

# 蜘蛛肠道酵母菌的分离与鉴定

颜 静 戴 韬 蔡焱湘 张梓龙 唐建洲  
长沙学院生物与环境工程学院 湖南 长沙 410022

**摘要:** 节肢动物体内存在大量微生物, 其体内细菌类群对宿主的生殖和发育具有重要的影响。蜘蛛属节肢动物门, 蛛形纲, 其种类繁多, 分布广泛, 是作物害虫的一类重要的捕食性天敌。目前对蜘蛛体内细胞类群的研究主要集中在内共生菌的检测及其对宿主生殖行为的影响, 而对蜘蛛整体内, 肠道内菌群多样性研究较少, 本实验对捕鸟蛛肠道进行酵母菌株的分离与纯化, 得到 20 株酵母菌, 通过形态学以及生理学特征鉴定, 将这 20 株捕鸟蛛的肠道酵母菌进行归属, 为蜘蛛肠道酵母益生菌开发与利用提供了一定的理论基础。

**关键词:** 蜘蛛肠道; 酵母菌; 分离; 鉴定

酵母是一种单细胞真菌, 在有氧和无氧的条件下都能生存, 属于兼性厌氧菌, 能将糖发酵成酒精和二氧化碳。酵母菌是人类文明史中被应用得最早的微生物, 可用于酿造生产, 也可成为致病菌, 现如今, 我们的生活已经离不开酵母菌, 日常生活中的啤酒、面包、酸奶等美味可口的食品都是酵母菌经发酵而来, 能改善食品的风味、提高营养价值、保护肝脏等作用。因此, 酵母益生菌的分离和纯化对提高人类健康水平有着十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种来源

本实验的捕鸟蛛为虎纹捕鸟蛛, 蜘蛛解剖后, 对肠道进行无菌取样, 并立即将样品置于 4℃ 冰箱冷藏保存。

#### 1.1.2 培养基

富集培养基 (LB)、马铃薯培养基、麦芽汁培养基、高氏琼脂培养基、糖发酵基础培养基、同化乙醇基础培养基。

#### 1.1.3 主要试剂

PBS 洗脱液、3% 盐酸浓度的乙醇、吕氏碱性美蓝染液 A 液: 美蓝 0.5 g, 95% 乙醇 35 mL、B 液: KOH 0.02 g, 纯水 100 mL, A 液与 B 液要分别配制, 配好后将 A 液与 B 液进行混合。齐氏石炭酸复红染色液 A 液: 碱性复红 0.35 g, 95% 乙醇 10 mL; B 液: 石炭酸 5 g, 蒸纯水 95 mL, 配好后将 A 液和 B 液混合即可。

#### 1.1.4 主要仪器

生化培养箱、超净工作台、高压蒸汽灭菌锅、糖度计、紫外分光光度计、电子天平和光学显微镜。

## 1.2 方法

### 1.2.1 捕鸟蛛空肠道样品的采集与保存

挑选生长情况良好、无病害的成年捕鸟蛛为实验材料, 在超净工作台对选取的捕鸟蛛进行解剖, 从捕鸟蛛的肠道内取出食物残渣样品, 装入取样袋中, 并立即放入 4℃ 冰箱中低温保存备用。

### 1.2.2 样品的摇瓶稀释与增殖培养

取上述 4℃ 低温保存的捕鸟蛛肠道食物残渣样品 1 g, 并加入 PBS 洗脱液 100 mL, 对蜘蛛肠道微生物进行洗脱, 并接入含 100 ml 富集培养基的 250 ml 三角瓶中, 37℃, 180 r/min 富集培养 48 h。

### 1.2.3 样品中酵母菌的分离与纯化

用平板稀释的方法将捕鸟蛛肠道样品在麦芽汁固体平板上以 30℃ 恒温培养 48 h, 从培养 48 h 后的平板上挑取单菌落用平板划线的方法进一步纯化 3~4 次。纯化完成后, 再用接种环从纯化培养基上挑取少量菌体并接种在麦芽汁固体斜面上, 放入生化培养箱, 在 30℃ 的条件下恒温培养 72 h, 再将其放入 4℃ 冰箱保存备用。

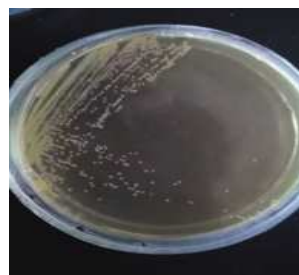


图 1 平板划线法初筛



图 2 平板划线法复筛

### 1.2.4 酵母菌的鉴定

#### (1) 观察菌落特征

将平板稀释法培养 72 h 后, 选取单个菌落作为观察对象, 观察该菌落的颜色、形状、光滑度、湿润度、透明度以及边缘整齐度等特征。用麦芽汁液体培养基观察其发酵情况、培养液的浑浊度、能否形成浮膜、环或岛以及沉淀物的疏松度等情况。

#### (2) 观察细胞形态

挑取少量培养 72 h 后的菌体至于光学显微镜下观察, 转用高倍显微镜对菌体细胞的大小、形状和生殖方式进行观察, 酵母的生殖方式是无性生殖, 主要有芽殖、芽裂和裂殖, 其中大部分为芽殖, 少数是芽裂, 还有极少数的为裂殖。

(3) 观察菌丝的形成

在平底培养皿倒一层薄至透明的马铃薯固体培养基，凝固后将培养皿倒置数小时，直至培养基表面稍干燥，划线 3 ~ 4 条并接种，再盖上灭菌处理的盖片，于 30 °C 条件下恒温培养 72 h 后用低倍镜对划线的两旁进行观察，看是否有菌丝形成以及菌丝的类型。

(4) 观察孢子的形成

孢子的观察包括子囊孢子和掷孢子的观察，对于子囊孢子的观察首先用麦芽汁固体斜面转接 3 代，在对数生长期将已转接 3 代的菌体转到高氏琼脂培养基斜面，在 30 °C 的条件下培养 48 ~ 72 h 后涂片观察，若没有产生子囊孢子，则继续培养 4 周左右，且每周观察 2 ~ 3 次，观察是否有子囊孢子形成。而对于掷孢子的观察，则通过测定其镜像的形成，来判断是否有掷孢子的形成，先将酵母菌接种在麦芽汁固体培养基制成的平板上，30 °C 倒置培养 72 ~ 96 h 后，观察培养皿盖上有无形成与菌落形状大小相同的镜像，如果形成了镜像，则继续观察掷孢子的大小和形状。

(5) 测定类淀粉化合物

向产类淀粉化合物的液体培养基中接入新培养的酵母一环，30 °C 培养 5 ~ 7 d，以碘液为指示剂，向培养基中加入 2 滴碘液，若培养基颜色变蓝，则证明有类淀粉物质生成。

(6) 葡萄糖发酵实验

将 12% 的豆芽汁进行分装，分装完毕后放入高压蒸汽灭菌锅中灭菌 20min，用灭菌处理后的蒸馏水将葡萄糖配成 10% 浓度的溶液，再将溶液煮沸 20min，稍稍冷却后，吸取一定量的糖液继续分装，直至糖的质量浓度达到 2%。将新鲜培养物接种于发酵瓶，30 °C 培养 3 ~ 5d，每天观察 1 次结果，不发酵或弱发酵的延长观察 3 ~ 5d。

(7) KNO<sub>3</sub> 同化实验

向酵母的培养基中一半加入 KNO<sub>3</sub>，而另一半则不加，然后进行分装、灭菌并制成斜面，分别接种 2 支，以未加 KNO<sub>3</sub> 的为对照，在 30 °C 下培养 5 ~ 7 d 后观察结果。每天观察各组酵母的生长情况，假如对照组中没有细菌生长，而加了 KNO<sub>3</sub> 溶液的有细菌生长，则表明该菌种能同化 KNO<sub>3</sub>；反之，如果加了 KNO<sub>3</sub> 的生长情况与对照组一样，则表明这种酵母不能同化 KNO<sub>3</sub>。

(8) 乙醇同化实验

向同化乙醇的培养基中加入 3% 盐酸浓度的乙醇 10mL，再接入少许酵母培养物，30 °C 培养 3 ~ 5 d，观察酵母的生长情况，是否形成浮膜、环或岛，并用紫外分光光度计测定其 OD 值，OD 值越高，则证明菌体生长情况越好，以未加碳源的空白组为对照比较其各组的生长情况。

2 结果与分析

经过一系列的实验得出表 1 (形态学鉴定表) 和表 2 (生

理生化鉴定表)，结合其形态学与生理生化特征对菌种进行了初步归类：

5、10、18 号菌，其细胞呈卵圆形，1 端芽殖，有菌丝，类淀粉化合物生成实验、葡萄糖发酵实验与乙醇同化实验均呈阴性。所以把 5、10、18 号菌纳入瓶形酵母属。

表 1 捕鸟蛛肠道酵母形态鉴定结果

编号	颜色	形态	菌丝	浮膜	子囊孢子	掷孢子	繁殖方式
1	乳白	卵圆形	有	无	无	无	芽殖
2	乳白	卵圆形	有	无	无	无	芽殖
3	白	卵圆形	有	有	无	无	芽殖
4	乳白	圆形	有	无	无	无	芽殖
5	乳白	椭圆	有	无	无	无	芽殖
6	白	卵圆形	无	无	无	无	芽殖
7	白	圆形	有	无	无	无	芽殖
8	乳白	圆形	有	有	有(卵圆, 1~4)	无	芽殖
9	乳白	卵圆形	无	有	无	无	芽殖
10	乳白	卵圆形	有	无	有(卵圆, 1~3)	无	芽殖
11	乳白	圆形	有	无	无	无	芽殖
12	白	圆形	有	无	无	无	芽殖
13	白	圆形	有	无	无	无	芽殖
14	白	卵圆形	无	无	有(卵圆, 1~3)	无	芽殖
15	乳白	卵圆形	有	无	无	无	芽殖
16	乳白	卵圆形	无	无	有(卵圆, 1~3)	无	芽殖
17	乳白	卵圆形	有	无	无	无	芽殖
18	白	卵圆形	有	有	无	无	芽殖
19	乳白	卵圆形	有	无	无	无	芽殖

表 2 捕鸟蛛肠道酵母生理生化鉴定结果 (“+”为阳性，“-”为阴性)

编号	类淀粉化合物生成	葡萄糖发酵实验	KNO <sub>3</sub> 同化实验	乙醇同化实验
1	—	—	—	—
2	+	—	—	—
3	—	+	+	—
4	—	—	—	+
5	—	—	—	+
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	+	—	+
9	—	+	—	—
10	—	—	—	+

11	—	+	+	+
12	—	—	—	+
13	—	—	+	—
14	—	+	+	—
15	—	—	—	—
16	—	+	—	—
17	+	—	—	+
18	—	—	—	+
19	+	—	—	—
20	—	—	+	—

3号菌,细胞呈卵圆形,多端芽殖,有菌丝,葡萄糖发酵实验与KNO<sub>3</sub>同化实验均为阳性,类淀粉化合物生成实验与乙醇同化实验呈阴性,因而将3号菌纳入酒香酵母属。

4、7、12、13号菌,细胞呈圆形,真、假菌丝兼有,生殖方式为芽殖。类淀粉化合物生成实验与葡萄糖发酵实验均呈阴性。4、7、12号菌的KNO<sub>3</sub>同化实验呈阴性,13号菌的KNO<sub>3</sub>同化实验呈阳性。4、12号的乙醇同化实验呈阳性,7、13号的乙醇同化实验呈阴性。因而将4、7、12、13号菌纳入假丝酵母。

8号菌,细胞呈圆形,生殖方式为芽殖,有假菌丝,有1~4个卵圆形子囊孢子。葡萄糖发酵实验与乙醇同化实验为阳性,类淀粉化合物生成实验与KNO<sub>3</sub>同化实验为阴性。故将8号菌纳入酵母属。

9、16号菌,细胞呈卵圆形,生殖方式为多端芽殖,没有菌丝,类淀粉化合物生成实验、KNO<sub>3</sub>同化实验和乙醇同化实验均呈阴性,葡萄糖发酵实验呈阳性。因而将9、16号菌纳入卵孢酵母属。

1、2、6、15、19、20号菌,细胞均呈卵圆形,生殖方式为芽殖。1、2、15、19、20号菌有菌丝,6号菌没有菌丝。1、6、15、20号菌类淀粉化合物生成实验呈阴性,2、19号菌类淀粉化合物生成实验呈阳性。1、2、6、15、19、20号菌葡萄糖发酵实验与乙醇同化实验均呈阴性。1、2、6、15、19号菌KNO<sub>3</sub>同化实验呈阴性,20号菌KNO<sub>3</sub>同化实验呈阳性。因而将1、2、6、15、19、20号菌纳入裂芽酵母属。

17号菌,细胞呈卵圆形,生殖方式为芽殖,有菌丝,有1~3个卵圆形子囊孢子。类淀粉化合物生成实验与乙醇同化实验呈阳性,葡萄糖发酵实验与KNO<sub>3</sub>同化实验呈阴性。因而将17号菌纳入毕赤酵母属。

14号菌,细胞呈卵圆形,没有菌丝,,生殖方式为芽殖。类淀粉化合物生成实验与乙醇同化实验呈阴性,葡萄糖发酵实验与KNO<sub>3</sub>同化实验呈阳性。因而将14号菌纳入克勒克酵母属。

11号菌,细胞呈圆形,生殖方式为芽殖,有菌丝。类淀粉化合物生成实验呈阴性,葡萄糖发酵实验、KNO<sub>3</sub>同化实验与乙醇同化实验均呈阳性。因而将11号菌纳入白色冬孢酵母属。

## 结束语:

通过对捕鸟蛛的解剖,从捕鸟蛛肠道内生菌中分离纯化得到了20株酵母菌。通过形态学特征鉴定与生理生化鉴定相结合,对分离纯化得到的这20株酵母菌进行了解和归类,本次得到的20株酵母菌中有瓶形酵母属3株、酒香酵母属1株、假丝酵母属4株、酵母属1株、卵孢酵母属2株、裂芽酵母属6株、毕赤酵母属1株、克勒克酵母属1株、白色冬孢酵母属1株。

## 参考文献:

- [1] 何志礼,李清平,朱德成.高产D-甘露醇虫草菌种分离纯化的研究[J].成都大学学报(自然科学版),2001(04):21-25.
- [2] 王义华,徐梅珍,江萍,何照范,熊绿芸.酵母蛋白多糖的分离纯化及鉴定[J].微生物学报,2004(04):515-518.
- [3] 田晖艳.猪肠道酵母菌的分离鉴定及应用研究[D].武汉工业学院,2012.
- [4] 李艳波,史怀.微生物发酵床垫料中酵母菌的分离与鉴定[J].畜禽业,2020(06).
- [5] 李新月.湖南省茶园蜘蛛种类调查与优势生态学研究[D].湖南农业大学,2012(06)
- [6] 张丽华.多种蜘蛛体内细菌多样性研究[D].湖北大学,2018(05).

课题来源:大学生研究性学习和创新性实验计划项目

作者简介:颜静(2000-),女,湖南衡阳人,生物工程专业

通讯作者:唐建洲(1979-),男,湖南永州人,生物化学专业,副教授,主要研究方向:水生动物营养与水生生化。