

云南阳宗海酵母菌种群结构及产胞外酶测试

严亚萍¹, 李治滢¹, 董明华¹, 周巧², 晋方佑¹, 杨丽源¹, 李绍兰^{1*}

¹ 云南大学微生物研究所, 昆明 650091

² 昆明理工大学生物技术研究中心, 昆明 650500

摘要: 【目的】研究阳宗海酵母菌种群结构, 分析生物因子及非生物因子对酵母菌种群分布的影响; 测试阳宗海酵母菌产胞外酶活性。【方法】水样用醋酸纤维素滤膜过滤, 原位培养分离酵母菌; 梯度稀释法分离土样和底泥样品; 对分离得到的菌株进行 DNA 提取和测序, 分析 26S rDNA 的 D1 /D2 区域, 并结合形态及生理生化指标进行鉴定; 用产酶筛选培养基对分离得到的酵母菌进行产胞外酶活性测试。【结果】共分离得到 201 株酵母菌, 鉴定分属于 15 个属 48 个种, 其中包括 10 个潜在的新种; 普鲁兰类酵母 (*Aureobasidium pullulans*), 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*), 胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*), *Cryptococcus podzolicus* 是优势种; 15.9% 的酵母菌具有产胞外酶活性, 主要是脂肪酶和淀粉酶。【结论】阳宗海酵母菌有较为丰富的多样性, 人为活动对阳宗海酵母菌分布影响较大, 其次浊度、电导率也是影响酵母菌种群分布的重要因素; 阳宗海产胞外酶酵母菌可能参与湖泊生态系统的自然循环。

关键词: 阳宗海, 酵母菌多样性, 环境因子, 胞外酶活性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1205-08

高原海拔高, 气压低, 氧气含量少, 是一种典型的低压缺氧环境。云贵高原是世界十大高原之一, 平均海拔为 2000 m, 面积为 30 万 km²。云南省有九大高原湖泊, 阳宗海是其中之一, 它位于东经 102°5′–103°02′, 北纬 24°51′–24°58′之间, 地跨昆明市的宜良县、呈贡县和玉溪市的澄江县。阳宗海湖区属亚热带高原季风气候, 年均气温 14.5℃, 年均降水量 963.5 mm; 1 月份水温最低为 9.8℃, 8 月份水温最高为 23.9℃; 湖面海拔 1770.75 m, 面积 31.68 km², 平均水深 19.5 m, 最深处 30 m, 蓄水量 6.17 × 10⁸ m³, 是云南省第三大深水湖泊。高原湖泊海拔高, 光照充足, 湖区气候温暖干燥, 年降水量

不大, 湖水冬季不结冰, 湖泊水位年变化幅度小, 是一种特有的高原水环境^[1]。目前对阳宗海微生物的研究还比较少, 未见有关酵母菌研究的报道, 而特殊的生态环境造就了特有的生物多样性及生物活性, 因此研究阳宗海酵母菌的多样性, 可为云南特殊地理环境条件下酵母菌资源的开拓提供一定的理论及实际意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2012 年 8 月 1 日, 在阳宗海湖区

基金项目: 国家自然科学基金 (31160006); 云南省科技条件平台建设计划项目 (2009DA002); 云南省教育厅科学研究基金 (09Z0006)

* 通信作者。Tel: +86-871-65033540; Fax: +86-871-65034621; E-mail: shlli@ynu.edu.cn

作者简介: 严亚萍 (1987–), 女, 云南大理人, 硕士研究生, 主要从事酵母菌资源研究。E-mail: muxuyaping@126.com

收稿日期: 2013-03-11; **修回日期:** 2013-05-09

选取了 10 个样点, 在 10 个样点上采集水样和底泥。水样采样深度为 30 cm, 每个样点采 2 份水样, 每份水样采集 1.5 L; 利用抓斗式采泥器采集阳宗海表层约 10–30 cm 底泥样品, 每个样点采集 1 份底泥, 每份底泥采集约 500 g; 另外在进水口汤池河选取 2 个样点进行水样采集, 每个样点采集 2 份水样, 每份水样采集 1.5 L。采集湖周 5 个土壤样品, 每个样品采集 10–20 个点, 每 2 个点之间相距 10–20 m, 每个样品采集汇总约有 500 g, 居民区旁即人为活动影响较大的地方没有设置采样点 (图 1)。水样放在 1.5 L 无菌的塑料桶里, 底泥和土样放在无菌的封口袋中。样品采集完带回实验室立即处理。

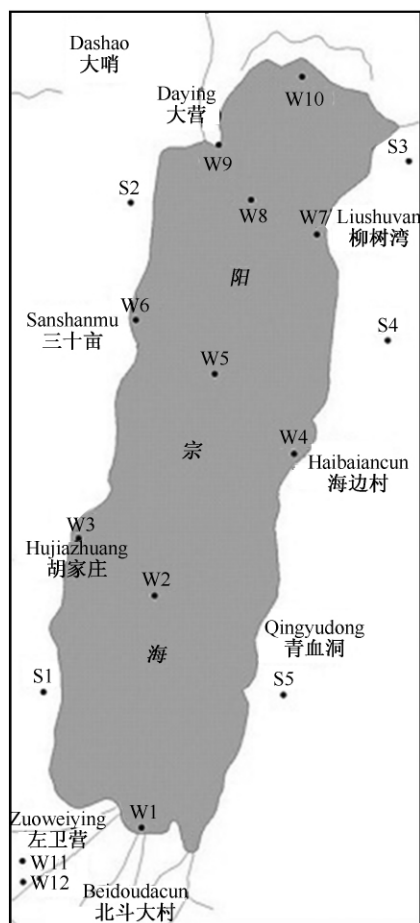


图 1. 阳宗海采样位点图

Figure 1. Sampling stations in Yangzonghai Lake.

1.1.2 理化指标测定: 用 Orion 5 star (Thermo Scientific) 测定各样点水样的 pH, 电导率, 温度、溶解氧; 浊度用 TN100 浊度仪 (Eutech Instruments Pte Ltd.) 进行测定。测定每个样品的理化指标时重复进行 2 次实验。

1.1.3 主要试剂和仪器: *Taq* 酶、dNTP、DNAMarker、GoldView 购自大连宝生物有限公司; Tris、EDTA、SDS、Triton-100 购自昆明硕阳科技有限公司; 引物 NL1、NL4 由上海生工生物有限公司合成; 凝胶成像仪 (SYDR /1305 美国 Syngene 公司); 电泳仪 (POWER PAC 3000 美国 BIO-RAD); 离心机 (美国 Thermo 公司); PCR 扩增仪 (PTC-200 美国 MJ Research 公司)。

1.2 菌株分离和计数

50 mL 水样用孔径 0.45 μm , 直径 47 mm 的醋酸纤维素滤膜过滤, 滤膜平放在培养基上原位培养; 底泥和土壤样品采用梯度稀释涂皿法。分离培养基 YM 培养基 (酵母膏 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 麦芽汁 0.3%, 葡萄糖 1%, 琼脂 2%, 倒皿前在 100 mL 培养基中加 1 mol/L 的盐酸溶液 0.7 mL)、RBCH 培养基 (蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 1%, 磷酸氢二钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 孟加拉红 0.005%, 琼脂 1.55%, 临用时在 1 mL 培养基中加青霉素 80U) 和 PDA 培养基 (马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, 临用时在 1 mL 培养基中加青霉素 80U)。室温下培养 3–30 d, 挑取单菌落, 经划线纯化, 获得纯培养物。纯化好的菌株冻干保存。

每个水样共过滤 1L 水样, 重复 20 次, 共用 20 个平皿, 酵母菌数量 / (CFU⁻¹) = (每皿酵母菌数量平均值 / 每皿过滤水量) \times 1L

1.3 酵母菌的鉴定

1.3.1 形态和生理生化指标: 形态和生理生化测试主要参照文献 [2] 进行。形态主要包括菌落颜色、形状、质地, 细胞形状、大小等。生理生化测试选取了 5 个指标: 葡萄糖发酵, 脲酶反应, 无维生素生长测试, 淀粉类似物的形成, 高渗透测试 [2]。

1.3.2 DNA 的提取和 PCR 扩增: 对所有分离得到的菌株都进行了 DNA 的提取, 扩增, 然后送检测序。DNA 的提取参照文献 [3] 方法进行。26S rDNA D1 / D2 区域序列的 PCR 扩增和测序参照文献 [4] 的方法并稍作改动进行。引物 NL1 (5'-GCATATCAAT AAGCGGAGGAAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCCGTGTTT CAAGACGG-3')。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。1% 琼脂糖凝胶检测扩增的目标产物。所得产物送上海生工生物有限公司测序。

1.3.3 序列分析: 对测序菌株进行 26S rDNA D1 /

D2 区域序列分析^[3-5], 同时结合形态学及生理生化指标对菌株进行鉴定。菌株 26S D1 /D2 区域测序结果采用 DNASTar 软件进行图谱分析, 对序列进行人工校对, 校正后的序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索 (BLAST search), 选取与供试菌株关系最近的已知酵母菌模式菌株的 D1/D2 区序列, 以比较测试菌株与已知酵母菌模式菌株 D1/D2 序列的相似程度^[7], 应用 Clustal X 进行序列比对, 用 Meg 4. 0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining) 进行分子系统学分析^[6-9]。

1.4 产胞外酶测试

将分离得到的菌株在 YM 培养基斜面上活化, 进行产胞外脂肪酶, 纤维素酶, 淀粉酶和蛋白酶的筛选, 培养基的具体配方及实验操作参照文献 [10-12] 进行。对初筛有活性的菌株进行复筛实验。

1.5 数据处理

香农威尔指数分析各样点酵母菌的丰富度, 计算公式: Shannon H = $-\sum ni/n \ln (ni/n)$ 。

2 结果和分析

2.1 各样点理化因子和酵母菌数量

阳宗海湖水各样点的理化因子和酵母菌数量见表 1。湖水中各样点 pH, 电导率, 溶解氧和温度没有太大变化, 浊度值相差不大, 除 9 号点和 10 号点略高外。汤池河进水口处 2 个样点 (11 和 12 号样点) 的 pH 相对低一些, 但是电导率和浊度却明显高于湖中样点, 酵母菌的数量也明显高于湖中样点。在 12 个样点中, 酵母菌的数量在 2.3CFUL^{-1} 到 755CFUL^{-1} 之间, 在 1 号至 10 号样点中, 3 号样点的酵母菌数量最多, 浊度最小, 溶解氧较高, 同时在这个样点分离到了较多的产红色素酵母 [禾本红酵母 (*Rhodotorula graminis*), 胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*), *Rhodospiridium diobovatum*], 产红色素酵母菌能够分泌产生类胡萝卜素, 这是一种良好的抗氧化剂, 能够抵御 UVR 的伤害, 这也许解释了在浊度较小的样点产色素酵母能够大量存活的原因^[13]。进水口 11 号和 12 号 2 个水样点的电导率和浊度是其它湖水样点的 5-10 倍, 但 pH 值和溶解氧较低, 酵母菌数量比湖水中各样点高出许多, 可能是因为 11 号和 12 号样点是汤池河入水口, 汤池河经汤池镇流入阳宗海, 农业用水和生活污水的排放增加了水体的营养度, 这可能为酵母菌的生长提供了良好的条件^[14]。

表 1. 阳宗海湖水各样点理化因子

Table 1. Physical and chemical characteristics of Yangzonghai

Sites	pH	Conductivity / ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Turbidity	OD / (mg/L)	T / $^{\circ}\text{C}$	Yeast counts / (CFU/L)
W1	8.85	438	3.39	5.78	22	2.3
W2	8.87	436	3.74	6.05	22.5	39.7
W3	8.94	438	3.26	6.22	22.5	167.2
W4	8.94	434	3.57	5.79	23.5	53
W5	8.88	437	3.34	5.96	22.9	21.2
W6	8.95	440	3.71	5.92	24	11.6
W7	8.91	441	3.39	6.2	23.5	33
W8	8.95	433	3.66	5.91	22.8	12.6
W9	8.92	440	4.76	6.9	24	18.6
W10	8.88	437	5.29	5.91	23.5	92.1
W11	8.11	2447	30.3	5.68	23.1	285.3
W12	8.25	2306	10.48	5.53	23.5	755

2.2 各样点酵母菌种群结构

根据目前酵母菌的分子分类标准, 若测试菌株的 D1 /D2 区域序列与已知种的相似性为 99% 以上, 并有形态特征的支持时, 则可对其作出种的鉴定; 与最近缘的已知种的相似性为 98% 或以下时,

则可初步确定为新种; 在 98% - 99% 之间时, 则需要结合 ITS 序列分析和生理生化特征比较对其作出分类学处理^[6-8]。经分离鉴定总共获得 201 株酵母菌, 172 株来自于湖水, 3 株来自于周围环境土样 (在 5 个土壤样品中, 1 号, 2 号和 5 号土壤样品没有

表 2. 云南阳宗海酵母菌种群数量分布表

Table 2. The yeasts from water and soil collected in Yangzonghai Lake, Yunnan

Species	Water samples												Soil samples		Sediment samples		
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	S3	S4	W6	W9	W10
Ascomycetes																	
<i>Candida albicans</i>			1														
<i>Candida natalensis</i>			5							1					1		
<i>Candida tropicalis</i>			1									2					
<i>Candida parapsilosis</i>					1												
<i>Candida pseudolambica</i>									1		1						5
<i>Candida rugosa</i>											1						
<i>Candida catenulata</i>											1						
<i>Candida asiatica</i>				1													
<i>Candida ernobii</i>								1									
<i>Cyberlindnera saturnus</i>																1	
<i>Hanseniaspora warum</i>								1				1	4				
<i>Issatchenkia terricola</i>													1				
<i>Issatchenkia siamensis</i>													1				
<i>Kodamaea ohmeri</i>		1															
<i>Kluyveromyces hupeiensis</i>																	1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		1	1				1			1							
<i>Pichia kluyveri</i>			1									1					
<i>Pichia occidentalis</i>			1						1			2	2				
<i>Pichia kudriavzevii</i>						1						4	12				1
<i>Pichia fermentans</i>												2	2				
<i>Pichia aff. fermentans</i>																	1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>												1	4				
Basidiomycetous																	
<i>Cryptococcus luteolus</i>		1						1									
<i>Cryptococcus albidus</i>		1	1														
<i>Cryptococcus flavescens</i>		1	1	1			1			1			1				
<i>Cryptococcus friedmannii</i>			1														
<i>Cryptococcus magnus</i>	3		2		1					2							1
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>								1									
<i>Cryptococcus sp. *</i>	1				1					1							2
<i>Cryptococcus podzolicus</i>														1			12
<i>Cryptococcus terreus</i>																	1
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	3																
<i>Cryptococcus carnescens</i>								1									
<i>Cryptococcus wieringae</i>					1												
<i>Cryptococcus victoriae</i>			3														
<i>Hannaella zeae</i>										1							
<i>Pseudozyma aphidis</i>		1															
<i>Rhodotorula graminis</i>		2	4		4					1			1				
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			7		3		3	1		1							
<i>Rhodotorula glutinis</i>			1				1										
<i>Rhodotorula nothofagi</i>							1										
<i>Rhodotorula sp. *</i>			1		1		1										
<i>Rhodotorula vanillia</i>			1														
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>			1														
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>			2														
<i>Aureobasidium sp. *</i>			1	1													
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5	1	9		14		4	1		3	1						
Shannon H	1.3	2	2.6	1.1	1.5	0	2.1	1.4	0.7	2.3	2.1	2					

* possible new species

分离到酵母菌), 26 株来自于底泥 (在 10 个底泥样点中, 只在 6 号, 9 号, 10 号 3 个样点的底泥中分离到酵母菌)。共分离到的 201 株酵母菌都进行了分子鉴定, 其中 191 株经序列比对与相应模式菌株同源率为 99% - 100%, 归属于 15 个属 48 个种 (见表 2), 担子菌纲占优势 (43.3%), 在担子菌纲中隐球酵母属 (*Cryptococcus*) 为优势属 (55.2%), 其次是红酵母属 (*Rhodotorula*) (40.2%); 在子囊菌纲中毕赤属 (*Pichia*) 是优势属 (41.9%), 其次是假丝酵母属 (*Candida*) (31.1%)。在所有分离到的菌株中普鲁兰类酵母 (*Aureobasidium pullulans*) 是优势种, 共分离到 38 株, 其次分别是库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 18 株, 胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 15 株, *Cryptococcus podzolicus* 13 株, 禾本红酵母 (*Rhodotorula graminis*) 12 株。还有 10 株酵母菌与模式菌株的核酸差异大于 3 个以上, 暂时列为潜在的新种^[15-17]。

在 12 个样点中, 酵母菌的丰富度在 3 号点最大为 2.6, 3 号样点浊度较小, 溶解氧较高, 这可能是造成酵母菌丰富度最大的原因, 其次是 10 号样点为 2.3 和 7 号样点为 2.1, 10 号样点在阳宗海引水渠旁, 可能是由于河流的进入带进了较多的有机物质和迁移物种, 为酵母菌的生长提供了营养物质, 使得酵母菌的多样性较为丰富; 7 号样点在柳树湾村旁, 可能是因为人为活动的影响增加了该样点酵母菌的丰富度。11 号样点酵母菌的丰富度与 7 号样点相同, 但是浊度却高于 7 号样点, 可能是由于 11 号样点对应的是汤池河入水口, 汤池河流经汤池镇和周边农田, 人为污染和农业污染较为严重, 所以 11 号样点浊度较大。

2.3 湖水, 底泥, 土壤中酵母菌的差异

此次研究在周围土壤中分离得到很少的酵母菌, 共只分离得到 3 株, 在阳宗海底泥中分离得到 26 株 (见表 2)。湖水、底泥和土壤这 3 种基质中没有发现共同的种。*Candida natalensis*、*Candida pseudolambica*、库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 和大隐球酵母 (*Cryptococcus magnus*) 是湖水和底泥中共同的种; 浅黄隐球酵母 (*Cryptococcus flavescens*) 和禾本红酵母 (*Rhodotorula graminis*) 是湖水和土壤中共同的种。*Cryptococcus podzolicus* 在湖周围土壤和湖水底泥中都分离得到, 但却没有在湖

水中分离到, 可能是因为这个种的酵母菌不适应高原水环境, 不能存活。由于土壤样点的选择是在人为活动影响较小的地方, 故分离到的酵母菌也较少。从底泥中也只分离到 26 株酵母菌, 可能是因为湖深, 所以光照和含氧量都较少, 不利于酵母菌的生长。

2.4 阳宗海酵母菌与其他水环境中酵母菌的比较

比较云南阳宗海湖与云南程海湖, 阿根廷巴塔哥尼亚淡水湖, 阿根廷巴里洛切高纬度湖的湖水中酵母菌多样性^[14, 18-19], 我们发现阳宗海湖水中酵母菌的多样性与另外 3 种水环境中的酵母菌多样性存在比较大的差别 (表 3)。普鲁兰类酵母 (*Aureobasidium pullulans*) 在 4 种水环境中都有发现, 而据先前报道, 普鲁兰类酵母 (*Aureobasidium pullulans*) 能存在于多种环境中, 且在极端环境中, 这种菌出现的频率非常高^[20]。在阳宗海湖水样中分离到 42 个种的酵母菌, 而在云南程海湖水样中分离到 31 个种, 通过比较同在云南省的阳宗海湖和程海湖酵母菌种群多样性, 共只分离到 8 个相同的种, 阳宗海属于珠江水系, 是深水平贫营养型湖泊, 湖水主要受砷污染严重, 而程海属长江水系, 是中度营养型湖泊, 湖水主要受周围螺旋藻厂生产用水的污染, 程海属于碱性湖泊, 平均 pH 比阳宗海高, 这些可能是引起阳宗海和程海酵母菌种群结构差异较大的原因, 因此这也说明不同的地理位置的生物因子和非生物因子对酵母菌的种群结构影响较大。

2.5 阳宗海酵母菌产胞外酶实验结果

分离所得的 201 株酵母菌, 经过产胞外酶筛选实验, 有 32 株在淀粉酶和脂肪酶筛选培养基上产生透明的水解圈或晕圈 (表 4), 所有分离到的菌株均未有产胞外纤维素酶和蛋白酶的活性。仅有大隐球酵母 (*Cryptococcus magnus*) (YM26010) 同时能产胞外淀粉酶和脂肪酶。12 株禾本红酵母 (*Rhodotorula graminis*) 有产胞外脂肪酶的活性。9 株 *Cryptococcus podzolicus* 能产生胞外淀粉酶。纤维素酶广泛存在于细菌, 真菌和动物体内, 而真菌中主要是丝状真菌, 如木霉, 曲霉, 根霉和青霉中含有纤维素酶较多^[21], 微生物蛋白酶主要是细菌和霉菌产生, 本次试验没有筛选到有纤维素酶和蛋白酶活性的菌株, 可能是酵母菌含纤维素酶和蛋白酶较少, 但脂肪酶就广泛存在于酵母菌中^[22]。

表 3. 阳宗海湖水中酵母菌与其它 3 种水环境中酵母菌的比较

Table 3. Comparison of yeast species isolated from Yangzonghai lake and from other aquatic environments

Species	Chenghai lake	Oligotrophic lake (Patagonia, Argentina)	High-altitude lakes (Bariloche, Argentina)	Yangzonghai lake
<i>Candida natalensis</i>	-	-	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	+
<i>Candida pseudolambica</i>	+	-	-	+
<i>Candida rugosa</i>	-	-	-	+
<i>Candida catenulata</i>	-	-	-	+
<i>Candida asiatica</i>	-	-	-	+
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	-	+
<i>Candida ernobii</i>	-	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	+	-	+
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	-	-	+
<i>Issatchenkia siamensis</i>	+	-	-	+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	-	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	+
<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	-	+
<i>Pichia fermentans</i>	-	+	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-	-	+
<i>Cryptococcus luteolus</i>	+	-	-	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	+	-	+	+
<i>Cryptococcus flavescens</i>	-	-	-	+
<i>Cryptococcus friedmannii</i>	-	-	-	+
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	-	-	-	+
<i>Cryptococcus magnus</i>	+	+	-	+
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	+	-	-	+
<i>Cryptococcus wieringae</i>	-	+	-	+
<i>Cryptococcus victoriae</i>	-	+	-	+
<i>Cryptococcus carnescens</i>	-	+	-	+
<i>Hannaella zeae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudozyma aphidis</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula graminis</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula vanillica</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	+	-	-	+
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	-	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	+

“+” Present “-” Absent.

表 4. 阳宗海酵母菌产酶活性筛选结果

Table 4. Enzyme activities of yeast strains from Yangzonghai Lake, Yunnan

Species	Collection No.	Cellulase	Amylase	Lipase	Proteinase
<i>Rhodotorula graminis</i>	YM25945 YM25963 YM25964 YM25969	-	-	+	-
	YM25981 YM984 YM25985 YM25986	-	-	+	-
	YM25988 YM26006 YM26059 YM26060	-	-	+	-
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	YM25959 YM25971	-	-	+	-
<i>Cryptococcus magnus</i>	YM25967	-	-	+	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	YM25992 YM26002	-	+	-	-
<i>Aureobasidium sp.</i>	YM25997	-	+	-	-
<i>Cryptococcus luteolus</i>	YM25998	-	+	-	-
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	YM26001	-	+	-	-
<i>Hannaella zeae</i>	YM26007	-	+	-	-
<i>Cryptococcus magnus</i>	YM26010	-	+	+	-
<i>Cryptococcus flavescens</i>	YM26057	-	-	+	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	YM26065 YM26068 YM26069 YM26074	-	+	-	-
	YM26075 YM26077 YM26079	-	+	-	-
	YM26080 YM26081	-	+	-	-

“+” the diameter of the clear halo is 1.5cm-2cm “-” negative.

3 结论

本次研究描述了阳宗海酵母菌种群结构及生物因子和非生物因子对其分布的影响, 研究发现云南阳宗海酵母菌存在较为丰富的多样性, 且与其它水环境中酵母菌多样性相比较有较大的差异性, 人为活动对酵母菌多样性影响较大, 同时研究结果也表明浊度和电导率也是影响酵母菌存活和分布的重要环境因子, 浊度小即透明高, 湖水对光的透射、散射和吸收也会较大, 这可能也导致 UVR 成为酵母菌存活和分布的一个重要选择条件。本次试验筛选到的活性菌株占总菌株的 23.5%, 主要是产胞外淀粉酶和脂肪酶, 淀粉酶在工业发酵、淀粉液化中具有举足轻重的位置; 而脂肪酶广泛存在于自然界中, 微生物产生的脂肪酶产量高, 而且功能多样, 并且只有微生物产生的脂肪酶具有生产应用价值^[23], 可见阳宗海中有应用价值的酵母菌资源较为丰富, 这些酵母菌不仅能够适应这种高原水环境, 有活性的酵母菌还能够高原湖泊中进行新陈代谢, 参与自然循环, 在阳宗海的生态系统中发挥作用。

参考文献

- [1] Zhu Y. Study on environmental background of Yangzonghai Lake Basin. *Environmental Science Survey*, 2008, 27(5): 75-78. (in Chinese)
祝艳. 阳宗海流域环境背景状况. 环境科学导刊, 2008, 27(5): 75-78.
- [2] Kurtzman CP, Fell JW. The Yeast: A Taxonomic Study. 5th eds. London: Elsevier Science, 2011: 1-107.
- [3] Nisioutou AA, Spiropoulos, Nychas G-JE AE. Yeast community structures and dynamics in healthy and botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environment Microbiology*, 2007, 73(21): 6705-6713.
- [4] Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [5] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 31-371.
- [6] Kurtzman CP, Fell JW. The Yeast: A Taxonomic Study. 4th eds. London: Elsevier Science, 1997: 1-107.
- [7] Bai F, Wang C. Species diversity of yeasts from rotten wood in the rainforests of Hainan, China. *Mycosystema*, 2009, 28(3): 354-362. (in Chinese)
- 白逢彦, 王辰. 海南热带雨林腐木上酵母菌物种多样性研究. 菌物学报, 2009, 28(3): 354-362.
- [8] Fell JW, Noekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 1351-1371.
- [9] Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2: 495-517.
- [10] Chi Z, Wang X. Isolation and identification of amylase-producing marine yeasts. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37 (Sup. II): 95-100. (in Chinese)
池振明, 王晓红. 产淀粉酶海洋酵母菌的筛选及鉴定. 中国海洋大学学报, 2007, 37 (Sup. II): 95-100.
- [11] Song W, Jiang L, Shen A, Tan Z. Isolation of lipase yeast strains and their induction with ultraviolet radiation. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2009, 29(3): 55-59. (in Chinese)
宋炜, 蒋丽娟, 申爱荣, 谭著明. 高产脂肪酶酵母菌株的分离筛选及紫外诱变. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(3): 55-59.
- [12] Zhang L, Chi Z. Screening and identification of a cellulase producing marine yeast and medium and fermentation condition optimization for cellulase production. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37 (Sup. II): 101-107. (in Chinese)
张亮, 池振明. 1株产纤维素酶海洋酵母菌的筛选, 鉴定及发酵条件优化. 中国海洋大学学报, 2007, 37 (Sup. II): 101-107.
- [13] Morris DP, Zagarese H, Williamson CE, Balseiro EG, Hargreaves BR, Modenutti B, Moeller R, Queimalinos C. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol Oceanogr*, 1995, 40: 1381-1391.
- [14] Brandao LR, Libkind D, Vaz ABM, Espirito Santo LC, Molin e M, Garcia VD, Broock MV, Rosa CA. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol Ecology*, 2011, 76: 1-13
- [15] Gabriel Russo, Diego Libkind, Jos'e P, Sampaio, Maria R, van Broock. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol Ecology*, 2008, 65: 415-424.
- [16] Zalar P, Gostinčar C, de Hoog G. S, Uršič I V, Sudhaddham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in*

- Mycology, 2008, 61:21-38.
- [17] Michael Wuczkowski, ChrisBond Hansjrog, Prillinger. *Geotrichum vulgare* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56:301-303.
- [18] 周新丽. 云南三种极端环境酵母菌多样性研究. 云南大学学位论文, 2012.
- [19] Libkind D, Moline M, Sampaio JP, van Broeck M. Yeasts from high-altitude: influence of UV radiation. *FEMS Microbiol Ecology*, 2009, 69: 353-362.
- [20] Zalar P, Gostincar C, de Hoog Gs, Ursic V, Sudhaddham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol*, 2008, 61: 21-38.
- [21] Du C, Ren H, Du J, Du J. Cellulose enzyme and application. *Food Engineering*, 2011, 2 (6) :41-44. (in Chinese)
- 杜翠娇, 任河, 杜建敏, 杜进民. 纤维素酶及应用. 食品工程, 2011, 2 (6) :41-44.
- [22] He J, Xu J, Zhong C, Lv Y, Wang P. Yeast lipases: an overview of production and application. *Biotechnology*, 2011, 21 (4) :94-97. (in Chinese)
- 何军邀, 许江丽, 钟成刚, 吕亚萍, 王普. 酵母脂肪酶的制备及应用新进展. 生物技术, 2011, 21 (4) : 94-97.
- [23] Chi Z, Gong F, Li J. Recent research progress of the extracellular enzymes and their corresponding genes from the marine yeasts. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38 (5) :766-774. (in Chinese)
- 池振明, 龚方, 李静. 海洋酵母菌胞外酶及其基因的最新研究进展. 中国海洋大学学报, 2008, 38 (5) :766-774.

Yeasts from Yangzonghai Lake in Yunnan (China) : diversity and extracellular enzymes

Yaping Yan¹, Zhiying Li¹, Minghua Dong¹, Qiao Zhou², Fangyou Jin¹, Liyuan Yang¹, Shaolan Li^{1*}

¹Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

²Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: [Objective] The aims of this study were to investigate yeast diversity in Yangzonghai Lake, and to explore the value of these yeasts in such ecological environment, and at the same time, to analyze biological factors and abiotic factors on the influence of the yeast diversity. [Methods] Water was filtered through cellulose acetate membrane, serial dilutions of soil and sediment; The D1/D2 domain of 26S rRNA gene of all yeast strains have been sequenced and analyzed. The ability of the yeast strains to produce various enzymes was tested by enzyme screening plates. [Results] In total of 201 yeast strains were isolated, these strains were identified as 48 species in 15 genera, including 10 presumed new species or variety; 15.9% showed at least one extracellular enzymatic activity, mainly the lipases and amylases. [Conclusion] The yeast community from Yangzonghai Lake showed high species richness, and anthropogenical influenced is an important factor for the yeast count and distribution, at same time, conductivity and turbidity are also important factors for yeast distribution; Some yeasts produced at least one extracellular enzymatic activity, which suggested that these microorganisms are participating in nature cycle and are metabolically active in the lake.

Keywords: Yongzonghai lake, yeast diversity, environmental factors, extracellular enzymatic

(本文责编:王晋芳)