

酵母出芽细胞电镜观察、颜色反应与尿素酶活性的比较研究

许坤一 陈远腾 杨丽源

(云南省微生物研究所,昆明)

张鸿飞 刘爱武 韩丹 李长江 钱伟

(昆明医学院电镜室,昆明)

观察了6个属的12株酵母菌出芽时的胞壁结构、重氮基蓝色B盐颜色反应和尿素酶活性,认为出芽型和颜色反应二者有相关性,可以说明这些属种之间的亲缘关系。

关键词 酵母;出芽型;颜色反应;尿素酶活性

近年来有许多报告提出,以出芽方式,细胞壁的亚显微结构和生物化学特性作为确定酵母菌的分类地位及其种属亲缘关系的依据^[1-3]。作者研究了6个属的12株酵母菌芽殖(其中1株为裂殖)时的胞壁结构、颜色反应和尿素酶活性。这些菌株中,属于子囊菌的酵母有2属共2株,属于掷孢酵母科的1属1株,属半知菌无孢子的3属共9株。现将试验及观察结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株

12株酵母中,5株系保藏菌种:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、赭色掷孢酵母(*Sporobolomyces salmonicolor*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、劳伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)和热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)。其余7株均分离自云南省哀牢山常绿阔叶林根际土壤中。根据 Lodder (1970) 酵母菌分类系统^[4],分别鉴定为红酵母属(*Rhodotorula*)2株(II-33, II-41)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)2株(I-28, III-28)、假丝酵母属(*Candida*)2株(II-42 II-43)和裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)1株(IV-30)。

(二) 出芽细胞胞壁结构的电子显微镜超薄切片

将培养的菌体置离心管中,加戊二醛离心固定两次,弃上清液,再用锇酸后固定。然后将4%琼脂与菌体混合拌匀,俟琼脂冷却凝固,切为0.5 mm³小块,经脱水、渗透、包埋、切片、染色等常规处理即可在电镜下观察。

(三) 颜色反应

按乐静珠的方法^[1],采用YM琼脂于25—27℃培养三周,将重氮基蓝色B盐(Diazonium Blue B,简称DBB)试剂滴加在培养好的斜面培养物上,使其1/2浸泡在试剂中,1—2分钟后观察结果。此时,在界面处可观察到菌落呈红色者为阳性反应;不变色者为阴性反应。

(四) 尿素酶活性

按 Lodder 的方法^[4],分别在 pH5.4 和 6.8 的培养基上进行。

结 果

6属12株酵母菌出芽细胞的胞壁结构、颜色反应结果和尿素酶活性列于表1。

(一) 出芽细胞的胞壁结构

电镜下观察6属12株酵母菌繁殖过程中,母细胞与子细胞连接部位胞壁结构的形态(出芽型 Blastocyst): 1. 出芽时,母细胞的外壁在出芽处破裂,向外侧绽开为喇叭

本文于1984年6月25日收到。

表 1 6 属 12 株酵母菌的出芽型、DBB 颜色反应和尿素酶活性的比较

Table 1 A comparative study of the sprouting type, color reaction of Diazonium-Blue B Salt (DBB) and urease activity of 12 strains of yeast representing 6 genera

	菌 名	出芽型	颜色反应	尿素酶活性	出芽型和颜色反应符合情况
属于囊菌类的酵母	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	全分芽型	-	-	+
	裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces</i> sp. IV-30)	全分芽型	-	+	+
	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)	全分芽型	-	+	+
	假丝酵母 (<i>Candida</i> sp. II-42)	全分芽型	-	-	+
	假丝酵母 (<i>Candida</i> sp. II-43)	全分芽型	-	+	+
属担子菌类的酵母	桔色掷孢酵母 (<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>)	内分芽型	+	+	+
	粘红酵母 (<i>Rhodotorula glutinis</i>)	内分芽型	+	+	+
	红酵母 (<i>Rhodotorula</i> sp. II-33)	内分芽型	+	+	+
	红酵母 (<i>Rhodotorula</i> sp. II-41)	内分芽型	+	+	+
	劳伦隐球酵母 (<i>Cryptococcus laurentii</i>)	内分芽型	+	+	+
	隐球酵母 (<i>Cryptococcus</i> sp. I-28)	内分芽型	+	+	+
	隐球酵母 (<i>Cryptococcus</i> sp. III-28)	内分芽型	+	+	+

叭状卷口,并可见暗色菌褶;而内壁则仍向前延伸形成芽细胞的初壁。这种出芽方式称为内分芽型(Entroblastic)。属于这一类型的有桔色掷孢酵母(*Sporobolomyces salmonicolor*) (图版 1-1)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) (图版 1-2)、红酵母 II-33 (*Rhodotorula* sp. II-33)、红酵母 II-41 (*Rhodotorula* sp. II-41) (图版 1-3)、劳伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)、隐球酵母 I-28 (*Cryptococcus* sp. I-28) (图版 1-4) 和隐球酵母 III-28 (*Cryptococcus* sp. III-28)。2. 母细胞的外壁完全,不破裂;母细胞和芽细胞的内、外层胞壁相互连续;无菌褶结构;胞壁由呈暗色且很薄的一层外壁和浅色而宽的内壁组成,称为全分芽型(Joloblastic)。属于这一类型的有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (图版 1-5)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) (图版 1-6)、假丝酵母 II-42 (*Candida* sp. II-42) (图版 1-7)、假丝酵母 II-43

(*Candida* sp. II-43)。然而,属于子囊菌类的裂殖酵母 IV-30 (*Schizosaccharomyces* sp. IV-30) 可以视为一种特殊情况。该菌的繁殖方式并非芽殖,而是通过二分裂形成第二代子细胞。电镜下母细胞与子细胞连续部位的胞壁不发生破裂,但在胞壁外侧又具有菌褶结构(图版 I-8)。内、外层胞壁的形态结构仍和全分芽型十分相似。

(二) DBB 颜色反应

从表 1 可以看出,半知菌无孢子的 3 株红酵母、3 株隐球酵母和 1 株掷孢酵母的颜色反应全部为阳性;而属于子囊菌的 2 株酵母和半知菌的 3 株假丝酵母则全部为阴性。二者颜色反应差异十分明显。

(三) 尿素酶活性

在两种 pH 条件下的试验结果表明,半知菌无孢子的 3 株红酵母、3 株隐球酵母有尿素酶活性。假丝酵母中,热带假丝酵母和菌株 II-43 有尿素酶活性;而菌株 II-42

则无尿素酶活性。属于子囊菌的酿酒酵母无尿素酶活性；而裂殖酵母 IV-30 有尿素酶活性。

讨 论

观察结果证明，酵母菌增殖时，母细胞与子细胞连接处的胞壁亚显微结构确有明显差异。半知菌类中的红酵母属、隐球酵母属芽细胞基部，与半担子菌的掷孢酵母都具内分芽型的特点。它们的 DBB 颜色反应均为阳性。由表 1 可见，出芽型、颜色反应和尿素酶活性三者结果一致。而不完全菌类中的假丝酵母与子囊菌类的所试菌

株则为全分芽型，颜色反应均为阴性，结果也一致（尿素酶活性有差别）。

综上所述，可以将胞壁结构，分芽类型和 DBB 颜色反应作为确定那些形态简单、种属繁多的不完全酵母菌的分类地位及其亲缘关系的依据。

参 考 文 献

- [1] 乐静珠：真菌学报，2(1)：41—49，1983。
- [2] Kreger-Van Rij, N. W.: *J. Gen. Microb.*, 68: 87—95, 1971.
- [3] Baharaeen, S. and H. S. Vishniac: *Mycologia*, 73: 618, 1981.
- [4] Lodder, J.: *The Yeast A Taxonomic Study*, Amsterdam North Holland Publishing Co, 1970.

COMPARATIVE STUDIES ON THE SPROUTING CELLS OBSERVED IN ELECTRON MICROSCOPE, COLOR REACTION AND UREASE ACTIVITY OF YEASTS

Xu Kunyi Chen Yuanteng Yang Liyan

(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming)

Chang Hongfei Liu Aiwn Han Dan

Li Changjiang Qian Wei

(Kunming Medical College, Kunming)

In this paper, the wall structure of sprouting cell in electron microscope, color reaction of Diazonium-Blue B Salt (DBB) and urease activity of 12 strains of yeast representing 6 genera were studied. We consider that the characteristics of sprouting type and color reaction are extremely

clear and coincide with each other. The result shows the affinity relationship between these species.

Key words

Yeast; Blastic; Color reaction; Urease activity

图 版 说 明

1. 赭色孢拟酵母 (*Sporobolomyces salmonicolor*) 出芽细胞已自母细胞分开, 狭窄部可见分裂后的痕迹。母细胞和芽细胞(外壁已形成)胞壁有菌褶结构($\times 32,000$)。2. 粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 出芽时母细胞的外壁在出芽处破裂, 向外侧绽开呈喇叭状卷口 ($\times 52,000$)。3. 红酵母 II-41 (*Rhodotorula* sp. II-41) 出芽基部母细胞外壁明显向外侧绽开呈喇叭口 ($\times 52,000$)。4. 隐球酵母 I-28 (*Cryptococcus* sp. I-28) 出芽基部母细胞胞壁外层呈向外侧绽开状 ($\times 40,000$)。5. 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 母细胞壁内、外层和芽细胞的内、外层相连续, 出芽基部的细胞壁无菌褶结构 ($\times 32,000$)。6. 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 出芽时呈典型的全分芽状 ($\times 52,000$)。7. 假丝酵母 II-42 (*Candida* sp. II-42) 胞壁由薄而暗色的外层和淡色而宽的内壁组成 ($\times 40,000$)。8. 裂殖酵母 IV-30 (*Schizosaccharomyces* sp. IV-30) 细胞分裂繁殖时, 暗而薄的外层胞壁和浅而宽的内层胞壁清晰可见; 但是, 胞壁外层显示菌褶结构 ($\times 26,000$)。

1. *Sporobolomyces salmonicolor*. Bud has separated from the mother cell. After cell division, the residue at the isthmus is visible. Lamellar structure presents at the wall of mother cell and bud (the outer wall has formed already). 2. *Rhodotorula glutinis*. While budding, the outer wall of the mother cell is broken up at the site of budding and splits toward the outside to appear as a bell-shaped opening. 3. *Rhodotorula* sp. II-41. The outer wall of mother cell evidently splits toward the outside and appears as a bellshaped opening at the base of the bud. 4. *Cryptococcus* sp. I-28. The outer layer of the wall of the mother cell splits toward the outside at the base of bud. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. The inner and outer layers of the wall of the mother cell are continuous with the wall of the bud. No lamellar structure presents in the wall at the base of the bud. 6. *Candida tropicalis*. It shows typically holoblastic while budding. 7. *Candida* sp. II-42. The wall consists of thin dark outer layer and broad light inner wall. 8. *Schizosaccharomyces* sp. IV-30. While division, the thin dark outer wall and broad light inner wall are clearly visible, but the outer layer of the wall shows the lamellar structure.