

袁 斌,吕美云,刘紫英. 宜春温泉中嗜热菌的分子鉴定及系统发育分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):199–203.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.05.049

宜春温泉中嗜热菌的分子鉴定及系统发育分析

袁 斌¹, 吕美云², 刘紫英²

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院,江西宜春 336000; 2. 宜春学院化学与生物工程学院,江西宜春 336000)

摘要:分离纯化宜春温泉水中的嗜热菌并鉴定分析其系统发育多样性。将宜春温泉水在嗜热菌分离培养基上进行多次分离纯化,液体扩大培养,提取 DNA、16S rRNA 进行 PCR 扩增,将其序列送往公司检测,经 Blast 分析和比对,对检测结果进行系统发育分析。结果表明,宜春温泉水中分离并鉴定 42 株中度嗜热细菌。宜春温泉菌群系统发育中,以芽孢杆菌类群为主;其中,解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)和土样芽孢杆菌属(*Geobacillus*)占主导,其次是短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

关键词:温泉;嗜热菌;分子鉴定;系统发育分析

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)05–0199–05

嗜热微生物是指生长温度上限高于 50 ℃ 的微生物,研究嗜热菌可以探索高温环境中微生物的种类和多样性^[1],更重要的是可以利用和开发嗜热菌在耐热机制、环境保护、工业应用、资源开发等方面应用^[2],使其具有非常重要的意义。

对热泉中的微生物资源研究国内外已有相关报道^[3–5]。我国南部、西部和北部地区的热泉中嗜热微生物等资源已探索^[6–8],根据厦门温泉不同于内陆温泉和深海热液喷口的特点,杨波等发现了一些新的嗜热菌,为探索厦门地区新的微生物资源提供依据^[9]。辽宁鞍山温泉的水样表明,中温环境中以中度嗜热菌芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主,对其嗜热酶进行了

定性分析^[10]。以上研究表明,国内的温泉中蕴藏着丰富的嗜热菌,为开发相关嗜热酶提供了前景。

宜春温泉水温常年维持在 68 ~ 72 ℃ 之间,具有独特的高硒低硫水质,是迄今全球仅有的高硒且低硫的温泉^[11]。泉水中的嗜热菌更是具有对泉水的净化和维稳作用。嗜热菌对高温有着较强适应性,通过对温泉中嗜热微生物的分析,能够充分了解高温环境中微生物的多样性及其功能多样性,使其具有重大的意义。本试验将宜春温泉水中嗜热菌的多样性进行研究分析,并且对各菌种之间的相关性进行比对。这一分析为了解温泉中的生态平衡提供了有力的证据,同时也为进一步开发、利用内陆温泉中的嗜热微生物提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

样品来自于江西省宜春市宜春镇富硒温泉,宜春富硒温

收稿日期:2017–11–06

基金项目:江西省科技厅青年科学基金(编号:20142BA214011)。

通信作者:刘紫英(1979—),女,江西万年人,硕士,副教授,从事微生物工程技术研究。E-mail:yingziliu2008@163.com。

methionine transgenic line of this cultivar[J]. PLoS One,2014,9(7):e103343.

[21] 陈 丰,彭 欣,华小梅,等. 富含硫氨基酸转基因大豆对根际土壤有机元素含量和微生物群落多样性的影响[J]. 大豆科学,2012,31(2):259–265.

[22] 吴建平,梁国华,熊 鑫,等. 鼎湖山季风常绿阔叶林土壤微生物量碳和有机碳对模拟酸雨的响应[J]. 生态学报,2015,35(20):1–10.

[23] Wang G H, Jin J, Chen X L, et al. Biomass and catabolic diversity of microbial communities with long-term restoration, bare fallow and cropping history in Chinese Mollisols[J]. Plant Soil & Environment, 2007,53(4):177–185.

[24] 杜 娟,吴季荣,俞明正,等. 转基因小麦根际土壤中荧光假单胞菌数量的变化[J]. 麦类作物学报,2014,34(3):345–350.

[25] Caldwell B A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review[J]. Pedobiologia,2005,49(6):637–644.

[26] Cheng F, Peng X B, Zhao P, et al. Soil microbial biomass, basal respiration and enzyme activity of main forest types in the Qinling Mountains[J]. PLoS One,2013,8(6):e67353.

[27] Fang H, Dong B, Yan H, et al. Effect of vegetation of transgenic Bt rice lines and their straw amendment on soil enzymes, respiration, functional diversity and community structure of soil microorganisms under field conditions[J]. J Environ Sci,2012,24(7):1259–1270.

[28] Lahl K, Unger C, Emmerling C, et al. Response of soil microorganisms and enzyme activities on the decomposition of transgenic cyanophycin-producing potatoes during overwintering in soil[J]. European Journal of Soil Biology,2012,53(6):1–10.

[29] Monkiedje A, Olusoji M, Spiteller M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil[J]. Soil Biol Biochem,2002,34(12):1939–1948.

[30] Shen R F, Cai H, Gong W H. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil[J]. Plant Soil,2006,285(1/2):149–159.

[31] Wu J R, Yu M Z, Xu J H, et al. Impact of transgenic wheat with wheat yellow mosaic virus resistance on microbial community diversity and enzyme activity in rhizosphere soil[J]. PLoS One, 2014,9(6):e98394.

泉位于 115°E、28°N, 坐落在江西省明月山风景区, 国家 AAAA 级风景区。在温泉中心及周围 5 个样点取样, 同时检测温泉的温度、pH 值等; 样品采集后装入无菌 50 mL 离心管中, 4 h 之内于 4 °C 保存运回实验室, 低温保藏待用。

2 个泉水口, 分别标记为宜春新井和宜春老井, 实测温度均为 60 °C, pH 值为 6.0。采样时间为 2014 年 5 月 3 日; 每个温泉水样各 5 管, 运抵实验室后 4 °C 密闭保存待用。

1.2 主要试剂与仪器

DNA marker、16S rRNA 扩增引物(27F: 5′-ATTCGGTTGATCCTGC-3′; 1541R: 5′-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)、Goldview II 型核酸染料、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

主要仪器设备有温度梯度 PCR 仪(伯乐)、超低温冰箱(美菱)、水平凝胶电泳仪(北京六一 DYC-32A)、生化培养箱(LRH-250A)、凝胶成像仪(伯乐)等。

1.3 培养基

根据样品温泉的温度, 选择 TYE 培养基作为富集培养基, 牛肉膏蛋白胨培养基作为对照。嗜热菌分离培养基 TYE: 1.3 g/L (NH₄)₂SO₄、0.28 g/L KH₂PO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.07 g/L CaCl₂·2H₂O、1.8 mg/L MnCl₂·4H₂O、4.5 mg/L Na₂B₄O₇·10H₂O、0.05 mg/L CuSO₄·2H₂O、0.22 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.01 mg/L CoCl₂·0.03 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O、5.0 g/L 酵母浸膏(yeast extract)、4.0 g/L 胰蛋白胨(tryptone)、1 L 超纯水, 22 g 琼脂粉, pH 值为 7.2。

1.4 方法

1.4.1 嗜热菌的分离纯化 温泉水样品: 将从宜春市宜春镇富硒温泉中取得的 2 处水样, 经过压滤处理后, 滤膜(0.22)加入到已灭菌的 TYE 液体培养基中, 在温度为 55 °C 条件下摇瓶培养, 于恒温水浴摇床上培养 3 d, 至出现混浊; 培养液梯度稀释后涂布 TYE 平板, 55 °C 温箱培养, 待形成明显菌落后, 再依据形态菌落特征挑取单菌落。每一个单菌落转接摇管, 在相同条件下将细菌液梯度稀释, 然后采用稀释涂布平板法分离细菌, 重复多次, 直到得到单菌落, 挑取平板中的单菌落, 根据菌落形态特征进行编号。宜春温泉水中分离出的菌株, 宜春新井编号为 N11、N12、N1202、N1209、N9、N1211、N1212、N1213、N1214、N1216、N1221、N22、N1222、N23、N1224、N24、N1230、N1233、N13、N3、N14、N15、N17、N18、N28、N2、N4、N5、N8、N19、N20、N25、N26、N27、N29; 宜春老井编号为 O2104、O2108、O2111、O2112、O2202、O2203、O2212。

1.4.2 细菌基因组 DNA 的提取 挑选每个编号的单个菌落, 分别接种到液体培养基中, 55 °C 恒温摇床培养 10 h, 测定 D 值并检测菌体浓度后, 用细菌基因组 DNA 的提取试剂盒提取总 DNA。参考试剂盒的操作说明书进行提取 DNA。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 取待检测的样品 5 μL 与 1 μL 10×DNA Loading Buffer 均匀混合, 琼脂糖水平凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 0.5×TAE, 电泳电压为 75 mV。

1.4.4 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和产物纯化 选择细菌通用引物上游引物(27F: 5′-ATTCGGTTGATCCTGC-3′), 下游引物(1541R: 5′-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′); PCR 反应体系: 12.5 μL 2×Taq PCR Master, 上下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 1.5 μL, 补足水至 25 μL; 扩增条件为:

94 °C 5 min; 94 °C 60 s, 56.4 °C 45 s, 72 °C 100 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。由上海生工生物工程(上海)股份有限公司协助将本试验所得的 PCR 扩增产物纯化及测序。

1.4.5 嗜热菌的分子鉴定及系统发生关系分析 进入 NCBI 官网, 上传测序的序列获取菌株序列号(KY433292 ~ KY433310、KY433860 ~ KY433882), 经 Blast 查询已测序列的同源序列, 筛选并下载与其相似度较高的菌株序列并将其作为参考序列, 记录相似序列的 GenBank 收录号、与原序列的相似度、分值(分值表示 2 株菌株相似性的参考值, 数值越大, 相似度越高)。用软件 Mega 6.0 进行序列分析, Neighbour-Joining 法构建系统发育树, 并且在其分枝上标出自展检验 Bootstrap 值(1 000 次重复获得)。

2 结果与分析

2.1 宜春温泉水中嗜热菌的分离纯化

从宜春温泉水中分离纯化近 150 株嗜热菌, 经形态初步鉴定筛选, 最后 DNA 琼脂凝胶电泳检测到 PCR 扩增, 有 42 个编号的菌体测序成功(35 个新井、7 个老井), 所以本研究的最终结果只选取与测序成功的编号相关内容进行分析讨论。

2.2 宜春温泉水中嗜热菌 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

由图 1 可知, 嗜热菌经试剂盒提取 DNA 后电泳显示了良好的效果, 显示条带很亮, 但也有一些拖尾现象, 估计是少量蛋白没有完全清除干净, 但结果不影响下一步的 PCR 扩增。

2.3 宜春温泉水中嗜热菌的 PCR 扩增

由图 2 可知, 提取后的 DNA 经过 PCR 扩增后, 每条条带扩增的大小与 marker 比较在 1 600 bp 左右, 符合 16S rRNA 的大小, 扩增成功, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.4 在 NCBI 中的 Blast 结果

分离纯化得到 42 株不同表型的嗜热细菌菌株, 通过 Blast 比对分析其 16S rRNA 序列, 由表 1 可知, 嗜热菌归属于 5 个属 11 种: 土样芽孢杆菌属(*Geobacillus*)的嗜热脂肪土芽孢杆菌(*G. stearothermophilus* partial)、喜热嗜油地芽孢杆菌(*G. thermoleovorans*)、土芽孢杆菌(*Geobacillus* sp.)、嗜热地芽孢杆菌(*G. kaustophilus*); 解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌(*A. thermoaerophilus*); 短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)的波斯坦短芽孢杆菌(*B. borstelensis*)、嗜热短芽孢杆菌(*B. thermoruber*); 芽孢杆菌属(*Bacillus*)的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.); 无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)的 *A. lavithermus*、努比卤地无氧芽孢杆菌(*A. rupiensis*), 其中土样芽孢杆菌属(*Geobacillus*)和解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)是优势属, 均占 23.8%, 其次是短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)分离最少。从采样地分析, 新井的群落多样性更丰富, 新井中分离有短芽孢杆菌属、土样芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、无氧芽孢杆菌属、解硫胺素芽孢杆菌属; 老井仅分离到短芽孢杆菌属、土样芽孢杆菌属、芽孢杆菌属这 3 个属; 这估计与旧井的过度开放有关, 取水过度, 造成菌群多样性丰度小。

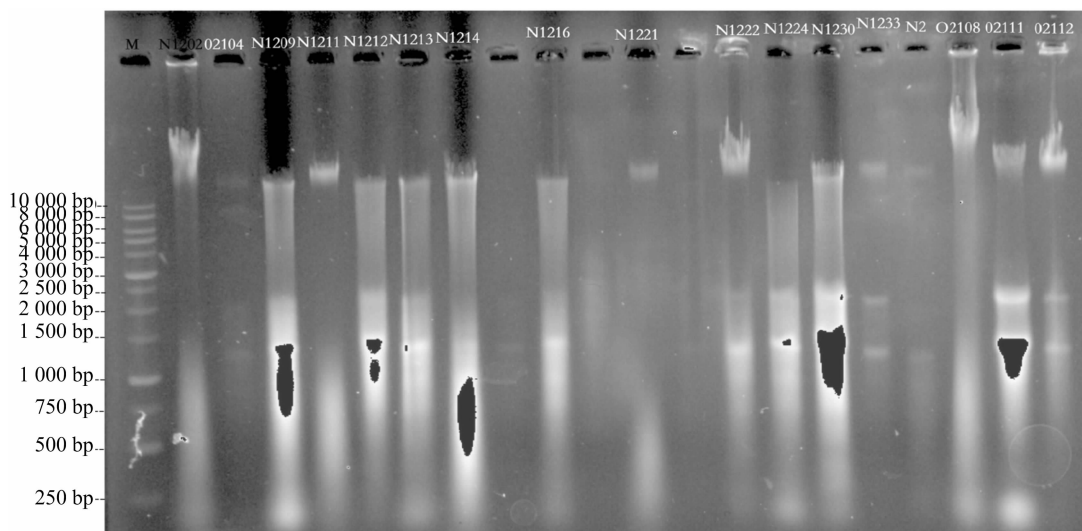


图1 宜春温泉中部分嗜热菌总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

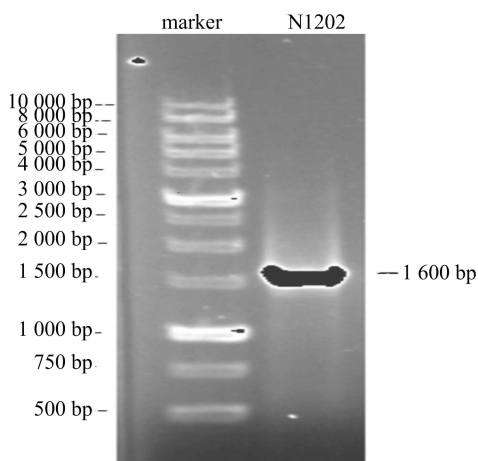


图2 宜春温泉水中部分嗜热菌的 PCR 扩增产物电泳

2.5 嗜热菌的分子鉴定及系统发育分析

由表 1 与图 3 可知,从宜春温泉水中能够分离出一定数量且不同类群的嗜热菌,表明嗜热菌能够在温泉这种特殊的环境中生存,并且广泛存在。从温泉水中分离得到的这批嗜热菌中 N1202、N1221、O2108、O2202、O2212、N11、N14、N17、N4 属于短芽孢杆菌属;N1209、N1211、N1212、N1213、N1214、N1216、N1222、N1233、O2104、O2203 属于土样芽孢杆菌属;N1224、O2111、O2112、N27、N5 属于芽孢杆菌属;N1230、N12、N18、N19、N28、N2、N9、N13 属于厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*);N3、N8、N15、N20、N22、N23、N24、N25、N26、N29 属于解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)。

从分析结果可以看出,150 株分离纯化菌株中获得 42 种基因型菌株,宜春温泉中的嗜热菌为中度嗜热细菌,以芽孢杆菌类群为主,具体为土样芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、厌氧芽孢杆菌属、解硫胺素芽孢杆菌属。其中,优势菌群为土样芽孢杆菌属和解硫胺素芽孢杆菌属,均占 23.81%。上述分析结果说明,解硫胺素芽孢杆菌属和土样芽孢杆菌属在宜春温泉的微生态系统中处于优势地位。短芽孢杆菌属占总菌群数量的 21.4%、厌氧芽孢杆菌占 19.05%,为次要菌

群,芽孢杆菌属约占总菌株数的 11.90%,为最少的菌群。本研究结果与李杨霞等在四川、陕西温泉报道菌株主要分布在厌氧芽孢杆菌属和土样芽孢杆菌属有其相似性,都分离有厌氧芽孢杆菌属和土样芽孢杆菌属,且为优势菌^[12]。本研究结果与 Maugeri 等报道土样芽孢杆菌属在 60℃ 左右的中等高温条件下一般处于优势地位的报道是一致的,土样芽孢杆菌属是中度嗜热的芽孢杆菌分支属,广泛存在各地热泉中^[13]。本研究分离纯化得到的嗜热菌菌株结果是不同于在福建和云南省的国内研究者的报道。郭春雷等对云南温泉的嗜热菌报道显示,在滇西二泉中栖热菌属(*Thermus*)的高温菌株为优势菌群^[14]。综上所述,嗜热菌的菌群分布与其地理位置有密切关系,不同地域的嗜热菌优势菌呈现不一。

3 讨论与结论

通过可培养法富集分离宜春温泉水中的嗜热菌,进而分离纯化,利用 16S rRNA 分子鉴定其菌株,分析温泉中嗜热菌的系统发育,在嗜热微生物分类学中从分子时钟水平来分析其系统发育地位并确定宜春温泉水中的优势菌群,且通过这些优势菌群的特性,更好地了解 and 发掘温泉中有益的功能菌,使其发挥巨大作用。然而,可培养法获得的嗜热微生物非常有限,本结果获得的嗜热短芽孢杆菌(*B. thermoruber*)、波斯坦短芽孢杆菌(*B. borstelensis*)、嗜热脂肪土芽孢杆菌(*G. stearothermophilus* partial)、喜热嗜油地芽孢杆菌(*G. thermoleovorans*)、土芽孢杆菌(*Geobacillus* sp.)、嗜热地芽孢杆菌(*G. kaustophilus*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、*A. lavithermus*、努比卤地无氧芽孢杆菌(*A. rupiensis*)、嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌(*A. thermoaerophilus*)等 11 种嗜热菌。这个结果与进一步采用非培养法,利用高通量测序技术检测宜春泉水中细菌群落结构与多样性有些差异。高通量测序技术对水体样品物种类群结果显示,主要属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、*Thermosynechococcus*、鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*);这也为以后采用多种培养基分离培养嗜热菌提供一个思路,随着分

表 1 宜春温泉嗜热菌序列在 NCBI 中的 Blast 结果

属名	近缘种相似序列 GenBank 收录号	菌株	菌株序列号	同源性(%)
土样芽孢杆菌属(10 种)	<i>G. stearothermophilus</i> strain BGSC 9A20	N1209	KY433293	99
	<i>G. kaustophilus</i> strain NBRC 102445	N1211	KY433294	100
	<i>G. thermoparaffinivorans</i> strain BGSC 90A1	N1212	KY433295	99
	<i>G. kaustophilus</i> strain NBRC 102445	N1213	KY433296	100
	<i>G. sp.</i> SBS-4S gene AB306519.1	N1214	KY433297	99
	<i>G. kaustophilus</i> strain G2 JX522539.1	N1216	KY433298	100
	<i>G. sp.</i> SBS-4S gene AB306519.1	N1222	KY433300	100
	<i>G. stearothermophilus</i> partial FN428673.1	N1233	KY433303	100
	<i>G. sp.</i> HPI HMI61631.1	O2104	KY433304	99
解硫胺素芽孢杆菌属(10 种)	<i>G. kaustophilus</i> strain L14 FJ823105.2	O2203	KY433309	100
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM10154 NR_112216.1	N15	KY433863	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N20	KY433867	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain L420-91 NR_029303.1	N22	KY433868	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain L420-91NR_029303.1	N23	KY433869	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N24	KY433870	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N25	KY433871	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N26	KY433872	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N29	KY433875	99
短芽孢杆菌属(9 种)	<i>A. thermoaerophilus</i> strain L420-91 NR_029303.1	N3	KY433877	99
	<i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154;NR_112216.1	N8	KY433880	99
	<i>B. thermoruber</i> strain B4M KJ722521.1	N1202	KY433292	99
	<i>B. borstelensis</i> strain LMG 15536 AF378230.1	N1221	KY433299	100
	<i>B. borstelensis</i> strain AK2 KC503891.1	O2108	KY433305	100
	<i>B. borstelensis</i> strain LMG 15536 AF378230.1	O2202	KY433308	100
	<i>B. borstelensis</i> strain AK2 KC503891.1	O2212	KY433310	100
	<i>B. borstelensis</i> strain NBRC 15714 ID;NR_113799.1	N11	KY433860	100
	<i>B. borstelensis</i> strain NBRC 15714 NR_113799.1	N14	KY433862	100
嗜热短芽孢杆菌属(8 种)	<i>B. borstelensis</i> strain NBRC 15714 NR_113799.1	N17	KY433864	100
	<i>B. borstelensis</i> strain DSM 6347 NR_040984.1	N4	KY433878	100
	<i>A. avithermus</i> strain DSM2641 NR_026516.1	N1230	KY433302	100
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 NR_042379.1	N12	KY433861	100
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 ID;NR_042379.1	N18	KY433865	99
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 ID;NR_042379.1	N19	KY433866	99
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 ID;NR_042379.1	N28	KY433874	99
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 ID;NR_042379.1	N2	KY433876	99
	<i>A. rupiensis</i> strain R270 NR_042379.1	N9	KY433881	99
芽孢杆菌属(5 种)	<i>A. rupiensis</i> strain R270 NR_042379.1	N13	KY433882	99
	<i>B. licheniformis</i> strain DSM 13 NR_118996.1	N1224	KY433301	99
	<i>B. licheniformis</i> strain DSM 13 NR_118996.1	O2111	KY433306	99
	<i>B. sp.</i> RKJDB-0018 partial LN849704.1	O2112	KY433307	99
	<i>B. licheniformis</i> strain DSM 13 NR_118996.1	N27	KY433873	99
	<i>B. licheniformis</i> strain DSM 13 NR_118996.	N5	KY433879	99

子生物学技术的推进,嗜热微生物多样性探索可以拓展到更多嗜热菌,同时对嗜热微生物系统发育分析提供一个更好的方向。

参考文献:

[1] Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature[J]. Archiv Fur Mikrobiologie, 1972, 84(1): 54.

[2] 王柏婧, 冯雁, 王师钰, 等. 嗜热酶的特性及其应用[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 259-262.

[3] Irfan M T A, Shah A A, Production and characterization of organic Solvent-Tolerant cellulase from bacillus amyloliquefaciens AK9 isolated from hot spring [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 182(4): 1390-1402.

[4] Shu F, Chong D, Juan Y. Phylogenetic analysis of strain CHBT-1721 with other thermophile bacteria isolated from hot springs of China[J]. Journal of Zhejiang University, 2015.

[5] Song J, Weon H Y, Yoon S H, et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis[J]. Fems Microbiology Letters, 2001, 202(1): 97-102.

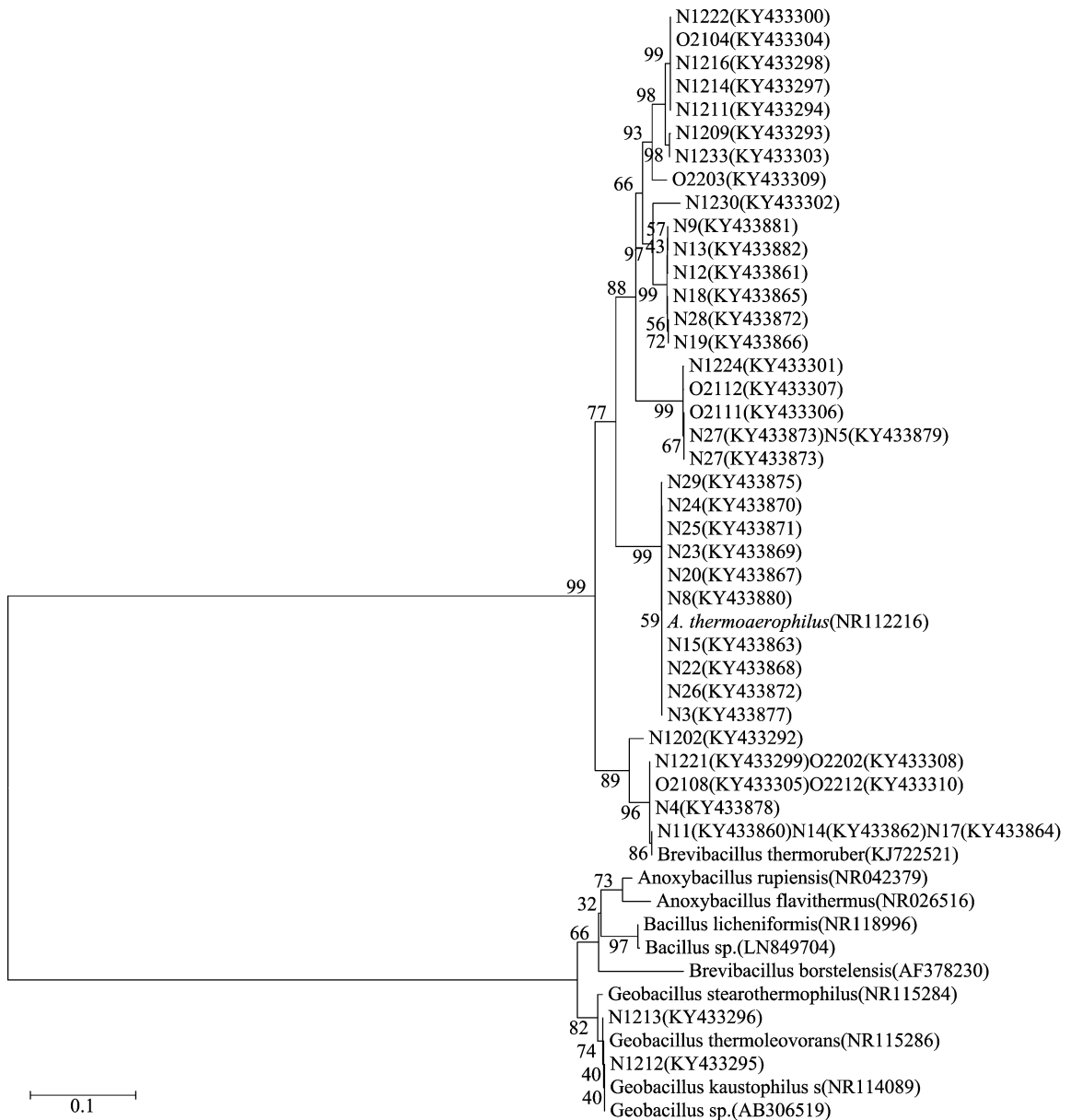


图3 42 株嗜热菌的分子鉴定及系统发育树

- [6] 吴红萍, 孟甜, 张飞官, 等. 海南温泉嗜热菌的 16S rDNA 分析[J]. 生物技术, 2013, 23(2): 48-53.
- [7] 陆月情, 陈波, 刘晓黎, 等. 腾冲热海七株高温厌氧菌的分离及鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1234-1239.
- [8] 刘景圣, 许志超, 刘回民, 等. 一株长白山温泉高温菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 274-277.
- [9] 杨波, 陈新华. 厦门地区近海温泉嗜热菌的分离、鉴定[J]. 台湾海峡, 2007, 26(1): 61-70.
- [10] 张心齐. 陆地热泉及深海热液沉积物生境中的嗜热菌多样性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [11] 刘慧婷. 宜春温汤富硒温泉水资源与环境保护研究[J]. 能源与环境, 2016(5): 48-50.
- [12] 李杨霞, 张心齐, 林盈盈, 等. 我国中部地区热泉嗜热菌的分离及其产酶研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2008, 35(2): 204-209.
- [13] Maugeri T L, Gugliandolo C, Caccamo D, et al. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2001, 24(4): 572-587.
- [14] 郭春雷, 王涛, 祝伟, 等. 滇西二高温温泉中 *Thermus* 高温菌的 16S rRNA[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(5): 458-462.