

## 研究报告



## 云南星云湖酵母菌多样性及产类胡萝卜素的评价

李治滢<sup>Δ1</sup> 樊竹青<sup>Δ2</sup> 董明华<sup>3</sup> 谭金连<sup>1</sup> 周斌<sup>1</sup> 杨丽源<sup>1</sup> 李绍兰<sup>\*1</sup>

1 云南大学云南省微生物研究所 云南 昆明 650091

2 普洱学院 云南 普洱 665000

3 昆明学院化学科学与技术系 云南 昆明 650214

**摘要:**【背景】星云湖属云南高原湖泊,对其酵母菌的多样性研究和产类胡萝卜素菌株的筛选有助于开发利用星云湖酵母菌资源。【目的】研究云南星云湖酵母菌群落结构多样性,筛选和评价产类胡萝卜素活性菌株。【方法】采用膜过滤平置培养对星云湖水样进行酵母菌分离;应用 26S rRNA D1/D2 区域序列分析和形态特征及生理生化指标相结合,对分离获得的酵母菌进行鉴定;运用软件 BIO-DAP 分析酵母菌类群的多样性;采用酸热法提取类胡萝卜素,紫外分光光度计测定类胡萝卜素含量。【结果】从星云湖湖水中分离得到 797 株酵母菌,鉴定为 18 个属 37 个种。胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和 *Naganishia albida* 是优势种,分别占总菌株数的 36.64% 和 28.86%;有 28 株酵母菌类胡萝卜素产量可达 200 μg/g 细胞干重以上;有 4 株类胡萝卜素产量可达 300 μg/g 细胞干重以上;粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) 2 株、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和 *Rhodosporidiobolus fluviale* 各 1 株。【结论】云南高原湖泊星云湖的酵母菌具有丰富的多样性,湖泊的营养化程度以及地理差异影响酵母菌群落的结构;红冬孢酵母属(*Rhodosporidiobolus*)和红酵母属(*Rhodotorula*)是星云湖类胡萝卜素产量可达 300 μg/g 细胞干重以上的主要类群。有进一步开发研究的价值。

**关键词:** 星云湖, 酵母菌, 多样性, 类胡萝卜素

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31160006); Sciences and Technology Condition Platform Construction Program of Yunnan Province (2009DA002); National Microbiology Resource Platform Special Service Program for Microbiology Teaching Experiment (NIMR-2014-8); Applied Basic Research Project of Yunnan (2017FH001-111)

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

**\*Corresponding author:** Tel: 86-871-65033540; E-mail: shlli@ynu.edu.cn

**Received:** 22-06-2018; **Accepted:** 11-10-2018; **Published online:** 13-11-2018

**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); 国家微生物资源平台专项-面向微生物教学实验的专题服务项目(NIMR-2014-8); 云南省应用基础研究计划项目(2017FH001-111)

<sup>Δ</sup>对本文贡献相同

**\*通信作者:** Tel: 0871-65033540; E-mail: shlli@ynu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-06-22; **接受日期:** 2018-10-11; **网络首发日期:** 2018-11-13

## Diversity and evaluation of carotenoids-producing of yeasts isolated from Xingyun Lake

LI Zhi-Ying<sup>Δ1</sup> FAN Zhu-Qing<sup>Δ2</sup> DONG Ming-Hua<sup>3</sup> TAN Jin-Lian<sup>1</sup> ZHOU Bin<sup>1</sup>  
YANG Li-Yuan<sup>1</sup> LI Shao-Lan<sup>\*1</sup>

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

2 Puer University, Puer, Yunnan 665000, China

3 Department of Chemical Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214, China

**Abstract:** [Background] Xingyun Lake is one of plateau lakes of Yunnan. The study of its diversity of yeasts and the screening of carotenoids-producing strains contribute to the development and utilization of the yeast resources of Xingyun Lake. [Objective] To study the diversity of community structure of yeasts in Xingyun Lake, and to screen the carotenoids-producing strains. [Methods] Yeast separation was carried to on the water samples of Xingyun Lake by membrane filtration flat culture. Identification was based on sequence analysis of D1/D2 domains of 26S rRNA gene, and to combine with morphological characteristics and physiological and biochemical indicators, and the diversity of yeast was analyzed by software BIO-DAP. The carotenoids were extracted by acid-heating method, and the content of carotenoids were determined by ultraviolet spectrophotometer. [Results] A total of 797 strains were isolated from the water samples of Xingyun Lake, and identified as 18 genera and 37 species. The *Rhodotorula mucilaginosa* and *Naganishia albida* are the dominant species, accounting for 36.64% and 28.86% of the total strains, respectively. There were 28 strains of yeast carotenoids with a yield of more than 200 μg/g cell dry weight, and 4 strains of carotenoids-producing were up to 300 μg/g cell dry weight: *Rhodotorula glutinis* (2 strains), *Rhodotorula mucilaginosa* (1 strain) and *Rhodospiridiobolus fluviale* (1 strain). [Conclusion] The yeasts of Xingyun Lake are rich in diversity, and the degree of lake nutrition and geographical difference affect the structure of yeast community. In Xingyun Lake, *Rhodospiridiobolus* and *Rhodotorula* are the major groups of carotenoids-producing, and carotenoids-producing were up to 300 μg/g of cell dry weight. It has the value of further development research.

**Keywords:** Xingyun Lake, Yeast, Diversity, Carotenoids

星云湖是云南九大高原湖泊之一, 位于滇中腹地, 北距昆明约 80 km, 向西距玉溪 20 km, 属于珠江流域南盘江水系的源头湖泊, 为半封闭高原断陷型浅水湖。地理位置为东经 102°45′–102°48′, 北纬 24°17′–24°23′; 径流面积 378 km<sup>2</sup>, 湖面高程 1 722 m, 水域面积 34.17 km<sup>2</sup>, 平均水深 7 m, 水容量 1.833 亿 m<sup>3</sup>。平均气温 15.6 °C, 流域内风向多为西南风<sup>[1-2]</sup>。星云湖的水质仅为 IV–劣 V 类, 湖泊富营养化严重, 达到中度富营养型, 湖泊功能衰退老化过程加速。星云湖主要的入湖河流有东西大河、螺蛳铺河等 14 条季节性河流, 河流及湖泊积水主要靠降水补给<sup>[1]</sup>。2007 年前, 湖水由隔河经抚仙湖流入南盘江; 2007 年以后, 随着星云湖–抚仙湖出流改道工程的竣工, 星云湖湖水改迁流向, 抚

仙湖湖水倒灌流入星云湖<sup>[2]</sup>。星云湖与抚仙湖两湖相连, 构成一个相连湖泊的微生态系统, 这在云南九大高原湖泊中具有唯一性。

湖泊中酵母菌多样性丰富, 包含酵母菌在内的微生物在水生生态系统的物质循环和能量流动中起着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。近年来对云南程海、阳宗海、杞麓湖和抚仙湖的酵母菌多样性研究<sup>[5-9]</sup>中也发现高原湖泊的酵母菌多样性丰富, 存在与海洋酵母相同的种群<sup>[10]</sup>, 并有大量的产胞外酶活性菌株及产抗氧化物质(类胡萝卜素)的菌株<sup>[5-6,9,11]</sup>。类胡萝卜素对酵母菌在高原湖泊的生存起着光保护物质的作用<sup>[12]</sup>, 它是脂溶性四萜型分子, 由于存在几个共轭双键, 呈现红色至黄色。类胡萝卜素包括番茄红素、β-胡萝卜素和虾青素等, 因其具有保

健功能,被认为是最具潜力的天然色素类食品添加剂之一,类胡萝卜素广泛用于食品、化妆品、水产养殖业。

在这项研究中,我们调查了星云湖酵母菌的多样性,对产类胡萝卜素的活性菌株进行了筛选,比较分析该区域酵母菌的群落特征及其应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

样品采集于2013年8月30日,在星云湖选取了10个采样点采集水样(图1)。水样采样深度为30 cm–50 cm,每个样点采2份水样,每份水样采集1.5 L,装在无菌的收集瓶里避光保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

2×Power Taq PCR Master Mix, 昆明硕阳科技有限公司;引物 NL1 和 NL4 由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR 扩增仪, MJ Research 公司;电

泳仪, Bio-Rad 公司;紫外可见分光光度计, 北京普析通用有限公司;旋转摇瓶机, 乐山长征制药机械有限责任公司。

#### 1.1.3 培养基

(1) 酵母菌分离培养基。酸化 YM 培养基、RBCH 培养基和 PDA 培养基参考文献[7]稍作改动配制,将青霉素 80 U/mL 改成氯霉素 1 g/L,所有培养基都用星云湖的湖水配制。 $1\times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

(2) 类胡萝卜素发酵筛选培养基。培养基配方和制作方法参考文献[11]进行。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酵母菌分离和计数

采用孔径大小为 0.45  $\mu\text{m}$  和直径 47 mm 的醋酸纤维素滤膜过滤湖水,之后将滤膜平放在培养基上培养,进行酵母菌的分离。分离方法参考文献[7]稍作改动。每个样点过滤水样 1.5 L。在  $20\pm 2$  °C 下培养 3–7 d,计数和挑取单菌落到斜面培养基;划线纯化后冷冻干燥和甘油管保藏备用。

#### 1.2.2 酵母菌的鉴定

(1) 形态和生理生化指标。形态和生理生化测试主要参考文献[13]进行。形态主要包括菌落颜色、形状、质地、细胞形状和大小等;生理生化测试主要包括无维生素生长、类似淀粉化合物形成、葡萄糖发酵、尿素分解、高渗葡萄糖生长和 DBB (Diazonium Blue B) 实验。

(2) DNA 的提取和 PCR 扩增。对所有分离得到的 797 株酵母菌,全部进行 DNA 提取和 26S rRNA D1/D2 区域序列的扩增,然后送检测序。DNA 的提取参考文献[14]方法进行。PCR 扩增和测序参考文献[15]的方法并稍作改动。引物采用 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 2×Power Taq PCR Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , 引物(10 pmol/L)各 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝

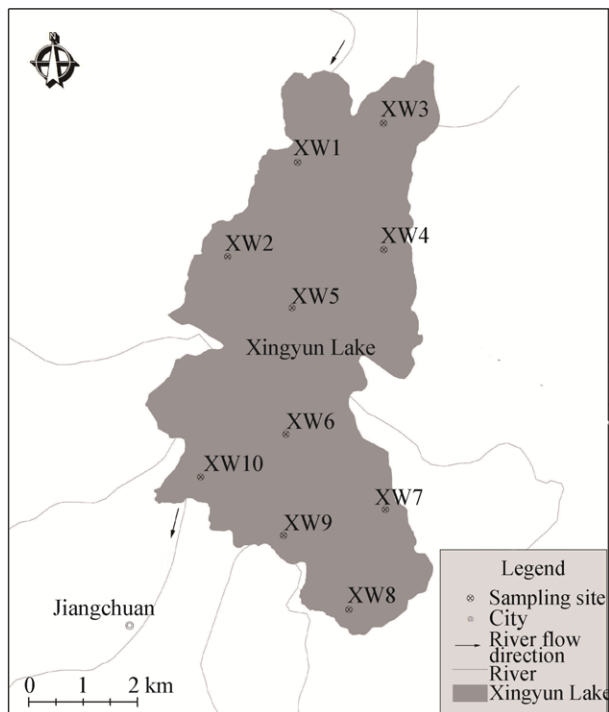


图1 星云湖采样位点分布图

Figure 1 Distribution of sample sites in Xingyun Lake

胶电泳检测扩增目标产物后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

(3) 序列分析和鉴定。对酵母菌的 26S rRNA D1/D2 序列进行分析<sup>[16]</sup>, 采用 DNASTar 软件对序列进行人工校对, 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLAST search), 选取与菌株亲缘关系较近的模式菌株, 应用 Clustal X 进行序列比对, 用 MEGA 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树进行系统进化分析<sup>[17-19]</sup>。结合文献[20-21], 对酵母菌进行鉴定。GenBank 登录号为 KY463369–KY463428。

### 1.2.3 产类胡萝卜素菌株的筛选

(1) 发酵培养。发酵培养条件和方法参照文献[11]进行。

(2) 实验菌株产类胡萝卜素的筛选。从星云湖分离的酵母菌中选择所有的红色酵母, 以及不同样区、不同种群的 263 株酵母菌进行类胡萝卜素的筛选, 参照文献[11]进行类胡萝卜素含量的测定。

### 1.2.4 数据处理

采用出现频率(*OF*)比较酵母菌在各样点分布,  $OF = \text{酵母菌种群出现的样点数} / \text{总样点数} \times 100$ ; 分离频率(*IF*)比较判断酵母菌的优势类群,  $IF = \text{某一酵母菌种群的菌株获得数} / \text{分离到的总酵母菌的菌株数} \times 100$ ; 应用 BIO-DAP 软件计算各样点酵母菌 Shannon-Wiener 多样性指数(*H'*)和 Simpson 多样性指数(*D*)分析各样点酵母菌的多样性<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 星云湖酵母菌多样性

#### 2.1.1 星云湖湖水中酵母菌的种群结构

从星云湖 10 个湖水样点中共分离获得 797 株酵母菌, 采用酵母菌经典分类法, 结合 26S rRNA D1/D2 区域序列分析将分离获得的酵母菌进行分类鉴定为 18 个属 37 个种(表 1); 对 37 个种的代表菌株与相应模式菌株的 26S rRNA D1/D2 进行比较构建系统进化树(图 2); 从表 1 和图 2 可以发现, 星云

湖酵母菌分布在子囊菌酵母、担子菌酵母和类酵母中。其中子囊菌酵母有 8 个属 19 个种共 138 株(占总酵母数的 17.31%): 假丝酵母属(*Candida*) 7 个种, 毕赤酵母属(*Pichia*) 4 个种, *Meyerozyma* 和 *Diutina* 各 2 个种, 威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、半乳糖属(*Galactomyces*)和有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)分别为 1 个种。子囊菌酵母中的优势种为 *Wickerhamomyces anomalus*, 占子囊菌酵母的 37.68%, 其次为库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)和西方毕赤酵母(*Pichia occidentalis*), 分别占子囊菌酵母的 14.49%和 13.77%。

担子菌酵母共得到 651 株, 占总数的 81.68%, 是星云湖的主要酵母菌类群。担子菌酵母归属 9 个属 17 个种: 红酵母属(*Rhodotorula*) 3 个种共 303 株占总分离菌株数的 38.02%, 占担子菌酵母的 46.54%, 为星云湖的主要优势属; *Naganishia* 2 个种共 239 株(占总分离菌株数的 29.99%和担子菌酵母的 36.713%); *Filobasidium* 3 个种共 79 株(分别占总菌株数和担子菌酵母的 9.91%、12.14%); 红冬孢酵母属(*Rhodosporiobolus*) 3 个种共 8 株, *Papiliotrema* 2 个种共 13 株, *Cystobasidium*、*Moesziomyces*、*Sampaiozyma* 和 *Vishniacozyma* 均只有 1 个种, 分别有 4 株、1 株、1 株和 3 株。

类酵母中只有出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) 1 个种共 8 株, 占总菌株数的 1.00%。

在分离到的菌株中担子菌酵母出现频率较高的 5 个种是 *Naganishia albida* (100%)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*) (100%)、*Filobasidium floriforme* (80%)、*Filobasidium uniguttulatum* (80%)和 *Papiliotrema flavescens* (60%); 子囊菌酵母有 2 个种为 *Wickerhamomyces anomalus* (90%)和库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) (70%); 出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) (60%)。分离频率较高的是胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*), 共分离到 292 株, 为 36.64%; 其次是 *Naganishia albida* 230 株 (28.86%); *Wickerhamomyces anomalus*、*Filobasidium*

表 1 星云湖各样点酵母菌种群的分布

Table 1 The distribution of yeast species at sample-sites in Xingyun Lake

Species	XW1	XW2	XW3	XW4	XW5	XW6	XW7	XW8	XW9	XW10	OF (%)	IF (%)
Ascomycetes												
<i>Candida mengyuniae</i>										5	10	0.63
<i>Candida parapsilosis</i>										5	10	0.63
<i>Candida quercitrusa</i>			1								10	0.13
<i>Candida railenensis</i>			1								10	0.13
<i>Candida sorboxylosa</i>										1	10	0.13
<i>Candida saopaulonensis</i>						1					10	0.13
<i>Candida tropicalis</i>	5									1	20	0.75
<i>Debaryomyces hansenii</i>			1	2							20	0.38
<i>Diutina catenulata</i>	1									6	20	0.89
<i>Diutina rugosa</i>			1								10	0.13
<i>Galactomyces candidum</i>			2		1						20	0.38
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1										10	0.13
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>						1				3	20	0.50
<i>Meyerozyma caribbica</i>										3	10	0.38
<i>Pichia fermentans</i>	1										10	0.13
<i>Pichia kluyveri</i>	1		3								20	0.50
<i>Pichia kudriavzevii</i>	6	2	2	2	3		1			4	70	2.51
<i>Pichia occidentalis</i>	4		3						1	11	40	2.38
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9	7	10		2	3	2	2	14	3	90	6.52
Basidiomycetes												
<i>Cystobasidium slooffiae</i>						3		1			20	0.50
<i>Filobasidium chernovii</i>			2								10	0.25
<i>Filobasidium floriforme</i>		6	2	3	3		10	11	7	1	80	5.40
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>		7		4	6	1	4	5	3	4	80	4.27
<i>Naganishia albida</i>	4	32	4	26	22	19	28	43	38	14	100	28.86
<i>Naganishia liquefaciens</i>				6		2				1	30	1.13
<i>Papiliotrema flavescens</i>		1	3	1	1				4	2	60	1.51
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>									1		10	0.13
<i>Moesziomyces aphidis</i>	1										10	0.13
<i>Rhodospordiobolus fluvialis</i>									1		10	0.13
<i>Rhodospordiobolus nylandii</i>	5										10	0.63
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>									2		10	0.25
<i>Rhodotorula glutinis</i>			4	2					4		30	1.26
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>				1							10	0.13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	31	21	49	49	8	45	37	18	30	100	36.64
<i>Sampaiozyma vanillica</i>									1		10	0.13
<i>Vishniacozyma foliicola</i>										3	1	0.38
Yeast-like organism												
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	2	1	1			1	2			60	1.00
Specie richness	13	8	16	11	8	8	7	7	12	17		
Yeast counts(CFU/L)	425	1 675	2 550	1 050	1 525	400	925	775	2 900	750		
Shannon index ( $H'$ )	2.29	1.54	2.25	1.49	1.28	1.52	1.27	1.32	1.81	2.33		
Simpson index ( $D$ )	0.099	0.266	0.153	0.328	0.382	0.293	0.347	0.324	0.225	0.138		

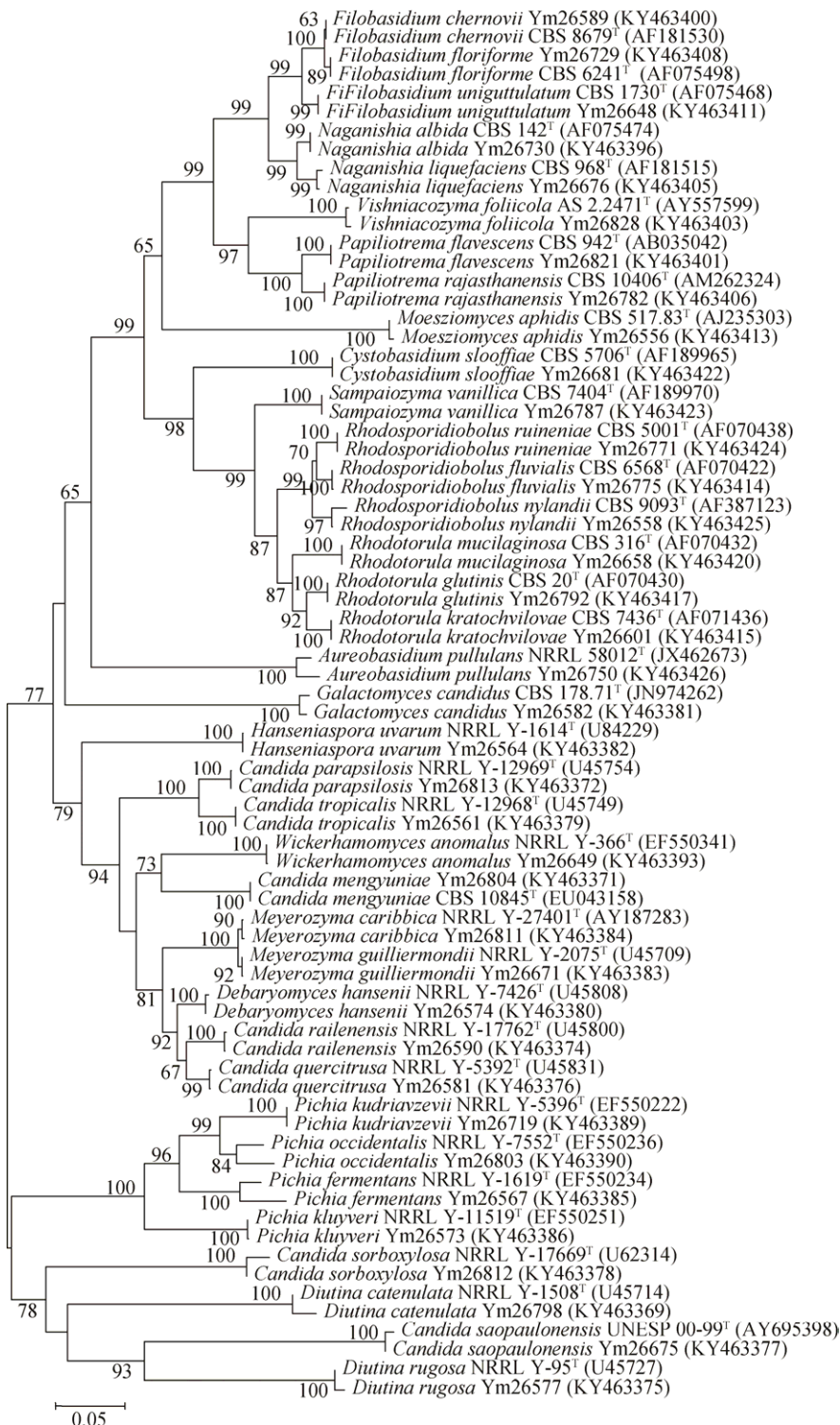


图 2 基于 26S rRNA D1/D2 区域序列应用 Neighbor-Joining 法构建的系统树

Figure 2 Phylogenetic tree drawn from Neighbor-Joining analysis based on the 26S rRNA D1/D2 domain sequence alignment

注: 括号内为 GenBank 登录号; 分支点数字代表 1 000 次重复后自展值, 并且只显示大于 50% 的数值; 标尺表示 100 个核苷酸中有 5 个被替换。

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the nodes are bootstrap values obtained after 1 000 replicates, and bootstrap values higher than 50% are shown; The scale bar represent 5 substitutions per 100 nucleotide positions.

*floriforme* 和 *Filobasidium uniguttulatum* 分别为 6.52%、5.40% 和 4.27%。

### 2.1.2 星云湖湖水中酵母菌的多样性指数

从表 1 看出, 星云湖酵母菌在种群丰富度、酵母菌数量、Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 多样性指数上都存在差异。种群丰富度最高的是位于下大河嘴出水口的样点 XW10, 其次是位于海门桥的 XW3 和位于东西大河入口的 XW1, 最少的是远离村子的东南沿岸的样点 XW7 和 XW8; 而酵母菌数量最多的是紧邻陆家嘴村子的样点 XW9, 其次是位于海门桥的 XW3, 最少的是位于湖心的样点 XW6, 酵母菌的数量在 400–2 900 CFU/L 之间, 平均为 1 297.5 CFU/L; Shannon 指数( $H'$ )高的是位于西北沿岸的样点 XW10、XW1 和 XW3, 较低的是位于东南沿岸的 XW7、XW8 和位于湖心的 XW5; Simpson 指数( $D$ )高的则是位于湖心的 XW5 和位于东南沿岸的 XW7、XW4 和 XW8, 最低的是样点位于东西大河入口的 XW1。

### 2.2 星云湖酵母菌产类胡萝卜素菌株的筛选

将星云湖的 263 株酵母菌作为筛选产类胡萝卜素的供试菌株, 结果有 207 株(78.71%)的菌株产类胡萝卜素(表 2)。其中子囊菌酵母 18 个种的 46 株菌中有 8 株产类胡萝卜素, 产量为 11–100  $\mu\text{g/g}$ ; 7 株类酵母中有 6 株产类胡萝卜素, 产量均在 11–100  $\mu\text{g/g}$ ; 而担子菌酵母 210 株 17 个种的供试菌株中, 产类胡萝卜素的共有 194 株, 产量为 11–100  $\mu\text{g/g}$  的有 53 株, 101–200  $\mu\text{g/g}$  有 112 株, 201–300  $\mu\text{g/g}$  有 24 株; 产量高于 300  $\mu\text{g/g}$  的有 4 株。

从表 2 星云湖酵母菌产类胡萝卜素的筛选结果看到, 担子菌酵母不仅是筛选类胡萝卜素供试菌株的优势种群, 也是产生类胡萝卜素菌株的优势菌群。其中红酵母属(*Rhodotorula*)和红冬孢酵母属(*Rhodospiridiobolus*)是产类胡萝卜素的主要菌种, 也是高产类胡萝卜素的主要菌种资源, 并且所有的供试菌株均产类胡萝卜素, 产量高于 300  $\mu\text{g/g}$  的菌株都分布在这 2 个属中; 胶红酵母不仅是供试菌株

的优势种群, 同时也是产类胡萝卜素的优势种群。子囊菌酵母和类酵母产类胡萝卜素的量均较少, 产量均为 11–100  $\mu\text{g/g}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 星云湖酵母菌的群落多样性特点

星云湖酵母的物种多样性十分丰富, 有 18 个属 37 个种。星云湖酵母菌群落与云南高原湖泊抚仙湖<sup>[8]</sup>、程海<sup>[5,9]</sup>、阳宗海<sup>[6]</sup>、杞麓湖<sup>[7]</sup>和阿根廷纳新罕布什尔州韦尔瓦皮湖<sup>[23]</sup>比较, 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是 6 个湖泊的共有种; *Naganishia albida*、*Wickerhamomyces anomalus* 和粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)是云南星云湖、抚仙湖<sup>[8]</sup>、程海<sup>[5,9]</sup>、阳宗海<sup>[6]</sup>和杞麓湖共有种; 库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、*Papiliotrema flavescens* 和 *Rhodotorula kratochvilovae* 出现在星云湖、抚仙湖、阳宗海和杞麓湖 4 个高原湖泊中; 汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)和 *Cystobasidium slooffiae* 在云南星云湖、抚仙湖、程海和韦尔瓦皮湖中被分离到; 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、*Meyerozyma guilliermondii*、*Naganishia liquefaciens* 和 *Filobasidium uniguttulatum* 出现在星云湖、抚仙湖、阳宗海中; 近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)和发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)在星云湖、阳宗海和韦尔瓦皮湖中被分离到; *Candida mengyuniaie*、*Candida railenensis*、*Candida saopaulonensis*、*Candida sorboxylosa*、*Meyerozyma caribbica*、*Cryptococcus kuetzingii* 和 *Rhodospiridiobolus nylandii* 是星云湖独有的种。从水系来说, 星云湖、抚仙湖、杞麓湖和阳宗海属于珠江水系, 程海为长江水系; 从地理位置来看, 星云湖紧邻抚仙湖, 其次是杞麓湖和阳宗海, 距离星云湖较远的是程海; 在这 6 个湖中, 星云湖与抚仙湖、阳宗海和杞麓湖共有的酵母种分别有 18、18 和 11 个, 程海和韦尔瓦皮湖相同的种有 8 个。表明地



表 2 星云湖酵母菌产类胡萝卜素菌株筛选结果

Table 2 The results of the screening of carotenoids-producing yeasts from Xingyun Lake

种名 Species	菌株数 Numbers of strains	类胡萝卜素产量 Carotenoids yield (μg/g)			
		11–100	101–200	201–300	>300
Ascomycetes					
<i>Candida mengyuniaie</i>	1				
<i>Candida railenensis</i>	1				
<i>Candida parapsilosis</i>	2				
<i>Candida quercitrusa</i>	1	1			
<i>Candida saopaulonensis</i>	1				
<i>Candida sorboxylosa</i>	1				
<i>Candida tropicalis</i>	2	1			
<i>Diutina catenulate</i>	2	1			
<i>Diutina rugosa</i>	1				
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2				
<i>Galactomyces candidum</i>	2	1			
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1				
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2				
<i>Meyerozyma caribbica</i>	1				
<i>Pichia kluyveri</i>	2	1			
<i>Pichia kudriavzevii</i>	8	1			
<i>Pichia occidentalis</i>	7	1			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9	1			
Basidiomycetes					
<i>Cystobasidium slooffiae</i>	2			2	
<i>Naganishia albida</i>	13	9			
<i>Naganishia liquefaciens</i>	4	4			
<i>Papiliotrema flavescens</i>	7	7			
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	1	1			
<i>Filobasidium chernovii</i>	1				
<i>Filobasidium floriforme</i>	10	6			
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	9				
<i>Moesziomyces aphidis</i>	1		1		
<i>Rhodosporidiobolus fluviale</i>	1				1
<i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i>	1			1	
<i>Rhodosporidiobolus nylandii</i>	2		2		
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5	1	1	1	2
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	1	1			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	149	21	108	19	1
<i>Sampaiozyma vanillica</i>	1	1		1	
<i>Vishniacozyma foliicola</i>	2	2			
Yeast-like organism					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	7	6			
Total	263	67	112	24	4
Percentage (%)		25.48	42.59	9.13	1.52



理位置、水体等环境因素对酵母菌的群落结构有影响,造成每个湖泊都有其独特的种。

从种群结构来看,星云湖酵母菌的种与抚仙湖和阳宗海的酵母种相似性达到 47.37%,进一步分析发现,星云湖子囊菌酵母的种有 19 个(占总数的 50%),担子菌酵母的种为 18 个(占总数的 47.37%),而抚仙湖的 73.1%的种为担子菌酵母,子囊菌酵母仅为 21.8%;阳宗海的子囊菌酵母有 19 个(占总数的 46.34%),担子菌酵母的种为 21 个(占总数的 51.22%);星云湖和阳宗海酵母菌中毕赤酵母属有 4 个相同的种,抚仙湖仅有其中的库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*),该种常见于土壤、果实和各种天然发酵物中。总的来说,毕赤酵母(*Pichia*)主要存在于有机碳等营养物质含量丰富的果实<sup>[13]</sup>、酿酒物(大曲、酒醅、酒渣)<sup>[24]</sup>、原料乳和发酵乳制品<sup>[25]</sup>中。由于星云湖和阳宗海的富营养化程度高于抚仙湖,因此毕赤酵母属的种较多。由于抚仙湖是 I 类水质,星云湖是 IV-劣 V 类水质,阳宗海是 IV 水质,产红色素的酵母种抚仙湖(14 个种,占总种数 26.41%)均高于星云湖(8 个种,占 21.05%)和阳宗海(8 个种,占 19.52%),说明湖泊中酵母菌的多样性受环境因子的影响较大,湖泊的营养化程度不同是造成湖泊酵母菌群落明显差别的主要原因<sup>[8]</sup>。

星云湖种群丰富度高的是位于下大河嘴出水口的样点 XW10 和位于海门桥的 XW3;酵母菌数量多的是紧邻陆家嘴村子的样点 XW9 和位于海门桥的 XW3,最少的是位于湖心的样点 XW6;这些均说明人类活动和水质都是造成种群丰富度和酵母菌数量差异的主要原因。与相邻的抚仙湖比较<sup>[8]</sup>,抚仙湖酵母菌的数量除一个样点外(1 056 CFU/L),其他样点在 44–358 CFU/L 之间,平均为 259 CFU/L,由此可见星云湖酵母菌的数量明显高于抚仙湖,两个湖泊的明显区别就是其水质,富营养化的湖水是酵母菌数量增多的重要环境因素。

### 3.2 星云湖酵母菌产类胡萝卜素活性菌株及潜在的用途

星云湖的酵母菌具有潜在的用途,如产香的桔

假丝酵母(*Candida quercitrusa*)、产酶的 *Candida sorboxylosa* 和 *Candida railenensis* 以及有各种用途的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)<sup>[10,26]</sup>。本研究组对星云湖酵母菌胞外酶活性的研究也表明,星云湖的酵母种群中有大量产胞外酶(蛋白酶、脂肪酶、几丁质酶、植酸酶、淀粉酶、菊粉酶、纤维素酶、漆酶、木聚糖酶、锰依赖过氧化物酶和木质素过氧化物酶)的活性菌株<sup>[27]</sup>,表明湖泊中的酵母菌资源非常丰富,应用前景可观。

星云湖酵母菌中 *Rhodosporidiobolus fluviale*、*Rhodosporidiobolus ruineniae*、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)和胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)酵母产类胡萝卜素的能力较强,其中胶红酵母产类胡萝卜素的菌株较多,同时它也是星云湖的优势种群,表明由于它们产生抗氧化物质类胡萝卜素,能够抵御紫外线的伤害,使得产色素的酵母类群能够在高紫外线下的高原湖泊中繁殖,成为优势种属<sup>[12,28–32]</sup>。星云湖酵母菌产类胡萝卜素菌株与相邻的抚仙湖比较,产类胡萝卜素酵母的种与抚仙湖相似,主要集中在红酵母属、红冬孢酵母属<sup>[11]</sup>。据文献报道,粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)和胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)被认为是类胡萝卜素的主要生产者<sup>[28,33]</sup>,星云湖产类胡萝卜素含量达到 300  $\mu\text{g/g}$  细胞干重以上的野生菌株也来自这两个种和 *Rhodosporidiobolus fluviale*;而且有研究表明胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)可以去除水中的亚硝态氮和降低化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)<sup>[34]</sup>,并含有丰富的蛋白质,可以在作为鱼饵和净化水质方面进行开发研究。

## 4 结论

云南高原湖泊星云湖的酵母菌和类酵母具有丰富的多样性,胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和 *Naganishia albida* 是优势种,湖泊的营养化程度

以及地理位置的差异影响酵母菌群落的分布;星云湖的酵母菌群落中有大量的产胞外酶和类胡萝卜素的活性菌株,红冬孢酵母属的 *Rhodospiridiobolus fluviale*、红酵母属的粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)和胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的类胡萝卜素产量可达 300  $\mu\text{g/g}$  细胞干重以上。由此可见,云南高原湖泊酵母菌的研究对湖泊的多样性保护提供了第一手资料,并为微生物的开发利用提供了非常丰富的种质资源。

致谢:感谢星云湖保护管理局和吴程同学在工作上的大力支持。

## REFERENCES

- [1] Qin J, Wu XH, Wu B, et al. Phytoplankton and water environment in Xingyun Lake: characteristics study and correlation analysis[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(6): 46-50 (in Chinese)  
秦洁, 吴献花, 吴斌, 等. 星云湖浮游植物和水环境特征研究及相关性分析[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(6): 46-50
- [2] Yang JL, Li J, Li JW, et al. Summarize on the research of the hydro-bios and aquatic environment in Fuxian Lake and Xingyun Lake[J]. Yunnan Geographic Environment Research, 2012, 24(2): 98-102, 109 (in Chinese)  
杨加林, 李杰, 李经纬, 等. 抚仙湖-星云湖水生生物与水环境研究综述[J]. 云南地理环境研究, 2012, 24(2): 98-102, 109
- [3] Nagahama T. Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments[A]/Péter G, Rosa C. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2006: 241-262
- [4] Baker BJ, Sheik CS, Taylor CA, et al. Community transcriptomic assembly reveals microbes that contribute to deep-sea carbon and nitrogen cycling[J]. The ISME Journal, 2013, 7(10): 1962-1973
- [5] Zhou XL, Li ZY, Yang LY, et al. Identification of yeasts isolated from Chenghai Lake, a plateau lake in Yunnan province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 51(4): 547-553 (in Chinese)  
周新丽, 李治滢, 杨丽源, 等. 云南程海湖酵母菌多样性及应用[J]. 微生物学报, 2010, 51(4): 547-553
- [6] Yan YP, Li ZY, Dong MH, et al. Yeasts from Yangzonghai Lake in Yunnan (China): diversity and extracellular enzymes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(11): 1205-1212 (in Chinese)  
严亚萍, 李治滢, 董明华, 等. 云南阳宗海酵母菌种群结构及产胞外酶测试[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1205-1212
- [7] Dong MH, Li ZY, Zhou B, et al. Diversity of cultivable yeast in Qilu Lake in winter[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 603-613 (in Chinese)  
董明华, 李治滢, 周斌, 等. 云南高原湖泊杞麓湖冬季可培养酵母菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 603-613
- [8] Guo XF, Li ZY, Dong MH, et al. Spatial dynamics of yeast community and its relationship to environmental factors in Lake Fuxian, Yunnan Province[J]. Journal of Lake Sciences, 2016, 28(2): 358-369 (in Chinese)  
郭小芳, 李治滢, 董明华, 等. 云南高原湖泊抚仙湖酵母菌空间分布及其与环境因子的关系[J]. 湖泊科学, 2016, 28(2): 358-369
- [9] Li ZY, Zhou XL, Zhou B, et al. Diversity and extracellular enzymes of yeasts from Chenghai Lake in winter[J]. Mycosystema, 2017, 36(2): 177-185 (in Chinese)  
李治滢, 周新丽, 周斌, 等. 云南程海湖冬季酵母菌多样性及胞外酶活性研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(2): 177-185
- [10] Zaky AS, Tucker GA, Daw ZY, et al. Marine yeast isolation and industrial application[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 14(6): 813-825
- [11] Fan ZQ, Li ZY, Dong MH, et al. Carotenoid-producing yeasts resources in Fuxian Lake, Yunnan[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 296-304 (in Chinese)  
樊竹青, 李治滢, 董明华, 等. 云南抚仙湖产类胡萝卜素酵母菌的资源调查[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 296-304
- [12] Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, et al. Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content[J]. Current Microbiology, 2016, 72(1): 94-101
- [13] Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeast: A Taxonomic Study[M]. 5th ed. London: Elsevier Science, 2011: 293-2058
- [14] Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GJE. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations[J]. Applied and Environment Microbiology, 2007, 73(21): 6705-6713
- [15] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(4): 331-371
- [16] Fell JW, Noekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3): 1351-1371
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [18] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [20] Liu XZ, Wang QM, Göker M, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*[J]. Studies in Mycology, 2015, 81: 85-147
- [21] Wang QM, Yurkov AM, Göker M, et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina*[J]. Studies in Mycology, 2015, 81: 149-189
- [22] Thomas G, Clay D, Magurran A. BIODAP-Ecological Diversity

- and Its Measurement[M]. Alma, New Brunswick, Canada: Fundy National Park, 2000
- [23] Brandão LR, Libkind D, Vaz ABM, et al. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(1): 1-13
- [24] Wang W, Wu Q, Xu Y. Identification and analysis of yeast community structure in Chinese light-style liquor brewing process[J]. Microbiology China, 2012, 39(9): 1272-1279 (in Chinese)
- 王薇, 吴群, 徐岩. 清香型白酒固态酿造过程中酵母种群结构和多样性分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1272-1279
- [25] Qing MJ, Bai M, Zhang Y, et al. Identification and biodiversity of yeasts from Qula in Tibet and milk cake in Yunnan of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1141-1146 (in Chinese)
- 卿蔓君, 白梅, 张勇, 等. 西藏曲拉和云南乳饼中酵母菌的鉴定及其生物多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1141-1146
- [26] Chen K, Li GB, Li DH, et al. Water quality improvement and algal inhabitation by *Wolffia arrhiza*, *Schizosaccharomyces* and *Rhodospirillum*[J]. Ecological Science, 2007, 26(5): 428-431 (in Chinese).
- 陈坤, 李根保, 李敦海, 等. 无根萍、酵母菌和红螺菌的水质净化和抑藻作用[J]. 生态科学, 2007, 26(5): 428-431
- [27] Tan JL, Li ZY, Zhou B, et al. Extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from Fuxian Lake and Xingyun Lake in Yunnan Plateau[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 302-313 (in Chinese)
- 谭金连, 李治滢, 周斌, 等. 云南高原湖泊抚仙湖和星云湖的酵母菌胞外酶活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 302-313
- [28] Moliné M, Regina Flores M, Libkind D, et al. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2010, 9(8): 1145-1151
- [29] Libkind D, Moliné M, Sampaio JP, et al. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 69(3): 353-362
- [30] Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, et al. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in patagonia, argentina[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2003, 84(4): 313-322
- [31] Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 12
- [32] Moliné M, Libkind D, Diéguez MC, et al. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009, 95(3): 156-161
- [33] Mannazzu I, Landolfo S, da Silva TL, et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(11): 1165-1173
- [34] Xie FX, Zhang FF, Zhou K, et al. Isolation, screening and identification of yeast for aquaculture water purification[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(5): 635-642 (in Chinese)
- 谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 水质净化酵母菌的分离筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2015, 55(5): 635-642