

我国中部地区热泉嗜热菌的分离及其产酶研究

李杨霞, 张心齐, 林盈盈, 王勇*, 吴敏*

(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 从我国中部的四川喜德、普格地区以及陕西南部地区分别采集地表热泉和地下热水水样, 采用培养方法分离得到47株中度嗜热细菌。16S rRNA基因片段序列的分析和比对结果表明, 采集地的嗜热细菌以芽孢杆菌为主, 并且主要分布在 *Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 2个属中。同时, 通过平板法对分离的嗜热菌进行产酶定性实验, 发现其在60℃或70℃条件下能够分泌多种耐热的水解酶类, 其中60%的菌株能够利用吐温, 38%的菌株分泌蛋白酶, 29%的菌株能够降解木聚糖, 38%的菌株产生淀粉酶。根据筛酶统计结果, 所分离的菌株在种间和种内均存有显著的产酶差异。

关键词: 热泉; 嗜热细菌; 系统发育多样性; 耐热水解酶

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2008)02-204-06

LI Yang-xia, ZHANG Xin-qi, LIN Ying-ying, WANG Yong, WU Min (College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Diversity of culturable thermophiles from hot springs of Mid-China. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2008, 35(2): 204~209

Abstract: The phylogenetic diversity of culturable thermophiles from hot springs of Sichuan and Shanxi province was investigated. A total of 47 moderately thermophilic strains were isolated. Analysis of 16S rRNA gene sequences revealed that most of the isolates is thermophilic bacilli, which mainly belong to two genera, *Anoxybacillus* and *Geobacillus*. The majority of these thermophiles is able to secrete thermostable hydrolytic enzymes at 60 °C or 70 °C. Totally, 60% of the isolates can utilize Tween, 29% can secrete xylanase, the strains releasing protease or amylase occupy 38%, but no one can produce chitinase or chitosanases. Moreover, the difference of enzyme production is distinct either intraspecifically or interspecifically.

Key words: hot spring; thermophile; phylogenetic diversity; thermostable hydrolytic enzymes

嗜热菌(thermophile)是指最适生长温度在45~80℃之间的一类微生物。超嗜热菌(hyperthermophile)是指最适生长温度在80℃或以上的一类微生物^[1]。由嗜热菌和超嗜热菌产生的酶被称为嗜热酶(thermozyme)^[2]。嗜热菌和嗜热酶因其对高温独特的适应性而备受人们关注。目前,对嗜热菌和嗜热酶的研究主要集中在资源^[3]、耐热机制^[2,4]、生物工程^[5]和工业应用^[6]等几个方面。陆地热泉作为典型的地热生境之一,为嗜热微生物的生长提供了理想的条件,对其进行微生态研究对于认识高温环境中

的微生物遗传多样性与功能多样性具有十分重大的意义^[7]。目前,国内外对热泉中的微生物资源研究十分广泛,国内对热泉微生物的研究主要集中在我国南部和西部地区^[8,9],而对中部地区热泉中的微生物资源则鲜有报道。

本文报道了从我国中部地区的热泉中分离纯化嗜热菌,通过对其系统发育关系的分析以及高温水解酶产生情况的研究,揭示了地热水样中嗜热菌的多样性,为今后嗜热菌及其酶的开发利用积累了资源。

收稿日期:2007-01-11.

作者简介:李杨霞(1984-),女,硕士研究生,主要从事嗜热微生物研究。

* 通讯作者,吴敏, E-mail: wumin@zju.edu.cn. 王勇, E-mail: Yongw99@163.com. Yongw99@163.com.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集和保存

陕西南部地区地下热水(SX),四川喜德(XD)、普格(PG)地区热泉地表水,常温运输,实验室4℃保存。

1.1.2 培养基

(1) 菌株富集分离培养基

M1(Nutrient Broth, g · L⁻¹):牛肉抽提物 3, 蛋白胨(Oxoid LP0037)10, NaCl 5; 采用 5 mol · L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0, 或用 0.5 mol · L⁻¹ Na₂CO₃-NaHCO₃ 调 pH 至 9.0. 固体培养基中另加 20 g · L⁻¹ 琼脂粉。

M2 (Modified Brock's Medium, g · L⁻¹): Yeast Extract (BBI) 1, Tryptone (Merck) 1, (NH₄)₂SO₄ 1.3, KH₂PO₄ 0.28, MgSO₄ 0.112, CaCl₂ 0.074; 微量元素液(mg · L⁻¹): FeCl₃ · 6H₂O 1.9, MnCl₂ · 4H₂O 0.18, ZnCl₂ 0.022, CuCl₂ · 2H₂O 0.005, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.44, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.003; 采用 5 mol · L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0, 或用 0.5 mol · L⁻¹ Na₂CO₃-NaHCO₃ 调 pH 至 9.0. 固体培养基中另加 20 g · L⁻¹ 琼脂粉。

M3 (Modified 2216 Marine Broth, g · L⁻¹): Yeast Extract (BBI) 1, Tryptone (Merck) 1, 柠檬酸铁 0.1, NaCl 5, MgCl₂ · 6H₂O 2.5, (NH₄)₂SO₄ 1, CaCl₂ 1.8, KCl 0.6, KBr 0.08, H₃BO₃ 0.022, KNO₃ 0.0016, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.008, Sr Cl₂ · 6H₂O 0.034. 采用 5 mol · L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0, 或用 5 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 调 pH 至 4.8. 固体培养基中另加 20 g · L⁻¹ 琼脂粉。

(2) 产酶培养基: 分别在 M2 和 M3 号培养基中加入相应的底物。

1.2 菌株富集分离

水样经过压滤处理后, 滤膜(0.22 μm)接种摇瓶, 于恒温水浴摇床(60℃, 120 r · min⁻¹ 或 70℃, 140 r · min⁻¹) 培养 7~10 d; 培养液梯度稀释后涂布相应平板, 电热恒温培养箱(60℃ 或 70℃) 静置培养, 待形成明显菌落后, 根据形态多样性挑取单菌落。

每一个单菌落转接螺口摇管, 相同条件下培养, 菌液梯度稀释后涂布相应平板获取单菌落, 上述步骤至少重复 3 次, 并通过革兰氏染色及镜检, 同时根据 16S rRNA 基因测序以确定获得纯培养。

1.3 16S rDNA 序列测定和分析

1.3.1 模板的制备

从过夜培养的新鲜斜面上刮取适量菌泥至装有适量无菌去离子水的离心管中, 充分悬浮, 沸水浴 40 min 后立即冰浴; 260 nm 及 280 nm 下检测吸光度值, 确定 DNA 浓度及纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)。

1.3.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序

细菌 16S rDNA 扩增通用引物: F8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R1513 (5'-ACGGHTACCTTGTACGACTT-3')。

PCR 程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃, 0.5 min, 55℃, 0.5 min, 72℃, 1.25 min, 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min. 目标扩增产物经电泳检测后送国家人类基因组南方研究中心测序(高通量基因分析仪 3730/3730xl)。

1.4 序列分析及比对

获得的序列与 GenBank 数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行 blast 分析, 获取相似性较高的菌株信息; 选取这些相关菌株的 16S rDNA 序列, 通过 Mega3.1 软件包进行多序列比对分析和系统发育树的构建. 采用 Kimura 双参数模型计算各序列分化距离, 缺少和不确定的位点在计算中被省略, 用邻接法(neighbor-joining method)获得分支系统树, 并通过自举分析(bootstrap)进行拓扑结构置信度的检测, 自举数据集为 1 000 次。

1.5 产酶定性实验

采用平板筛酶方法, 在 60℃ 或 70℃ 条件下静置培养 2~3 d 观察是否有透明圈(蛋白酶、淀粉酶、木聚糖酶、几丁质酶和壳聚糖酶)或晕圈(脂肪酶)的产生。

2 结果

2.1 嗜热菌多样性分析

样品富集液梯度稀释后涂布平板, 获得的单菌落形态基本表现为圆形, 平、隆起、纽形或脐状突起, 边缘呈锯齿状、细丝状或光滑; 颜色以黄色或白色为主, 还有一株呈紫红色. 绝大部分菌株具有端生或近端生、柱形或椭圆形芽孢. 考虑到芽孢杆菌(Bacilli) 可观的表型多样性, 根据菌落形态的细微差别进行菌株筛选, 获得 47 株中度嗜热菌. 其中, 喜德地区热泉水样中分离得到中性菌株 18 株, 耐碱性菌株 2 株; 普格地区热泉水样中分离得到耐酸性菌株 2 株, 中性菌株 11 株, 耐碱性菌株 3 株; 从陕西南部地下水样中分离得到中性菌株 3 株, 耐碱性菌株 8 株。

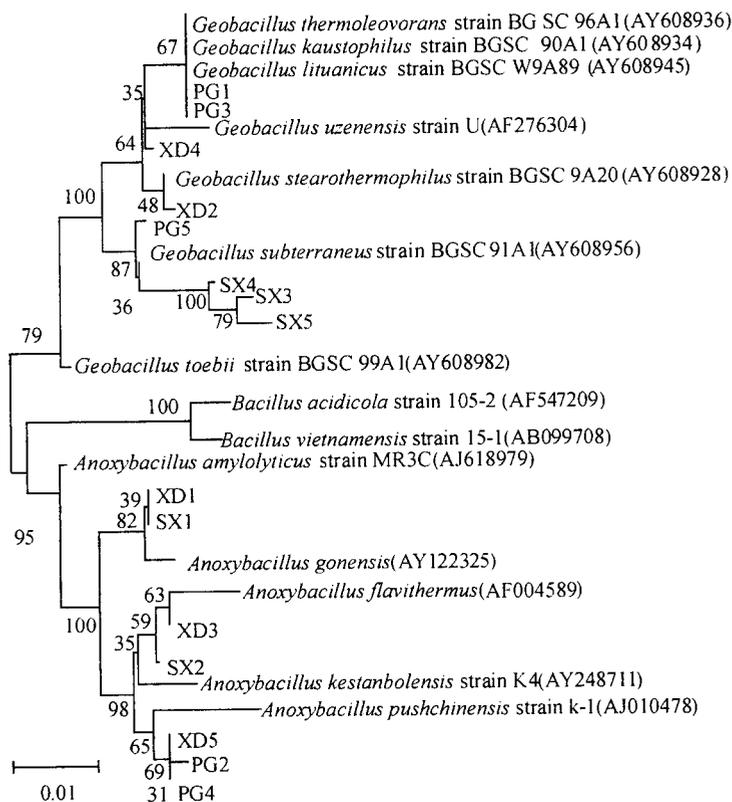
对上述菌株逐一进行 16S rDNA 的扩增和测

序,根据各株菌的 blast 分析结果,选择 GenBank 中各相关菌株的 16S rDNA 序列进行比对分析,并在此基础上构建了系统发育树(见图 1),初步确定了各株菌的系统发育地位(见表 1).从分析结果可以看出,分离的菌株主要分布于 *Anoxybacillus* 属和 *Geobacillus* 属,而形成紫红色菌落的菌株则属于 *Meiothermus* 属.

Anoxybacillus 属是芽孢杆菌世系中的一个嗜热分支,严格厌氧或耐氧,碱性或耐碱性,在热泉中广泛分布^[10].需要说明的是,本文中分离得到的、与

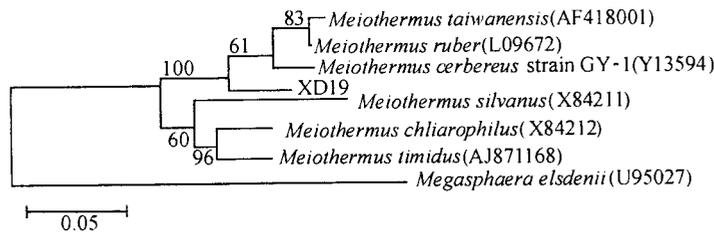
Anoxybacillus 属的亲缘关系最为接近的菌株,在严格厌氧条件下均不能生长. *Geobacillus* 属是另一个中度嗜热的芽孢杆菌分支,在 37~75 °C 的环境中均能够分离得到,最适生长温度为 55~65 °C,最适生长 pH 值为 6.2~7.5,生长 pH 范围为 6.0~8.5,其中的绝大多数种分布广泛,如热泉、油田、堆肥等热环境中都能分离得到^[11].本文分离到的 *Geobacillus* 属菌株均为中性菌株,但有些在 pH 9.0 的碱性条件下也生长良好,如 SX3, SX4, SX5 和 PG5.

此外,来自地下热水的 3 株产芽孢菌(SX3, SX5



(a) 分离菌株与中度嗜热芽孢杆菌系统发育树

(a) Phylogenetic tree of moderately thermophilic bacilli and the isolates



(b) 分离菌株与亚栖热菌属系统发育树

(b) Phylogenetic tree of genus *Meiothermus* and the isolates

图 1 以 16S rDNA 序列为基础的热泉嗜热菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of thermophiles isolated from the hot springs in Sichuan and Shanxi province

Evolutionary distance is calculated with Kimura two-parameter calculation model. The trees are constructed by the neighbor-joining method. *Bacillus acidicola* strain 105-2 (AF547209), *Bacillus vietnamensis* strain 15-1 (AB099708) and *Megasphaera elsdenii* (U95027) are used as outgroup microorganisms. Value that supports each branching order is near the relevant nodes. Scale bars respectively correspond to a 1% (Fig. 1(a)) or 5% (Fig. 1(b)) difference in nucleotide sequences. The numbers in parentheses are NCBI accession numbers of the 16S rDNA sequences of corresponding strains

和 SX4) 分别与 *Geobacillus subterraneus* strain 34 (T) 和 *Geobacillus uzenensis* strain BGSC 92A2 的相似性仅为 97%, 根据 Stackebrandt 等的观点, 16S rDNA 序列相似性在 97% 或以下即可以认为是新种^[12], 但是, 进一步的多相分类研究对于确定这三株菌是否为新种仍是必需的。

亚栖热菌属 (*Meiothermus*) 处于细菌域的另一嗜热世系——栖热菌科 (Thermaceae), 是世系中的一个中度嗜热分支, 最适生长温度为 50~65 °C, 没有一个种可以在 70 °C 或以上生长, 最适生长 pH 在 8.0 左右, 形成红色或黄色菌落。亚栖热菌属的菌株可从中性或碱性的陆地热泉中分离得到^[7,13]。本文仅获得一株分布于栖热菌科的菌株 XD19, 其与 *Meiothermus rubber* strain SPS-241^[14] 的 16S rDNA 序列相似性为 98%, 是否代表一个新种还有待进一步的鉴定。此外, 在富集分离的过程中发现, XD19 的生长明显弱于芽孢杆菌, 一旦被污染则极易被取代, 这种现象与 Beffa 等的研究结论一致, 即在 60 °C 左右的环境中, 嗜热芽孢杆菌占据优势

地位^[15]。

上述分析结果说明, *Anoxybacillus* 属和 *Geobacillus* 属在本文所研究的热泉微生态系统中处于优势地位。

2.2 嗜热酶资源分析

以 41 株 60 °C 分离的菌株和 4 株 70 °C 分离的菌株作为筛酶对象, 分别在相应温度条件下进行产酶定性实验。结果显示, 大部分芽孢杆菌能够产生一种或多种水解酶 (见表 1)。其中, 60% 的菌株能够利用吐温, 淀粉酶和蛋白酶产生菌的比例均为 38%, 而能够分解木聚糖的菌株占 29%。在利用吐温的 27 株菌中, 绝大部分的菌株 (26 株) 可以利用 Tween-60, 而只有 6 株可以分解 Tween-20, 这可能说明了 *Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 属的嗜热芽孢杆菌对脂肪酶底物的偏好性。实验中没有发现分泌几丁质酶和壳聚糖酶的菌株, 这两种酶在细菌、真菌和植物中都有分布, 但迄今关于嗜热菌壳聚糖酶和几丁质酶的报道很少^[6]。此外, 有 7 株菌的所有平板筛酶结果均为阴性。

表 1 部分菌株的分离条件、产酶情况及 16S rDNA 序列分析结果

Table 1 Isolation, enzyme production and the results of 16S rRNA gene sequence analysis

菌株	分离条件/°C	产酶情况	最相似菌株	相似性/%
Strain	Isolation Condition	Enzyme Production	Strain with the highest similarity	Similarity
SX1	中性, 60	脂肪酶	<i>Anoxybacillus gonensis</i> strain A4	99
SX2	中性, 60	脂肪酶	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain C	99
SX3	碱性, 60	蛋白酶, 木聚糖酶	<i>Geobacillus subterraneus</i> strain 34 (T)	97
SX4	碱性, 60	蛋白酶, 木聚糖酶	<i>Geobacillus uzenensis</i> strain BGSC 92A2	97
SX5	碱性, 60	蛋白酶, 木聚糖酶	<i>Geobacillus subterraneus</i> strain 34 (T)	97
XD1	中性, 60	脂肪酶	<i>Anoxybacillus gonensis</i> strain A4	99
XD2	中性, 70	脂肪酶, 蛋白酶	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	100
XD3	中性, 60	脂肪酶	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain D	99
XD4	中性, 60	脂肪酶, 淀粉酶	<i>Geobacillus kaustophilus</i> KKUA1	99
XD5	碱性, 60	淀粉酶	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain C	99
PG1	中性, 70	脂肪酶, 淀粉酶, 木聚糖酶	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	99
PG2	中性, 60	—	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain C	99
PG3	中性, 60	脂肪酶, 淀粉酶	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> isolate HS1	99
PG4	碱性, 60	脂肪酶, 淀粉酶, 木聚糖酶	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain C	99
PG5	碱性, 60	脂肪酶, 淀粉酶, 木聚糖酶	<i>Geobacillus uzenensis</i> strain BGSC 92A2	99

注 (1) 中性表示培养基的初始 pH 值为 7.0, 碱性表示培养基的初始 pH 值为 9.0。 (2) SX 表示从陕西南部地下热水分离得到的菌株, XD 表示从喜德地区热泉分离得到的菌株, PG 表示从普格地区热泉分离得到的菌株。 (3) “—”表示不产酶

(1) Neutral means pH 7.0, alkaline means pH 9.0. (2) SX represents the strains isolated from Shanxi hot spring, XD and PG represent the ones from Xide and Puge hot spring respectively. (3) “—” means no production of any enzyme

3 讨论

本文分离得到的菌株以中度嗜热的芽孢杆菌为主, 而且 16S rDNA 序列分析结果表明, 这些菌株主

要分布在 *Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 2 个属中。属于 *Anoxybacillus* 属的菌株与 *A. flavithermus* 和 *A. gonensis* 2 个种的相似性为 99% 或 100%, 属于 *Geobacillus* 属的菌株与 *G. stearothermophilus*, *G. thermoleovorans*, *G. uzenensis*, *G. kaustophilus*

和 *G. subterraneus* 5 个种的相似性为 97%~100%。*Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 2 个属都是从 *Bacillus* 属中独立出来的嗜热芽孢杆菌分支,在热泉中分布广泛。而纵观整个芽孢杆菌类群(*Bacilli*),像 *Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 一样从 *Bacillus* 属中独立出来的嗜热分支还有 *Alicybacillus*、*Ureibacillus* 和 *Thermobacillus* 属。但有学者认为,在 60 °C 左右的中等高温条件下,*Geobacillus* 一般处于优势地位^[16],本文的研究结果与此论点相吻合。

而从筛酶统计结果来看,*Anoxybacillus* 和 *Geobacillus* 属的菌株在产酶多样性上存在显著的属间差异,属于前一个属的菌株大多只产 1 种酶,而属于后一个属的菌株大多至少产 2 种酶,以喜德地区热泉水样中分离出来的菌株为例,所有 *Anoxybacillus* 属菌株产脂肪酶或/和淀粉酶,而属于 *Geobacillus* 属的菌株中,除 2 株只产脂肪酶以外,其余都能产 2 种或 2 种以上的酶。同时,属内不同种间的产酶情况也不一样,以 *Geobacillus* 属为例(见表 1),与 *G. stearothermophilus* 具 99% 相似性的 XD2 产脂肪酶和蛋白酶,与 *G. kaustophilus* 具 99% 相似性的 XD4 产脂肪酶和淀粉酶,与 *G. thermoleovorans* 具 99% 相似性的 PG1 产脂肪酶、淀粉酶和木聚糖酶。此外,种内的不同菌株间同样存在产酶差异,就同一个热泉而言,以从陕西南部地下热水中分离得到的菌株为例,与 *G. stearothermophilus* 具有 99% 或以上相似性的菌株中,一些可以产脂肪酶和蛋白酶,如 XD2,一些可以产脂肪酶、蛋白酶和淀粉酶,如 XD9,一些可以产淀粉酶、蛋白酶和木聚糖酶,如 XD15;就不同热泉而言,3 个采集地样品中与 *A. flavithermus* strain C 相似性均为 99% 的 4 株菌——XD5, SX2, PG2 和 PG4 的筛酶结果不同(见表 1),XD5 为耐碱菌,产淀粉酶, SX2 产脂肪酶, PG4 也为耐碱菌,产脂肪酶和淀粉酶,而 PG2 的平板筛酶结果为阴性。

根据以上结果,我国中部地区的热泉中蕴藏着丰富的嗜热芽孢杆菌资源,其在遗传多样性上体现了典型的陆地热泉的微生态构成,同时包含了较高丰度的嗜热脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶和木聚糖酶的产生菌。嗜热酶是当今研究和开发得最多的极端酶,因其具有诸多酶学性质上的优势而具有很高的商业应用价值,并有可能带来巨大的经济效益^[6,17,18]。来自于嗜热芽孢杆菌的一些酶类已有成功的研发范例,如来自 *Bacillus licheniformis* 的淀粉水解酶^[19]、来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的聚合酶 BstI pol^[20]等已经应用于商业生产。当然,对于嗜

热芽孢杆菌菌株及其酶而言,要在应用方面取得突破性进展还有赖于不同生境中嗜热菌的分离纯化及其热稳定性酶的提取^[6]。本文通过传统培养方法对我国中部地区热泉水样中的微生物资源进行了分离筛选,初步了解了其中的嗜热细菌及其酶资源的分布和构成,为中部地区地热资源中的微生物资源研究和开发打下了基础。

参考文献(References):

- [1] MADIGAN M T, OREN A. Thermophilic and halophilic extremophiles[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 265-269.
- [2] LI W F, ZHOU X X, LU P. Structural features of thermozymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23: 271-281.
- [3] ATESLIER Z B B, METIN K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38: 628-635.
- [4] SINGERL G A C, HICKEY D A. Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content[J]. *Gene*, 2003, 317: 39-47.
- [5] LIM W J, PARK S R, AN C L, et al. Cloning and characterization of a thermostable intracellular α -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154: 681-687.
- [6] HAKI G D, RAKSHIT S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89: 17-34.
- [7] 和致中, 彭 谦, 陈俊因. 高温菌生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
HE Zhi-zhong, PENG Qian, CHEN Jun-ying. *Thermophiles*[M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [8] 蔡 莹, 陈秀珍, 杨克迁, 等. 云南腾冲热泉土壤微生物基因组文库的构建与分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 427-431.
CAI Ying, CHEN Xiu-zhen, YANG Ke-qian, et al. Construction and analysis of a metagenomic library from Tengchong hot spring soil in Yunnan Province [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 427-431.
- [9] 陈志伟, 姜成英, 刘双江. 云南和广东部分热泉 *Alicyclobacillus* 分布及系统发育[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 51-56.
CHEN Zhi-wei, JIANG Cheng-ying, LIU Shuang-jiang. Survey on and phylogeny of *Alicyclobacillus*

- sepecies in hot springs of southern China's Gungdong and Yunnan Provinces[J]. **Microbiology**, 2004,31(3): 51-56.
- [10] PIKUTA E, LYSENKO A, CHUVILSKAYA N, et al. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov.[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2000,50:2109-2117.
- [11] NAZINA T N, TOUROVA T P, POLTARAUS A B, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli; descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenuatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2001,51:433-446.
- [12] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1994,44(4):846-849.
- [13] NOBRE M F, TRÜPER H G, da COSTA M S. Transfer of *Thermus ruber* (Loginova et al. 1984), *Thermus silvanus* (Tenreiro et al. 1995), and *Thermus chliarophilus* (Tenreiro et al. 1995) to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Meiothermus silvanus* comb. nov., and *Meiothermus chliarophilus* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Thermus*[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1996, 46:604-606.
- [14] PIRES A L, ALBUQUERQUE L, TIAGO I, et al. *Meiothermus timidus* sp. nov., a new slightly thermophilic yellow-pigmented species[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2005,245(1):39-45.
- [15] BEFFA T, BLANC M, FRANC P, et al. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C)[J]. **Applied And Environmental Microbiology**, 1996, 62(5):1723-1727.
- [16] MAUGERI T L, GUGLIANDOLO C G, CACCAMO D, et al. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents[J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2001,24(4):572-587.
- [17] VIEILLE C, ZEIKUS G J. Hyperthermophilic enzymes; sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 2001,65(1):1-43.
- [18] ATOM H, IMANAKA T. Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles[J]. **Tetrahedron Asymmetry**, 2004,15:2729-2735.
- [19] CHITRADON L, MAHAKHAN P, BUCKE C. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*[J]. **J Mol Catal B: Enzyme**, 2000,10:273-280.
- [20] MEAD D, MCCLARY J, LUCKEY J, et al. Bst DNA polymerase permits rapid sequence analysis from nanogram amounts of template[J]. **Biotechniques**, 1991,11:76-78.
- [21] 李永华,金文涛,雀颖异,等.嗜盐古菌 *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050^T *bop* 基因序列研究[J]. **浙江大学学报:理学版**,2007,34(5):576-579.
LI Yong-hua, JIN Wen-tao, HUO Ying-yi, et al. Partial sequence of *bop* gene for *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050^T[J]. **Journal of Zhejiang University: Science Edition**,2007,34(5):576-579.

(责任编辑 涂红)