

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (5):635-642; 4 May 2015  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140465

## 水质净化酵母菌的分离筛选及鉴定

谢凤行, 张峰峰, 周可, 赵玉洁\*, 孙海波, 王云

天津市农业生物技术研究中心, 天津 300384

**摘要:** 【目的】针对目前水产养殖专用优良菌种资源缺乏的现状, 从养殖环境和养殖生物体中分离筛选具有水质净化功能的酵母菌, 并对优良菌株进行鉴定。【方法】在低温和常温条件下从皮皮虾、南美白对虾肠道及养殖池底质活性污泥中分离具有水质净化功能的酵母菌, 在模拟水体中对分离菌株的水质净化能力进行筛选, 并对优良菌株采用形态、生理生化实验及 5.8S rDNA ITS 序列分析进行鉴定。【结果】从 3 种介质中共分离到酵母菌 37 株, 其中常温分离 16 株, 低温分离 21 株。水质净化实验结果表明, 常温分离的 16 株酵母菌中有 5 株, 低温分离的 21 株酵母菌中有 6 株对模拟水体中亚硝态氮和氨氮有显著的去除效果; 其中低温分离的 DN9 和常温分离的 CN6 48h 能将 10.64mg/L 的亚硝态氮彻底转化, 96h 对 630mg/L COD<sub>cr</sub> 的去除率分别达 52% 和 67%。DN9 和 CN6 均产红色色素, 经形态特征、生理生化特性及 5.8S rDNA 基因序列分析, 鉴定菌株 CN6 为沼泽生红冬胞酵母 (*Rhodospiridium paludigenum*), DN9 为胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)。【结论】红酵母 DN9 和 CN6 能有效去除养殖水体中的有机污染物和亚硝态氮, 有望开发成水产养殖水质净化高效微生态制剂。

**关键词:** 酵母菌, 水质净化, 分离筛选, 鉴定

**中图分类号:** X172      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0635-08

酵母菌 (Yeast) 是一类以芽殖或裂殖方式进行无性繁殖的单细胞真菌, 由于菌体蛋白含量高、代谢产物多 (如: 肽、有机酸、寡糖、氨基酸) 等特点, 广泛应用于饲料、酿酒、制药、生物工程等方面<sup>[1]</sup>。酵母菌作为腐生型真菌能利用多种有机物 (简单糖, 有机酸、醇等), 体内含有特殊的氧化分解酶, 具有很强的代谢能力, 同时具有良好的耐酸、耐渗透压等特点, 因此广泛地应用于高浓度有机废水的处理<sup>[2]</sup>, 如可用于橄榄油压榨废水中 COD 和酚类物质的降解<sup>[3]</sup>, 高浓度味精废水处理<sup>[4]</sup>、烟草废水中有机物

的处理<sup>[5]</sup>, 还可用于石油污染的修复<sup>[6-8]</sup>。酵母菌在水产养殖上主要作为饵料添加剂, 生产的饲料酵母还可部分替代鱼粉<sup>[9]</sup>, 不仅能刺激鱼虾体内蛋白酶、淀粉酶等酶类的分泌, 从而提高动物对食物的利用率增加重量; 而且能增强鱼虾对弧菌病菌的抵抗能力, 提高成活率<sup>[10-13]</sup>, 而作为水质净化剂的研究相对较少。本研究以净化水质为筛选目标, 从养殖环境和养殖生物体内选育优良菌株, 并对优良菌株进行鉴定, 以期水产养殖高效微生态制剂的研制和开发提供优良的菌种资源。

**基金项目:** 国家农业科技成果转化项目 (2012GB2A100021); 天津市科技支撑计划重点项目 (11ZCKFNC00500); 天津市农业科技成果转化与推广项目 (201202160)

\* 通信作者。Tel: +86-22-27950956; E-mail: yujiezh@126.com

**作者简介:** 谢凤行 (1979-), 女, 湖南邵阳人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为水产养殖微生物修复技术。E-mail: fengxing\_xie@126.com

**收稿日期:** 2014-09-29; **修回日期:** 2014-12-10

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 培养基:** (1) 富集培养基: 20 g 葡萄糖, 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母膏, 100 mg 青霉素 (筛选过程中排除细菌干扰), 1000 mL 蒸馏水。(2) 分离培养基 (PDA 培养基): 葡萄糖 20 g, 土豆 200g, 琼脂 12g, 蒸馏水 1000 mL。

**1.1.2 材料:** (1) 分离介质: 养殖池底泥、皮皮虾、南美白对虾。(2) 模拟污水: 将 60g 麸皮加水 400mL 高压灭菌后过滤, 取上清稀释至 6L 作为模拟污水<sup>[14]</sup>。

**1.1.3 主要仪器和试剂:** Allegra X-22R 离心机 (Beckman), 灭菌锅 (Sanyo), PCR (MJ Research PTC-100), 电泳仪 (Bio-RAD), 凝胶成像系统 (SIM Bio-Best), 水质快速测定系统 (北京普析通用仪器有限责任公司), UV-2550 紫外可见分光光度计 (岛津), 恒温培养箱、摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司)。尸胺、乳糖、麦芽糖、D-甘露醇、D-木糖、松三糖、棉子糖、放线菌酮 (Sigma), DNA 提取试剂盒 (TaKaRa), *Taq* 酶、dNTP (北京鼎国生物技术有限责任公司), 回收试剂盒 (宝生物 (大连) 有限公司), 酵母膏、蛋白胨 (北京奥博星生物技术有限责任公司), 其它试剂均为国产分析试剂。

## 1.2 常温条件下酵母菌分离纯化

**1.2.1 取样:** 从养殖池中采集 5 cm - 15 cm 池底污泥, 用烧杯带回室内。分别取健康的南美白对虾、皮皮虾在无菌条件下剪下肠道, 将肠道加入少许蒸馏水研磨, 以研磨后的样品为原液。

**1.2.2 富集:** 取 1 g 泥或 1 mL 原液于 50 mL 富集培养基中, 25℃ 振荡培养 2 d。

**1.2.3 分离纯化:** 将富集液梯度稀释至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ , 取 0.1 mL 稀释液于分离培养基中, 涂平板, 25℃ 培养, 观察菌落生长状况, 等菌落长出后, 取平板上单独分布的菌落并标记, 制片在显微镜下观察, 对菌体为酵母菌的菌落进行划线纯化。

## 1.3 低温条件下酵母菌分离纯化

低温条件下酵母菌的富集和分离同常温, 只是将温度设为 15℃, 培养时间适当延长。

## 1.4 模拟污水中酵母菌水质净化能力筛选

**1.4.1 初筛:** 配模拟污水并在水中加入一定的亚

硝态氮, 分装到 150 mL 三角瓶中, 每瓶装 50 mL, 灭菌后每瓶接菌 2 环。常温酵母于 25℃ 处理 4 d, 低温酵母菌在 15℃ 处理 5 d, 处理期间每天早晚晃动三角瓶 2 次。处理完后取水离心, 取上清液测亚硝态氮和氨氮含量。

**1.4.2 复筛:** 将初筛菌株按 3% 的接种量接种到模拟污水中, 于 25℃ 下 150 r/min 振荡处理, 分别在 24 h、48 h 和 72 h 取样测亚硝酸盐含量及  $OD_{600}$  值, 对亚硝态氮转化效率高的菌株于 96h 取样, 测 COD 含量, 以接种灭菌发酵液为对照。

## 1.5 优良酵母菌的形态观察及生理生化实验

实验包括掷孢子、子囊孢子、分裂方式、25℃ 生长、30℃ 生长、37℃ 生长、是否产色素、假菌丝、菌体细胞形状、菌落特征 (PDA)、硝酸盐生长、亚硝酸钠、乙胺、尸胺、类淀粉产生、乳糖、麦芽糖、D-甘露醇、D-木糖、葡萄糖、松三糖、棉子糖、放线菌酮、无生物素。

## 1.6 优良酵母菌分子鉴定

**1.6.1 DNA 模板的提取:** DNA 提取采用 TaKaRa Yeast DNAiso Kit 试剂盒, 提取产物在 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳后, 紫外灯下观察, 若出现目的条带说明提 DNA 成功。

**1.6.2 5.8S rDNA 的 PCR 扩增:** 采用 50 $\mu$ L 反应体系, 用一对与 ITS 序列互补的引物, ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对 5.8S ITS 区段进行扩增。取菌株基因组 DNA 2.5  $\mu$ L, ITS1 2.5  $\mu$ L, ITS4 2.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 14  $\mu$ L, 首先 98℃ 变性 10 min 取出, 冰浴加 10  $\times$  Ex*Taq* buffer 5  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, TaKaRa *rTaq* 酶 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L。反应条件: 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 末端延伸 10 min。PCR 产物保存于 -20℃ 备用。

**1.6.3 5.8S rDNA 的序列测定:** 扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像系统中紫外灯照射下将目的条带迅速切下, 使用宝生物 (大连) 有限公司的 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 PCR 产物回收试剂盒进行回收, 回收产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 5.8S rDNA 的纯化产物, 测序工作由北京三博远志生物技术有限公司完成。

**1.6.4 分类地位分析及系统发育树的构建:** 将测序获得的酵母 5.8S ITS rDNA 序列与 GenBank 核酸

数据库进行 BLAST 分析比对, 用 MEGA ( version 5.2) 构建系统发育树, 用 Neighbor Joining 法对进化树评估, 进行亲缘关系和系统发育分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 分离

从皮皮虾、对虾及养殖池底泥中共分离到酵母菌 37 株, 其中常温分离到 16 株 (泥中 6 株, 编号为 CN1-CN6, 对虾中 5 株, 编号 CD1-CD5, 皮皮虾中 5 株, 编号 CP1-CP5), 低温分离到 21 株酵母菌 (泥中 11 株, 编号为 DN1-DN11, 对虾中 6 株, 编号 DD1-DD6, 皮皮虾中 4 株, 编号 DP1-DP4)。

### 2.2 模拟污水中酵母菌水质净化能力筛选

**2.2.1 常温酵母菌水质净化能力初筛:** 从表 1 可知, 常温分离的酵母菌对亚硝态氮均表现较强的去除能力, 去除率达到 90% 以上, 其中 CN6、CD1、CD4、CD5 和 CP4 能将初始浓度为 11.65 mg/L 的亚硝态氮彻底转化, 且对氨氮表现一定的净化效果, 其它菌株虽然对亚硝态氮的转化效率较高, 但部分菌株氨氮出现了累积, 说明常温分离菌株中的 CN6、CD1、CD4、CD5 和 CP4 的水质净化能力相对较强。

表 1. 常温酵母菌的筛选结果 (25℃)

Table 1. Results of normal temperature yeast screening under 25℃

Strain No.	<i>c</i> (Nitrite-N) / (mg/L)	<i>c</i> (Ammonia-N) / (mg/L)	Nitrite-N removal rate / %	Ammonia-N removal rate / %
CK	11.65	11.14	/	/
CN1	0.70	10.53	94.01	5.41
CN2	0.40	9.55	96.59	14.21
CN3	0.32	10.67	97.24	4.14
CN4	0.66	6.27	94.37	43.72
CN5	0.06	11.30	99.46	-1.44
<b>CN6</b>	<b>0.05</b>	<b>9.82</b>	<b>99.56</b>	<b>11.84</b>
<b>CD1</b>	<b>0.02</b>	<b>8.24</b>	<b>99.79</b>	<b>25.96</b>
CD2	0.82	13.08	92.98	-17.42
CD3	0.63	13.93	94.58	-25.12
<b>CD4</b>	<b>0.04</b>	<b>9.37</b>	<b>99.66</b>	<b>15.90</b>
<b>CD5</b>	<b>0.02</b>	<b>9.37</b>	<b>99.83</b>	<b>15.90</b>
CP1	0.94	11.26	91.96	-1.10
CP2	0.39	10.78	96.68	3.21
CP3	0.92	10.50	92.13	5.67
<b>CP4</b>	<b>0.05</b>	<b>10.18</b>	<b>99.56</b>	<b>8.63</b>
CP5	0.67	11.59	94.24	-4.06

**2.2.2 低温酵母菌水质净化能力初筛:** 从表 2 可知, 低温分离的酵母菌对亚硝态氮的转化能力较强, 去除率达到 97% 以上, 但部分菌株氨氮含量上升, 其中 DN5、DN9、DD4、DD5、DD6 和 DP4 此 6 株酵母菌对亚硝态氮去除率达到 99%, 同时对氨氮去除率超过 40%, 因此, 将初筛 6 株菌用于后续复筛试验。

表 2. 低温酵母菌的筛选结果

Table 2. Results of low temperature yeast screening under 15℃

Strain No.	<i>c</i> (Nitrite-N) / (mg/L)	<i>c</i> (Ammonia-N) / (mg/L)	Nitrite-N removal rate / %	Ammonia-N removal rate / %
CK	11.44	11.16	/	/
DN1	0.06	11.70	99.45	-4.81
DN2	0.04	8.52	99.65	23.70
DN3	0.05	10.44	99.60	6.50
DN4	0.05	8.91	99.59	20.16
<b>DN5</b>	<b>0.06</b>	<b>6.62</b>	<b>99.45</b>	<b>40.66</b>
DN6	0.06	15.42	99.49	-38.13
DN7	0.05	9.09	99.55	18.56
DN8	0.05	9.04	99.53	19.07
<b>DN9</b>	<b>0.10</b>	<b>6.17</b>	<b>99.13</b>	<b>44.71</b>
DN10	0.29	8.55	97.43	23.45
DN11	0.05	7.36	99.57	34.08
DD1	0.04	7.02	99.69	37.12
DD2	0.05	9.45	99.56	15.35
DD3	0.08	9.35	99.33	16.28
<b>DD4</b>	<b>0.06</b>	<b>5.91</b>	<b>99.45</b>	<b>47.07</b>
<b>DD5</b>	<b>0.04</b>	<b>5.32</b>	<b>99.68</b>	<b>52.30</b>
<b>DD6</b>	<b>0.04</b>	<b>6.69</b>	<b>99.66</b>	<b>40.01</b>
DP1	0.28	7.56	97.57	32.31
DP2	0.34	5.64	97.03	49.52
DP3	0.04	8.39	99.64	24.89
<b>DP4</b>	<b>0.04</b>	<b>6.45</b>	<b>99.69</b>	<b>42.26</b>

**2.2.3 酵母菌水质净化能力复筛:** 由于筛选酵母菌对氨氮的去除效果均不太理想, 复筛主要比较菌株的生长繁殖速率与亚硝态氮的转化速率之间的关系及对 COD 的降解效果。从表 3 可知, 随着时间的推移菌液的  $OD_{600}$  值逐渐升高, 48 h 后 CN6 和 DN9 的  $OD_{600}$  达到 1.0 以上, 72 h  $OD_{600}$  达到 1.0 以上有 4 株菌, 分别为 CN6、CD4、CP4 和 DN9, 其余菌株  $OD_{600}$  值低于 1.0, 而对照  $OD_{600}$  值基本不变。

菌株对亚硝态氮转化速率比较发现, 24 h 仅菌株 CN6 对 10.64 mg/L 亚硝态氮转化率达到

50% 以上,48 h 对亚硝态氮转化率达到 90% 以上的有 4 株,分别为 CN6、CD4、CP4 和 DN9,转化速率均超过 0.20 mg/(L·h),说明此 4 株菌不仅对亚硝态氮的转化率高且转化速率快,其菌液  $OD_{600}$  相

应也较高,说明菌株对亚硝态氮的转化与菌体细胞的生长繁殖呈正相关。其他菌株转化率低于初筛结果,可能是初筛为 96h 测定的结果,本试验最终取样点是 72 h。

表 3. 酵母菌的 OD 值及对亚硝态氮转化速率比较

Table 3. The difference of OD and Nitrite-N removal speed for yeast

Strain No.	24 h		48 h		72 h	
	$OD_{600}$	Removal rate / %	$OD_{600}$	Removal rate / %	$OD_{600}$	Removal rate / %
CK	0.12	-0.08	0.14	3.42	0.17	5.12
<b>CN6</b>	0.90	51.33	1.06	<b>99.32</b>	1.14	99.55
CD1	0.23	9.02	0.27	6.67	0.49	17.11
<b>CD4</b>	0.51	24.35	0.74	<b>93.19</b>	1.41	99.49
CD5	0.37	13.61	0.48	12.81	0.59	17.01
CP4	0.68	24.05	0.98	99.39	1.16	99.50
DN5	0.36	14.97	0.83	57.44	0.92	61.46
<b>DN9</b>	0.74	24.05	1.05	<b>99.39</b>	1.23	99.50
DP4	0.17	2.72	0.28	5.02	0.30	8.52
DD4	0.19	5.12	0.65	33.33	0.68	36.75
DD5	0.16	1.82	0.23	37.20	0.74	46.33
DD6	0.19	0.32	0.36	39.83	0.68	45.30

从图 1 可知,所有处理 COD 含量都显著低于对照,说明实验菌株对有机质都有一定的降解效果,其中 CN6 和 DN9 的 COD 含量相对较低,分别为 205 和 291 mg/L,不到对照 630 mg/L 的 1/3,说明 CN6 和 DN9 对有机质的分解能力强。

综合衡量各指标发现 DN9 和 CN6 在 48 h 能将 10.64 mg/L 的亚硝态氮彻底转化,96h 对 630 mg/L COD 的去除率分别达 52% 和 67%。说明 CN6 和 DN9 的水质的净化效果较好,对此两个分离株进行鉴定。

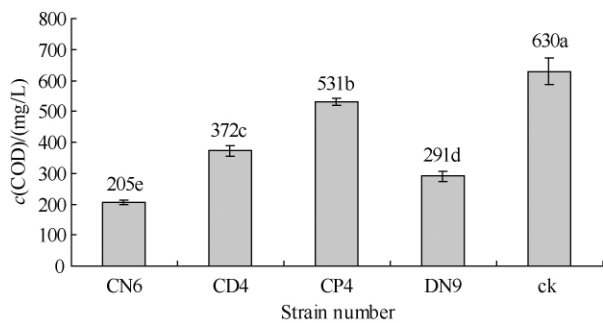


图 1. 各处理 COD 含量

Figure 1. The COD concentrations of different treats

## 2.3 菌株的鉴定

**2.3.1 形态及生理生化实验鉴定结果:** 从表 4、表 5 结果综合分析,参照《酵母菌的特征与鉴定手册》

中六、检索表(九)产粉红色菌落的酵母菌检索表(包括生理学试验和形态学描述)364-366 页描述,检索出 CN6 为沼泽生红冬胞酵母 *Rhodosporidium paludigenum*, DN9 为胶红酵母 *Rhodotorula mucilaginosa*。

**2.3.2 分子鉴定结果:** PCR 扩增后进行电泳发现, CN6 和 DN9 在 500-750 bp 之间有一条清晰条带,说明 DNA 提取及 PCR 扩增都比较成功,PCR 产物可用测序。测序结果表明:CN6 和 DN9 的 5.8S ITS rDNA 序列大小分别为 580 bp、591 bp,序列与 GenBank 数据库中已收录的酵母菌的 5.8SrDNA 进行 Blast 分析,利用 MEGA 软件对菌株 CN6、DN9 和模式菌株进行系统发育树的构建。NCBI 数据库 blast 搜索结果表明, CN6 为 *Rhodosporidium paludigenum*, DN9 为 *Rhodotorula mucilaginosa*,然后将得到的序列采用 MEGA5.2 建立系统发育树,从图 2 可知,菌株 DN9 与模式菌株 KDLYC24-1 (GenBank: HQ909092.1) 同处一个分支中,相似度为 100%,说明 DN9 为 *Rhodotorula mucilaginosa*,菌株 CN6 与模式菌株 AUMC7789 (GenBank: JQ425395.1) 同处一个分支中,相似度为 96%,说明 CN6 为 *Rhodosporidium paludigenum*,与 blast 数据结果一致。

表 4. 形态与生理生化特征

Table 4. Morphological and physio-biochemical characteristics

Strain	Ballistospore	Ascospore	Division method	25°C grow	30°C grow	37°C grow	Pigment	Pseudo-hypha	Cell morphology	Colony characteristics (PDA)
CN6	-	-	Budding	+	+	-	Pink	-	Long oval	Smooth, middle spherical protrusions, opacity
DN9	-	-	Division	+	++	-	Red	-	Oval	Smooth, circle, regular edge, opacity

—: no growth, +: grow, ++: grow well.

表 5. 碳、氮源同化实验

Table 5. Carbon and nitrogen source assimilation test

Strain	Nitrate	Nitrite	Ethylamine	Cadaverine	Amyloid generation	Lactin	Malt sugar	D-mannitol	D-xylose	Melezitose	Raffinose	Actidione	Biotin
CN6	+	+	+	W	—	—	+	+	+	—	+	+	+
DN9	—	—	+	V	—	—	+	V	+	+	+	—	+

+: positive, —: negative, W: weak positive, V: variable reaction.

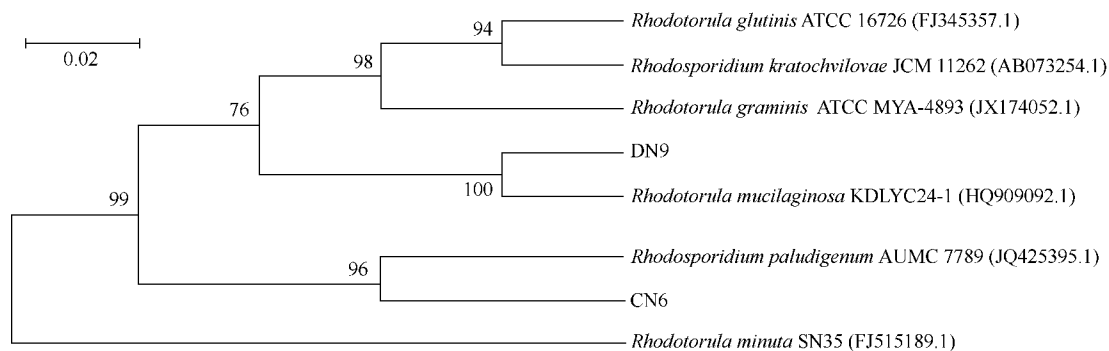


图 2. 基于 DN9 和 CN6 的 5.8S rDNA 的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree drawn based on 5.8S rDNA of DN9 and CN6. Number in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank, the number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.02 sequence divergence.

### 3 讨论

在现代化的高密度养殖模式中, 由于残饵、粪便和生物残体大量沉积腐烂, 导致有害藻类和病菌的大量繁殖, 水质恶化, 而抗生素和化学药品的滥用带来了药物在鱼虾体内大量富集残留和病原菌的抗药性等问题<sup>[13]</sup> 导致水产品质量的下降, 既危害了人类健康, 也污染了环境<sup>[15]</sup>。因此, 如何控制养殖污染已成为养殖成败的关键因素之一, 目前也开发出系

列微生态制剂用于净化养殖环境, 主要菌种有光合细菌、芽胞杆菌、(反)硝化细菌、酵母菌等。光合细菌可有效去除水体中小分子有机物、氨氮及硫化氢含量, 但光合细菌生长周期长, 起效慢, 一般在 96h 以后发挥净水作用<sup>[16]</sup>; 芽胞杆菌对水体中的亚硝态氮及 COD 有很强的去除效果<sup>[17]</sup>; (反)硝化细菌主要用于水体脱氮, 对有机质去除效果不明显<sup>[18]</sup>。酵母菌相对于上述 3 种细菌具有以下优势, 一是菌体细胞蛋白质的含量高, 占细胞干重的 30% - 50%, 含有鱼类、甲壳类必需氨基酸、脂肪酸、还富含多种

维生素、矿物质、各种消化酶和生物活性物质,能促进各种饵料的消化吸收,可作为水产动物饵料添加剂;二是酵母菌作为单细胞真菌,细胞大、生长快、代谢旺盛,施于水体容易形成优势菌群,快速发挥作用;三是作为水产养殖水质净化剂具有脱氮(李静等在培养基上研究了粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) CICC3122的好氧反硝化特性,发现在pH值4.0,温度30℃,转速200 r/min;以柠檬酸钠为碳源,碳氮比为360:1条件下,对初始浓度为40mg/L在亚硝酸钠去除率可达99.26%)<sup>[19]</sup>和降解有机污染物的能力(戴顺珍等研究发现圆丘假丝酵母(*Candida. colliculosa*) DY11-1处理9d后对饲料浸出液中27.60 mg/mL COD、12.22 mg/mL总氮、2.67 mg/mL总磷的降解率分别为43.0%、37.8%和47.5%)<sup>[20]</sup>。

菌株CICC3122虽然菌株去除亚硝酸盐的能力较强,但试验条件比较苛刻,实用性不是很强;菌株DY11-1脱氮和降解COD的效率都不是很高。本研究选育的红酵母菌DN9和CN6不仅对模拟水体中的亚硝态氮的去除效率高,25℃处理48h,基本能将初始浓度为10.64mg/L的亚硝态氮彻底转化,同时对COD的降解能力强,96h对630mg/LCOD降解率达到52%和67%。这说明选育的酵母菌DN9和CN6可用于亚硝态氮和有机质含量高的养殖水体修复,且菌株产红色色素,菌体蛋白含量高有望开发成饵料添加和水质净化兼用微生态制剂。

## 参考文献

- [1] Lv A, Gu D, Hu X, Qi B, Liang S. Identification and phylogenetic analysis of a yeast strain from the intestinal tract of zebrafish *Danio rerio*. *Mycosystema*, 2011, 30 (3):421-425. (in Chinese)
- 吕爱军, 顾丹, 胡秀彩, 戚冰洁, 梁爽. 斑马鱼肠道中一株酵母菌菌株的鉴定与系统发育分析. 菌物学报, 2011, 30 (3):421-425.
- [2] Cao W, Wu X, Guo Y, Zhu W. Application and progress on treatment of wastewater using yeasts. *China Biotechnology*, 2007, 27 (11): 99-104. (in Chinese)
- 曹文平, 吴晓刚, 郭一飞, 朱伟萍. 酵母菌在废水处理中的应用现状和进展. 中国生物工程杂志, 2007, 27 (11): 99-104.
- [3] Raja J, Salwa M, Raja J A, Ali G, Néji G, Emna A. *Aspergillus niger* P6 and *Rhodotorula mucilaginosa* CH4 used for olive mill wastewater (OMW) biological treatment in single pure and successive cultures. *Environmental Technology*, 2013, 34 (5):629-636.
- [4] Raja J, Houda B, Fatma F, Ali G, Néji G, Emna A. Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environmental Technology*, 2012, 33 (8):951-960.
- [5] Xi Y, Ji Y, Li M, Cao R, Wang Y, Zhu D. On screening, identification and fermentation characteristics of a rhodotorula strain using tobacco wastewater as substrate. *Journal of Zhengzhou University (Natural Science Edition)*, 2012, 44 (3):101-105. (in Chinese)
- 席宇, 吉彦龙, 李敏睿, 曹瑞丽, 王燕燕, 朱大恒. 一株利用烟草废水红酵母的筛选鉴定及发酵性能研究. 郑州大学学报(理学版), 2012, 44 (3):101-105.
- [6] Satpute SK, Banat IM, Dhakephalkar PK, Banpurkar AG, Chopade BA. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marinemicroorganism. *Biotechnology Advances*, 2010, 28 (4): 436-450.
- [7] Sood N, Lal B. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. *Journal of Environment Management*, 2009, 90 (5):1728-1736.
- [8] Liu J, Ma C, Wang C, Zhou T. Isolation and identification of marine petroleum-degrading yeast and their biodegradation characteristics. *Research of Environmental Sciences*, 2013, 26 (8): 899-906. (in Chinese)
- 刘杰凤, 马超, 刘正辉, 王春, 周天. 海洋石油降解酵母的分离鉴定与降解特性. 环境科学研究, 2013, 26 (8):899-906.
- [9] Cui M, Guo R, Xia H. Effects of replacement of fish meal by feed yeast on growth performance and immunity in turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27 (1):58-63. (in Chinese)
- 崔敏, 郭冉, 夏辉. 用饲料酵母替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长及免疫机能的影响. 大连海洋大学学报, 2012, 27 (1):58-63.
- [10] Zhang Q, Mai K, Zhang W, Ma H, Ai Q, Xu W, Liu F. Effects of dietary selenoyeast and vitamin E on growth and

- immunity and disease resistance of sea cucumbers (*Apostichopus Japonicus Selenka*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23 (10): 1745-1755. (in Chinese)
- 张琴, 麦康森, 张文兵, 马洪明, 艾庆辉, 徐伟, 刘付志国. 饲料中添加硒酵母和维生素 E 对刺参生长、免疫力及抗病力的影响. *动物营养学报*, 2011, 23 (10): 1745-1755.
- [11] Su X, Li X, Leng X, Tan C, Liu B, Chai X. Effects of yeast culture and *Bacillus* on growth, protease activity and immunity of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Fisheries*, 2012, 34 (2): 168-176. (in Chinese)
- 粟雄高, 李小勤, 冷向军, 谭崇桂, 刘波, 柴仙琦. 酵母培养物和芽胞杆菌对凡纳滨对虾生长、蛋白酶活性和免疫性能的影响. *海洋渔业*, 2012, 34 (2): 168-176.
- [12] Deng D, Mei C, Mai K, Tan B, Ai Q, Ma H. Effects of a yeast-based additive on growth and immune responses of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), and aquaculture environment. *Aquaculture Research*, 2013, 44 (9): 1348-1357.
- [13] Hai NV, Fotedar R. A review of probiotics in shrimp aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 2010, 22: 251-266.
- [14] Hu Y, Ge X, Liang Y. Water purification functions of the strain *Bacillus subtilis* FY99-01. *Journal of Huazhong Agricultural University*. 2006, 25 (4): 404-407. (in Chinese)
- 胡咏梅, 葛向阳, 梁运祥. 枯草芽胞杆菌 FY99-01 菌株的净水作用. *华中农业大学学报*, 2006, 25 (4): 404-407.
- [15] Sugiura SH, Marchant DD, Kelsey K, Thomas W, Ronaldo PF. Effluent profile of commercially used low-phosphorus fish feeds. *Environmenta Pollution*, 2006, 140 (2): 95-101.
- [16] Liu Y, Shu Q, Lou C, Wu X, Han Z, Ye J. Selection and identification of two photosynthetic bacteria strains and their purification effect for aquaculture wastewater. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43 (5): 57-61. (in Chinese)
- 刘洋, 舒巧玉, 楼春燕, 吴湘, 韩志萍, 叶金云. 两株光合细菌的分离鉴定及其水质净化效果研究. *淡水渔业*, 2013, 43 (5): 57-61.
- [17] Xie F, Zhang F, Zhou K, Zhao Y. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain and its potential application in water purification. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32 (11): 1-8. (in Chinese)
- 谢凤行, 张峰峰, 周可, 赵玉洁. 一株解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及水质净化效果的研究. *环境科学学报*, 2012, 32 (11): 1-8.
- [18] Zhang F, Xie F, Zhao Y, Zhou K, Li Y. Identification and denitrification efficiency of a denitrifying bacteria. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2013, 7 (11): 4415-4419. (in Chinese)
- 张峰峰, 谢凤行, 赵玉洁, 周可, 李亚玲. 一株反硝化细菌的分离鉴定及脱氮能力. *环境工程学报*, 2013, 7 (11): 4415-4419.
- [19] Li J, Deng M, Gu Z, Wang Y, Liao F. Study on characteristics of aerobic denitrifying of *Rhodotorula glutinis*. *Guangdong Agriculture Science*, 2012, 13: 180-182. (in Chinese)
- 李静, 邓毛程, 顾宗珠, 王瑶, 廖帆. 粘红酵母好氧反硝化特性研究. *广东农业科学*, 2012, 13: 180-182.
- [20] Dai S, Xia J, Xu Z, Lin X. Studies on activities of extracellular enzymes of four yeasts and their degradation of organic pollutants from aquaculture. *Ecological Science*, 2013, 32 (1): 022-026. (in Chinese)
- 戴顺珍, 夏新建, 许忠能, 林小涛. 4 株海洋酵母菌胞外酶活力及其对水产养殖有机污染物的降解. *生态科学*, 2013, 32 (1): 022-026.

# Isolation, screening and identification of yeast for aquaculture water purification

Fengxing Xie, Fengfeng Zhang, Ke Zhou, Yujie Zhao<sup>\*</sup>, Haibo Sun, Yun wang  
Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300384, China

**Abstract:** [Objective] In order to get excellent yeast strains for aquaculture water purification, we isolated, screened and identified yeasts from the aquacultural environment and intestinal tract of shrimp. [Methods] The potential water purification ability of yeasts, isolated from the activated sludge of aquacultural environment and intestinal tract of white shrimp and mantis shrimp under normal and low temperature, was evaluated in the simulated wastewater. Morphological physio-biochemical characteristics, 5.8S rDNA ITS gene sequence analysis were used to identify the strains. [Results] Thirty-seven yeast strains were isolated from 3 samples, among them 16 strains were isolated under normal temperature (25°C) while 21 strains were isolated under low temperature (15°C). Water purification test suggested 5 strains isolated under 25°C and 6 strains isolated under 15°C had higher removal ability of nitrite and ammonia from water. After 48 hours treatment with DN9 and CN6, 10.64 mg/L nitrite in the water was completely removed. After 96 hours treatment, COD<sub>cr</sub> degradation rates of the 2 strains were 52% and 67%, respectively. According to morphological, physio-biochemical characteristics and 5.8S rDNA ITS gene sequence analysis, the strain DN9 was identified as *Rhodotorula mucilaginosa* and CN6 as *Rhodospiridium paludigenum*. [Conclusion] Strains DN9 and CN6 would be promising for water purification in aquaculture.

**Keywords:** yeast, water purification, isolation and screening, identification

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the Agriculture Science Technology Achievement Transformation Fund (2012GB2A100021), by the Major Projects in Science and Technology Support Program of Tianjin of China (11ZCKFNC00500) and by the Tianjin Transformation Fund for Agricultural Science and Technology Achievements (201202160)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-22-27950956; E-mail: yujiezh@126.com

Received: 29 September 2014 / Revised: 10 October 2014