

酵母菌实验中平板变橙原因的分析与验证

人大附中翠微学校 高二五班 陈梓睿

一、绪论

在3/6与3/8进行的酵母菌平板划线与稀释涂布接种的课程实验中，酵母菌在生长过程中正常的出现了乳白色酵母菌落。然而一段时间后发现菌落被橙色覆盖，直至整个培养基都变为橙色。



左侧两张为酵母菌菌落正常形态，右侧三张为橙色污染平板与橙色污染菌落

酵母菌平板变橙可能是由于多种原因引起的，这可能包括：

- **生长条件变化：**酵母菌在培养基中生长时，如果环境条件发生变化，如pH值、温度或营养物质的浓度等，都可能导致其菌落颜色的变化。
- **突变：**在酵母菌群体中可能发生突变，导致菌落颜色发生变化。这种变化可能是自然发生的，也可能是由于实验操作或环境条件引起的。
- **代谢产物与外分泌物：**酵母菌产物可能会导致菌落颜色的改变。某些产物可能在氧化或还原过程中发生颜色变化，从而使菌落呈现橙色。
- **污染：**在培养酵母菌的过程中，可能发生其他微生物的污染，这些微生物可能具有产生橙色色素的能力，导致酵母菌落呈现橙色。

本文分析平板变橙的可能原因并通过控制变量实验验证。为了方便叙述，本文将课程实验时接种的酵母菌种记为 A、新购酵母菌种记为 B，不同时间稀释培养的菌液依次记为 I、II、III……。实验中配制菌液的统一方法为：将酵母粉与温水按特定比例混

匀，在28℃下恒温培养24h制成菌液。接种培养菌种的统一方法为：在超净工作台酒精灯火焰旁按实验设计进行平板划线或稀释涂布，接种完成后放入28℃恒温培养箱中培养48h。

实验在人大附中翠微学校高中部生物实验室中由陈梓睿进行。所选用配制B组菌液的酵母粉为安琪酵母股份有限公司于2023/10/9生产的高活性干酵母粉，品种为发面酵母（*Sacc-haromyces*）。培养基选用济南百博生物技术股份有限公司生产的LB培养基。实验中菌液配置时间、接种时间与稀释比例如下表（*标记代表近似时间）：

菌液编号	A	B-I	B-II	B-III	
稀释比例	约>1:50	1:15	1:4	1:15	
配制时间	*3/4	3/10 17:21	*3/12 13:40	3/20 15:50	
接种时间	3/6*11:00 3/8*15:00	3/11*13:00 3/15 13:34	3/15 13:34	3/25 15:00	

表 1 实验菌液数据

二、生长条件变化与突变

三、代谢产物与分泌物

1. 代谢产物

酵母代谢物中存在大量生化黄腐酸、氨基酸（以天冬氨酸和谷氨酸为主）、有机酸（主要为酵母在有氧呼吸三羧酸循环途径中的有机酸，如苹果酸、柠檬酸和琥珀酸等）、酵母细胞壁多糖、甘露聚糖、葡聚糖、天然抗逆成分甜菜碱以及酵母源 γ -氨基丁酸和麦角甾醇等物质。下表列出了酵母菌代谢产物的详细成分：

分类	物质	颜色	变色条件
抗病因子	水杨酸甲酯	无色至淡黄色	/
	茉莉酸甲酯	无色	氧化反应、光照
	几丁质	淡黄色至白色	/
果品调控因子	酵母多肽	白色	氧化反应、金属离子络合、糖基化
	生化黄腐酸	棕色	/
土壤养护因子	土壤有机质	黑色至棕色	有机质含量不同
	柠檬酸	白色	氧化反应、金属离子络合
	苹果酸	白色	氧化反应
	琥珀酸	无色	氧化反应
	乳酸	无色	氧化反应
	酵母多糖	白色	氧化反应、金属离子络合、Maillard反应

表 5 酵母菌代谢产物及其变色条件

物质本身显色：水杨酸甲酯、几丁质与生化黄腐酸本身有可能显黄色，但在下文实验1中B-I-①与B-I-②中酵母菌正常生长代谢却并没有变色。代谢出的土壤有机质在相同条件下理应相同，与不同平板颜色不同矛盾。

需氧反应：代谢产物发生的氧化反应通常在有氧和光照加热条件下完成，上文实验中密封的平板虽在制作的时候一定包含一部分空气，但是这些空气迅速被酵母菌的繁殖所利用，后期长成菌落但未变色的时候平板内氧极其稀薄。另外，培养过程中阴凉、干燥与28°C也不满足氧化反应的条件。同理，酵母多糖的Maillard反应通常也发生在加热的条件下，需要氧气参与，也不满足条件。

络合反应：有机酸类与部分氨基酸的络合反应会使培养基显色，显橙色的有 Cr^{3+} 和 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 与 Zn^{2+} 等，这些离子如 Cr^{3+} 的大部分均不能在培养的任何一阶段被找，且酵母菌本身含有的微量离子浓度过低，也无法通过络合反应使整个菌落乃至平板变橙。

含量过低：水杨酸甲酯与茉莉酸甲酯在酵母内只作为激素类物质调解生命活动，酵母多糖与酵母多肽只占代谢糖类与蛋白质类的很小一部分。这些含量过低的物质即使显色也无法使菌落显肉眼可见的橙色，故不做讨论。

2. 外分泌物

酵母菌的外分泌物包括蛋白质、酶、代谢产物等。以下是酵母菌外分泌物的详细成分：

分类	物质	颜色	变色条件
蛋白质	凝集素		
	抗生素		
	信号分子		
酶	蛋白酶		
	糖化酶		
	纤维素、淀粉酶		
	脂肪酶		
	酒精脱氢酶		
外泌小泡	蛋白质、核酸、脂质		

综上，排除了酵母菌代谢产物使平板变色的可能。

四、污染

从杂菌污染的角度考虑，可以对实验过程中的所有可能污染的变量进行实验一一排除。回顾整个实验过程，考虑到以下变量：菌种本身、稀释水、稀释时空气、稀释容器、培养皿、培养基、涂布器、培养时空气。

1. 菌种本身

在课程实验结束后分析讨论的过程中，提出了A菌液可能存在因污染或放置时间过长导致失活等一系列变性可能。为排除菌种本身的影响，另购置新干酵母粉B进行实验：

配制1:15的酵母菌液B-I。如下表：①②③菌液使用平板划线法接种，④使用300 μ L菌液稀释涂布接种；待菌液充分吸收后，将①②用透明胶密封后倒置，③④直接倒置，放入恒温培养箱中培养。

菌液	B-I			
序号	①	②	③	④
接种方式	平板划线	平板划线	平板划线	稀释涂布
密封培养基	√	√	×	×
实验现象	正常	正常	变橙	变橙

表 2 实验1

培养48h之后观察到③④变橙而①②的正常生长，且48h后再次观察也无明显变化。本实验排除了菌种本身对于变色的影响。

2. 稀释水、稀释时空气、培养皿和培养基

从实验1中进一步发现A菌液均变色，而B-I中有些并未变色，故可以排除稀释水、稀释时空气、培养皿和培养基的自身原因。

3. 涂布器、培养时空气

在对于实验1结果分析中，发现了两个特殊变量。其中之一是平板划线接种的培养基有两组未变橙而稀释涂布的变橙（考虑B-I-③为特殊情况重新实验），据此怀疑涂布器是导致平板变色的原因。另外，B-I-①与B-I-②在接种后使用透明胶对皿盖进行了密封而B-I-③与B-I-④没有。后续前往实验室进行PCR时也偶然发现了课程实验时的两个平板划线接种的A菌液培养基接种后密封，且出现酵母菌落后48h内均培养基均未变橙。据以上两点对于培养时空气染菌做出怀疑。针对以上两个猜想，做出了如下实验：

配制1:4的酵母菌液B-II，将B-I与B-II分别进行实验。每个实验中均吸取300 μ L菌液接种至培养皿。如下表：每组①②菌液不使用涂布器，③④使用涂布器接种；等待两组实验的菌液被充分吸收后，将每组①③用透明胶密封后倒置，②④直接倒置，放入恒温培养箱中培养。

菌液	B-I				B-II			
序号	①	②	③	④	①	②	③	④
使用涂布器	×	×	√	√	×	×	√	√
密封培养基	√	×	√	×	√	×	√	×
实验现象	-	-	-	-	正常	正常	正常	正常

表 3 实验2

72h后从恒温培养箱中取出平板观察结果。如下图，观察到B-I平板均无明显现象，B-II平板均正常生长酵母菌菌落。在将两组平板暴露在空气中48h后平板均无明显变化。



实验2培养结果：左侧为B-I，右侧为B-II

从实验现象分析可知，B-I菌液因保存时间过久酵母失活，导致平板上无明显菌落生存，故不做实验相关讨论。但由于平板无酵母菌生长，且在是否使用涂布器与是否密封两组变量下均未变橙，可排除培养皿和培养基本身对变橙无影响，说明变橙现象依赖酵母菌落。B-II组观察到酵母菌落无变色现象，本实验排除了涂布器与接种后空气的影响。

4. 稀释容器

值得注意的是，A组所有实验与B-I有一个共同之处就是使用了同样的大烧瓶容纳菌液，而在配制B-II菌液的时候则是使用了小烧杯。为验证大烧瓶是否存在特殊之处（可能为化学物质）使菌落变橙，设计如下实验：

配制1:15的酵母菌液B-III，先将菌液在锥形瓶中40℃培养48h后转移至先前洗净的大烧瓶中28℃培养72h使菌液与瓶内壁充分接触后接种。如下表：①②菌液使用平板划线法接种，③④使用300μL菌液稀释涂布接种；待菌液充分吸收后，将①③用透明胶密封后倒置，②④直接倒置，放入恒温培养箱中培养。

菌液	B-III			
序号	①	②	③	④
接种方式	平板划线	平板划线	稀释涂布	稀释涂布
密封培养基	√	×	√	×
实验现象				

表 4 实验3