

## 研究报告

## 河南鲁山五大温泉水细菌多样性分析

刘丽 张科\* 李冰洁 李明灿 陈秋 郑新华 王福安 周云霞

(平顶山学院 河南 平顶山 467000)

**摘要:**【背景】位于河南中部的平顶山市含有丰富的温泉资源,对温泉水中的微生物多样性和群落结构进行研究有助于更好地开发利用温泉资源。【目的】探究河南鲁山五大温泉水中(上汤、中汤、下汤、温汤和神汤)细菌多样性。【方法】采用 Illumina HiSeq2500 PE250 技术对鲁山五大温泉水细菌的 16S rRNA 基因 V3–V4 变异区序列进行测序,应用 UPARSE、Mothur、Silva、MUSCLE 和 QIIME 等软件整理和统计样品序列数目和操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)数量,最后分析五大温泉水中细菌的丰度和多样性。【结果】上汤、中汤、下汤、温汤和神汤分别获得 56 017、68 319、65 247、59 340、68 825 条有效 Tags,聚类为 670、287、337、598、381 个 OTU。细菌分类分析表明,五大温泉水的细菌超过 40 个门,变形菌门(Proteobacteria)占 84.12%,是优势菌;在属分类阶元上,五大温泉水的细菌超过 239 个属,上汤的优势菌是不动杆菌属(*Acinetobacter*),中汤的优势菌是 *Tepidimonas*,下汤的优势菌是 *Vogesella* 和不动杆菌属(*Acinetobacter*),温汤的优势菌是 *Sphingopyxis* 和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*),神汤的优势菌是 *Aquabacterium*。【结论】鲁山五大温泉水中含有丰富的微生物资源,为后续五大温泉水中的微生物资源开发奠定了基础。

**关键词:** 五大温泉, 细菌多样性, 16S rRNA 基因, HiSeq2500 PE250

## Bacterial diversity analysis of Five Hot Spring in Henan Lushan

LIU Li ZHANG Ke\* LI Bing-Jie LI Ming-Can CHEN Qiu ZHENG Xin-Hua  
WANG Fu-An ZHOU Yun-Xia

(Pingdingshan University, Pingdingshan, Henan 467000, China)

**Abstract:** [Background] Pingdingshan is rich in hot spring resources. The study of microbial diversity and community structure in the spring water will help us to better exploit these resources. [Objectives]

**Foundation items:** Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (16B180004); Key Grant of Science and Technology Department of Henan Province (172102310211, 172102310529); Training Program of the National Natural Science Foundation of Pingdingshan University (PXY-PYJJ2016004); Scientific Research Start-up Foundation for the High-level Talent of Pingdingshan University (PXY-BSQD-2015006); Key Discipline of Pathogenic Biology from Pingdingshan University; The Central Financial Support Project (ZXPT2015001)

\*Corresponding author: E-mail: kekely555@126.com

**Received:** September 03, 2017; **Accepted:** January 25, 2018; **Published online** (www.cnki.net): February 14, 2018

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(16B180004); 河南省科技厅科技公关项目(172102310211, 172102310529); 平顶山学院国家自然科学基金培育项目(PXY-PYJJ2016004); 2014 年度平顶山学院高层次人才科研启动项目(PXY-BSQD-2015006); 平顶山学院病原生物学重点学科; 中央财政支持项目(ZXPT2015001)

\*通信作者: E-mail: kekely555@126.com

收稿日期: 2017-09-03; 接受日期: 2018-01-25; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-02-14

The bacterial diversity of Five Hot Spring (SHANGT, ZHONGT, XIAT, WENT and SHENT) in Henan Lushan was investigated and analyzed. **[Methods]** The bacterial 16S rRNA V3–V4 genes were sequenced by Illumina HiSeq2500 PE250 technology. The OTUs was sorted and counted using UPARSE, Mothur, Silva, MUSCLE and QIIME software. Finally, the bacterial abundance and diversity in Five Hot Spring was analyzed. **[Results]** It was obtained 56 017, 68 319, 65 247, 59 340, 68 825 effective tags, and acquired 670, 287, 337, 598, 381 OTUs from the SHANGT, ZHONGT, XIAT WENT, and SHENT respectively. The analysis of bacterial classification showed that the bacteria from Five Hot Springs could be classified as more than 40 phyla. Proteobacteria accounted for 84.12% was the dominant bacteria. In the genera level, bacteria from Five Hot Springs could be classified into more than 239 genera. The dominant bacteria of Five Hot Springs (SHANGT, ZHONGT, XIAT, WENT and SHENT) respectively is *Acinetobacter*, *Tepidimonas*, *Vogesella* and *Acinetobacter*, *Sphingopyxis* and *Novosphingobium*, *Aquabacterium*. **[Conclusion]** Five Hot Springs in Lushan are rich in microbial resources and may have the potential for the development of such resources.

**Keywords:** Five Hot Spring, Bacterial diversity, 16S rRNA gene, HiSeq2500 PE250

自 20 世纪 50 年代以来,人们一直对生长在嗜热(>55 °C)和超嗜热(>80 °C)的温泉微生物有着巨大的兴趣,原因是从这些温泉微生物中获取的酶作为生物催化剂在工业以及生物制剂等领域的应用中具有极高的价值<sup>[1]</sup>。另外,人们也一直在不同的环境条件下,尤其是在极端环境微生物中寻找新的化合物用于药物的研发<sup>[2]</sup>,而温泉、海洋则是地球上生物多样性最大的蓄水池,对于研发新的天然产物具有巨大的潜力<sup>[3]</sup>。尽管如此,地球上仅有约 1%–10% 的原核生物被人们研究<sup>[4]</sup>。

在我国中部河南平顶山市鲁山县城西 10 km,位于外方山和伏牛山之间的沙河河谷两侧,在长约 30 km 地域内,分布着鲁山五大温泉,分别是:上汤、中汤、下汤、温汤和神汤(也称碱汤)。上汤海拔 275 m,中汤及温汤海拔 220 m,下汤海拔 179 m,神汤海拔 148 m。鲁山五大温泉矿化度在 0.46–0.72 g/L 之间,氟含量在 13.60–17.78 mg/L 之间,偏硅酸含量在 74.8–97.0 mg/L 之间,水温在 27–63 °C 之间,pH 8.0–9.1,属于弱碱性医疗热矿水,具有极佳的医疗效果。早在北魏时期,地理学家郦道元在他的《水经注·洧水》篇中称鲁山温泉“可以疗万疾”<sup>[5]</sup>。虽然鲁山五大温泉旅游、医疗等资源开发历史悠久,但是关于其微生物的研究却很少,而鲁山五大温水的微生物多样性和群落结构的研究至今未见报道。

在本研究中,我们采用高通量测序平台 Illumina

HiSeq2500 PE250,使用 16S rRNA 基因扩增测序技术对鲁山五大温泉水中细菌的 16S rRNA 基因 V3–V4 区域进行了测序,分析了鲁山五大温泉水的细菌多样性和群落结构,发现鲁山五大温泉水的微生物资源十分丰富。本研究首次对鲁山五大温泉水的微生物开展多样性研究,为将来开发和利用温泉微生物资源提供了基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和处理

样品采集于河南平顶山鲁山五大温泉区:上汤(Shangtang, SHANGT)、中汤(Zhongtang, ZHONGT)、下汤(Xiatang, XIAT)、温汤(Wentang, WENT)、神汤(Shentang, SHENT)。用干净的塑料桶收集温泉水各 10 L,现场测定温度并对样品所处的经纬度进行 GPS 定位。然后用 0.22 μm 的滤膜过滤温泉水,在滤膜上富集温泉水中的微生物,–80 °C 保存滤膜,备用。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取滤膜上富集的微生物的总 DNA,然后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,使用无菌水稀释样品至 1 ng/μL。

### 1.3 16S rRNA 基因扩增与测序

以稀释后的基因组 DNA 为模板,根据细菌的 16S rRNA 基因 V3–V4 区序列,选择测序引物为 341F

(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和 806R (5'-GGAC TACNNGGGTATCTAAT-3'),使用带 Barcode 的特异引物, New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶对测序区域进行 PCR 扩增。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 合格后使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量鉴定合格后, 使用 HiSeq2500 PE250 测序平台进行测序。

#### 1.4 基因组数据分析

对测序后得到的原始数据(Raw data)数据进行拼接(FLASH V1.2.7)<sup>[6]</sup>、质控<sup>[7]</sup>和嵌合体过滤<sup>[8]</sup>等, 得到最终的有效数据(Effective tags)。

#### 1.5 OTU 聚类 and 物种注释

利用 UPARSE 软件(V7.0.1001)对 Effective tags 进行聚类(Identity≥97%), 将序列聚类成为 OTU, 同时选取 OTU 的代表性序列(OTU 中出现频数最高的序列作为 OTU 的代表序列)。然后, 使用 Mothur 与 Silva 的 SSUrRNA 数据库对 OTU 代表序列进行物种注释分析(阈值为 0.8–1.0), 获得各个分类水平的分类学信息: 界 (Kingdom)、门 (Phylum)、纲 (Class)、Order (目)、Family (科)、Genus (属)、Species (种), 在各分类水平统计各样本的群落组成。最后, 使用 MUSCLE 软件(Version 3.8.31)进行快速多序列比对, 得到所有 OTU 代表序列的系统发生关系。

#### 1.6 样品复杂度分析

使用 QIIME 软件(Version 1.7.0)计算 Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、Goods-coverage 和 PD\_whole\_tree 指数, 使用 R 软件(Version 2.15.3)绘制稀释度曲线、Rank 曲线、物种累积曲线, 并使用 R 软件进行 Alpha 多样性指数组间差异分析。

#### 1.7 多样品比较分析(Beta diversity)

根据所有样品的物种注释结果和 OTU 的丰度信息, 将相同分类的 OTU 信息合并处理得到物种丰度信息表(Profiling table)。同时利用 OTU 之间的

系统发生关系, 进一步计算 UniFrac 距离(Unweighted UniFrac)<sup>[9-10]</sup>。UniFrac 距离是一种利用各样品中微生物序列间的进化信息计算样品间距离, 2 个以上的样品, 则得到一个距离矩阵。然后, 利用 OTU 的丰度信息对 UniFrac 距离进一步构建 Weighted UniFrac 距离<sup>[11]</sup>。以 Weighted UniFrac 和 Unweighted UniFrac 距离来绘制距离矩阵热图进行多样品的比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品的水质参数

鲁山温泉水化学类型为  $\text{HCO}_3\text{-SO}_4\text{-Na}$  型或  $\text{SO}_4\text{-HCO}_3\text{-Na}$  型<sup>[5]</sup>, pH 8.0–9.1, 属于弱碱性医疗热矿水, 五大温泉水采样信息见表 1。

### 2.2 序列拼接与组装

鲁山五大温泉水细菌的 16S rRNA 基因序列文库共获得 460 190 条 Reads, 拼接后得到 317 748 条有效的 Tags, 在 97% 相似度下可将其聚类为用于物种分析的 2 273 个 OTU。其中, 鲁山五大温泉中上汤共有 56 017 条 Reads, 聚类为 670 个 OTU; 中汤共有 68 319 条 Reads, 聚类为 287 个 OTU; 下汤共有 65 247 条 Reads, 聚类为 337 个 OTU; 温汤共有 59 340 条 Reads, 聚类为 598 个 OTU; 神汤共有 68 825 条 Reads, 聚类为 381 个 OTU (图 1)。

### 2.3 鲁山五大温泉水细菌物种及其丰度

在门分类阶元水平, 五大温泉水细菌的 16S rRNA 基因序列共注释到了变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、奇古菌门 (Thaumarchaeota) 等超过 40 个门, 其中, 变形菌门在五大温泉中所占比例最高, 是优势菌。但不同温泉样本中优势菌门的相对丰度有所不同, 上汤中所占比例为 60%, 在中汤中占 94%, 在温汤中占 75%, 在下汤中高达 99%, 在神汤中占 93%。在门的分类阶元上, 上汤和温汤的多样性最丰富, 其次是中汤、神汤, 多样性最差的是下汤 (图 2)。此外, 上汤和温汤、中汤和神汤在微生物不同的门上的分布较为相似。

表 1 五大温泉水样信息

Table 1 The water information for Five Hot Spring

温泉 Spring	位置 Position	经度 Longitude	纬度 Latitude	体积 Volume (L)	水温 Temperature (°C)
上汤 SHANGT	大佛温泉山庄 Buddha hot spring villa	112.461	33.755	10	51
中汤 ZHONGT	赵庄中心卫生院 The central hospital of Zhaozhuang	112.568	33.746	10	58
下汤 XIAT	皇姑浴温泉国际酒店 Huanggu bath spa international hotel	112.637	33.724	10	44
温汤 WENT	赵村乡温汤庙村 Zhao village Wentang Temple Village	112.562	33.741	10	44.5
神汤 SHENT	让河乡新孟庄 Xinmengzhuang, Ranghe township	112.794	33.719	10	47

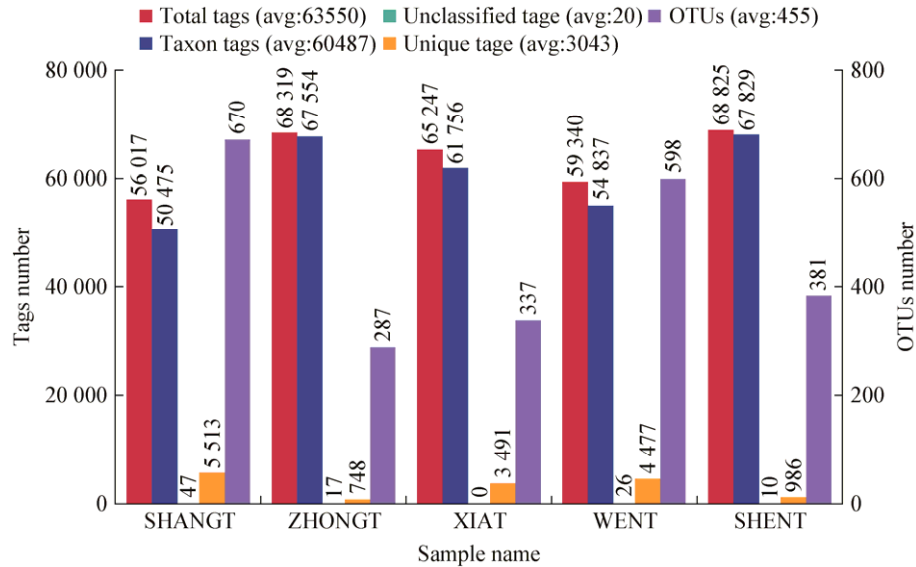


图 1 各样本的 OTUs 聚类 and 注释情况

Figure 1 OTUs clustering and annotation from different samples

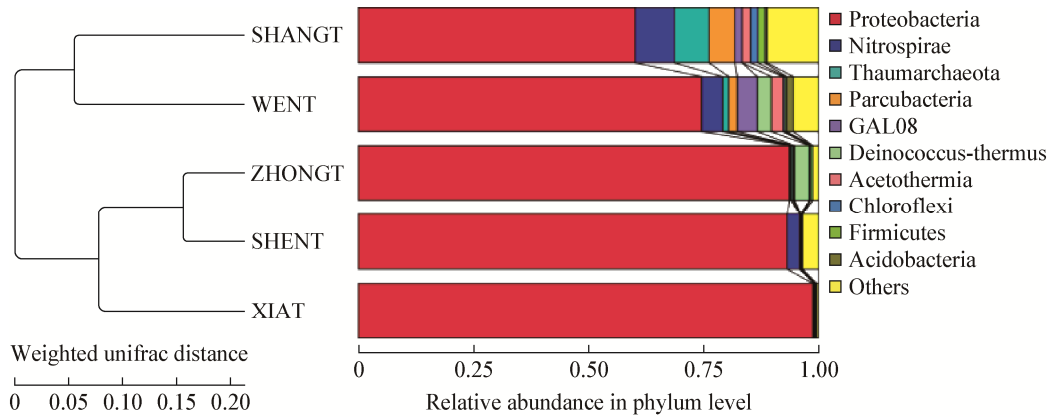


图 2 各样本在门水平的分布

Figure 2 The distribution of Phylum from different samples

在属分类阶元水平, 鲁山五大温泉菌落构成不同, 且不同菌属所占的比例也不同。上汤在属水平上的主要微生物是 *Fontimonas*、*Schlegelella*、*Candidatus-Nitrosocaldus*、*Caldimonas*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、*Bacillus*、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、柯克斯体属(*Coxiella*)等; 中汤在属水平上主要的微生物是 *Tepidimonas*、嗜氢菌属(*Hydrogenophilus*)、栖热菌属(*Thermus*、*Hydrogenobacter*)等; 下汤在属水平上主要的微生物是 *Limnobacter*、*Perlucidibaca*、*Gulbenkiania*、*Vogesella*、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)等; 温汤在属水平上主要的微生物是新鞘脂菌属

(*Novosphingobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、*Pseudorhodoferax*、*Sphingopyxis*等; 神汤在属水平上主要的微生物是 *Aquabacterium* 和 *Comamonas*。在属分类阶元上, 上汤和温汤的多样性最丰富, 其次是中汤和下汤, 神汤的多样性最差(图 3)。

在鲁山五大温泉中发现前十的属有: *Aquabacterium* (21.57%)、*Tepidimonas* (17.76%)、*Vogesella* (5.89%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (8.23%)、*Sphingopyxis* (2.36%)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*) (2.29%)、*Perlucidibaca* (2.36%)、*Pseudorhodoferax* (1.70%)、亚硝化暖菌属(*Candidatus\_Nitrosocaldus*) (1.68%)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*) (1.49%)。

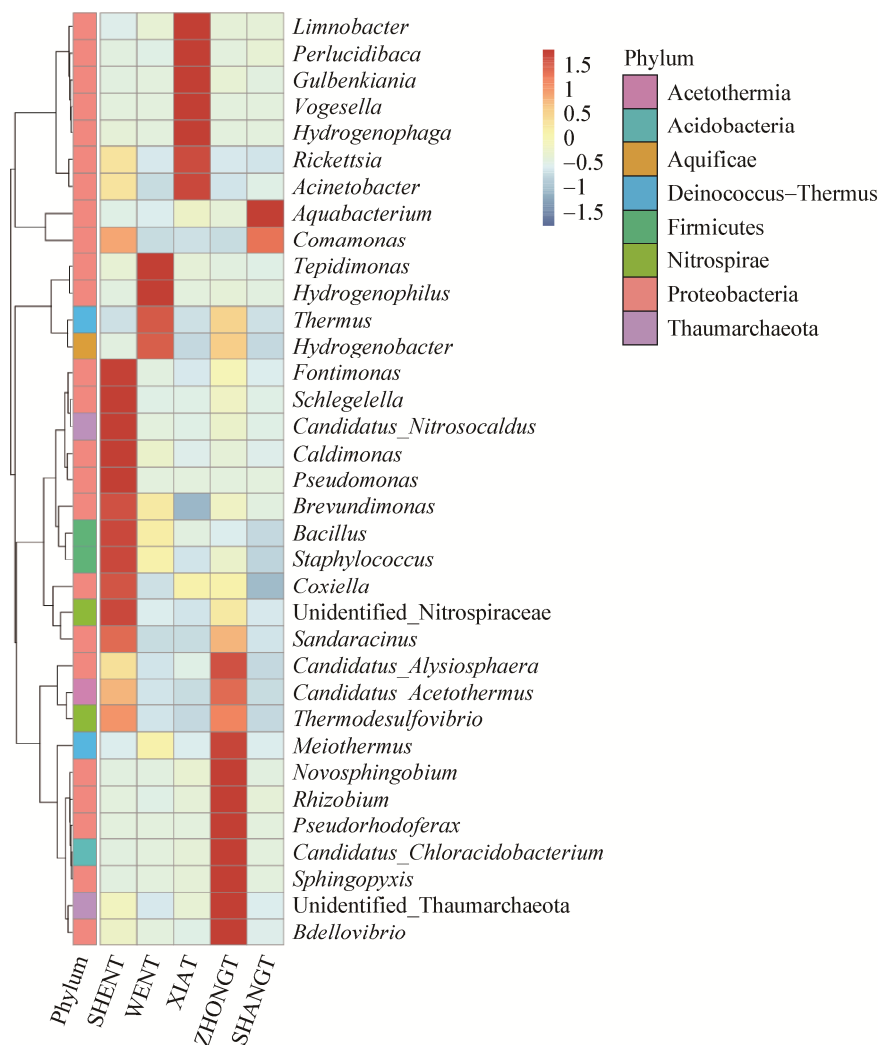


图 3 各样本在属水平的分布

Figure 3 The distribution of general from different samples

## 2.4 鲁山五大温泉水细菌多样性分析

物种稀释度曲线和物种 Rank 曲线是展示样品物种多样性的重要形式。物种稀释度曲线可以展示物种的丰富度,由图 4A 可知,上汤物种的丰富度最高,其次是温汤、神汤和下汤,中汤物种丰富度最低。物种 Rank 曲线展示了物种的均匀度,由图 4B 可知,均匀度最高的是上汤,最低的是中汤。

Beta 多样性研究中,选用 Weighted UniFrac 距离和 Unweighted UniFrac 距离 2 个指标来衡量 2 个样品间的相异系数,其值越小,表示这 2 个样品在物种多样性方面存在的差异越小。由图 5 可知,中汤和神汤在物种多样性方面最相近,相差最远的是上汤和神汤。

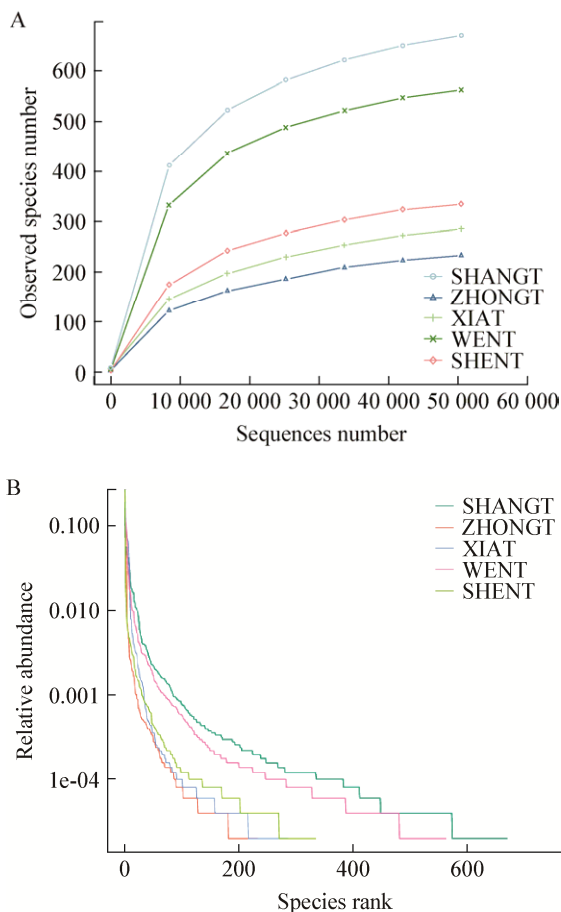


图 4  $\alpha$ -多样性分析

Figure 4  $\alpha$ -diversity comparison

注: A: 稀释曲线; B: Rank Abundance 曲线。

Note: A: Rarefaction curve; B: Rank abundance curve.

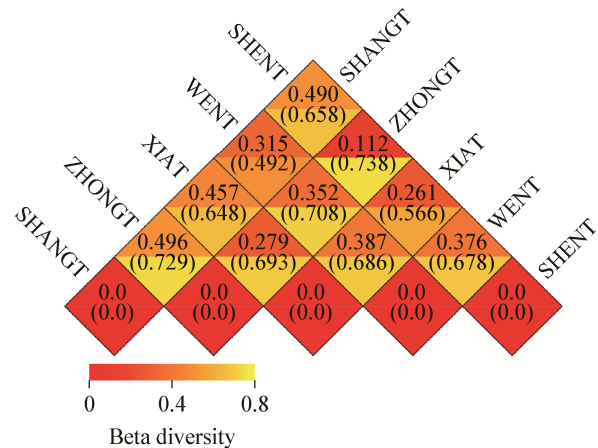


图 5 Beta 多样性指数热图

Figure 5 Beta diversity index heat map

## 3 讨论

### 3.1 上汤和温汤细菌多样性

上汤和温汤的物种丰富度和均匀度在五大温泉中相对较高,其中上汤的物种多样性最高且分布均匀,这可能与上汤较低的经度(112.461)以及适宜的温度(51 °C)有关。在属分类阶元上,上汤的优势菌是不动杆菌属(*Acinetobacter*),此菌属在自然界分布广泛,主要存在于水体和土壤中,革兰氏阴性,好氧,过氧化氢酶阳性,可耐受的 pH 范围是 3.0–9.0 (最适为 6.0–7.0)。 *Acinetobacter* 是重要的石油烃降解者,在降低石油烃生物毒性等方面有重要作用,因此可用于石油烃的修复工程<sup>[12]</sup>。温汤的优势菌属是 *Sphingopyxis* 和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*),在温汤中含量分别为 11%和 10%, *Sphingopyxis* 在其他几个温泉中含量极低( $\leq 0.3\%$ ),这可能与温汤独特的微环境有关。 *Sphingopyxis* 属于  $\alpha$ -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,可用于研制微生物修复剂并应用于生物修复<sup>[13]</sup>。 *Novosphingobium* 是革兰氏阴性的杆状细菌,具有浅黄色素,有运动型和非运动型。可从深海海山、温泉<sup>[14–15]</sup>、荷花池、养鱼池、森林土壤<sup>[16–18]</sup>以及被石油污染的土壤中<sup>[19]</sup>分离得来,从耐盐的水稻根际分离得来的 *Novosphingobium* 具有促进植物生长的作用<sup>[20]</sup>。 *Novosphingobium* 可用于合成银纳

米材料 AgNPs, 与抗生素联合使用可以增强其抗绿脓杆菌、大肠杆菌、肠道沙门菌以及副溶血弧菌的活性, 可作为一种新型环保的抗菌剂<sup>[21]</sup>。

### 3.2 中汤、神汤和下汤细菌多样性

中汤和神汤在物种多样性方面最为相近, 但由于两温泉的地理位置以及微环境有所不同, 在属的分类阶元上二者的优势菌群有所不同。在中汤中 *Tepidimonas* 的含量高达 79%, 为优势菌。*Tepidimonas* 属于  $\beta$ -变形杆菌, 大部分来自温泉并且轻度嗜热<sup>[22-23]</sup>, 在意大利、印度、台湾、葡萄牙的温泉中也分离出来过<sup>[24-27]</sup>。革兰氏阴性杆菌, 无色素, 最适生长温度为 50–55 °C, 最适 pH 为 7.5–8.5, 严格好氧, 兼性化能异养。因 *Tepidimonas* 能氧化还原硫化物形成硫酸盐, 鲁山温泉水化学类型为  $\text{HCO}_3\text{·SO}_4\text{-Na}$  型或  $\text{SO}_4\text{·HCO}_3\text{-Na}$  型<sup>[5]</sup>, 而 *Tepidimonas* 在中汤中含量明显高于鲁山其他温泉也体现了中汤中硫酸根浓度高于鲁山其他温泉。*Aquabacterium* 在神汤中含量高达 85%, 为优势菌。该属细菌也属于  $\beta$ -变形杆菌, 革兰氏阴性无孢子短杆菌, 氧化酶阳性, 过氧化氢酶阴性。在温泉水<sup>[28-29]</sup>和饮用水<sup>[30]</sup>中均可分离到此属细菌, 另外在被石油污染的土壤<sup>[31]</sup>中也曾被分离出来, 因此 *Aquabacterium* 可用于石油污染的微生物修复工程。

下汤的优势菌群为 *Vogesella* 和 *Acinetobacter*, 分别占 29% 和 25%, *Vogesella* 在其他几个温泉中含量极低( $\leq 0.2\%$ ), 这可能与下汤的地理位置以及独特的微环境有关。*Vogesella* 为革兰氏阴性的短杆状细菌, 无色素, 可从温泉水<sup>[32]</sup>、河水<sup>[33-34]</sup>、湖水<sup>[35]</sup>、池塘<sup>[36]</sup>中分离得来, 在碱性土壤<sup>[37]</sup>中也可分离到此类细菌。

### 3.3 鲁山五大温泉水的细菌多样性

本研究采用 Illumina HiSeq2500 PE250 扩增子测序技术对河南鲁山五大温泉水细菌的群落组成进行分析, 一共注释鉴定获得 40 个门 239 个属。在鉴定的 40 个门中, 变形菌门在五大温泉中的所占比例最多, 是优势菌。已有研究表明, 变形菌门作为优势群落存在于厦门近海温泉的沉积物<sup>[38]</sup>

和云南洱源牛街温泉中<sup>[39]</sup>; Ruckmani 等<sup>[40]</sup>在研究印度高止山脉西部温泉水细菌构成时, 显示优势菌为蓝藻门, 其次是变形菌门。Bohorquez 等<sup>[41]</sup>在研究哥伦比亚安第斯山脉的酸性温泉时发现变形菌门、硬壁菌门等是主要微生物群落。总之, 世界各地的温泉含有丰富的微生物, 优势细菌群主要是以蓝藻门、变形菌门和产水菌门为主<sup>[42]</sup>。

鲁山五大温泉水细菌的种类与结构存在一定的差异。我们研究发现上汤和温汤的物种丰富度和均匀度均高于神汤、中汤和下汤, 而中汤的物种丰富度和均匀度是最低的, 这可能与上汤(51 °C)和中汤(58 °C)的温度有关, 上汤的温度最有利于大部分嗜热菌的生长。另外中汤和温汤的地理位置相差不大, 但是微生物分布却相差极大, 这可能与两温泉的温度有极大关系。张丽娜等<sup>[43]</sup>在研究河北承德地区 2 个不同温度的温泉水细菌多样性时, 发现温度是影响温泉水细菌多样性的重要因素。而在鲁山五大温泉中, 上汤水温 51 °C, 中汤 58 °C, 下汤 44 °C, 温汤 44.5 °C, 神汤 47 °C, 说明温度可能是影响鲁山五大温泉水细菌多样性的因素之一。

研究发现原核生物基因组中 16S rRNA 基因存在异质性, 因此基于 16S rRNA 基因的菌群多样性分析会引起一定程度的高估<sup>[44]</sup>。因此本研究中对于鲁山五大温泉水细菌多样性的初步分析可能会存在一定程度的高估, 因此还需结合其他技术进一步深入研究, 从而能更加清楚地理解温泉生态系统中微生物的群落特征和优势菌群所发挥的作用。

## 4 结论

温泉水中含有丰富的微生物资源, 具有很高的科研与应用价值。我们首次采用高通量测序分析了河南鲁山的上汤、中汤、下汤、温汤和神汤五大温泉水的细菌多样性和群落结构, 发现河南鲁山五大温泉含有丰富的微生物资源, 特别是 *Aquabacterium* (21.57%)、*Tepidimonas* (17.76%)、*Vogesella* (5.89%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (8.23%)、*Sphingopyxis*



(2.36%)的微生物。其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Sphingopyxis*、*Aquabacterium* 可用于微生物修复工程,新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)作为新型的抗菌剂在临床上具有较高的应用价值。本研究为该地区嗜热微生物的开发以及温泉生态系统的进一步深入研究提供可靠的依据。

## REFERENCES

- [1] López-López O, Cerdán ME, González-Siso MI. Hot Spring Metagenomics[J]. Life, 2013, 3(2): 308-320
- [2] Mahajan GB, Balachandran L. Sources of antibiotics: Hot springs[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 134: 35-41
- [3] Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 1925-1965
- [4] Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift[J]. Microbiology and Molecular Biology Review. 2000, 64(3): 573-606
- [5] Guo WX. Development prospects analysis on tourism resources of the Five Hot Springs of Lushan County, Henan Province[J]. Value engineering, 2014(26): 168-169 (in Chinese)  
郭文秀. 河南省鲁山县五大温泉开发前景分析[J]. 价值工程, 2014(26): 168-169
- [6] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [7] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59
- [8] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [9] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228-8235
- [10] Lozupone C, Lladser ME, Knights D, et al. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison[J]. The ISME Journal, 2011, 5(2): 169-172
- [11] Lozupone CA, Hamady M, Kelly ST, et al. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1576-1585
- [12] Liu YH, Wang H, Hu XK. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1579-1589 (in Chinese)  
刘玉华, 王慧, 胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1579-1589
- [13] 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), 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
- [14] Zhang DC, Liu YX, Huang HJ. *Novosphingobium profundum* sp. nov. isolated from a deep-sea seamount[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(1): 19-25
- [15] Sheu SY, Liu LP, Chen WM. *Novosphingobium bradum* sp. nov., isolated from a spring[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 5083-5090
- [16] Ngo HTT, Trinh H, Kim JH, et al. *Novosphingobium lotistagni* sp. nov., isolated from a lotus pond[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(11): 4729-4734
- [17] Sheu SY, Chen ZH, Chen WM. *Novosphingobium piscinae* sp. nov., isolated from a fish culture pond[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1539-1545
- [18] Nguyen TM, Myung SW, Jang H, et al. Description of *Novosphingobium flavum* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3642-3650
- [19] Chaudhary DK, Kim J. *Novosphingobium naphthae* sp. nov., from oil-contaminated soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(8): 3170-3176
- [20] Krishnan R, Menon RR, Likhitha, et al. *Novosphingobium pokkali* sp. nov., a novel rhizosphere-associated bacterium with plant beneficial properties isolated from saline-tolerant pokkali rice[J]. Research in Microbiology, 2017, 168(2): 113-121
- [21] Du J, Singh H, Yi TH. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2017, 45(2): 211-217
- [22] Chen WM, Huang HW, Chang JS. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(5): 1810-1816
- [23] Freitas M, Rainey FA, Nobre MF, et al. *Tepidimonas aquatica* sp. nov., a new slightly thermophilic  $\beta$ -proteobacterium isolated from a hot water tank[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(3): 376-381
- [24] Valeriani F, Biagini T, Giampaoli S, et al. 2016. Draft genome sequence of *Tepidimonas taiwanensis* strain VT154-175[J]. Genome Announcements, 2016, 4(5): e00942-16, DOI: 10.1128/genomeA.00942-16
- [25] Dhakan DB, Saxena R, Chaudhary N, et al. Draft genome sequence of *Tepidimonas taiwanensis* strain MB2, a chemolithotrophic thermophile isolated from a hot spring in central India[J]. Genome Announcements, 2016, 4(1): e01723-15, DOI: 10.1128/genomeA.01723-15
- [26] Chen TL, Chou YJ, Chen WM, et al. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring[J]. Extremophiles, 2006, 10(1): 35-40
- [27] Moreira C, Rainey FA, Nobre MF, et al. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the  $\beta$ -Proteobacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 735-742
- [28] Sheu SY, Shiau YW, Wei YT, et al. *Sphingobium fontiphilum* sp. nov., isolated from a freshwater spring[J]. International Journal



- of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 5): 1906-1911
- [29] Chen WM, Cho NT, Yang SH, et al. *Aquabacterium limnoticum* sp. nov., isolated from a freshwater spring[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 3): 698-704
- [30] Kalmbach S, Manz W, Bendinger B, et al. *In situ* probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms[J]. Water Research, 2000, 34(2): 575-581
- [31] Pham VHT, Jeong SW, Kim J. *Aquabacterium olei* sp. nov., an oil-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3597-3602
- [32] Chou YJ, Chou JH, Lin MC, et al. *Vogesella perlucida* sp. nov., a non-pigmented bacterium isolated from spring water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(12): 2677-2681
- [33] Chen WM, Chen JC, Wang C, et al. *Vogesella amnigena* sp. nov., isolated from a freshwater river[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3634-3640
- [34] Sheu SY, Chen YL, Young CC, et al. *Vogesella facilis* sp. nov., isolated from a freshwater river, and emended description of the genus *Vogesella*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 66(2): 3043-3049
- [35] Jørgensen NOG, Brandt KK, Nybroe O, et al. *Vogesella mureinivorans* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from lake water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2467-2472
- [36] Chou JH, Chou YJ, Arun AB, et al. *Vogesella lacus* sp. nov., isolated from a soft-shell turtle culture pond[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2629-2632
- [37] Subhash Y, Tushar L, Sasikala C, et al. *Vogesella alkaliphila* sp. nov., isolated from an alkaline soil, and emended description of the genus *Vogesella*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 6): 2338-2343
- [38] Lin BX. Investigation of microbial diversity of the coastal hot spring in Xiamen and characterization of the thermostable cellulases[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese)
- 林白雪. 厦门近海温泉微生物多样性及热稳定纤维素酶的研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2010
- [39] Sun P, Gu C, Ren F, et al. Prokaryotic microbial phylogenetic diversity of "Eryuan Niujie" hot spring in Yunnan Province, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(11): 1510-1518 (in Chinese)
- 孙盼, 顾淳, 任菲, 等. 云南洱源牛街热泉原核微生物多样性分析[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1510-1518
- [40] Ruckmani A, Chakrabarti T. Analysis of bacterial community composition of a spring water from the Western Ghats, India using culture dependent and molecular approaches[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 7-15
- [41] Bohorquez LC, Delgado-Serrano L, López G, et al. In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(1): 103-115
- [42] 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
- [43] Zhang LN, Hao CB, Li SY, et al. Bacterial diversity analysis of two hot springs in Chengde, Hebei[J]. Microbiology China, 2011, 38(11): 1618-1625 (in Chinese)
- 张丽娜, 郝春博, 李思远, 等. 河北承德地区两个温泉中细菌的多样性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1618-1625
- [44] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969