.5, luminescence reached maximum.

Maximum growth and luminescence were obtained when the luminous bacterium were grown in a medium containing 0.3% glycerol as carbon source. Yeast extract and tryptone as carbon and nitrogen sources also gave good results, but glycerol could not be replaced by these two nutrients. The peptone made from fish materials inhibited the bacterial growth and luminescence.

About 0.4 M KCl gave more rapid growth than the others and 0.4 M NaCl gave the highest luminescence of this luminous bacterium.