



研究报告

高通量测序分析云南腾冲热海热泉微生物多样性

秦亚玲^{Δ1,3} 梁宗林^{Δ1,3} 宋阳^{1,2,3,4} 王保军¹ 刘双江^{*1,3,4} 姜成英^{*1,3,4}

1 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

2 中国科学院生态环境研究中心环境生物技术重点实验室 北京 100085

3 中国科学院大学 北京 100049

4 中国科学院环境微生物技术联合实验室 北京 100101

摘要:【背景】云南腾冲热海热泉中蕴含着丰富的极端微生物资源。【目的】揭示云南腾冲热海热泉中微生物物种多样性及群落结构差异,发掘酸性热泉中铁、硫氧化功能微生物。【方法】采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术对 3 处热泉 15 个水体样品中微生物 16S rRNA 基因 V4-V5 区进行测序及生物信息学分析。【结果】3 处热泉中共获得 578 061 条有效序列,聚类为 141 个可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU),包括 19 个门 66 个属。鼓鸣泉(GMQ)、蛤蟆嘴(HMZ)、黄瓜箐(HGQ) 3 处热泉均以泉古菌门(*Crenarchaeota*)和厚壁菌门(*Firmicute*)为主。从属水平分析,碱性热泉鼓鸣泉(GMQ)和中性热泉蛤蟆嘴(HMZ)分别注释到 37、32 个属,优势属均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和热棒菌属(*Pyrobaculum*)。酸性热泉黄瓜箐(HGQ)共注释到 20 个属,优势属为酸杆菌属(*Acidibacillus*)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*),此外,具有铁、硫氧化潜力的菌属有喜酸菌属(*Acidocaldus*)、硫化芽孢杆菌属(*Sulfobacillus*)、硫化叶菌属(*Sulfolobus*)及生金球菌属(*Metallosphaera*)等,进一步通过硫氧化培养基分离获得了这些菌属中的纯菌株。【结论】云南腾冲热海热泉水体中蕴含丰富的微生物资源,热泉间微生物物种组成差异明显;酸性热泉中存在多种具有潜在铁、硫代谢功能的菌种;未分类类群、非培养类群丰度很高,尤其是蕴藏着可观的古菌资源。

关键词: 热海热泉, 高通量测序, 微生物多样性, 硫氧化微生物

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670124); Basic Work of Science and Technology in the Ministry of Science and Technology (2015FY110100); National Basic Research Program of China (2014CB846000); National Material Environmental Corrosion Platform of China

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: LIU Shuang-Jiang: E-mail: liusj@im.ac.cn

JIANG Cheng-Ying: Tel: 86-10-64807581; E-mail: jiangcy@im.ac.cn

Received: 04-04-2019; **Accepted:** 24-04-2019; **Published online:** 29-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31670124); 科技基础性工作专项(2015FY110100); 国家重点基础研究发展规划(2014CB846000); 国家材料环境腐蚀平台项目

Δ对本文贡献相同

*通信作者: 刘双江: E-mail: liusj@im.ac.cn

姜成英: Tel: 010-64807581; E-mail: jiangcy@im.ac.cn

收稿日期: 2019-04-04; 接受日期: 2019-04-24; 网络首发日期: 2019-05-29

Amplicon-based high-throughput sequencing reveals the microbial diversity in Rehai hot springs, Tengchong, Yunnan Province

QIN Ya-Ling^{Δ1,3} LIANG Zong-Lin^{Δ1,3} SONG Yang^{1,2,3,4} WANG Bao-Jun¹
LIU Shuang-Jiang^{*1,3,4} JIANG Cheng-Ying^{*1,3,4}

1 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 IMCAS-RCEESCAS Joint-Lab of Microbial Technology for Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Rehai hot springs in Yunnan Province contain a wealth of extreme microbial resources. [Objective] This study was proposed to study the microbial diversity and community structures in Rehai hot springs, especially the diversity of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms in the acid hot springs. [Methods] The microbial 16S rRNA V4–V5 genes region was sequenced by Illumina HiSeq technology and analyzed by bioinformatics software. [Results] A total of 578 061 high-quality sequences were obtained from 15 samples of 3 hot springs, resulting in 141 OTU belonging to 19 phyla, 66 genera. *Crenarchaeota* and *Firmicutes* were main phyla in Gumingquan (GMQ), Hamazui (HMZ) and Huangguaqing (HGQ). On the genera level, there were 37 and 32 genera in alkaline hot spring GMQ and neutral hot spring HMZ, respectively, in which the major genera were *Bacillus* and *Pyrobaculum*. Among the 20 genera present in acidic hot spring HGQ, the genera *Acidibacillus* and *Acidithiobacillus* were dominant. Furthermore, some species of *Acidicaldus*, *Sulfobacillus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* genera were isolated from HGQ, which have potential to oxidize iron and sulfur. [Conclusion] The microbial resources were diverse in Rehai hot springs and the microbial compositions of the three hot springs were obviously different. Iron- and sulfur-oxidizing microorganisms, uncultured and unclassified microbes, especially archaea, were rich in acidic HGQ.

Keywords: Rehai hot springs, High-throughput sequencing, Microbial diversity, Sulfur-oxidizing microorganisms

热泉(Hot spring)是全球广泛分布的一种极端环境,多分布于地壳运动活跃的板块交界处,分为陆地热泉和海底热泉。陆地热泉与早期的地球环境比较接近,其温度、pH、矿物质成分、水化学类型等自然条件呈现多态化、极端化,因此孕育着丰富且独特的极端微生物资源^[1-2]。深入了解该环境中微生物多样性,探究微生物群落、微生物类群与代谢特征、极端环境微生物适应机理,不仅拓展对现有基因多样性、物种多样性、生态系统多样性的认识,而且对重构生命之树、探索早期生命起源、揭示生命与环境的协同进化机制都具有独特的贡献和意义。目前,无论是传统的纯

培养方法还是基于16S rRNA基因、宏基因组、单细胞基因组测序等新一代高通量技术方法的研究结果均显示,全球范围内的地热热泉中蕴含着高丰度的未培养微生物类群^[3-7],并探测到参与碳、氮、硫元素循环的重要功能基因甚至是代谢新途径^[8-14]。

云南-西藏地热带是世界上最活跃的地热带之一,分布着成千上万的陆地热泉。云南省探明的温泉共有862处,腾冲热海风景区是中国最大、研究最深入的地热区^[15]。近些年来,通过纯培养、分子生物学及16S rRNA基因扩增子测序等技术手段对热泉中硫化叶菌科^[16]、泉古菌门^[17-18]、类病

毒颗粒^[19]以及真菌^[20-21]等的微生物多样性进行了研究^[22],分析了热泉菌藻席、泉底沉积物中的微生物多样性和群落结构差异^[23-24],或是通过特定的功能基因来探究功能微生物多样性^[25]。酸性热泉一般 pH 较低,富含硫和还原型无机硫化物,SO₄²⁻浓度高^[26],独特的酸热环境中蕴藏着丰富的潜在铁、硫代谢相关的功能微生物和未知极端微生物^[27]。现有的研究对酸性热泉中厚壁菌门^[28]、变形菌门^[29]多样性,以及铁、硫代谢功能微生物新类群及其分子代谢机制、酸性极端环境适应机制等^[30-33]都有了一定程度的认识,但目前酸性热泉中还存在较大比例的未知类群,尤其是潜在的古菌,对于其中的功能微生物新类群如嗜酸热古菌的代谢机制的认识还存在较多空白。

本研究通过 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术分析腾冲热海风景区内 3 处热泉中微生物物种多样性及群落结构差异,旨在探索酸性热泉与其它类型热泉中的微生物组成差异以及潜在的铁、硫氧化微生物,发掘更多极端微生物新类群及功能微生物资源等,为未来极端微生物在生物冶金、煤炭生物脱硫过程中的应用以及酸性热泉中的微生物群落结构差异、生物地球化学元素循环的探究提供微生物资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集及环境因子测定

2018 年 1 月于云南省腾冲热海风景区采集鼓鸣泉(GMQ) (24°57'3.85"N, 98°26'10.35"E)、黄瓜箐(HGQ) (24°56'28.68"N, 98°26'20.49"E)和蛤蟆嘴(HMZ) (24°57'0.07"N, 98°26'18.48"E)等 3 处热泉水样,共 15 个样品。利用便携带手持式多参数计测定温度和 pH 值。用无菌采样器采取约 500 mL 水样于无菌广口瓶,置于干冰冰桶保存,运送至实验室进行处理。各样品用溶剂过滤器真空抽滤通过聚醚砜滤膜^[34],收集微生物到无菌滤膜,用于基因组提取。采用离子色谱、ICP-OES 及水质分析仪等进行阴、阳离子及元素等的测定。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, QIAGEN 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒, Omega 公司; 热启动 HiFi 高保真酶, Roche-KAPA 公司。便携带手持式多参数计, WTW 公司; 聚醚砜滤膜(Φ47 0.22 μm), PALL 公司。离子色谱仪, Dionex 公司; ICP-OES, PerkinElmer 公司; 全自动水质分析仪, Thermo Scientific 公司; 液相色谱, 安捷伦公司; 涡旋混匀仪, Scientific Incorporation 公司。

1.3 样品基因组提取

采用土壤 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA, 用已灭菌的手术剪刀和镊子将收集了菌体的滤膜剪碎^[35], 放入 PowerBead 管中, 后续按照试剂盒操作说明进行。利用 Tris 盐酸缓冲液(pH 8.0)洗脱 DNA 并置于-20 °C 条件下冻存, 送至北京博奥汇玖生物科技有限公司完成 16S rRNA 基因扩增子测序。

1.4 16S rRNA 基因扩增子测序

对 DNA 样品中 16S rRNA 基因的 V4-V5 区进行扩增子测序的引物为 515F (5'-GTGY CAGCMGCCGCGGTAA-3')和 926R (5'-CCGYCA ATTYMTTTRAGTTT-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2×KAPA 热启动 HiFi 高保真酶 12.5 μL, 上、下游引物终浓度 0.3 μmol/L, DNA 模板约 10 ng。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 98 °C 20 s, 55 °C 15 s, 72 °C 15 s, 25 个循环; 72 °C 1 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后回收约 440 bp (含双端分子标记)的产物条带, Qubit 测定浓度并连接接头完成文库构建。检测文库片段范围和浓度后, 选择 Illumina HiSeq 平台对文库进行测序。

1.5 测序数据分析

高通量测序的原始数据(Raw data)为各样本双端序列文件, 去除引物和引物中含有超过一个碱基错误的序列, 采用 QIIME 对双端序列拼接、质控、加入样本标签、合并序列, 采用 Usearch V11 对序列去冗余后得到 62 785 条序列, 根据 UPARSE 算法对相似度≥97%的序列进行聚类形成 OTU^[36]并去除嵌合体, 最终得到 141 个 OTU 并生成 OTU

表。利用 RDP classifier 分类器比对 Silva 132 16S rRNA 基因数据库, 按照 0.5 置信度对所有 OTU 代表序列进行物种注释。采用 QIIME 对 OTU 表抽平后计算各分组样本的 ACE、Chao1、Observed_otus、Shannon、Simpson、Simpson_e、Goods coverage 等 α 多样性指数。采用 CSS 标准化方法对原始 OTU 表进行标准化后计算 Binary_jaccard 和 Bray_curtis 等距离矩阵用于分析样品 β 多样性。测序数据分析主要按照 QIIME 的 16S rRNA 基因扩增子测序分析流程进行, 同时借助 Usearch V11 进行部分数据处理, 其它数据统计及作图使用 OriginLab 和 R。

2 结果与分析

2.1 热泉理化参数特征及 16S rRNA 基因序列多样性

腾冲热海地热区多为硅酸盐矿物, 3 处热泉中硅酸盐含量普遍较高。热泉间温度范围广, pH 跨度大。GMQ 为碱性超高温热泉, pH 9.5, 96 °C, 主要含有 Na (696.68±28.16 mg/L)、Cl⁻ (639.72±3.68 mg/L)、K (97.65±4.05 mg/L)、NO₃⁻ (53.03±0.64 mg/L) 等; HGQ 为酸性高温热泉, pH 2.5, 65 °C, 主要含有 SO₄²⁻ (631.37±56.08 mg/L)、Cl⁻ (80.68±0.22 mg/L)、NO₃⁻ (55.73±1.92 mg/L)、Ca (67.34±3.58 mg/L), 一些金属元素含量偏高, 如 Al (35.74±6.32 mg/L)、Mg (14.39±2.30 mg/L)、Fe (12.41±1.29 mg/L) 和 Mn (1.05±0.17 mg/L) 等; HMZ 为中性超高温热泉, pH 7.5, 86 °C, 主要含有 Na (461.57±11.91 mg/L)、Cl⁻ (389.96±1.69 mg/L)、K (66.58±2.38 mg/L)、NO₃⁻ (55.99±1.29 mg/L) 等。采样信息及理化参数等见表 1。

3 处热泉 15 个样品共获得 606 064 条 16S rRNA 基因序列, 质控后为 578 061 条序列(表 2)。片段中位长度 N50 为 372–377 bp, 以 97% 相似度聚类形成共 141 个 OTU, 其中 GMQ 获得 226 690 条有效序列, 聚类为 79 个 OTU; HGQ 获得 234 416 条有效序列, 聚类为 61 个 OTU; HMZ 获得 116 955 条有效序列, 聚类为 58 个 OTU, 对 OTU 代表序列注释

后进行后续分析。文库覆盖率为 99.96%–99.98%。

2.2 腾冲热海热泉微生物多样性分析

3 处热泉样品中共注释到 19 个门(图 1A)。碱性热泉 GMQ 中主要有泉古菌门(*Crenarchaeota*, 45%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 33%)、产水菌门(*Aquificae*, 12.7%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 3.5%)、奇异球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*, 4.3%), 未分类类群仅占 0.28%。酸性热泉 HGQ 中主要有厚壁菌门(*Firmicutes*, 39.42%)、泉古菌门(*Crenarchaeota*, 17.8%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 10%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 1.5%)等, 未分类类群高达 30.7%。中性热泉 HMZ 中主要有厚壁菌门(*Firmicutes*, 85.7%)、泉古菌门(*Crenarchaeota*, 6.7%)、产水菌门(*Aquificae*, 7%)等, 未分类类群占比极低, 仅占 0.002%。从门水平分析, GMQ 微生物多样性最高, HGQ 次之, HMZ 微生物多样性最低, GMQ 和 HMZ 的物种组成比较相似。

3 处热泉样品中共注释到 66 个属(图 1B)。GMQ 共注释到 37 个属, 丰度大于 3% 的属为芽孢杆菌属(*Bacillus*, 25.9%)、热棒菌属(*Pyrobaculum*, 23.1%)、氢杆菌属(*Hydrogenobacter*, 12.7%)、火球形菌属(*Ignisphaera*, 10.2%)、栖热菌属(*Thermus*, 4.3%)、嗜碱菌属(*Alkaliphilus*, 4.1%) 及喜温菌属(*Caldimicrobium*, 3.2%) 等, 非培养类群及未分类类群为 7.6% 和 0.33%。HGQ 共注释到 20 个属, 丰度大于 3% 的属为酸杆菌属(*Acidibacillus*, 35.6%)、酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 5.6%)、喜酸菌属(*Acidicaldus*, 4.3%)、硫化芽孢杆菌属(*Sulfobacillus*, 3.6%)、硫化叶菌属(*Sulfolobus*, 3.2%); 此外还存在具有铁氧化活性的生金球菌属(*Metallosphaera*, 2.7%) 等, 非培养类群及未分类类群占比均较高, 为 12.4% 和 30.7%。HMZ 共注释到 32 个属, 丰度大于 3% 的属包括芽孢杆菌属(*Bacillus*, 85.4%)、热棒菌属(*Pyrobaculum*, 6%)、氢杆菌属(*Hydrogenobacter*, 5.8%) 等, 非培养类群及未分类类群为 0.33% 和 0.002%。

表 1 热泉样品理化参数
Table 1 Physical and chemical parameters of hot spring samples

样品 Sample	Temperature (°C)	pH	Ion, element concentrations (mg/L)																	
			F ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	SiO ₃ ²⁻	Al	As	B	Ca	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	P	Sr
HMZ1	86	7.5	12.14	387.43	27.06	0.14	54.05	209.80	0.17	0.33	6.78	1.30	0.05	68.00	4.40	0.06	0.00	466.30	0.07	0.04
HMZ2			11.11	390.06	27.16	0.14	57.23	220.00	0.16	0.33	7.03	1.35	0.05	68.72	4.42	0.10	0.00	474.70	0.07	0.05
HMZ3			11.05	392.39	23.46	0.14	56.70	190.70	0.13	0.29	6.00	1.12	0.04	63.01	4.14	0.06	0.00	443.70	0.07	0.04
GMQ1	96	9.5	18.27	636.07	32.66	1.21	52.35	319.00	0.10	0.92	10.01	0.75	0.91	86.24	6.13	0.06	0.05	612.70	0.38	0.08
GMQ2			19.28	634.30	35.33	1.22	52.90	352.20	0.10	0.99	11.11	0.90	1.00	96.89	6.94	0.08	0.05	708.00	0.42	0.10
GMQ3			18.46	638.63	35.95	1.22	52.19	357.60	0.10	0.99	11.32	0.92	1.00	99.26	6.92	0.05	0.05	696.20	0.42	0.10
GMQ4			19.34	645.63	38.33	1.12	53.39	373.60	0.10	1.06	11.75	0.98	1.05	102.30	7.27	0.08	0.06	732.00	0.46	0.10
GMQ5			18.02	644.84	36.24	1.13	54.57	355.50	0.09	0.98	11.29	0.95	0.98	101.70	7.12	0.06	0.05	714.70	0.43	0.10
GMQ6			17.16	638.82	37.25	1.11	52.75	366.40	0.09	1.01	11.63	0.94	1.02	99.49	7.17	0.08	0.06	716.50	0.44	0.10
HGQ1	65	2.5	6.11	80.48	665.80	0.37	49.97	218.20	42.14	0.01	0.13	71.55	11.65	22.33	0.02	15.80	1.18	15.15	0.00	0.13
HGQ2			4.31	80.84	643.30	0.29	56.40	212.70	35.05	0.00	0.15	66.82	13.60	21.31	0.02	14.06	1.07	14.42	0.00	0.12
HGQ3			7.54	80.65	683.40	0.39	56.71	212.80	41.60	0.01	0.18	69.89	13.62	22.42	0.02	16.69	1.22	15.35	0.00	0.13
HGQ4			5.31	81.16	701.20	0.39	57.08	216.30	42.43	0.01	0.18	71.30	13.89	22.64	0.02	16.68	1.26	15.72	0.00	0.13
HGQ5			3.77	80.71	550.00	0.23	57.42	204.10	26.53	0.02	0.57	61.64	10.88	18.09	0.01	10.62	0.81	13.25	0.00	0.11
HGQ6			5.40	80.24	544.50	0.23	56.79	214.10	26.70	0.02	0.56	62.82	10.82	18.43	0.01	10.68	0.80	13.62	0.01	0.12

注: Mo、Pb、Co、Cd、Cr、Ni、V、Se、Zn、Cu、Ba 等均低于检测限。

Note: Mo, Pb, Co, Cd, Cr, Ni, V, Se, Zn, Cu, Ba, below detection.

表 2 样本测序数据统计结果

Table 2 Sequencing data of hot spring samples

样品 Sample	有效序列数 Sequences	OTUs	N50	ACE	覆盖率 Coverage (%)
GMQ1	39 748	55	376	60.8	99.97
GMQ2	38 956	50	374	63.6	99.97
GMQ3	40 129	51	374	53.5	99.98
GMQ4	39 024	54	374	57.2	99.97
GMQ5	40 153	54	374	55.6	99.97
GMQ6	28 680	58	374	61.7	99.98
HGQ1	39 821	45	377	48.3	99.98
HGQ2	38 933	34	372	46.9	99.97
HGQ3	39 465	43	377	45.2	99.98
HGQ4	38 350	41	377	42.7	99.98
HGQ5	37 613	45	372	46.4	99.98
HGQ6	40 234	43	377	49.4	99.97
HMZ1	39 377	50	372	48.7	99.97
HMZ2	39 018	46	372	48.2	99.97
HMZ3	38 560	43	372	54.5	99.96

从属水平分析, GMQ 和 HMZ 的物种组成比较相近, 非培养、未分类类群占比均较低, 被注释程度更高, 而 HGQ 中含有较高比例的非培养、未分类类群, 未被认知程度更高。

2.3 腾冲热海热泉微生物群落结构相似度分析

2.3.1 微生物组成 α 多样性分析

3 处热泉各样品的 α 多样性情况见图 2, 箱线图中每个点代表不同样品。根据 Chao1、Observed_otus 等指数可以看出, 3 处热泉中的微生物丰富度均较低。统计结果显示, 碱性热泉 GMQ 中微生物丰富度高于其它两处热泉(均 $P < 0.05$), 酸性热泉 HGQ 和中性热泉 HMZ 中微生物丰富度差异不显著($P > 0.05$), 但从箱体高低可大致认为 HMZ 中微生物丰富度略高于 HGQ。结合 Shannon 多样性指数和 Simpson_e 均匀度指数共同分析, 3 处热泉间微生物的多样性具有显著差异。GMQ 中微生物多样性最高, HMZ 中虽然微生物丰富度较高, 但是多样性却显著低于其它两处热泉。以上分析结果表明, 在热泉这种极端环境中, 微生物丰富度普遍较低, 酸性热泉表现更为明显。碱性热泉 GMQ 中微生物

多样性最高, 酸性热泉 HGQ 次之, 中性热泉 HMZ 中微生物多样性最低, 主要表现为均匀度低, 原因可能是少数物种在群落中具有较高的丰度, 这与属水平的物种组成分析结果一致, HMZ 中芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 占比高达 85.4%。

2.3.2 微生物群落结构差异分析

图 3 为 3 处热泉微生物群落结构的主坐标分析 (Principal coordinate analysis, PCoA) 分析结果。Bray_curtis、Binary_jaccard 的分析结果均显示, 3 处热泉间的微生物群落结构差异显著(均 $P < 0.05$), 尤其是 HGQ 和 GMQ 间差异极为显著(均 $P < 0.01$), 各热泉中组内各样品差异较小。两种分析结果相近, 表明 3 处热泉间群落结构差异受到各物种丰度差异的影响较小。

2.3.3 微生物群落结构热图分析

根据 OTU 丰度进行聚类, 将高丰度、低丰度的物种模块聚集, 通过颜色变化与相似程度来直观反映不同样品在属水平上群落结构的差异性和相似性, 热图(图 4)能够较为直接的反映 3 处热泉各样品间微生物群落中物种组成相似性、差异性、物种聚类关系等情况。GMQ 和 HMZ 在物种组成上较为相似, 都含有一些嗜嗜热类群如热棒菌属 (*Pyrobaculum*)、氢杆菌属 (*Hydrogenobacter*)、栖热菌属 (*Thermus*)、恐硫球菌属 (*Sulfophobococcus*)、火球形菌属 (*Ignisphaera*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、耐热球形菌属 (*Thermosphaera*) 等。GMQ 中独特含有一些较低丰度的属如嗜碱菌属 (*Alkaliphilus*)、热袍菌属 (*Thermotoga*)、厌氧芽孢杆菌属 (*Anaerobacillus*)、嗜氨菌属 (*Ammoniphilus*), HMZ 中独特含有一些较低丰度的属如毒弧菌属 (*Venenivibrio*)、热丝菌属 (*Thermofilum*) 等, 其非培养类群和未分类类群在 3 处热泉中占比最低。HGQ 与其它 2 处热泉差异明显, 主要含有一些嗜酸、硫代谢相关的属包括酸杆菌属 (*Acidibacillus*)、酸硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*)、喜酸菌属 (*Acidicaldus*)、硫化芽孢杆菌属 (*Sulfobacillus*)、硫化叶菌属 (*Sulfolobus*)、生金球菌属 (*Metallosphaera*)、酸微菌属 (*Acidimicrobium*)、脂环酸芽孢杆菌属

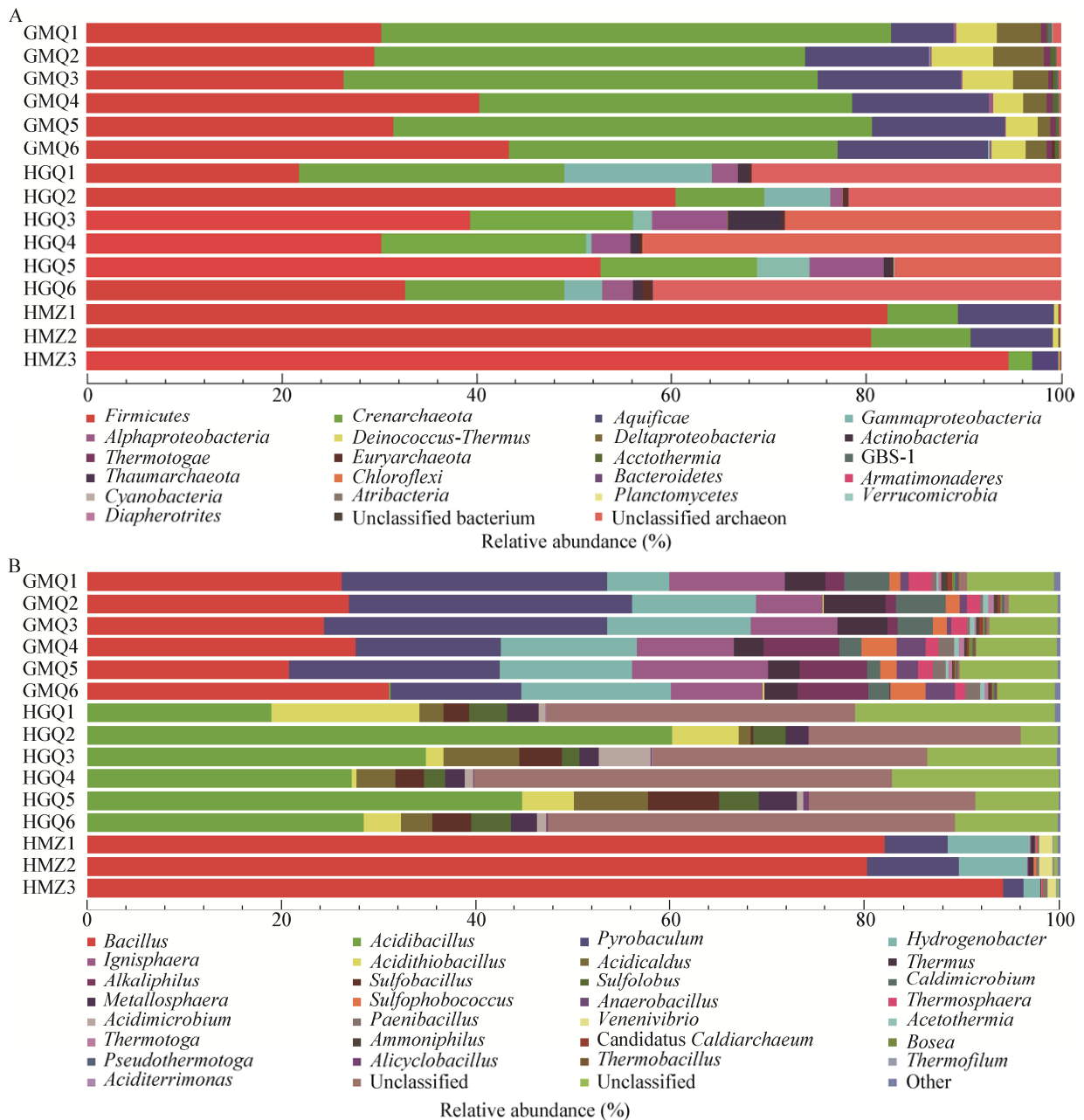


图 1 热泉样品中门(A)和属(B)水平的物种组成

Figure 1 Distribution of microbes at phylum- (A) and genus-levels (B) in hot spring samples

(*Alicyclobacillus*)等, 其中非培养类群及未分类类群在 3 处热泉中最高。

3 讨论

3.1 微生物组成多样性

3 处热泉中主要以厚壁菌门和泉古菌门为主, 尤其多样性较低的 HMZ 中厚壁菌门丰度高达

87%。2 处超高温热泉 GMQ 和 HMZ 物种组成较为相近, 除含有较高丰度的产水菌门, 低丰度的变形菌门(*Proteobacteria*)、奇异球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)和广古菌门(*Euryarchaeota*), 还含有中性及碱性热泉生物席中常见的光合菌 *Cyanobacteria* 和绿弯菌门(*Chloroflexi*)等^[37], 未

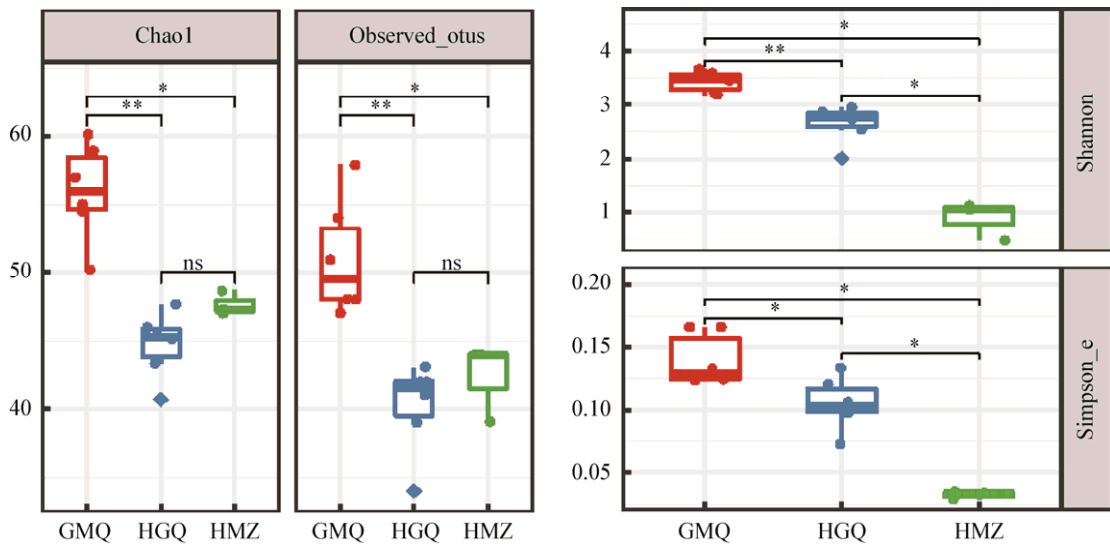


图 2 不同样品间微生物组成 α 多样性分析

Figure 2 α -diversity index analysis of different sample groups

注: 秩和检验. ns: $P > 0.05$; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

Note: Wilcoxon test. ns: $P > 0.05$; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

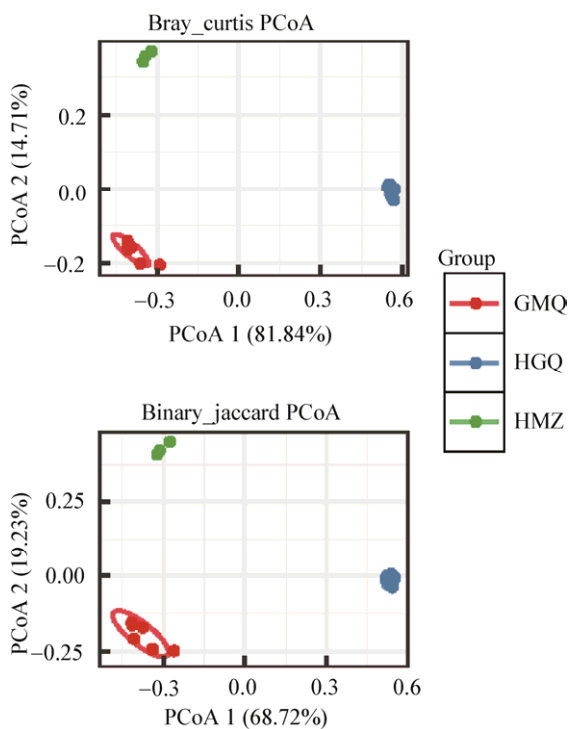


图 3 不同样品间微生物群落组成差异 PCoA 分析

Figure 3 PCoA analysis of community dissimilarities among different sample groups

分类类群仅占 0.002% 和 0.28%; 而酸性热泉 HGQ 中, 变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)丰度相对较高, 但是未分类类群占比高达 30.7%, 全部为未分类古菌类群。

极端环境中关于厚壁菌门的研究并不充分, 已有研究在 HMZ 中发现了种、属甚至更高分类水平的厚壁菌门新类群^[28]。本研究 3 处热泉中厚壁菌门丰度均较高, 但由于环境条件不同, 厚壁菌门群落差异明显。对腾冲热泉表层沉积物、菌藻席中泉古菌的研究发现, 中高温(59–77 °C)条件下泉古菌门多样性最高^[17]。本研究发现, 在水体中, 2 处超高温热泉 GMQ、HMZ 的已分类泉古菌门多样性明显高于高温热泉 HGQ, 同时 HGQ 为极端酸性环境, 其中未分类古菌类群占比可观, 这也提供了更多对于该环境中古菌研究的参考和认知空间。与已有研究^[6]类似, 在超高温中性及偏碱性的 2 处热泉中都存在产水菌门的氢杆菌属(*Hydrogenobacter*), 本研究在酸性高温热泉 HGQ 中也发现了极低丰度的该属, 这可能帮助我们拓宽对于该属生存条件的已有认知。有研究在 GMQ 和 HMZ 的沉积物中发现并分离获得了放线菌门的小单孢菌

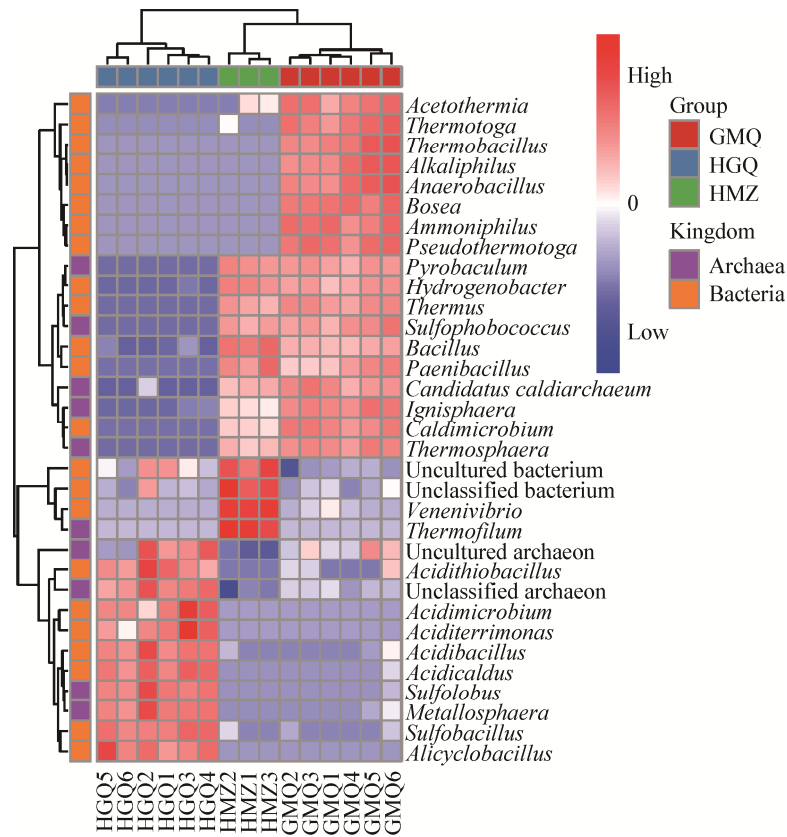


图 4 不同样品间微生物群落结构属水平热图分析

Figure 4 Microbial community structure (genus-level heatmap) of different sample groups

属(*Micromonospora*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、疣孢菌属(*Verrucosipora*)和马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)等^[38], 但是本研究在这 2 处热泉的水样中却没有注释到相应的属, 或许这也可以证明热泉水体中微生物是自主进化, 不是来自于周边土壤^[39]。HGQ 中也没有注释到前期可培养研究中酸性热泉分离到的放线菌门的微球菌属(*Micrococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)等^[38], 但是注释到低丰度的该门酸微菌属(*Acidimicrobium*), 这为未来发掘极端环境中放线菌门物种资源、抗生素及生物活性分子等提供重要目标。

3.2 功能微生物组成多样性

我国腾冲热泉中砷氧化微生物的探究表明, 虽然腾冲热泉中砷含量低于西藏热泉, 也低于美国黄石国家公园热泉等, 但确实存在砷氧化微生物。随着热泉温度升高, 虽然砷氧化微生物丰度

降低, 但多样性随之升高, 主要集中于奇异球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)中^[40]。本研究中超高温热泉 GMQ, 砷含量(0.99 ± 0.03 mg/L)相对较高, 其中含有的变形菌门(*Proteobacteria*, 3.5%)、奇异球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*, 4.3%)、绿弯菌门(*Chloroflexi*, 0.02%)等低丰度微生物均有可能对该环境中砷氧化微生物的探究提供重要参考。

有关热泉沉积物、菌藻席或泉华等的相关研究发现, 在热泉复杂的自然条件下($66-96$ °C, pH 4.3-9.0)均有氨氧化、碳固定新途径相关基因的存在及表达, 部分碳固定相关基因和脱硫球菌目(*Desulfurococcales*)存在一定的关联性, 并且推测氨氧化古菌可能通过有氧氨氧化及 CO_2 固定新途径获取能量进行生长^[11,41]。本研究中注释到较高丰度

的该目成员, 碱性热泉 GMQ 中含有火球形菌属 (*Ignisphaera*)、恐硫球菌属 (*Sulfophobococcus*), 中性热泉 HMZ 中含有恐硫球菌属 (*Sulfophobococcus*)、火球形菌属 (*Ignisphaera*) 和耐热球形菌属 (*Thermosphaera*)。关于热泉水体与沉积物、菌藻席、泉华中的该目成员是否存在前述碳固定新途径, 热泉中的极端微生物是否蕴含着更多特殊代谢能力尚未见报道。

酸性热泉中分离到的铁、硫代谢相关极端微生物, 尤其是古菌等由于其嗜酸嗜热的特性, 在生物湿法冶金、煤炭生物脱硫等方面均具有常规环境微生物无法比拟的优势^[42-43]。酸性热泉 HGQ 中注释到的优势属酸杆菌属 (*Acidibacillus*)、酸硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*)、喜酸菌属 (*Acidicaldus*)、硫化芽孢杆菌属 (*Sulfobacillus*)、硫化叶菌属 (*Sulfolobus*) 以及生金球菌属 (*Metallosphaera*) 等均具有铁、硫代谢相关能力, 该环境中 SO_4^{2-} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等含量均较高, 水体中富含含硫化合物, 所以我们推测该环境中硫氧化微生物氧化还原型硫化物生成硫酸盐的过程致使 pH 降低造成酸性环境。从属水平来看, HGQ 中非培养类群及未分类类群占比高达 12.4% 和 30.7%, 几乎全部为古菌, 它们是否与该环境中上述微生物类群相似, 具有铁、硫代谢功能尚属未知, 本研究对于未来发掘铁、硫代谢功能极端环境微生物资源提供了数据基础。

本研究表明, 酸性热泉 HGQ 中蕴含着丰富的微生物资源及潜在的硫氧化微生物资源, 因此我们通过传统的纯培养方法对该环境水体样品进行了微生物多样性的进一步探究。目前获得了厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和泉古菌门中已分类类群 7 个属的菌种, 包括脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)、硫化芽孢杆菌属 (*Sulfobacillus*)、酸硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*)、酸土单孢菌属 (*Aciditerrimonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、生金球菌属 (*Metallosphaera*)、硫化叶菌属 (*Sulfolobus*) 等属内成员, 此外还分离得到 3 个潜在新种、6 个潜在

新属等未分类新类群, 与相关菌群的相似性在 85.5%–98.6%, 关于新类群的生理生化特性及硫氧化功能探究将在后续研究中进行。

4 结论

本研究利用高通量测序技术探究云南腾冲热海 3 处热泉微生物多样性及其群落结构组成差异, 研究发现, 腾冲热海热泉水体中蕴含丰富的微生物资源, 热泉间微生物物种随环境条件不同组成差异明显, 其中酸性热泉中存在多种具有潜在铁、硫代谢功能的菌种, 非培养类群、未分类类群丰度很高, 尤其是蕴藏着可观的古菌资源。本研究为微生物菌种资源的培养获得及功能认识提供了数据基础。

REFERENCES

- [1] Hedlund BP, Murugapiran SK, Alba TW, et al. Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota'[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 25: 136-145
- [2] Segerer AH, Burggraf S, Fiala G, et al. Life in hot springs and hydrothermal vents[J]. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1993, 23(1): 77-90
- [3] Sakai HD, Kurosawa N. *Saccharolobus caldissimus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from an acidic terrestrial hot spring, and reclassification of *Sulfolobus solfataricus* as *Saccharolobus solfataricus* comb. nov. and *Sulfolobus shibatae* as *Saccharolobus shibatae* comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(4): 1271-1278
- [4] Sharp CE, Brady AL, Sharp GH, et al. Humboldt's spa: microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(6): 1166-1174
- [5] de León KB, Gerlach R, Peyton BM, et al. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geyser Basin, Yellowstone National Park[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 330
- [6] Hou WG, Wang S, Dong HL, et al. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53350
- [7] Eloe-Fadrosh EA, Paez-Espino D, Jarett J, et al. Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate phylum in geothermal springs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10476
- [8] 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: 17056
- [9] Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea[J]. *Science*, 2003, 301(5635): 976-978

- [10] Zhang CL, Ye Q, Huang ZY, et al. Global occurrence of archaeal *amoA* genes in terrestrial hot springs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6417-6426
- [11] Song ZQ, Wang L, Wang FP, et al. Abundance and diversity of archaeal *accA* gene in hot springs in Yunnan Province, China[J]. Extremophiles, 2013, 17(5): 871-879
- [12] Hua ZS, Qu YN, Zhu QY, et al. Genomic inference of the metabolism and evolution of the archaeal phylum Aigarchaeota[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2832
- [13] Mall A, Sobotta J, Huber C, et al. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium[J]. Science, 2018, 359(6375): 563-567
- [14] Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, et al. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile[J]. Science, 2018, 359(6375): 559-563
- [15] Hedlund BP, Cole JK, Williams AJ, et al. A review of the microbiology of the Rehai geothermal field in Tengchong, Yunnan Province, China[J]. Geoscience Frontiers, 2012, 3(3): 273-288
- [16] Han J, Chen B, Dai X, et al. Diversity of thermoacidophilic *Sulfolobus* in hot springs in Tengchong of Yunnan, China[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2010, 16(5): 692-696 (in Chinese)
韩剑, 陈波, 戴欣, 等. 云南腾冲热泉极端嗜酸热硫化叶菌多样性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(5): 692-696
- [17] Song ZQ, Chen JQ, Jiang HC, et al. Diversity of crenarchaeota in terrestrial hot springs in Tengchong, China[J]. Extremophiles, 2010, 14(3): 287-296
- [18] Song ZQ, Chen JQ, Zhi XY, et al. Crenarchaeal diversity and phylogenetic analysis of two hot springs in Tengchong[J]. Microbiology China, 2008, 35(3): 372-377 (in Chinese)
宋兆齐, 陈经全, 职晓阳, 等. 腾冲两热泉古菌多样性及系统发育的初步分析[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 372-377
- [19] Dang YF, Chen B, Zhang Q, et al. Diversity of virus-like particles from high-temperature acidic hot springs in Tengchong Rehai, China[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(2): 256-261 (in Chinese)
党亚锋, 陈波, 张琦, 等. 腾冲热海高温酸性热泉类病毒颗粒多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 256-261
- [20] 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
- [21] 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
- [22] Wang T, Chai LH, Cui XL, et al. Analytical study on five 16S rDNA clones that come from hot spring in Tengchong with a culture-independent approach[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2003, 25(1): 73-76 (in Chinese)
王涛, 柴丽红, 崔晓龙, 等. 从腾冲热海免培养获得的 5 个 16S rDNA 克隆分析[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(1): 73-76
- [23] Li QY, Cui XL, Zhang DH, et al. Studies on the bacterial diversities of the hot springs at Tengchong Rehai in Yunnan Province China[J]. Microbiology China, 2004, 31(5): 49-54 (in Chinese)
李沁元, 崔晓龙, 张东华, 等. 云南腾冲热海三热泉细菌多样性的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 49-54
- [24] Li QY, Cui XL, Zhang DH, et al. Bacterial diversities of microbial mats in two hot springs in Tengchong Rehai of Yunnan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 431-435 (in Chinese)
李沁元, 崔晓龙, 张东华, 等. 云南腾冲热海两热泉菌藻席细菌多样性的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 431-435
- [25] Feng C, Yang J, Jiang HC. Diversity and distribution of nitrogen-fixing bacteria in two geothermal channels in Tengchong geothermal zone, Yunnan Province[J]. Earth Science, 2018, 43(S1): 10-18 (in Chinese)
冯灿, 杨渐, 蒋宏忱. 云南腾冲两条热泉溪流的固氮细菌群落多样性[J]. 地球科学, 2018, 43(S1): 10-18
- [26] Brock TD. Bimodal distribution of pH values of thermal springs of the world[J]. Geological Society of America Bulletin, 1971, 82(5): 1393-1394
- [27] Jay ZJ, Beam JP, Dlakić M, et al. Marsarchaeota are an aerobic archaeal lineage abundant in geothermal iron oxide microbial mats[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(6): 732-740
- [28] Song ZQ, Wang L, Liu XH, et al. Diversities of *Firmicutes* in four hot springs in Yunnan and Tibet[J]. Biotechnology, 2015, 25(5): 481-486 (in Chinese)
宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性[J]. 生物技术, 2015, 25(5): 481-486
- [29] Song ZQ, Wang L, Liu XH, et al. The diversities of *Proteobacteria* in four acidic hot springs in Yunnan[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2016, 50(3): 376-382 (in Chinese)
宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南 4 处酸性热泉中的变形菌门细菌多样性[J]. 河南农业大学学报, 2016, 50(3): 376-382
- [30] Jiang CY, Liu LJ, Guo X, et al. Resolution of carbon metabolism and sulfur-oxidation pathways of *Metallosphaera cuprina* Ar-4 via comparative proteomics[J]. Journal of Proteomics, 2014, 109: 276-289
- [31] Liu LJ, You XY, Zheng HJ, et al. Complete genome sequence of *Metallosphaera cuprina*, a metal sulfide-oxidizing archaeon from a hot spring[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3387-3388
- [32] 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
- [33] You XY, Zhang QM, Zheng HJ, et al. Adaptation of *Acidianus hospitalis* W1 to oligotrophic and acidic hot spring environments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(10): 1193-1203 (in Chinese)
尤晓颜, 张巧明, 郑华军, 等. 好客嗜酸两面菌 W1 寡营养酸性热泉环境的适应机制. 微生物学报, 2014, 54(10):

- 1193-1203
- [34] Fuhrman JA, Comeau DE, Hagström Å, et al. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1426-1429
- [35] Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(5): 1225-1228
- [36] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998
- [37] Liu ZF, Klatt CG, Wood JM, et al. Metatranscriptomic analyses of chlorophototrophs of a hot-spring microbial mat[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(8): 1279-1290
- [38] 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
- [39] Boyd ES, Hamilton TL, Wang JX, et al. The role of tetraether lipid composition in the adaptation of thermophilic archaea to acidity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 62
- [40] Wu G, Jiang HC, Dong HL, et al. Distribution of arsenite-oxidizing bacteria and its correlation with temperature in hot springs of the Tibetan-Yunnan Geothermal Zone in Western China[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32(6): 482-493
- [41] Jiang HC, Huang QY, Dong HL, et al. RNA-based investigation of ammonia-oxidizing archaea in hot springs of Yunnan Province, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4538-4541
- [42] Liu LJ, You XY, Guo X, et al. *Metallosphaera cuprina* sp. nov., an acidothermophilic, metal-mobilizing archaeon[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61: 2395-2400
- [43] Zhu W, Xia JL, Yang Y, et al. Sulfur oxidation activities of pure and mixed thermophiles and sulfur speciation in bioleaching of chalcopyrite[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(4): 3877-3882

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊,CSCD 核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从2012年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(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所得;(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投稿;(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 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”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.2656)