



专论与综述

中国温泉微生物物种多样性及其酶活性研究进展

马瑞^{Δ1,2,4} 陈成^{Δ3,4} 李海峰^{3,4} 祝雪禧³ 宋可馨³ 袁梦³ 肖文¹ 杨晓燕¹ 王开玲^{*3,4}

1 大理大学东喜玛拉雅研究院 云南 大理 671003

2 大理大学公共卫生学院 云南 大理 671000

3 大理大学药学与化学学院 云南 大理 671000

4 大理大学药物研究所 云南 大理 671000

摘要: 微生物作为生物群体的重要组成成员,其生长受外界物化条件(如温度、盐度、pH等)影响较大。温泉作为极端水生环境之一,属于相对稳定且较为特殊的生态系统,使生长于其中的微生物可能具有适应高温等特殊生境的独特生存生理机制,具体表现为微生物物种及其活性次级代谢产物呈现出一定的多样性与新颖性。本文从菌株物种多样性分析及其酶活性研究方面,综述了近5年来国内温泉微生物相关研究进展,以期为温泉等极端环境微生物资源开发与保护提供参考。

关键词: 温泉, 微生物, 物种多样性, 酶活性

Species diversity and enzymatic activity of microorganisms in Chinese hot springs: a review

MA Rui^{Δ1,2,4} CHEN Cheng^{Δ3,4} LI Hai-Feng^{3,4} ZHU Xue-Xi³ SONG Ke-Xin³
YUAN Meng³ XIAO Wen¹ YANG Xiao-Yan¹ WANG Kai-Ling^{*3,4}

1 Institute of Eastern-Himalaya Biodiversity Research, Dali University, Dali, Yunnan 671003, China

2 School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

3 School of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

4 Institute of Materia Medica, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

Abstract: As an important component of the biological community, the growth of microorganisms is greatly affected by external physicochemical conditions (such as temperature, salinity, pH, etc.). Hot springs, as one of the extreme aquatic environments, belong to a relatively stable and special ecosystem. Microorganisms growing in hot springs may have special survival physiological mechanisms that are adapted to special environments such as high temperatures. More specifically, diversity and novelty are

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41706155, 31760126, 31360013); Development and Utilization of Characteristic Medicinal Plants in Western Yunnan & Bai Nationality Medicines (ZKLX2019106)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: kailingw@dali.edu.cn

Received: 30-03-2020; **Accepted:** 24-08-2020; **Published online:** 03-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41706155, 31760126, 31360013); 滇西特色药用植物与白族药开发利用创新团队(ZKLX2019106)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: kailingw@dali.edu.cn

收稿日期: 2020-03-30; 接受日期: 2020-08-24; 网络首发日期: 2020-09-03

high in microbial species and their active secondary metabolites. This paper reviews the research progress of microorganisms in Chinese hot springs from January 2015 to August 2020 with a focus on microbial species diversity and enzymatic activity, in order to provide references for the exploitation and protection of microbial resources in hot spring and other extreme environments.

Keywords: Hot spring, Microorganism, Species diversity, Enzymatic activity

温泉, 多数作为一种孤立存在的极端水生环境, 可能近似地球早期环境^[1-2], 其生态系统的温度、酸碱度及养分构成等均不同于一般生境, 从而使生长其中的微生物在进化适应过程中形成了高度分散的基因结构和功能特征, 呈现出独特的物种分布特征。研究表明, 温泉保留了最为原始的菌种资源, 而且空间距离较为接近的温泉之间也可能保留了各自的特有物种及一些新的微生物资源, 尤其是嗜热菌株。同时, 在热泉生态系统中生存的微生物, 往往会在长期适应进化过程中形成独特的产酶特性, 这些活性酶催化了温泉生境中的众多生化反应, 在温泉生态系统中营养物质循环和能量代谢及生产应用等过程中扮演着重要角色^[3]。目前, 菌株的产酶特性也是温泉微生物资源报道较多的生物活性。

我国温泉资源相对丰富, 目前主要有两大温泉分布区: (1) 以西部的藏南、川西、滇西地区为最多, 水热活动也最为强烈, 是沸喷泉、间歇喷泉和水热爆炸等高温热泉的集中区; (2) 以闽、粤、琼三省为主体的我国大陆东南沿海地区以及中国台湾地区是我国温泉广布和密集的地带, 大于 80 °C 的温泉数颇多, 温度虽达到沸点, 但无沸泉出现, 但相对于我国东部其他地区来说, 仍是水热活动较活跃的地区。以上两大温泉分布地的微生物资源研究报道较多。此外, 东北、西北和华北地区温泉分布较为稀少, 水热活动也不强烈, 目前这些地区的温泉相关研究较少。本文聚焦以上区域分布的温泉微生物研究状况, 综述近 5 年来我国云南、西藏、福建等 7 个省(自治区)的温泉微生物物种多样性分析及其酶活性研究成果, 探究我国温泉特境中的微生物菌种分布特征, 挖掘其微生物资源的潜在生态及生产

利用价值, 以期为促进我国温泉资源的保护与合理开发提供参考与合理指导。

1 中国温泉细菌菌种分布格局及其酶活性

1.1 云南温泉

云南省是中国地质构造最复杂、新构造最活跃的地区, 温泉资源几乎遍布全省, 据现有资料统计, 全省温泉 1 015 处, 约占全国总数的 1/3, 数量分布居全国之首^[4]。其中, 位于滇西的腾冲地处亚欧板块和印度板块的碰撞带上, 地下断层非常明显, 构造活动强烈, 经过漫长的演变, 造就了世界上最密集的火山群与热泉群。腾冲县境内有 80 多个地热显露区域, 数量之多堪称国内第一, 而且其种类之多也为国内少见。相对于其他地区的温泉微生物资源研究, 近 5 年来, 滇西地区极端温泉生境中的微生物相关报道主要聚焦于腾冲温泉。

采用微生物可培养方法, 研究者先后从云南省腾冲县温泉中共分离得到了 9 个属的 11 种细菌, 包括生存条件较为特殊的栖热菌属(*Thermus*)、亚栖热菌属(*Meiothermus*) 和无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)等细菌类群(表 1)。Zhang 等^[5]利用纯培养方法自腾冲温泉中分离出 *Anoxybacillus* sp. YIM 342, 该菌株可产生一种新颖的 α -淀粉酶(1,4- α -D-葡糖酸水解酶), 使支链淀粉及直链淀粉高速水解, 而且对温度变化有一定抵抗力, 在生物燃料、洗涤剂及食品工业中将会有良好的应用。Jiang 等^[6]采用纯培养方法从腾冲热海地热区 SRBZ 温泉水样分离出一株新型自养型亚砷酸盐氧化细菌 *Anoxybacillus flavithermus* TCC9-4, 该菌株能产生 As^{III} 氧化酶, 在化学自养条件下, TCC9-4 菌株能在 36 h 内氧化 90% 以上的 100 mg/L

As^{III}; 同时, 未在与 TCC9-4 具有较近亲缘关系的多株 *A. flavithermus* 菌株基因组中发现类似 *aioA* 基因, 表明该菌株中的 *aioA* 基因与已知同物种相关基因相比具有一定的新颖性; 该研究也拓展了目前对于微生物介导的砷氧化反应的理解。Wu 等^[7]由腾冲地热地区的大滚锅 2 号温泉中分离得到了一株脱硫肠状菌属菌株 *Desulfotomaculum* sp. TC-1, 并利用该菌株的基因组成功扩增出编码厌氧亚砷酸氧化酶的 *arsA* 基因, 该基因在厌氧条件下具有氧化亚砷酸盐的潜在能力, 表明嗜热微生物可能参与了硫砷酸盐的形成, 并为硫砷酸盐在陆地地热环境中的广泛分布提供了一种可能的解释。以上研究结果初步表明, 云南腾冲热泉生态系统中可培养细菌种类较为丰富, 而且表现出与其温泉特殊生境相适应的生理生化特性。此外, 研究者还从腾冲温泉中共分离得到了 7 株新型细菌, 主要隶属于栖热菌属和亚栖热菌属菌株, 具有一定的物种多样性, 而且这些菌株多数具有嗜热、嗜酸或嗜碱等极端环境微生物生存特性(表 1)。

由于温泉生态系统较为特殊, 许多特殊类群的微生物菌株通过现有的一般可培养方法较难获得, 因此高通量测序技术等引入, 可使人们充分挖掘菌群中的独特基因信息, 使人们对于温泉生境中微生物的物种分布格局及潜在生物活性有

进一步了解。近年来, 高通量测序技术已开始应用于温泉生态系统中的微生物资源物种分布格局及其潜在产酶特性挖掘相关研究, 可帮助人们进一步了解菌群分布与其所处生态环境的相关性。

Li 等^[12]采用 CARD-FISH、qPCR 和 16S rRNA 基因相结合的非培养方法, 研究了腾冲地热田(50–90 °C)随温度变化的土壤微生物丰度、群落结构和多样性, 发现在低温条件下(52.3–74.6 °C), 微生物群落以细菌为主导, 细菌占细胞总数的 60%–80%; 在 74.6 °C 时, 古细菌占主导地位; 但在 90.8 °C 时, 古细菌可占细胞总数的 90% 以上; 另外, 该研究还发现热袍菌属(*Thermotoga*)、高温厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)、火山鬃菌属(*Vulcanisaeta*)、超热菌属(*Hyperthermus*)和 *Caldisericum* 均在高温环境中占优势, 氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)活性与温度呈正相关。上述研究结果说明随着温度升高, 腾冲地热田中细菌群落减少, 而古菌群落增加且其 AOA 活性增加。Yang 等^[13]对腾冲的鼓鸣泉、姊妹泉和金泽等 6 个温泉(22.1–90.8 °C)的水样提取 DNA 后, 用 *Oligotroph*a、*Mycobacterium* 和 *Pseudomonas* 基因特异性引物从提取的 DNA 样本中扩增出细菌的 *coxL* 基因, 得到了 100 个 *coxL* 基因克隆, 分为 16 个 OTU, 主要是属于与 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)

表 1 云南腾冲温泉细菌的酶活性及其新型菌株^[5–11]
Table 1 Enzymatic activity of bacteria and new species from Tengchong hot springs of Yunnan^[5–11]

种属	培养温度	酶活性
Genus and species	Culture temperature (°C)	Enzymatic activity
<i>Anoxybacillus</i> sp. YIM 342	50	α -淀粉酶 Alpha-amylase
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> TCC9-4	40	As ^{III} 氧化酶 As ^{III} oxidase
<i>Metallosphaera tengchongensis</i> Ric-A (new species)	60	氧化酶 Oxidase
<i>M. tengchongensis</i> Ric-F (new species)	40–50	氧化酶 Oxidase
<i>Meiothermus roseus</i> YIM71031 (new species)	55–75	—
<i>M. roseus</i> YIM71039 (new species)	37–65	—
<i>Crenalkalicoccus roseus</i> YIM78023 (new species)	37–65	—
<i>C. roseus</i> YIM78058 (new species)	20–60	—
<i>Thermus amyloliquefaciens</i> YIM77409 (new species)	25–60	—

注: —: 文献中无该数据报道。
Note: —: No reported data.

和异常球菌纲(*Deinococci*)相关的 *coxL* 基因。Menzel 等^[14]对来自中国、冰岛、意大利、俄罗斯和美国的 8 个全球分布的温度在 61–92 °C 之间、pH 值在 1.8–7.0 之间的陆地温泉进行了基因组分析,发现中国洱源的某个温泉(65 °C、pH 7.0)中有 72.1%的细菌和 19.3%的古细菌组成;与温度较高地点不同的是,洱源温泉中最丰富的古生菌是广古菌门(*Euryarchaeota*) (11%),主要包括甲烷微菌纲(*Methanomicrobia*)和 *Archaeoglobacae*,最丰富的细菌是热袍菌门(*Thermotogae*),其次是厚壁菌门(*Firmicutes*)和网团菌门(*Dictyoglomi*);同时含有 29%细菌读数不能归属于域内的细菌门,表明了该温泉的细菌物种可能具有一定的物种新颖性。Jiang 等^[15]通过对腾冲地热区的低氯硫酸盐珍珠泉(89.1–93.3 °C)的水样和沉积物进行 Illumina MiSeq 测序,研究其微生物群落结构和砷地球化学,从水样中获得了超过 30 万个 16S rRNA 基因序列,充分显示了该温泉的细菌物种多样性;在该温泉的上游区域,细菌类群以嗜微氧/厌氧嗜热菌和超嗜热菌为主,而在下游区域则发现了好氧异养的中嗜热菌和嗜热菌,菌种分布存在较为明显的流域差异性,这可能是由于该温泉下游区域砷的浓度远高于上游区域,从而抑制了部分微生物的生长,呈现出不同的细菌群落分布特征。随后, Jiang 等^[16]选择腾冲地热区具有代表性的富碱性硫化物温泉姊妹泉(90.3–93.6 °C)的水和沉积物样品,利用 Illumina MiSeq 测序研究其砷地球化学和微生物群落,共获得了 256 883 个序列,水样中的微生物细菌类群与同一样点的沉积物样品细菌群落组成结构相似,但比例有显著差异,表现为变形菌门和泉古菌门比重增加,而产水菌门的比重减少;沿出水口排放后,下游水样的微生物群落除含有与池中的水样所包含的产水菌门、变形菌门和热脱硫杆菌门外,还同时含有异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、热袍菌门(*Thermotogae*)和绿弯菌

门(*Chloroflexi*),而下游沉积物中的微生物主要类群组成与上游相比,增加了装甲菌门(*Armatimonadetes*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、异常球菌-栖热菌门和厚壁菌门(*Firmicutes*),而且未分类门的细菌数量多于相对应的水样品;对水样与沉积物的砷、硫浓度测定发现,由于硫砷转化,沿着流出渠道该温泉池中亚砷酸盐、硫化物和硫酸盐浓度均显著增高。综合上述微生物群落结构变化与地球化学研究结果,研究者认为该碱性温泉中的微生物群落变化可能介导了该温泉中的硫砷转化。此外, Jiang 等^[17]采用非培养方法发现云南省西部昌宁县的鸡飞温泉(73.5 °C)中含有少量的以产水菌门(*Aquificae*)为代表的蓝藻(*Cyanophyta*),但优势微生物菌群为硫氧化细菌,这可能与该温泉高温高硫含量的生态环境相关。

1.2 西藏温泉

西藏处地中海-喜马拉雅地热带的中东部,自治区内构造极为复杂,岩浆活动和变质作用强烈,是全球地热活动最强烈的地区之一。早在 20 世纪 50 年代,国内外学者就已经开始关注西藏地热分布特征、规律、地热田地球化学和地热能发电等方面研究^[18–22],但对其微生物资源开发利用尚无报道。直至 2016 年,研究者才开始对西藏塔格架和曲卓木地热区部分温泉的微生物资源展开系统研究^[23–24](表 2)。

鲜文东^[23]首先用 Biolog ECO 微孔板技术研究了塔格架地热区沙状沉积物、泥状沉积物、热气孔黄壤和热气孔沙土 4 类代表性样品(32–86 °C)的微生物群落代谢特征,发现不同地热环境下微生物的代谢特征差别明显,沉积物中生物量少,在微孔板孵育过程中无法检测到代谢活动,而在热气孔中的微生物群落代谢活跃,表现出了丰富的代谢多样性;聚类分析发现,热泉沉积物中高温菌的代谢较为相似,而热汽孔土样中的高温菌群落代谢明显区别于热泉沉积物,且彼此间存在明显差异;同时,对该区 15 个样品中的微生物进行

表 2 西藏温泉细菌的酶活性及其新型菌株^[23-24]Table 2 Enzymatic activity of bacteria and new species from Tibet hot springs^[23-24]

温泉 Hot spring	种属 Genus and species	酶活性 Enzymatic activity
西藏塔格架地区 ^[23]	<i>Anoxybacillus caldiproieolyticus</i> YIM 78677	纤维素酶 Cellulase
Tower frame geothermal area of Tibet ^[23]	<i>A. rupiensis</i> YIM 78519	木聚糖酶 Xylanase
	<i>A. rupiensis</i> YIM 78570	
	<i>A. rupiensis</i> YIM 78659, YIM 78675	
	<i>A. tepidamans</i> YIM 78678	木聚糖酶、纤维素酶 Xylanase, cellulase
	<i>Bacillus aerius</i> YIM 78509, YIM 78542, YIM 78550	纤维素酶 Cellulase
	<i>B. aerius</i> YIM 78593, YIM 78631, YIM 78701	木聚糖酶、纤维素酶、微晶纤维素酶 Xylanase, cellulase, microcrystalline cellulase
	<i>B. aerius</i> YIM 78560, YIM 78723	
	<i>B. aerius</i> YIM 78615	
	<i>B. aerius</i> YIM 78668	纤维素酶、微晶纤维素酶 Cellulase, microcrystalline cellulase
	<i>B. aerophilus</i> YIM 78406	木聚糖酶、纤维素酶 Xylanase, cellulase
	<i>B. aerophilus</i> YIM 78404	木聚糖酶、纤维素酶、微晶纤维素酶 Xylanase, cellulase, microcrystalline cellulase
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YIM 78660	纤维素酶 Cellulase
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YIM 78726	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YIM 78788	
	<i>B. licheniformis</i> YIM 78520, YIM 78523, YIM 78524	木聚糖酶、纤维素酶 Xylanase, cellulase
	<i>B. licheniformis</i> YIM 78527, YIM 78556, YIM 78690	
	<i>B. licheniformis</i> YIM 78925, YIM 78944	
	<i>B. sonorensis</i> YIM78407	—
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> YIM 78414, YIM 78709	木聚糖酶、纤维素酶 Xylanase, cellulase
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> YIM 78625	木聚糖酶、纤维素酶、微晶纤维素酶 Xylanase, cellulase, microcrystalline cellulase
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78517, YIM 78518, YIM 78589	木聚糖酶 Xylanase
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78522, YIM 78525	纤维素酶 Cellulase
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78528, YIM 78579	木聚糖酶、纤维素酶 Xylanase, cellulase
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78521, YIM 78526, YIM 78543	
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78564, YIM 78567, YIM 78575	
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78576, YIM 78583, YIM 78584	—
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78596, YIM 78655, YIM 78661	
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78671, YIM 78687	
	<i>B. tequilensis</i> YIM 78688, YIM 78689	纤维素酶 Cellulase
	<i>Brevibacillus thermoruber</i> YIM 78300 (new species)	
	<i>B. thermoruber</i> YIM 78540	
	<i>Geobacillus kaustophilus</i> YIM 78515	木聚糖酶 Xylanase
	<i>G. kaustophilus</i> YIM 78588, YIM 78645	纤维素酶 Cellulase
	<i>G. thermoleovorans</i> YIM 78507, YIM 78508	
	<i>G. thermoleovorans</i> YIM 78658	
	<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YIM 78676	纤维素酶 Cellulase
	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> YIM 78680	
	<i>Microvirga vignae</i> YIM 78597	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> YIM 78679	木聚糖酶、纤维素酶、微晶纤维素酶 Xylanase, cellulase, microcrystalline cellulase
	<i>Streptomyces echinoruber</i> YIM 78536	木聚糖酶 Xylanase

(待续)

(续表 2)

西藏塔格架热泉、曲卓	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i> YIM 75004 (new species) –	
木地热区热泉 ^[24]	<i>A. troitsensis</i> YIM 75003 (new species)	–
Tower frame and qu	<i>Bacillus methylotrophicus</i> YIM 75157	纤维素酶 Xylanase
zhuomu thermal	<i>Bacillus</i> sp. YIM 75160, YIM 75187	
springs in Tibet ^[24]	<i>Bacillus</i> sp. YIM 75011, YIM 75174	几丁质酶 Chitinase
	<i>Geobacillus</i> sp. YIM 75316	

注：塔格架地热区位于西藏自治区西南部的日喀则地区昂仁县境内，样品温度 32–86 °C^[23]；曲卓木地热区热泉群位于西藏南部的错那县，塔格架热泉群位于西藏自治区昂仁县内，热泉样品温度范围 45.5–78 °C^[24]；–：文献中无该数据报道。

Note: Tower frame geothermal area is located in Angren county of Shigatse area in the southwest of Tibet, and the temperature of samples is ranging from 32 °C to 86 °C^[23]; Qu zhuomu and Tower frame thermal springs are located in Cona county and Angren county of Tibet, and the temperature of samples is ranging from 45.5 °C to 78 °C^[24]; –: No reported data.

了分离、纯化与培养，得到 378 株高温细菌，依据其 16S rRNA 基因序列的测序结果，分析发现这些菌株分布于细菌域的 5 个门 6 个纲 12 个目 17 个科和 26 个属，其中细菌有 20 个属，以芽孢杆菌属(*Bacillus*)、栖热菌属和亚栖热菌属等 6 个属的细菌为优势菌群，选择其中 150 株具有代表性的高温菌株进行了纤维素和木聚糖降解实验，发现超过 1/3 的菌株可降解纤维素、半纤维素或羧甲基纤维素，41 株可降解木聚糖，这些活性菌株主要集中在芽孢杆菌属、无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)和地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)，而且可降解微晶纤维素的 9 株细菌均属于芽孢杆菌属(表 2)。该研究揭示了西藏塔格架地热区可培养高温细菌的物种多样性，并且提供了大量具有产酶特性的芽孢杆菌属菌株，为人们深入理解塔格架地热区高温菌的多样性及其产酶菌株的后续开发都具有重要指导意义。

袁昌果^[24]以塔格架和曲卓木地热区两个样点(45.5–78 °C)的 10 份沉积物为研究对象，应用高通量测序技术，结合 OTU 数据和地球化学参数进行生物信息学分析，发现该地区细菌的优势类群主要是绿弯菌门(*Chloroflexi*)和产水菌门(*Aquificae*)等，古菌的优势类群是 *Parvarchaeota* 和泉古菌门(*Crenarchaeota*)，这两个样点的微生物物种多样性极为丰富且存在多种未知类群。从以上两个热泉样点各选取了 5 份沉积物样品进行微生物分离、纯化与培养，共分离获得了 382 株细菌，其

中从塔格架和曲卓木样点分别分离得到了 145 株和 237 株细菌，发现了 *Altererythrobacter* 属的两株新种细菌 *A. lauratis* YIM75003 和 *A. palmitatis* YIM75004；对比两样点细菌微生物物种分布格局发现，虽然曲卓木样点的菌株数目多于塔格架样点，但其物种多样性较低，以上两地细菌群落构成既有共性又有特性，共性表现在其主要类群相同，即以无氧芽孢杆菌属、栖热菌属、亚栖热菌属、芽孢杆菌属、地芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)为优势菌，特性主要表现为塔格架地热区分布有一些细菌稀有类群，主要包括橘色杆菌属(*Sandaracinobacter*)、新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)、交替红色杆菌属(*Altererythrobacter*)和潘隆尼亚碱湖杆菌属(*Pannonibacter*)等，而曲卓木地热区分布的细菌稀有类群主要为污水单胞菌属(*Deftuviimonas*)、赛托氏菌属(*Schlegelella*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)；同时，根据系统发育特征从已得可培养菌株中挑选 86 株具有种属代表性的菌株进行纤维素酶和几丁质酶活性的筛选，发现菌株 *Bacillus* sp. YIM75187 具有较高的纤维素酶活性，菌株 *Geobacillus* sp. YIM75316、*Bacillus* sp. YIM75011 和 YIM75174 具有较好的几丁质酶活性(表 2)。综上所述，西藏塔格架和曲卓木热泉环境的微生物具有较好的多样性与特异性，该地热区的细菌所分泌的酶也呈现出一定的生物活性多样性与特异性，而且酶反应的温度范围更为广泛，

最适温度更高, 符合工业应用中所需的温度要求, 具有很好的开发应用前景。

1.3 福建温泉

贾宪波^[25]应用 Illumina MiSeq 平台检测福州大汤(80 °C)、汤垠(65 °C)和双龙(61 °C)三处温泉水体中的细菌 16S rRNA 基因多样性, 结果显示 3 处温泉中嗜热菌多样性丰富, 其中丰度较大的嗜热菌包含变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和产水菌门(*Aquificae*)等 15 个门, 不同温泉之间细菌多样性差异也较大, 这可能与 3 处温泉的温度、Na⁺、NO²⁻、Mg²⁺及水体理化性质等有关; 同时, 对上述三大温泉底泥中的可培养嗜热菌进行了研究, 结果显示大汤温泉嗜热菌的种类多于汤垠, 双龙温泉嗜热菌最少; 进一步分析发现, 所分离得到的 32 株嗜热菌隶属于 6 个不同的属, 其中芽孢杆菌属和无氧芽孢杆菌属为该地区温泉中的优势菌群; 该研究者还发现一株嗜热菌土芽孢杆菌属 *Geobacillus* sp. CHB1 可适应低温生长, 推测可能由于过氧化氢酶高表达促进了该菌株在低温下的生长能力。

1.4 江西温泉

袁斌等^[26]利用可培养法从江西宜春市宜春镇富硒温泉(60 °C)泉水中分离得到了芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属和无氧芽孢杆菌属等 11 种芽孢杆菌, 同时进一步利用高通量测序技术对水样中的细菌群落结构与多样性进行了检测, 结果显示水体样品中的物种类群主要属于不动杆菌属

(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、水栖菌属 (*Enhydrobacter*) 、鞘脂杆菌属 (*Sphingobacterium*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和 *Thermosynechococcus*。该研究中高通量测序结果与纯培养法所得主要微生物类群完全不同^[26], 说明温泉中存在大量在现有技术条件和环境下不可培养的微生物, 在今后的微生物多样性探索实验中可以采用高通量测序指导纯培养法, 以期得到更多嗜热菌。

1.5 湖南温泉

李春霖等^[27]通过卢戈氏碘液染色法和透明圈法对湖南省汝城县热水镇温泉分离得到的无氧芽孢杆菌属菌株 *A. rupiensrain* R8、*Anoxybacillus* sp. R11 和地芽孢杆菌属 *Geobacillus* sp. R13 (60 °C 培养)进行嗜热琼胶酶和淀粉酶的筛选与鉴定, 发现 R13 降解琼胶能力最强, 而 *Anoxybacillus* sp. R11 水解淀粉的能力最强, 而且这 3 株细菌均能够产生嗜热琼胶酶和嗜热淀粉酶(表 3)。目前, 国内外对热泉中芽孢杆菌产嗜热琼胶酶的相关报道较少, 筛选出高产嗜热酶菌株不仅拓宽了琼胶酶的来源渠道, 也为琼胶酶的酶学性质及降解性质等方面的研究及其潜在的医药价值提供了菌株支持。程庆等^[28]对湖南省汝城县热水镇温泉(68、94、86、90 °C)分离得到的菌株进行碱性磷酸酶、尿素酶、蛋白酶、氧化酶和过氧化氢酶检测, 发现菌株 R5-R7 能产生过氧化氢酶、氧化酶、碱性磷酸酶和蛋白酶(表 3), 该研究为嗜热微

表 3 湖南汝城县热水镇温泉细菌的酶活性^[27-28]

Table 3 Enzymatic activity of bacteria from hot springs in Reshui town, Rucheng county, Hunan province^[27-28]

种属 Genus and species	酶活性 Enzymatic activity
<i>Anoxybacillus rupiensrain</i> R8	尿素酶、氧化酶、蛋白酶、嗜热琼胶酶、嗜热淀粉酶 Urease, oxidase, protease, thermophilic agarase, thermophilic amylase
<i>Anoxybacillus</i> sp. R11	过氧化氢酶、蛋白酶、嗜热琼胶酶、嗜热淀粉酶 Catalase, protease, thermophilic agarase, thermophilic amylase
<i>Geobacillus</i> sp. R13	氧化酶、嗜热琼胶酶、嗜热淀粉酶 Oxidase, thermophilic agarase, thermophilic amylase
<i>Meiothermus</i> sp. R5-R7	过氧化氢酶、氧化酶、碱性磷酸酶、蛋白酶 Catalase, oxidase, alkaline phosphatase, protease

注: 湖南汝城热水镇, 坐标: N25°31'47.29", E113°54'48.19", 采样点温度分别为 68、94、86 和 90 °C^[27-28]。

Note: Hot spring is located in Reshui town, Rucheng county, Hunan province (N25°31'47.29", E113°54'48.19"), and the temperatures of sampling sites are 68, 94, 86 and 90 °C^[27-28], respectively.

生物来源的工业酶研发提供了基础,也提示这些活性菌株可能在工业酶领域具有广阔的应用前景。

1.6 河南温泉

刘丽等^[29]采用 Illumina HiSeq 2500 技术从河南平顶山市鲁山县的五大温泉区(上汤: 51 °C; 中汤: 58 °C; 下汤: 44 °C; 温汤: 44.5 °C; 神汤: 47 °C)共检测到了 27 个属的细菌。对河南鲁山五大温泉开展细菌多样性分析发现,水小杆菌属(*Aquabacterium*)、台湾温单胞菌属(*Tepidimonas*)、*Vogesella*、不动杆菌属和鞘脂单胞菌属(*Sphingopyxis*)菌株为鲁山温泉的优势菌。据报道^[30],*Sphingopyxis* 属于 α -变形杆菌,大多数与有机物的降解有关,是环境中一类重要的降解菌,可用来研制微生物修复剂应用于生物修复。张科等^[31]进一步研究发现,鲁山温泉水中含有较高丰度的参与氨氧化过程的奇古菌门(*Thaumarchaeota*)类群分布,并且发现了一株嗜甲烷甲基菌属古菌 *Candidatus-Methanomethylophilus*, 该菌株以甲烷作为唯一碳源和能源,能够氧化大气中高浓度的甲烷,调控大气中甲烷的平衡,缓解温室效应。

1.7 小结

综合上述我国两大温泉分布地区及其他省(自治区)温泉细菌多样性研究结果发现,目前以藏南、川西、滇西地区为代表的高温热泉集中区域是国内温泉细菌研究的焦点,而且西南地区温泉细菌的物种多样性、新颖性及产酶特性等方面较为突出。具体表现为:在物种多样性方面,藏南、滇西地区温泉中的微生物多为无氧芽胞杆菌属(*Anoxybacillus*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、栖热菌属(*Thermus*)和亚栖热菌属(*Meiothermus*),这些微生物类群的生存条件与普通微生物相比较为特殊,高温环境为其提供了更为有利的生存条件;在产酶特性方面,温泉特殊生境中的细菌为适应环境,进化出了与生态环境相互影响的各种酶活性且参与生态系统的调节,目前研究多集中于淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、过氧化氢酶、嗜热酶活性筛选以及编码酶基因的克隆等方面,产酶

特性较为突出的菌株主要为无氧芽胞杆菌属(*Anoxybacillus*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)。同时,得到了一批在高温条件下具有稳定酶活性的菌株,可应用于许多实际的工业生产过程。然而东南沿海及内陆地区虽有散在温泉分布,但在温泉物种分布格局及产酶特性等方面未有突出之处,仍待挖掘。此外,基于宏基因组学的高通量测序技术为宏观分析温泉生态系统的物种分布格局提供了强有力的手段,而且对潜在活性基因的挖掘具有重要的启示意义。但现阶段极端生境微生物的生长特性和代谢特征的研究仍然依赖于纯培养的获得。因此,有必要进一步研究培养基组分和改善培养方法,参考宏基因组分析结果,以期分离到更多种类的目标微生物。

2 温泉放线菌菌种分布格局及其酶活性

2.1 云南温泉

研究者从云南大理和腾冲地区的 10 个温泉中共分离得到了 10 个属的放线菌^[32-33],其中以链霉菌属(*Streptomyces*)和小单孢菌属(*Micromonospora*)居多,可被认为是云南温泉放线菌群落中的优势菌群。Liu 等^[32]对采自腾冲县 3 个地热田(合华、热海和瑞滇 40–99 °C)的沉积物、水样和土壤进行了放线菌物种多样性研究,共分离得到链霉菌属、小单孢菌属和马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)等 10 个属的 58 株放线菌。马瑞等^[33]对保山市龙陵县的荷花温泉(44 °C)底泥进行了放线菌物种多样性和生物活性研究(表 4),共分离得到链霉菌属、小单孢菌属和野野村氏菌属(*Nonomuraea*)的 60 株放线菌,其中 25%的菌株可产生硫化氢和具有淀粉酶活性,23.3%的菌株具有硝酸盐还原能力,20%的菌株具有凝乳酶活性,16.7%的菌株具有纤维素酶活性,5%的菌株具有蛋白酶活性,而且链霉菌属菌株 *S. ossamyceticus* H13 和 H28 产酶特性极为显著,并首次发现菌株 *S. ossamyceticus* 的产酶特性,该研究中筛选得到的大量酶活放线菌为微生物酶类代谢产品的研发提供了菌株基础。

表 4 云南荷花温泉放线菌的酶活性^[33]

Table 4 Enzymatic activity of actinomycetes from Hehua hot spring in Yunnan province^[33]

种属 Genus and species	酶活性 Enzymatic activity
<i>Streptomyces rishiriensis</i> H2	硫化氢、淀粉酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, reductive nitrate
<i>S. rishiriensis</i> H23	硫化氢、淀粉酶、凝乳酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, rennet, reductive nitrate
<i>S. rishiriensis</i> H38	硫化氢、淀粉酶 hydrogen sulfide, amylase
<i>S. rishiriensis</i> H50	硫化氢、淀粉酶、凝乳酶 Hydrogen sulfide, amylase, rennet
<i>S. ossamyceticus</i> H7	硫化氢、淀粉酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, reductive nitrate
<i>S. ossamyceticus</i> H13, H28	硫化氢、淀粉酶、凝乳酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, rennet, cellulase, reductive nitrate
<i>S. ossamyceticus</i> H15	硫化氢、淀粉酶、凝乳酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, rennet, reductive nitrate
<i>S. ossamyceticus</i> H30	硫化氢、淀粉酶、蛋白酶 Hydrogen sulfide, amylase, protease
<i>S. ossamyceticus</i> H54	硫化氢、淀粉酶、凝乳酶、纤维素酶 Hydrogen sulfide, amylase, rennet, cellulase
<i>S. viridodiastaticus</i> H4	淀粉酶、纤维素酶 Amylase, cellulase
<i>S. viridodiastaticus</i> H35	淀粉酶、蛋白酶 Amylase, protease
<i>S. wuyuanensis</i> H12	硫化氢、凝乳酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, rennet, reductive nitrate
<i>S. wuyuanensis</i> H57	硫化氢、纤维素酶 Hydrogen sulfide, cellulase
<i>S. speibonae</i> H8	硫化氢、淀粉酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, cellulase, reductive nitrate
<i>S. alboqriseolus</i> H21	硫化氢、淀粉酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Hydrogen sulfide, amylase, cellulase, reductive nitrate
<i>S. toxytricini</i> H41	硫化氢、凝乳酶 Hydrogen sulfide, rennet
<i>S. filipinensis</i> H48	凝乳酶 Rennet
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> H5	凝乳酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Rennet, cellulase, reductive nitrate
<i>M. purpureochromogenes</i> H6	淀粉酶、蛋白酶、还原硝酸盐 Amylase, protease, reductive nitrate
<i>M. soil</i> H10	凝乳酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Rennet, cellulase, reductive nitrate
<i>M. chaiyaphumensis</i> H37	凝乳酶、纤维素酶、还原硝酸盐 Rennet, cellulase, reductive nitrate
<i>Nonomuraea roseola</i> H46	还原硝酸盐 Reductive nitrate

注：云南保山市龙陵县荷花温泉，坐标：N24°42'40"，E98°40'30"，水温 44 °C^[33]。

Note: Hehua hot spring is located in Baoshan city, Longling county, Yunnan province (N24°42'40", E98°40'30"), and the temperature of water sample is 44 °C^[33].

2.2 西藏温泉

鲜文东^[23]利用纯培养的方法进行了西藏塔格架地热区(32–86 °C)高温放线菌的多样性研究，共分离得到了 7 个属：链霉菌属、马杜拉放线菌属、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、纤维菌属(*Cellulomonas*)、纤维单胞菌属(*Cellulosimicrobium*)和异壁放线菌属(*Actinoallomurus*)的 12 株放线菌，在酶活研究时发现链霉菌属菌株 *S. echinoruber* YIM 78536 可以降解木聚糖(表 5)。尹明远等^[34]从羊八井地热田

(底泥样品温度 43.0–65.4 °C，水样样品温度 45.3–64.5 °C)中共分离得到 21 株放线菌，隶属于链霉菌属、拟诺卡氏菌属和小单孢菌属，并发现了 3 株产纤维素酶活性高的链霉菌属菌株 R5、R10 和 R20 (表 5)。

2.3 安徽温泉

张凤琴^[35]首次对从安徽庐江汤池泉水中(约 60 °C)的嗜热微生物进行研究，从中分离得到一株高温放线菌 *Thermoactinomyces* sp. LJTC-1，该菌株的最高耐受温度为 74 °C，而与其亲缘关系最

表 5 西藏温泉放线菌的酶活性^[23,34]
Table 5 Enzymatic activity of actinomycetes from Tibet hot springs^[23,34]

温泉	种属	酶活性
Hot spring	Genus and species	Enzymatic activity
塔格架地热区 ^[23]	<i>Streptomycescinerochromogenes</i> YIM 78758	木聚糖酶 Xylanase
Taggard geothermal area ^[23]		
羊八井地热 ^[34]	<i>Streptomyces anulatus</i> R3	还原硝酸盐 Reductive nitrate
Yangbajing geothermal ^[34]	<i>S. griseoruber</i> R5	纤维素酶、过氧化氢酶 Cellulase, catalase
	<i>S. radiopugnans</i> R7	硫化氢、过氧化氢酶 Hydrogen sulfide, catalase
	<i>S. radiopugnans</i> R20	纤维素酶、过氧化氢酶 Cellulase, catalase
	<i>S. flavofungini</i> R8	硫化氢、过氧化氢酶 Hydrogen sulfide, catalase
	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> R14	还原硝酸盐 Reductive nitrate

注：塔格架地热区位于西藏自治区南部的日喀则地区昂热县境内，温度为 32–86 °C^[23]；羊八井地热位于我国西藏自治区拉萨市的当雄县羊八井镇西侧，地理坐标为 N30°–31°，E90°–91°，底泥样品温度 43.0–65.4 °C，水样样品温度 45.3–64.5 °C^[34]。
Note: Tower frame geothermal area is located in Angre county of Shigatse area in the south of Tibet, and the temperature of samples is ranging from 32 to 86 °C^[23]; Yangbajing geothermal area is located in west of Yangbajing township, Dangxiong county, Lhasa, Tibet (N30°–31°, E90°–91°), the temperatures of samples of sediment and water is ranging from 43.0 to 65.4 °C and from 45.3 to 64.5 °C^[34], respectively.

近的 *Thermoactinomyces* sp. 60X-8 仅可在 15–40 °C 范围内生长，这可能是由于庐江汤池地区独特的温泉生境条件造成了菌株 LJTC-1 与其亲缘关系相近菌株之间的生理机制差异；同时，对 LJTC-1 进行生理生化特征的研究表明，该菌株在氧化酶试验中呈阳性，并可利用木糖。

2.4 山西温泉

郑洁等^[36]从山西太子滩温泉(46.5 °C)周围土样中分离到了链霉菌属、壤霉菌属(*Agromyces*)和微杆菌属(*Microbacterium*)等 12 个属的 104 株放线菌，其中链霉菌属菌株为 76 株，为此温泉的优势放线菌类群；还进行了菌株抗生素生物合成基因的研究，但目前尚未见产酶特性报道。

2.5 小结

综合上述国内温泉放线菌多样性及其生物活性研究结果发现，以西藏、云南地区为代表的高温热泉集中区域仍是国内温泉放线菌资源研究的主要目标，而且云南温泉放线菌具有较好的多样性与新颖性，中度嗜热放线菌分布特征较为明显，资源开发潜力大。通过对上述菌种信息分析发现，链霉菌属目前仍为温泉放线菌菌落的优势类群，嗜热放线菌和稀有放线菌分离得到的较少，

这可能与培养基的选择和现有培养条件的制约相关。在今后的研究中，要改变传统的培养方式，寻找新的实验方法，争取获得更多的放线菌菌株资源。在温泉放线菌酶活性研究方面，目前主要集中在菌株的纤维素酶、过氧化氢酶等产酶特性上。同时，宏基因组高通量测序等技术目前还未广泛应用到温泉放线菌物种多样性分析方面。

3 真菌菌种分布格局及其酶活性

3.1 云南温泉

研究者从云南 8 个温泉中共分离得到了节丛孢属 (*Arthrobotrys*) 和小掘氏孢属 (*Drechlerella*) 2 个属的 14 种真菌。范喜杰等^[37]对大理州大理市、弥渡县、漾濞县、祥云县和剑川县的 8 个温泉(大坝温泉：64.2 °C；锅底山温泉塘：38.5 °C；弥渡温泉：45.5 °C；祖来温泉：29 °C；西克郎温泉：35 °C；上坝澡堂：31 °C；大波那温泉：45 °C；后甸村温泉：42 °C)底泥进行捕食线虫真菌研究时共分离得到了 2 属 14 种捕食线虫真菌，分别为 *Arthobotrys* 属的 12 个种和 *Drechlerella* 属的 2 个种，其中分离得到的 *A. musiformis* 为该地区温泉捕食线虫真菌的优势种，而且发现了一株分离自祥云县大波那温泉(45 °C)的产黏性菌网的

新种捕食线虫真菌祥云节丛孢(*A. xiangyunensis*)。该研究对捕食线虫真菌群落进一步分析还发现, 上述大理州地区的温泉存在较为原始的产黏性菌网的捕食线虫真菌, 因此推断该地区温泉生态可能与原始生境最接近, 存在更为原始的菌种资源, 其微生物资源开发利用价值较大。

刘开辉等^[38]利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台对腾冲热海热泉沉积物宏基因组 ITS 基因进行测序以及生物信息分析, 探究腾冲热海右姐妹泉(JMQR, 83.4 ℃)、左姐妹泉(JMQL, 90.4 ℃)、蛤蟆嘴泉(M, 75.1 ℃)、桥泉(QQ, 75.6 ℃)和鼓明泉(GMQP, 84.5 ℃)底泥真菌多样性及群落分布格局, 共检测到 343 484 条有效序列, 包括 5 个真菌门 20 个纲 66 个目; 在属水平上共检测到 365 个真菌属, 以裂褶菌属(*Schizophyllum*)、青霉属(*Penicillium*)、枝孢属(*Cladosporium*)和侧齿霉属(*Engyodontium*)为最优势类群, 以上研究结果表明在高温热泉环境中蕴藏着极其丰富多样的真菌类群; 同时还发现 NH_4^+ 含量、温度及 pH 等环境因素可能会影响该地区温泉真菌群落的分布格局, 其中以 pH 对该地区温泉生态系统中的优势类群结构变化影响最大。随后, 该研究者等^[39]还通过 Illumina HiSeq 2500 高通量测序对腾冲极酸性温泉 (pH<4.0, 69.1–88.2 ℃)、中性(pH 6.2, 75.6 ℃)和碱性温泉 (pH 7.9–9.1, 75.1–90.4 ℃)的生物多样性展开分析研究, 共发现了 5 个真菌门 67 目 375 属, 初步表明该地区温泉真菌的物种多样性较好; 其中, 酸性温泉以青霉属、囊霉属(*Entyloma*)和枝孢属(*Cladosporium*)为优势类群, 碱性温泉真菌群落以青霉属、内生菌属(*Engyodontium*)和裂褶菌属(*Schizophyllum*)为主。此外, 该研究^[39]再次指明温泉的 pH、温度及温泉中 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 S^{2-} 浓度等综合因素对于温泉中优势菌群的分布格局具有重要影响。

3.2 西藏温泉

唐小飞^[40]对西藏羊八井地热热泉(43–84 ℃)、

尼木温泉林岗村热泉(32–36 ℃)、尼木温泉续迈乡热泉(22–83 ℃)和墨竹工卡仲德热泉(23–52 ℃)四处热泉的沉积物样品, 采用纯培养的方法共分离得到了 41 株嗜热真菌, 经过传统形态学和分子生物学相结合的鉴定方法, 共鉴定出 4 种嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus*、*T. dupontii*、*Malbranchea cinnamomea*、*Melanocarpus albomyces* 和一种耐热曲霉属真菌 *A. fumigatus*, 其中 *M. albomyces* 为首次从温泉中分得。以上物种鉴定结果表明, 西藏热泉蕴含一定的嗜热真菌资源, 值得进一步开发利用。对上述菌株进行酶活研究^[40], 结果显示以上 5 种真菌均具有产酶特性, 即均可产生木聚糖酶, 其中菌株 *M. albomyces* THN8 和 *A. fumigatus* THN6 产纤维素酶较强, 菌株 *M. cinnamomea* THN3 和 *T. lanuginosus* THN4 产淀粉酶较强, 未检测到产糖苷酶的阳性菌株。值得关注的是, 该研究^[40]中产纤维素酶的嗜热真菌与一般真菌相比, 其在高温发酵过程中纤维素酶活力较稳定或下降较慢, 同时较高的温度也降低菌株发酵过程中其他杂菌的污染, 因此上述嗜热真菌产生的纤维素酶可能在生产中具有广泛应用价值。同时, 嗜热菌株 *M. albomyces* THN8 产纤维素酶活力高达 28.1 U/mL, 产纤维素酶活力极强, 在生产中可能具有更广阔的应用前景; 还选用真菌特异性引物用于扩增真核生物 ITS2 区, 使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行高通量测序, 通过聚类分析发现上述西藏热泉真核生物主要分为 6 个门 19 个纲 52 个目 86 个科 110 个属, 在属的分类水平上主要分为枝孢属、青霉属、曲霉属(*Aspergillus*)、*Microbotryozyma* 和 *Ophiocordyceps*, 绝大部分属于未分类, 初步推断该地区热泉生态系统的真菌多样性及新颖性较好。综合上述菌种鉴定、酶活性研究和基于高通量测序的真核生物群落构成分析可得, 西藏羊八井地热热泉等热田地区真菌物种多样性丰富, 而且其微生物资源新颖性较高, 值得进一步开发利用。同时温泉中具有一定数量的酶活嗜热真菌资源, 具有较高的产

耐高温酶菌种资源开发潜力。

3.3 小结

真菌群落是地热温泉生态系统不可缺少的组成部分,然而本文通过对国内温泉真菌的整理发现,近5年内对温泉真菌群落的研究相对较少,仅有5篇文献报道了云南和西藏两省的部分温泉的真菌多样性及其生物活性相关研究。与温泉细菌、放线菌资源的研究热点地区相似,云南地区温泉真菌多样性研究较为集中,微生物纯培养手段和宏基因组高通量测序技术相结合,初步表明分布于云南大理及腾冲等地的温泉真菌具有较为丰富的物种多样性与新颖性;西藏温泉目前报道的真菌物种均为嗜热菌,宏基因组高通量测序结果揭示了西藏温泉中可能含有一些新颖类群。同时,上述部分嗜热真菌的产酶特性具有较大的生态及生产利用价值,值得深入挖掘。此外,从已有研究还可以看出 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术的应用为充分了解高温热泉生态系统中真菌群落的物种多样性及分布格局提供了重要技术支撑,该测序技术值得进一步推广使用。

4 问题与展望

综合上述近5年我国温泉微生物物种多样性、新颖性及其产酶特性研究结果发现,以云南和西藏为主的高温热泉西南集中分布带目前仍是国内温泉微生物资源研究的热点,其中又以云南省腾冲县热泉群为首。与东南沿海、其他省(自治区)及中国台湾地区的温泉相比,我国西南地区温泉生态系统中的微生物群落显示出了较好的物种多样性与新颖性,其中细菌多为无氧芽胞杆菌属、芽孢杆菌属、栖热菌属和亚栖热菌属,放线菌主要为链霉菌属,真菌主要为青霉属、枝孢属和裂褶菌属,而且嗜热菌株分布较为普遍。同时,部分菌株显示出优良的产酶特性,主要集中于纤维素酶、木聚糖酶、淀粉酶等与生产、生活相关的酶活性上,具有一定的生态学意义和工业生产应用潜力。此外,温泉生态学研究表明,温

度、酸碱度、硫化物含量等对微生物种群分布的影响可导致我国不同地区温泉独特的生态环境形成。

与我国温泉研究现状相似,国外温泉研究主要聚焦于温泉中微生物的物种多样性分析与耐热酶挖掘等方面^[41]。同时,近年来随着宏基因组学的出现和高通量测序技术的发展使得研究人员逐渐认识到温泉生境中可能存在大量具有生物活性物质资源开发潜力的微生物菌株,并采用组合化学、代谢途径工程、基因改组和蛋白质定向进化等多种分子生物学技术来筛选活性天然产物^[41-43]。但目前温泉微生物菌株活性次级代谢产物的研究仍处于初期阶段,主要表现为药源较为单一、菌株发酵液的粗浸膏或生物活性功能不全面的化合物的获得及初步活性测试,并未得到优良的药物先导化合物。此外,蓝藻类细菌目前被众多国内外学者认为是新颖生物活性天然产物最丰富的来源之一,也已成为温泉特境微生物研究热点之一^[43]。

比较相关国内外温泉微生物研究现状,我国温泉微生物资源的开发与利用仍存在一些难题与问题,建议将来从以下几个方面开展温泉微生物资源研究相关工作:(1)资源保护层面:尽快保护和挖掘天然温泉微生物资源,应从政府层面对那些容易受到人类活动干扰的温泉开展抢救性保护,对其微生物资源进行保护性开发利用;(2)微生物的分离培养方法探究:从近5年我国温泉可培养菌株研究结果不难看出,温泉生境中只有极少一部分微生物菌株能够得到纯培养,而部分温泉来源样品的宏基因组测序结果显示温泉生境中的微生物物种具有较好的多样性、新颖性与特异性,同时含有一定数量应用价值较高的基因簇。因此,探索合适的温泉微生物分离培养方法,模拟温泉原始生态环境(高温、强酸、低氧等)或采用原位培养方法,获得一些生长条件或代谢机制较为特殊的温泉菌株仍是该类资源开发应用的首

要前提; (3) 宏基因组高通量测序技术的推广应用: 近年来宏基因组学测序技术在微生物生态学研究得到了广泛应用, 但在温泉微生物资源研究方面的应用仍有待推广, 宏基因组学测序技术的应用不仅可以扩展对温泉生境中微生物群落组成和多样性的认识, 更能揭示温泉微生物的功能多样性和微生物之间的相互作用。特别是基于宏基因组测序片段分装方法, 可以获取大量温泉中不可培养微生物的基因组信息, 为后续的比较基因组、生态进化和培养组学等研究提供重要参考数据; (4) 嗜热菌株及其产酶特性研究: 我国滇藏地区存在一定数量的超过 80 °C 的温泉, 通过培养嗜热菌来研究菌株生命的极限及其生存机制, 可为研究动植物对日益严重的温室效应的应对举措提供一定的参考, 同时目前国内酶学研究多集中于耐热工业用酶如淀粉酶、纤维素酶等的筛选, 少见耐热分子生物酶与医药用酶的相关研究, 因此, 扩大温泉微生物耐热酶筛选范围, 优化耐热酶来源菌株的筛选方法, 发掘在高温条件下具有稳定酶活性的菌株, 也将成为温泉嗜热菌株微生物产酶特性的研究方向之一; (5) 微生物菌株药用资源的开发与利用: 温泉特殊的生态环境可能使生长于其中的部分微生物具有高度发散的基因结构和功能特征, 从而使其表现出较好的化学与生物活性多样性。通过文献调研结果不难看出, 目前我国温泉研究主要集中于物种多样性分析, 对于其微生物菌株次级代谢产物的研究与国外相比研究较少, 而通过宏基因组测序结果也可发现, 部分温泉微生物菌株中存在多个具有研究价值的基因簇, 尤其是蓝藻细菌类群基因组序列中含有大量与抗生素合成与抗性基因有关的片段, 因此可加强温泉特色微生物菌株活性次级代谢产物的挖掘, 从中寻找具有优良生物活性的药物先导化合物, 充分开发温泉微生物的药用资源潜力; (6) 温泉与其微生物的化学生态学研究: 微生物生存在动态环境中, 各种环境因子相

互作用可能会影响微生物次级代谢产物的生物合成, 我国滇藏地区温泉多数处于特境高寒生态系统中, 因此, 探讨不同温泉生态系统的环境因素对微生物次级代谢产物化学种类多样性或新颖性的影响应值得重视, 应进一步明确温泉生态系统特征与微生物菌落分布及其生物活性成分之间的相关性, 充分认知温泉与其中微生物的化学生态学关系。

总之, 温泉微生物作为温泉极端生态系统的重要组成部分, 在局域和区域的元素循环中发挥着关键作用。就陆地系统和海底热液活动而言, 我国滇藏、南海水域及中国台湾地区均占据了世界全球范围内的主要地热分布区带, 而且目前研究成果已初步显示出我国温泉微生物作为基因资源库的巨大潜力。因此, 运用多种手段认知、研究和开发我国不同温泉生态系统中的微生物资源十分重要, 将会带来巨大的经济、社会与生态学效益。

REFERENCES

- [1] Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, et al. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8): 650-659
- [2] Yun Z. Thermophilic microorganisms in the hot springs of Tengchong geothermal area, West Yunnan, China[J]. *Geothermics*, 1986, 15(3): 347-358
- [3] Gong ZT, Lai YH, Zhou YM, et al. Diversity of cellulose-producing thermophilic bacteria in the Baoshan hot spring[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(4): 699-703 (in Chinese)
龚志婷, 赖泳红, 周艳梅, 等. 云南保山温泉产纤维素酶高温菌多样性研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(4): 699-703
- [4] Liang NY, Liu SB, Ding JB. Records of Yunnan Province, Volume 25, Records of Hot Springs[M]. Yunnan: Yunnan People's Publishing House, 1999: 190 (in Chinese)
梁乃英, 刘时彬, 丁建博. 云南省志·卷二十五·温泉志[M]. 云南: 云南人民出版社, 1999: 190
- [5] Zhang F, Yang XY, Geng LP, et al. Purification and characterization of a novel and versatile α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. YIM 342[J]. *Starch-Stärke*, 2016, 68(5/6): 446-453
- [6] Jiang DW, Li P, Jiang Z, et al. Chemolithoautotrophic arsenite oxidation by a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* strain TCC9-4 from a hot spring in Tengchong of

- Yunnan, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 360
- [7] Wu G, Huang LQ, Jiang HC, et al. Thioarsenate formation coupled with anaerobic arsenite oxidation by a sulfate-reducing bacterium isolated from a hot spring[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1336
- [8] Yu TT, Ming H, Yao JC, et al. *Thermus amyloliquefaciens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment sample[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65: 2491-2495
- [9] Peng TJ, Liu LJ, Liu C, et al. *Metallosphaera tengchongensis* sp. nov., an acidothermophilic archaeon isolated from a hot spring[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65: 537-542
- [10] Ming H, Duan YY, Guo QQ, et al. *Meiothermus roseus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal area[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(4): 897-905
- [11] Ming H, Duan YY, Yin YR, et al. *Crenalkalicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from alkaline hot springs[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(6): 2319-2326
- [12] Li HZ, Yang QH, Li J, et al. The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong geothermal field, China[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 17056
- [13] Yang J, Zhou EM, Jiang HC, et al. Distribution and diversity of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria in geothermal springs of China, the Philippines, and the United States[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32(10): 903-913
- [14] Menzel P, Gudbergssdóttir SR, Rike AG, et al. Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(2): 411-424
- [15] Jiang Z, Li P, Jiang DW, et al. Microbial community structure and arsenic biogeochemistry in an acid vapor-formed spring in Tengchong geothermal area, China[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146331
- [16] Jiang Z, Li P, van Nostrand JD, et al. Microbial communities and arsenic biogeochemistry at the outflow of an alkaline sulfide-rich hot spring[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 25262
- [17] Jiang L, Xu HC, Qiao HJ. Biomediated precipitation of calcium carbonate in a slightly acidic hot spring, Yunnan Province[J]. *Acta Geologica Sinica-English Edition*, 2017, 91(1): 145-155
- [18] Li ML, Duo J, Wang Z, et al. Hydrochemical characteristics and material sources of the Riduo thermal spring in Tibet[J]. *Carsologica Sinica*, 2015, 34(3): 209-216 (in Chinese)
- 李明礼, 多吉, 王祝, 等. 西藏日多温泉水化学特征及其物质来源[J]. *中国岩溶*, 2015, 34(3): 209-216
- [19] Liao ZJ, Zhao P. Yunnan-Tibet Tropics—Geothermal Resources and Typical Geothermal Systems[M]. Beijing: Science Press, 1999 (in Chinese)
- 廖志杰, 赵平. 滇藏地热带——地热资源和典型地热系统[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [20] Duo J. The basic characteristics of the Yangbajing geothermal field—a typical high temperature geothermal system[J]. *Engineering Science*, 2003, 5(1): 42-47 (in Chinese)
- 多吉. 典型高温地热系统——羊八井热田基本特征[J]. *中国工程科学*, 2003, 5(1): 42-47
- [21] Wei SY, Teng JW, Yang BP, et al. Characteristics of geothermal distribution and geophysical field of Xizang Plateau[J]. *Northwestern Seismological Journal*, 1981, 3(4): 17-25 (in Chinese)
- 魏斯禹, 腾吉文, 杨秉平, 等. 西藏高原地热活动, 温泉分布与地球物理场特征[J]. *西北地震学报*, 1981, 3(4): 17-25
- [22] Wang P, Chen XH, Shen LC, et al. Reservoir temperature of geothermal anomaly area and its environmental effect in Tibet[J]. *Geology in China*, 2016, 43(4): 1429-1438 (in Chinese)
- 王鹏, 陈晓宏, 沈立成, 等. 西藏地热异常区热储温度及其地质环境效应[J]. *中国地质*, 2016, 43(4): 1429-1438
- [23] Xian WD. Study on diversity of thermophilic microorganisms from the Tazewia geothermal area in Tibet and their ability to degrade cellulose hemicellulose[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2016 (in Chinese)
- 鲜文东. 西藏塔格架地热区可培养高温菌多样性及纤维素、半纤维素降解菌研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2016
- [24] Yuan CG. Study on microbial diversity of two thermal hot spring areas in south of Tibetan and screening object strains of producing cellulase and chitinase[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2017 (in Chinese)
- 袁昌果. 西藏南部地区热泉微生物多样性及其产纤维素酶和几丁质酶的研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2017
- [25] Jia XB. Bacterial diversity of Fuzhou hot spring and low temperature adaption mechanism of *Geobacillus thermoglucosidasius*[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese)
- 贾宪波. 福州温泉嗜热菌多样性及嗜热菌 *Geobacillus thermoglucosidasius* 低温适应的机制[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2016
- [26] Yuan B, Lü MY, Liu ZY. Molecular identification and phylogenetic analysis of thermophilic bacteria isolated from hot spring in Yichun area[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(5): 199-203 (in Chinese)
- 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

- [27] Li CL, Li ZL, Xiao LL, et al. Screening and identifying bacterium producing agar enzyme and starch enzyme in Hunan Rucheng hot spring[J]. Journal of Xiangnan University (Medical Science Edition), 2015, 17(4): 1-4 (in Chinese)
李春霖, 李紫兰, 肖玲珑, 等. 湖南汝城县热水温泉产嗜热琼胶酶和淀粉酶菌的筛选及鉴定[J]. 湘南学院学报: 医学版, 2015, 17(4): 1-4
- [28] Cheng Q, Li ZL, Xiao LL, et al. Screening rucheng county, Hunan hot spring enzyme producing bacteria[J]. Journal of Huaihua University, 2016, 35(5): 52-55 (in Chinese)
程庆, 李紫兰, 肖玲珑, 等. 湖南汝城县热水温泉产酶菌的筛选[J]. 怀化学院学报, 2016, 35(5): 52-55
- [29] Liu L, Zhang K, Li BJ, et al. Bacterial diversity analysis of five hot spring in Henan Lushan[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1219-1227 (in Chinese)
刘丽, 张科, 李冰洁, 等. 河南鲁山五大温泉水细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1219-1227
- [30] Cui ZS, Shao ZZ. Characterization of a PAHs degrading marine strain *Novosphingobium* sp. Phe-8 and its degradative genes[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2006, 45(S1): 257-261 (in Chinese)
崔志松, 邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 *phe-8* (*Novosphingobium* sp.)的 PAHs 降解基因和降解特性[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(S1): 257-261
- [31] Zhang K, Liu L, Zheng XH, et al. Archaeal diversity analysis for five hot spring in Henan Lushan[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2019, 32(2): 221-227 (in Chinese)
张科, 刘丽, 郑新华, 等. 河南鲁山五大温泉古细菌多样性分析[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2019, 32(2): 221-227
- [32] Liu L, Salam N, Jiao JY, et al. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles[J]. Microbial Ecology, 2016, 72(1): 150-162
- [33] Ma R, Zhang F, Wang CQ, et al. Species diversity and biological activity of actinobacteria in Hehua hot spring of Yunnan Province[J]. Journal of Dali University, 2019, 4(12): 69-74 (in Chinese)
马瑞, 张发, 王传琪, 等. 云南荷花温泉放线菌物种多样性及其生物活性[J]. 大理大学学报, 2019, 4(12): 69-74
- [34] Yin MY, Zhang GJ, He JQ, et al. Biological activity and diversity of moderately thermophilic Actinomycetes from geothermal field in the Yangbajing of Tibet[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(12): 1-4 (in Chinese)
尹明远, 张格杰, 何建清, 等. 西藏羊八井高温地热田中度嗜热放线菌多样性及生物活性[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(12): 1-4
- [35] Zhang FQ. Isolation, identification and characterization of the first thermophilic bacteria from a hot spring in Tang Chi, Lujiang[J]. Journal of Anqing Normal University (Natural Science Edition), 2020, 26(2): 117-121 (in Chinese)
张凤琴. 庐江汤池温泉中首个嗜热菌的分离鉴定及特性研究[J]. 安庆师范大学学报: 自然科学版, 2020, 26(2): 117-121
- [36] Zheng J, Tuo L, Li W, et al. Diversity and screening of functional gene of actinomycetes isolated from soil in hot spring of Shanxi Prince Beach[J]. China Brewing, 2019, 38(9): 49-53 (in Chinese)
郑洁, 虞利, 李伟, 等. 山西太子滩温泉土壤放线菌多样性及功能基因筛选的研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 49-53
- [37] Fan XJ, Zhang X, Zhang F, et al. Investigation on resources of nematode-trapping fungi in hot springs in Dali Prefecture[J]. Journal of Chuxiong Normal University, 2018, 33(3): 50-55 (in Chinese)
范喜杰, 张欣, 张发, 等. 大理州温泉捕食线虫真菌资源调查研究[J]. 楚雄师范学院学报, 2018, 33(3): 50-55
- [38] Liu KH, Ding XW, Zhang B, et al. High-throughput sequencing to reveal fungal diversity in hot springs of Rehai at Tengchong in Yunnan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(9): 1314-1322 (in Chinese)
刘开辉, 丁小维, 张波, 等. 高通量测序分析云南腾冲热海热泉真菌多样性[J]. 微生物学报, 2017, 57(9): 1314-1322
- [39] Liu KH, Ding XW, Salam N, et al. Unexpected fungal communities in the Rehai thermal springs of Tengchong influenced by abiotic factors[J]. Extremophiles, 2018, 22(3): 525-535
- [40] Tang XF. Preliminary study on production enzyme and biological activity form isolation and identification of thermophilic fungi in Tibetan hot spring[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2019 (in Chinese)
唐小飞. 西藏热泉嗜热真菌分离鉴定、产酶及生物活性初步研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2019
- [41] Yu XJ, Wang LL, Jia SJ, et al. Microbial diversity and enzymes of hot springs[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 130-135 (in Chinese)
于新娟, 王莉莉, 贾盛佼, 等. 温泉微生物多样性与酶类分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 130-135
- [42] Mahajan GB, Balachandran L. Sources of antibiotics: hot springs[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 134: 35-41
- [43] Momper L, Hu E, Moore KR, et al. Metabolic versatility in a modern lineage of cyanobacteria from terrestrial hot springs[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 140: 224-232