

# 西藏羊八井废弃热井沉积物中的 真核微生物多样性

段双全 格桑曲珍\* 普布 许鹏辉 邢顺林 朱印酒  
(西藏大学 理学院 西藏 拉萨 850000)

**摘要:** 【目的】研究西藏羊八井废弃热井沉积物中的真核微生物多样性。【方法】采用 ITS-rRNA 基因分析法构建了沉积物中真核微生物的 ITS-rRNA 基因文库, 随机抽取文库中的克隆子进行扩增 rDNA 限制性酶切片段分析(ARDRA), 并对 ITS-rRNA 基因进行了系统发育分析。【结果】沉积物中主要的真核微生物有子囊菌、壶菌、担子菌、丝足虫、后生动物和非培养真菌。其中壶菌 *Chytridiales* sp., *Physoderma maydis* 和 *Powellomyces* sp., 子囊菌的假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)和短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)以及后生动物的轮虫(*Lecane bulla*)均未有报道存在于热泉或热井中。【结论】羊八井热井沉积物中具有丰富的真核微生物多样性。

**关键词:** 热井, ITS-rRNA 基因, 真核微生物, 系统发育分析

## Eukaryotic microbes diversity in a disused thermal vent in Yangbajing, Tibet A. R.

DUAN Shuang-Quan GESANG Qu-Zhen\* PU Bu XU Peng-Hui  
XING Shun-Lin ZHU Yin-Jiu

(School of Science, Tibet University, Lhasa, Tibet 850000, China)

**Abstract:** [Objective] To discover the eukaryotic microbes diversity in sediment from a dis-used thermal vent in Yangbajing, Tibet A. R.. [Methods] To constructed the ITS-rRNA gene

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31060280)

\*通讯作者: Tel: 86-891-6329701; 563175581@qq.com

收稿日期: 2012-12-14; 接受日期: 2013-03-13

library of total DNA extracted from sediment by analyzed ITS-rRNA gene. Positive clones from the library were analyzed randomly by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Phylogenetic trees based on eukaryotic ITS-rRNA gene sequences were built up by using MEGA 4.0 program. **[Results]** There were Ascomycota, Chytridiomycota, Basidiomycota, Cercozoan, Metazoan and uncultured fungus in sediment from Yangbajing thermal vent. *Chytridiales* sp., *Physoderma maydis*, *Powellomyces* sp., *Candida parapsilosis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aureobasidium pullulans* and *Lecane bulla*, all of them have not yet been reported to be inhabited in hot springs or thermal vents. **[Conclusion]** There were lots of eukaryotic microbes communities in sediment from the disused thermal vent in Yangbajing, Tibet A. R..

**Keywords:** Thermal vent, ITS-rRNA gene, Eukaryotic microbes, Phylogenetic analysis

地热热泉、热井和热液出口是一些很奇特的生物世界, 里面除了有许多嗜热耐热的原核微生物外, 还有不少真核的微生物。美国 Lassen 火山国家公园酸性热液出口的沉积物和生物席中有许多原生生物, 包括壶菌(Chytridiomycota)、子囊菌(Ascomycota)、担子菌(Basidiomycota)、后生动物(Metazoan)和一些未分类的真核生物(Unclassified eukaryote), 它们分布于 15 °C–85 °C、pH 1.7–4.5 的热泉中<sup>[1]</sup>。温度梯度决定着微生物的种类和多样性, 通常细菌可以在高于 95 °C 的环境中生存, 蓝绿藻(Blue-green algae)则生活在 74 °C 以下, 真菌和真核藻类通常生活在 60 °C 以下, 而后生动物门(Metazoan)的某些微生物则生存在 50 °C 以下的环境<sup>[2]</sup>。国内早在 20 世纪 80 年代末 90 年代初就分别有人研究过热泉微生物的多样性和热泉中酵母的分布情况<sup>[3–4]</sup>。近年来有学者在云南洱源县热泉漂浮物中分离得到能产耐碱耐热木聚糖酶的疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus* YNUCC415), 是一种在工业上很有应用潜力的微生物<sup>[5]</sup>。

本文拟运用分子生物学分析技术, 构建 ITS-rRNA 基因文库, 初步研究羊八井热井沉积

物中真核微生物的多样性。

## 1 材料与方法

### 1.1 热井概况

采样的地点靠近羊八井地热电站, 是一口废弃的热井, 海拔 4 360 m, 热井编号为 303<sup>[6]</sup>, 现今已经封闭。采样点水温 67 °C, pH 值约 6.0。

### 1.2 采样方法与样品处理

用灭菌的容器采取沉积物样品和水样, 编号后放入盛有低温冷冻冰袋的保温箱中, 到实验室置于–40 °C 冰箱保存备用。

### 1.3 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂: 磷酸盐提取缓冲液, 5 mol/L Kac 溶液, 贮存于 4 °C 备用。CTAB、PEG 8000、TE 缓冲液, 均 1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 20 min。

PCR 扩增所用试剂: rTaq 酶(TaKaRa 公司)、dNTPs (TaKaRa 公司), 均贮存于 –20 °C。

真核微生物 ITS-rRNA 基因文库的克隆所用试剂: pMD18-T vector (TaKaRa 公司)试剂盒、均贮存于–20 °C; 氨苄青霉素溶液、CaCl<sub>2</sub> 溶液、LB 液体培养基、LB 固体培养基, 均贮存于 4 °C 备用。

通用试剂: TAE 溶液、EB (溴化乙锭)、凝胶电泳琼脂糖(西班牙 Biowest)、 $\lambda$ DNA/Hind III Marker (Tiangen 公司)、D2000 DNA Marker (Tiangen 公司)、100 bp DNA ladder (Tiangen 公司)、PCR 产物胶回收试剂盒(Omega 公司)、灭菌 3dH<sub>2</sub>O (三蒸水)若干。

克隆使用的工程菌: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 。

电泳仪(北京市六一仪器厂), 全自动凝胶成像分析系统(Syngene 公司), 温度梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司), 隔水式恒温培养箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司), 低温恒温水浴锅(德天佑科技发展公司)等。

#### 1.4 DNA 的提取与 ARDRA

样品总 DNA 的提取方法采用的是 Lai 等<sup>[7]</sup>的方法。提取的总 DNA 用 0.7%琼脂糖凝胶进行电泳并用胶回收试剂盒割胶回收, 置于 -20 °C 保存备用。

真核微生物 ITS-rRNA 基因的 PCR 扩增引物<sup>[8]</sup>为:

ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA A-3';

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

PCR 采用 50  $\mu$ L 体系, 加入模板 2.0  $\mu$ L。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 58 °C 50 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, 并割胶回收。使用 pMD18-T vector 进行连接反应, 并转化到 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中, 涂布得到长有克隆的氨苄平板, 置 4 °C 冰箱保存。

随机挑取克隆子(菌落)用 M13 引物进行菌落 PCR 扩增反应, 通过琼脂糖凝胶电泳检测其阳性。PCR 采用 25  $\mu$ L 体系, 加入模板 1.0  $\mu$ L。反应条件为: 98 °C 1 min; 94 °C 50 s, 54 °C 50 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

从克隆文库中随机挑取 96 个克隆子, 用

*Hae* III 内切酶和 *Bsh*1236 I 内切酶分别做扩增 rDNA 限制性酶切片段分析(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 得到的电泳图谱用 Gel-pro Analyzer 软件进行分析分类, 每种不同酶切电泳谱型作为一个分类操作单元(Operational taxonomic units, OTUs), 选取相应的克隆子送广州拓谱基因技术有限公司测序。

构建西藏羊八井 303 热井的 ITS 基因文库目的是为了反映热井中的真核微生物的种类与数量, 因此采用覆盖率(Coverage, C)来反映文库的库容, 并用 Shannon-Wiener index ( $H'$ )反映细菌的多样性<sup>[9-10]</sup>。Coverage 计算公式如下:

$$C=1-n_1/N$$

$N$  代表分析的有效 ITS-rRNA 基因克隆数,  $n_1$  则代表在 ITS-rRNA 基因文库中仅出现过 1 次的 OTU 的数量。

在 NCBI 网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)运用 VecScreen 在线检验工具去除载体序列, 并运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP (Ribosomal Database Project) 在线数据库中(<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi>)对序列进行嵌合体检验。运用 BLAST 程序将获得的序列在 GenBank 数据库中在线进行相似性搜索。选取相似性较高的为参照序列, 用 Clustal\_X 1.8 程序进行比对; 采用 Kimura\_2 参数模型计算进化距离, 通过邻接法和最大简约法, 运用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。经重复取样 1 000 次, 进行 Bootstrap 值分析, 最后得到可信心度最高的一棵。

#### 1.5 ITS-rRNA 基因序列注册登记

36 个 ITS-rRNA 基因序列已经提交到 GenBank 数据库, 登录号为 EU825614-EU825649。

2 结果与分析

2.1 ITS-rRNA 基因克隆文库的评价

用覆盖率(C)来评估所构建的 ITS-rRNA 基因文库的多样性,文库的覆盖率达 64.4%,  $H'$  为 3.40。覆盖率在一定程度上反映出热井沉积物的多样性,说明 303 热井中真核微生物比较丰富,  $H'$  值反映的是环境中物种数量和丰度的一个多样性指数,  $H'$  值越高则环境中微生物的多样性也就越丰富(表 1)。综合两个数值来看,热井中真核微生物类群丰富度是比较高的。

2.2 热井沉积物中真核微生物 ITS-rRNA 基因序列的比对分析

ITS-rRNA 基因序列的相似性比对分析表明其中 9 个克隆子可以明确确定归属,17 个克隆子由于分值(Total score)覆盖率(Query coverage)很低,不能完全确定其归属,另外还有 10 个克隆子没有检索到与它们同源的序列(表 2)。但是,实验表明热井沉积物中的真核微生物比较丰富。

在确定归属的 9 个克隆子中,有 8 个归属于子囊菌纲(Ascomycota),另外一个归属于担子菌纲(Basidiomycota)。8 个克隆子中又有 3 个归属于酵母科(Saccharomycetaceae)的近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)和鲁氏结合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*),3 个分别归属于肉座菌目(Hypocreales)的镰孢菌(*Fusarium* sp.)、穴壳科(Dothioraceae)的短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)和盘菌目(Leotiomyces)的 *Gloeotinia*

*temulenta*, 另外两个,一个属于子囊纲的丝状真菌另一个归属于 Uncultured soil fungus。17 个 BLAST 检索比对分值和覆盖率均不高的克隆子归属情况大致如下:有 3 个克隆子归属于 Uncultured fungus,4 个克隆子归属于原生生物 Ichthyosporea 纲,3 个克隆子归属于壶菌门(Chytridiomycota),3 个归属于古虫界(Rhizaria)的 Uncultured cercozoan,2 个归属于根肿菌(Plasmodiophorida),最后剩下两个分别归属于轮虫动物门(Lecane)和鲁氏结合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)。

2.3 系统发育分析

由于得到的真核微生物 ITS-rRNA 基因序列涉及门类很广,序列之间的差异性比较大,我们按照门类归属远近把序列分成 3 组来构建进化树,10 个没有显著相似性的序列没有参与构建系统发育树。如图 1 所示,系统发育树 A、B 和 C 上的克隆子分别属于后生动物门(Metazoan)、壶菌门和子囊菌-担子菌纲,3 棵树均以花色曲霉(*Aspergillus versicolor*)的 ITS 基因序列作为外群(登录号为 AM883156)。

从系统发育树 A 中可以看到,克隆子 yang-Bi91 应归属于轮虫(Lecane), yang-Bi66 进化距离比较远,归属不明确,其它克隆子应归属于后生动物(Metazoan);从系统发育树 B 则可以明显看到所有参与建树的克隆子归属于壶菌(Chytridiomycota)的可能性比较大;再看系统发育树 C,分支点自引导值 74 分支点下面的

表 1 西藏羊八井废弃热井沉积物真核微生物 ITS-rRNA 基因克隆文库的分析						
Table 1 Analysis of eukaryotic ITS-rRNA gene library constructed from a disused thermal vent sediment in Yangbajing, Tibet A. R.						
Samples	Sum of clones analyzed by ARDRA	Rate of positive clones (%)	N	<sup>a</sup> OTUs	C (%)	H'
Sediment	96	90.6	87	53 (31)	64.4	3.40

Note: <sup>a</sup>OTUs: The number in bracket in OTUs list shows the sum of OTUs which appeared just one time in analysis by ARDRA.

表 2 西藏羊八井废弃热井沉积物真核微生物 rRNA 基因 ITS 间隔区序列相似性比对结果 Table 2 Result of eukaryotic rRNA gene ITS spacer from a disused thermal vent sediment in Yangbajing, Tibet A. R.			
Clones	GenBank accession No.	Most similar sequence (GenBank accession No.)	Similarity (%)
yang-Bi1	EU825614	<i>Candida parapsilosis</i> (EU564206)	99
yang-Bi3	EU825615	Uncultured cercozoan (DQ457087)	100
yang-Bi5	EU825616	No significant similarity	–
yang-Bi7	EU825639	<i>Sphaerothecum destruens</i> (AY388645)	100
yang-Bi8	EU825617	<i>Fusarium</i> sp. (DQ682581)	96
yang-Bi10	EU825618	<i>Chytridiales</i> sp. (EU352773)	100
yang-Bi12	EU825640	<i>Sphaerothecum destruens</i> (AY388645)	98
yang-Bi20	EU825619	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (AB363060)	89
yang-Bi22	EU825620	<i>Candida parapsilosis</i> (EU564206)	99
yang-Bi23	EU825641	Uncultured fungus (EU292375)	100
yang-Bi24	EU825621	No significant similarity	–
yang-Bi25	EU825642	<i>Sphaerothecum destruens</i> (AY388645)	98
yang-Bi26	EU825622	Uncultured fungus (AF504875)	85
yang-Bi27	EU825623	No significant similarity	–
yang-Bi28	EU825624	<i>Powellomyces</i> sp. (AY349100)	85
yang-Bi29	EU825625	<i>Aureobasidium pullulans</i> (EU547495)	99
yang-Bi37	EU825626	<i>Physoderma maydis</i> (AY997072)	93
yang-Bi40	EU825627	<i>Candida parapsilosis</i> (EU564206)	97
yang-Bi42	EU825643	No significant similarity	–
yang-Bi45	EU825628	No significant similarity	–
yang-Bi61	EU825629	Uncultured fungus (EU292330)	82
yang-Bi64	EU825630	No significant similarity	–
yang-Bi66	EU825644	<i>Sphaerothecum destruens</i> (AY388645)	90
yang-Bi71	EU825645	No significant similarity	–
yang-Bi77	EU825646	No significant similarity	–
yang-Bi78	EU825631	Uncultured basidiomycete (AM902048)	99
yang-Bi81	EU825647	No significant similarity	–
yang-Bi83	EU825632	Uncultured ascomycete (AM902077)	99
yang-Bi86	EU825633	Uncultured cercozoan (DQ457087)	100
yang-Bi87	EU825634	Uncultured plasmodiophorida (AM260825)	97
yang-Bi89	EU825635	Uncultured cercozoan (DQ457087)	100
yang-Bi90	EU825648	No significant similarity	–
yang-Bi91	EU825649	<i>Lecane bulla</i> (EU202664)	82
yang-Bi92	EU825636	<i>Gloeotinia temulenta</i> (DQ235697)	99
yang-Bi95	EU825637	Uncultured plasmodiophorida (AM260825)	97
yang-Bi96	EU825638	Uncultured soil fungus (DQ421028)	99

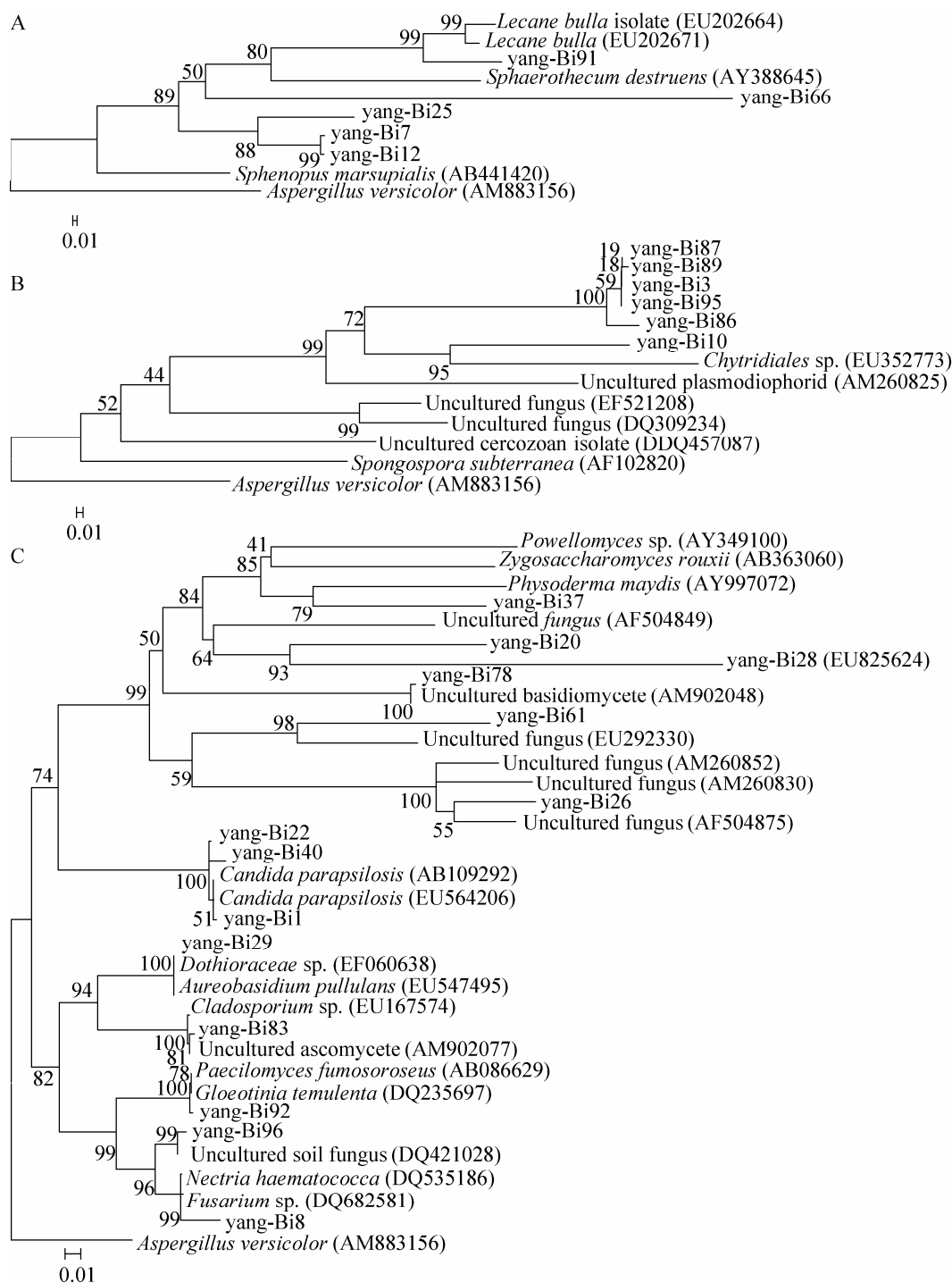


图1 西藏羊八井废弃热井沉积物中真核微生物 ITS-rRNA 基因系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic trees of eukaryotic microbes in sediment from the disused thermal vent in Yangbajing, Tibet A. R.

Note: Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among ITS-rRNA gene sequences (accession number from EU825614 to EU825649) of eukaryotic microbes in sediment from a disused thermal vent in Yangbajing, Tibet A. R. and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. The three trees all were rooted by *Aspergillus versicolor* ITS gene sequence (AM883156). The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence. A: Clones belong to phylum Metazoa and Cercozoan; B: Clones belong to Chytridiomycota; C: Clones belong to Ascomycota, Basidiomycota and Chytridiomycota.

克隆子均属于子囊菌, 进化距离均比较接近; 自引导值 74 分支点上面的克隆子归属比较复杂, 有归属于非培养担子菌 (Uncultured basidiomycete) 的克隆子 yang-Bi78, 有归属于壶菌的克隆子 yang-Bi37, 有归属于非培养真菌 (Uncultured fungus) 的 yang-Bi26 和 yang-Bi67, 还有归属不明的 yang-Bi20 和 yang-Bi28, 进化距离和其它分支比较远。

### 3 讨论

#### 3.1 关于序列相似性比对与系统发育分析出现相异情况的分析

从 ITS-rRNA 基因序列相似性比对分析和系统发育分析的结果来看, 两种分析结果出现了相异的情况, 相似性比对分析归属明确的 9 个克隆子在系统发育分析中均没有出现偏差, 均与最相似的种属相邻, 相应的分支点的自引导值也比较高。系统发育树 A 的克隆子 BLAST 比对时最相近的归属均为 *Sphaerothecum destruens*, 而在系统发育树中只有一个克隆子 yang-Bi91 接近 *Sphaerothecum destruens*, 其它克隆子相距都比较远。系统发育树 A 克隆子总体上均归属于 Metazoa, 这一点没有变化(从自引导值上可以得出)。系统发育树 B 中克隆子 BLAST 比对时唯有 yang-Bi10 归属于壶菌, 其余均非壶菌, 其中有 3 个克隆子相似性比对归属根肿菌, 但是在系统发育树中均聚在一起与壶菌相邻, 而离根肿菌远一些。系统发育树 C 中克隆子除了 yang-Bi20 和 yang-Bi28 相似性比对分别归属酵母菌和壶菌, 而系统发育分析却无明确归属外, 其余克隆子的两种分析结果均基本一致。造成上面某些序列在相似性比对和系统发育分析归属不一致的原因, 主要是序列比对得到相应的最相似序列与克隆子序列之间匹配的分值太低和覆盖率太低, 如系统发育树

A 中除 yang-Bi91 与相对应的最相似序列的匹配分值达 300 以上覆盖率达 60%外, 其余克隆子序列与其相对应的最相似序列的匹配分值均低于 300, 覆盖率均小于 40%, yang-Bi66 的匹配分值和覆盖率甚至分别只有 207 和 16%。系统发育树 B 和 C 的情况同样如此, 如 yang-Bi28 与最相似的序列的匹配分值低达 102, 覆盖率也只有 13%。此外造成某些克隆序列两种分析结果不一致的情况还可能与系统发育分析的算法有关。

#### 3.2 热井中真核微生物类群的分布及特征

从 ITS-rRNA 基因克隆文库的分析结果可以看出, 西藏羊八井热井沉积物中存在真核生物的主要类群有壶菌、子囊菌、担子菌、古虫界生物、后生动物和非培养的真菌, 此外还有一些未找出亲缘关系的克隆子。

壶菌 (Chytridiomycota) 能生活在高酸性且温度高达 68 °C 的热泉沉积物中, 目前发现的热泉中的壶菌有 *Chytridiomycota* sp. 和 *Rhizophydium* sp.<sup>[1]</sup>。而西藏羊八井 303 热井中发现的壶菌主要有 *Chytridiales* sp.、*Physoderma maydis* 和 *Powellomyces* sp. 三种。Gleason 等<sup>[11]</sup>对从干旱高温土壤中分离得到的壶菌进行环境压力生存机制研究, 发现 *Rhizophydium* sp.、*Catenophlyctis* sp. 和 *Spizellomyces* sp. 在 90 °C 条件下培养 2 d 后, *Powellomyces* sp. 在 80 °C 培养 2 d 后, 一边抽真空一边振荡, 一边补加培养基让其膨胀, *Rhizophydium* sp. 菌丝体马上释放出游离孢子来, 这说明壶菌在某些时候可以通过自我构筑结构来防范干旱和高温<sup>[10]</sup>。

李绍兰等<sup>[4]</sup>通过培养法研究热泉中酵母种类和分布, 从 40 °C–80 °C 范围内热泉水中、漂浮物和沉积物中均分离得到了酵母, 其中假丝酵母 (*Candida*)、红酵母 (*Rhodotorula*) 和隐球酵母 (*Cryptococcus*) 属为优势种群, 40 °C 以下没有

发现隐球酵母属的存在。肖凯等<sup>[12]</sup>在 68.5 °C 热泉中发现了酵母 *Lodderomyces* sp.。Ueno Ryohei 等<sup>[13-14]</sup>在 40 °C 的热泉出口中发现有多种酵母的存在,而且这些酵母能在 55 °C 的发酵罐中发酵并产生乙醇。通过实验证明西藏羊八井 303 热井沉积物中只有两种酵母,一种是近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*),一种是鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*),其中近平滑假丝酵母(*C. parapsilosis*)占有一定的种群优势,两种酵母均未有存在于热泉中的报道。

除酵母外,已发现有不少子囊菌纲的类群存在于热泉中。*Pezizomycotina* sp.生活在 45 °C 的绿席上<sup>[1]</sup>, 68.5 °C 的热泉沉积物中发现有青霉菌(*Penicillium* sp.)和 *Gloeotinia* sp.等子囊菌<sup>[12]</sup>。还有研究者在 50 °C 的热泉沉积物中发现有耐热且具有使金矿化的子囊菌曲霉<sup>[15]</sup>,我国台湾的学者研究了不同季节热泉沙土(Hot spring soil)中真核微生物的生长变化情况,发现季节变化影响真核微生物的生长,但优势菌群几乎没有发生变化,仍然以曲霉和无孢菌类(*Mycelia sterilia*)为主<sup>[16]</sup>。实验结果表明在西藏羊八井 303 热井沉积物中也有真菌存在,主要有镰孢菌(*Fusarium* sp.)、短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)和 *Gloeotinia temulenta* 等,其中短梗霉尚未有存在于高温热泉沉积物中的报道。

古虫界(Rhizaria)的微生物存在于热泉中的报道不多见。已知报道美国 Lassen 火山国家公园 68 °C 酸性热液出口的沉积物中发现有丝足虫类<sup>[1]</sup>(Cercozoan),在西藏羊八井 303 热井沉积物中也有疑是 Cercozoan 的真核微生物存在。但是在西藏羊八井 303 热井沉积物中发现的后生动物轮虫(Lecane)尚未有存在于热泉中的报道。另外,在西藏羊八井 303 热井沉积物中还发现有类似于非培养担子菌(Uncultured basidiomycete)(GenBank 登录号为 AM902048)

存在于热井沉积物中,国外在 68 °C 酸性热液出口的沉积物中也发现有非培养担子菌<sup>[1]</sup>。

虽然本文在研究过程中,存在引物设计多样性和样品采集数量不足,采样点靠近羊八井地热电站,是一口废弃的热井,采样点的环境受到一定程度的破坏,不能完全反映出原有生物类群的种类等缺点。但是,由于热井废弃的时间较长,使得热井的水质和生物多样性得到一定程度的恢复。为此,在一定程度上反映了西藏羊八井废弃热井真核微生物类群的多样性。

## 参考文献

- [1] Brown PB, Wolfe GV. Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen volcanic national park, USA[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2006, 53(6): 420-431.
- [2] Mitchell R. The evolution of thermophily in hot springs[J]. The Quarterly Review of Biology, 1974, 49(3): 229-242.
- [3] Zhang Y. Thermophilic microorganisms in the hot springs of Tengchong geothermal area, West Yunnan, China[J]. Geothermics, 1986, 15(3): 347-358.
- [4] 李绍兰, 陈有为, 方霭祺. 云南热泉酵母菌的初步调查研究[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 179-182.
- [5] 李文鹏, 陈静, 廖昌珑, 等. 疏棉状嗜热丝孢菌耐 *Thermomyces lanuginosus* YNUCC415 碱热稳定木聚糖酶的特性及其产生菌的系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4): 480-483.
- [6] 赵平, 金建, 张海政, 等. 西藏羊八井地热田热水的化学组成[J]. 地质科学, 1998, 33: 61-72.
- [7] Lai XT, Zeng XF, Fang S, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of bacterial community composition in deep-sea sediments of the South China Sea[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2006, 22: 1337-1345.
- [8] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2: 113-118.
- [9] Molles MC. Ecologie: concepts and application(影印版)[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] Good IL. The population frequencies of species and



- the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264.
- [11] Gleason FH, Letcher PM, McGee PA. Some Chytridiomycota in soil recover from drying and high temperatures[J]. *Mycological Research*, 2004, 108(5): 583-589.
- [12] 肖凯, 曹理想, 陆勇军, 等. 广东金山温泉沉积物中原核与真核微生物多样性初步分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(6): 717-724.
- [13] Ueno R, Hamada-sato N, Urano N. Fermentation of Molasses by several yeast from hot spring drain and phylogeny of the unique isolate producing ethanol at 55 °C[J]. *Journal of Tokyo Fisheries*, 2003, 90: 23-30.
- [14] Ueno R, Urano N, Kimura S. Characterization of thermotolerant fermentative yeast from hot spring drainage[J]. *Fisheries Science*, 2001, 67: 138-145.
- [15] 薛堂荣, 陈昭蓉, 彭世群, 等. 云南西藏热泉中主要微生物类群及其金成矿作用的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 1998, 4(3): 271-276.
- [16] Chen KY, Huang DJ, Liu CC. The mycoflora of hot spring soil in northern Taiwan[J]. *Taiwania*, 2003, 48(3): 203-211.

~~~~~

(上接 p.1986)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>