

一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离鉴定和代谢特征的分析

刘海昌¹, 兰贵红³, 刘全全¹, 曹毅³, 邓宇^{1,2}, 张辉^{1,2*}

(¹ 农业部沼气科学研究所, ² 农业部能源微生物与利用重点开放实验室, 成都 610041)

(³ 四川大学生命科学学院, 成都 610041)

摘要:【目的】从高温油藏中发掘新的微生物种质资源。【方法】采用 Hungate 厌氧操作技术从大港油田采出水中分离到一株厌氧杆菌 HL-3。通过生理生化特征比较和 16S rRNA 序列比对, 确定 HL-3 的分类地位。【结果】菌株 HL-3 为严格厌氧的革兰氏阴性杆菌。生长温度范围 40℃ - 75℃ (最适温度 60℃); pH 范围 5.0 - 8.0 (最适 pH 6.5); NaCl 浓度范围 0% - 3.2% (最适 NaCl 浓度 0.25%)。能够利用葡萄糖、核糖、甘露糖、木糖、纤维二糖等多种碳水化合物, 发酵葡萄糖的产物是乙醇、乙酸、CO₂ 及少量丙酸和丁醇。菌株 HL-3 的 (G + C) mol% 含量为 33.9%, 与 *Thermoanaerobacter* (嗜热厌氧杆菌属) 中模式菌株 *T. uzonensis* DSM18761^T (EF530067) 的 16S rRNA 序列相似性为 98.8%, 与 *T. sulfurigignens* DSM17917^T (AF234164) 的相似度次之为 98.1%。菌株能够耐受浓度较高的亚硫酸根 (0.1 mol/L) 离子和浓度极高的硫代硫酸根 (0.8 mol/L)。当硫代硫酸根浓度高于 0.075 mol/L 时, 菌体内产生硫单质颗粒; 同时, 在培养血清瓶顶空中检测到硫化氢气体。菌株 HL-3 与 *T. uzonensis* DSM18761^T 对硫代硫酸根和亚硫酸根的耐受程度有很大不同。菌株 HL-3 对硫代硫酸根和亚硫酸根耐受程度及对硫代硫酸根的代谢机制与 *T. sulfurigignens* DSM17917^T (AF234164) 极为相似, 但二者代谢葡萄糖的产物却极不相同。【结论】所以菌株 HL-3 可能是 *Thermoanaerobacter* 属中的一个新种, 其确切分类地位还有待用 DNA 分子杂交^[1] 的技术手段做进一步的鉴定。

关键词: 热厌氧细菌; 鉴定; 硫代硫酸根; 亚硫酸根

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1525-07

油藏是作为一个特殊的地质生物反应器, 其特殊的物理化学性质必然会对油藏微生物形成特殊的选择压力, 进而导致油藏微生物特殊的种群结构和特异的物质代谢方式。以油藏为种质资源库, 从中分离具有特殊代谢特性的菌株, 通过菌株代谢特性推测并认识整个菌群的物质代谢方式, 已经成为当今油藏微生物研究的重要组成部分。分子生态学研究表明, 油藏中分布有丰富的发酵性细菌, 高温油藏中尤以热厌氧杆菌为最多^[2-5]。目前, 热厌氧杆菌属中有 18 个种和 5 个亚种。其中 *T. sulfurigignens*^[6] 和

T. uzonensis^[7] 分别是 2007 年和 2008 年定义的两个新种。笔者从大港油田采出水中分离到一株热厌氧杆菌 HL-3, 其与 *T. uzonensis* DSM 18761^T (EF530067) 和 *T. sulfurigignens* DSM 17917^T (AF234164) 的相似性分别为 98.8% 和 98.1%。进一步的生理生化实验显示, HL-3 分别与 *T. uzonensis* DSM 18761^T (EF530067) 和 *T. sulfurigignens* DSM 17917^T (AF234164) 在几个重要生理生化指标上具有明显的差异。

基金项目: 国家自然科学基金 (40973059)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

作者简介: 刘海昌 (1985—), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 从事厌氧微生物研究。E-mail: haichangliu198510@163.com

收稿日期: 2010-04-28; **修回日期:** 2010-06-09

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:样品取自大港油田庄海8背斜区块3号采油井。该油井为非注水井,井顶深为3364.59 m,井底深为4098.41 m,油层有效厚度为733 m。原油密度为0.9543 g/mL(20℃下测得),粘度为599.0 mPa·s(50℃下测得)。油层温度为65℃-75℃。

1.1.2 主要试剂和仪器:16S rRNA Bacterial Identification PCR Kit 试剂盒和 AgaroseGel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒均购于 TaKaRa 公司。BH-2 荧光相差显微镜购于 OLYMPUS 公司;721 型分光光度计购于上海第三分析仪器厂;气相色谱 GC-2010 购于日本岛津(Shimadzu)公司;DU800 spectrophotometer 购于 Beckman 公司。

1.2 菌种分离培养

培养基(g/L): KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 0.5, NaCl 1.0, MgSO_4 0.5, NaNO_3 0.5, NH_4Cl 1.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{Cys-HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 葡萄糖 2.0, 酵母粉 0.5 g, 微量元素-141^[8] 1 mL。培养基于亨盖特厌氧装置下配制并分装于厌氧管或血清瓶内(固体培养基碳源为0.5%的葡萄糖,另加2.0%的琼脂)。初次接种10%(V/V)采出水于60℃下富集培养;经过多次滚管、挑菌后最终获得纯菌。

1.3 形态观察

采用相差显微镜和扫描电子显微镜观察菌体形态,电镜照片的制作参见文献^[9]。

1.4 生理生化特性鉴定

采用葡萄糖(0.2%)作为碳源,其中 pH 实验分别采用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 溶液调至 pH4-10;对于生长 NaCl 浓度范围,灭菌前调整 NaCl 浓度为 0% - 5.0%。最适生长条件下菌株的倍增时间测定采用监测菌体密度,取对数生长期菌体密度作非线性回归,计算得到倍增时间。底物实验采用含微量酵母粉的培养基,用各种不同碳源代替葡萄糖(终浓度均为 2 g/L)^[10]。培养基灭菌后加入不同抗生素(终浓度为 100 mg/L),测定菌密度以确定菌株对不同抗生素的抗性。

1.5 代谢产物检测及代谢产物对菌株生长的影响

1.5.1 小分子有机酸和醇的检测:菌株 HL-3 以葡萄糖为唯一碳源,培养(pH6.5, 60℃)72 h 后。对 CO_2 、乙酸、丙酸、丁醇、丁酸进行定量检测^[11]。

1.5.2 不同浓度乙醇对菌株生长的影响:分别配制含有 0% - 4% (V/V) 乙醇的培养基(1% 葡萄糖, pH6.5),接种(接种量 2%)于 60℃ 培养 72 h 后测定 OD_{600} ,以确定不同浓度的乙醇对菌株 HL-3 生长的影响^[12]。

1.6 硫代硫酸根和亚硫酸根对 HL-3 生长代谢的影响

在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中,分别添加硫代硫酸根和亚硫酸根,使亚硫酸根的浓度梯度位于 0.025 mol/L - 0.125 mol/L 之间,硫代硫酸根的浓度位于 0.025 mol/L - 1.25 mol/L 之间^[7]。分别接种 HL-3,培养 72 h 后相差显微镜下检测各个浓度下的菌体含量。菌体中硫单质的定性检测见文献^[13]。

1.7 16S rRNA 序列扩增、测序及系统发育树构建

1.7.1 PCR 扩增:提取各纯化菌株基因组,分别以 27F (5'-GAGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增出细菌的 16S rRNA,PCR 扩增体系为 50 μL :1 U Taq 酶, 5 μL 10 \times buffer, 4 μL dNTP (0.025 mol/L), 3 μL Mg^{2+} (0.025 mol/L), 25 pmol 引物, 0.1 mg/L 模板,补加灭菌 ddH₂O(双蒸水)至 50 μL 。PCR 扩增条件:94℃ 2 min;94℃ 0.5 min,55℃ 0.5 min,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 10 min。1% 琼脂糖电泳回收产物,与载体 pMD-18 连接,转化至 *E. coli* JM109,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.7.2 构建系统发育树:提交菌株 HL-3 的 16S rRNA 序列在 EMBL 数据库中进行比对,选取与之相似性最高的热厌氧杆菌属中的 18 个模式种的 16S rRNA 序列,进行 Clustalx 比对,MEGA3.1 分析,采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树,Bootstrap 1000 次进行稳定性验证^[14]。

1.8 (G+C) mol% 含量的测定

根据热变性温度法^[15](T_m 值法)测定基因组 (G+C) mol%。测定菌株 DNA 的热变性温度 (T_m 值),同时测定 *E. coli* K12 的 T_m 值。根据公式^[15] (G+C) mol% = 51.2 + 2.08 \times [T_m (X) - T_m (K12)] 计算出 (G+C) mol%。

2 结果分析

2.1 形态特征

菌株 HL-3 是严格厌氧菌,呈直杆状,革兰氏染色呈阴性,无鞭毛,不运动,直径 0.50 μm ,长

3.5 μm - 4.2 μm, 单生、成对或成串生长。菌株在葡萄糖固体培养基中滚管、培养 7 d 后形成白色菌落, 圆形、湿润, 直径大约 1 mm, 边缘整齐。

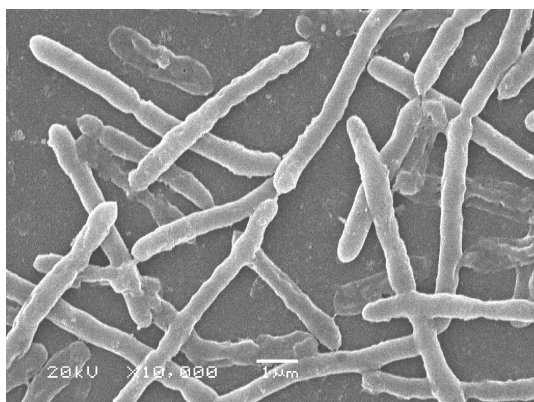


图 1 HL-3 扫描电镜照片 (10000 ×)

Fig. 1 Electron micrograph of strain HL-3 (10000 ×).

2.2 生理生化特征

2.2.1 生理特征: 菌株 HL-3 的温度范围为 45℃ - 73℃, 最适生长温度为 60℃ (图 2); pH 范围为 5.0 - 8.0, 最适 pH 为 6.5 (图 2); 耐受盐浓度范围为 0% - 3.2%, 最适 NaCl 浓度 0.25% (图 3)。菌株 HL-3 在 pH6.5、温度 60℃、NaCl 浓度为 0.25%, 以葡萄糖为碳源时, 菌株的倍增时间为 75 min。

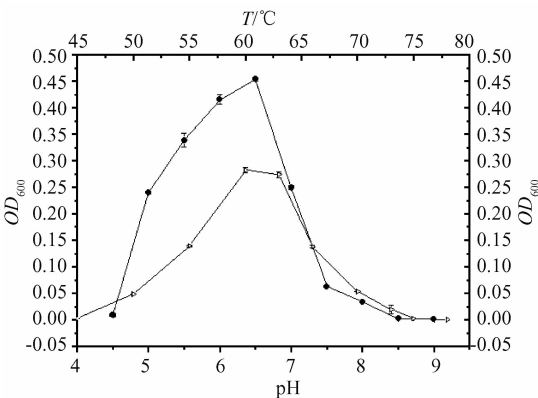


图 2 不同温度和 pH 对菌株 HL-3 生长的影响

Fig. 2 The effect of temperate and pH on the growth of strain HL-3. T:—◇—; pH—●—.

2.2.2 生化特征: 底物实验结果表明, 菌株 HL-3 能利用的底物包括纤维二糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、D-半乳糖、甘露糖、松三糖、棉子糖、蔗糖、木糖、淀粉、酵母粉、酪蛋白胨。不能利用延胡索酸、乳糖、核糖、菊糖、蜜二糖、L-山梨糖、甘油、L-鼠李糖、山梨糖醇、阿拉伯糖、羧甲基纤维素钠、木聚糖等。

抗生素实验结果表明, 菌株对红霉素、氯霉素和卡那霉素均敏感, 但对四环素不敏感。结果见图 4。

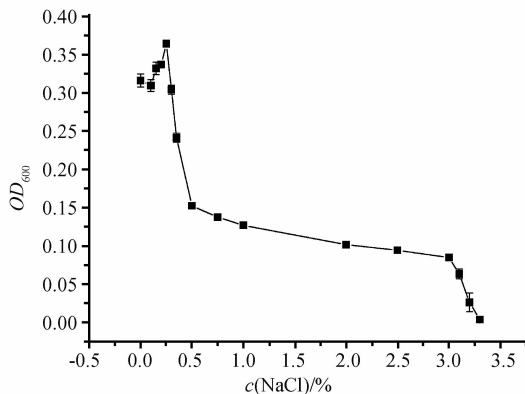


图 3 不同盐浓度对菌株 HL-3 生长的影响

Fig. 3 The effect of salinities on the growth of strain HL-3.

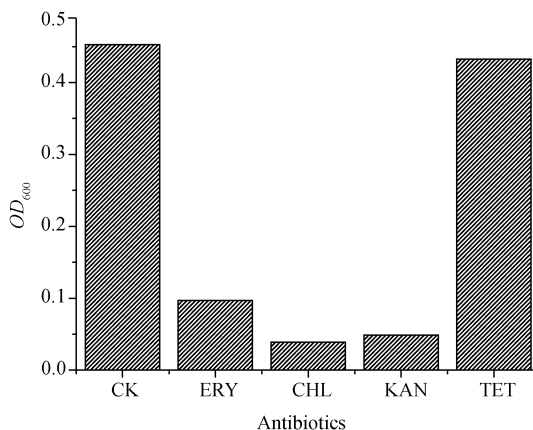


图 4 抗生素对菌株 HL-3 的生长抑制

Fig. 4 Effect of antibiotics on the grow of strain HL-3.

2.3 菌株 HL-3 代谢产物分析和几种物质对其生长代谢的影响

2.3.1 菌株 HL-3 代谢葡萄糖的产物分析: 从色谱图 (图 5) 得出菌株 HL-3 代谢葡萄糖的产物主要为乙酸、乙醇和少量的丙酸和丁醇。具体含量见表 1。

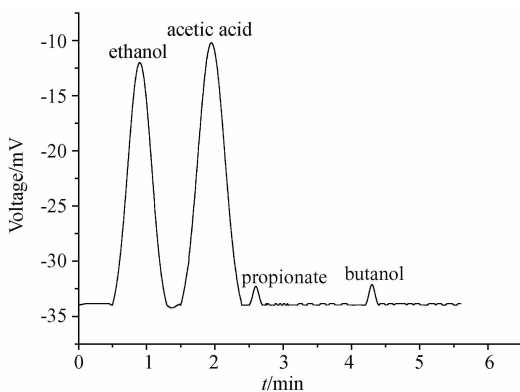


图 5 代谢产物色谱图

Fig. 5 Gas chromatograms of end products from glucose.

表 1 菌株 HL-3 代谢产物

Table 1 The production of HL-3 growing on D-glucose

Metabolites of glucose	H ₂ /(mol/L)	CO ₂ /(mol/L)	ethanol/(g/L)	acetic (g/L)	propionic/(g/L)	butanol/(g/L)	butyrate/(g/L)
Content	0	0.0061	0.261	0.242	0.003	0.003	0

以葡萄糖为碳源时的代谢方程式: $C_6(H_2O)_6 \rightarrow 1.38CO_2 + 0.92CH_3COOH + 1.38CH_3CH_2OH$

2.3.2 代谢产物(乙醇)对菌株生长的影响:从图 6 可知,乙醇对菌株 HL-3 的生长代谢有明显抑制作用。当浓度大于 1.5 % 时,菌株停止生长。

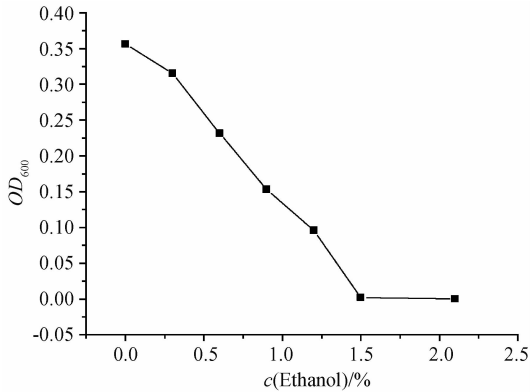


图 6 不同乙醇浓度对菌株 HL-3 的影响

Fig. 6 The effect of ethanol on the growth of strain HL-3.

2.4 硫代硫酸根和亚硫酸根对 HL-3 生长代谢的影响

HL-3 能利用硫代硫酸根产生胞内单质 S 颗粒,

对硫代硫酸根的耐受浓度上限为 0.8 mol/L, 0.5 mol/L 浓度下菌体形态如图 7 所示。菌株对亚硫酸根的耐受程度上限为 100 mmol/L。菌株对亚硫酸根和硫代硫酸根的耐受与 *T. uzonensis* strain JW/IW010 和 *T. sulfuriginens* DSM 17917^T (AF234164) 的比较参见表 2。

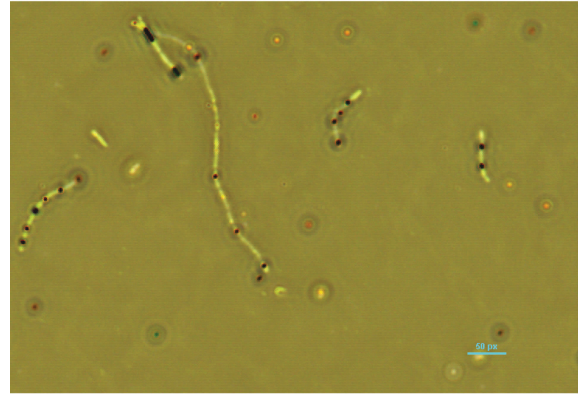


图 7 0.5 mol/L 浓度下的硫代硫酸盐菌株 HL-3 的菌体形态 (OLYMPUS BH-2 100 ×)

Fig. 7 Phase-contrast micrograph of cells of strain HL-3 grown in the presence of 0.5 mol/L thiosulfate (OLYMPUS BH-2 100 ×).

表 2 菌株 HL-3 与亲缘关系密切的热厌氧杆菌菌株的比较

Table 2 Comparison between strain P4-1 and other most closely strains of *Thermoanaerobacter*

Characteristic	HL-3	<i>T. uzonensis</i> DSM 18761 ^T (EF530067)	<i>T. sulfuriginens</i> DSM 17917 ^T (AF234164)
Source	Oil reservoir water	Hot spring [7]	Acidic volcanic steam [6]
Temperature range (optimum)/°C	45 - 73 (58 - 63)	32.5 - 69 (61) [7]	34 - 72 (63 - 67) [7]
pH range (optimum)	5.0 - 8.0 (6.3 - 6.5)	4.2 - 8.9 (7.1) [7]	4.0 - 8.0 (5.0 - 6.5)
Doubling time under optimal condition/h	0.5	1.25 [7]	2.4 [7]
DNA G + C content/(mol%)	33.9	33.6 [7]	34.5 [7]
Products from S ₂ O ₃ ²⁻ reduction	S	S [7]	S [7]
Tolerance of 1M thiosulfate and reduction to S	Only up to 0.8 mol/L	Only up to 0.2 mol/L [7]	+ [7]
Tolerance of 0.09 mol/L sulfite	+ ; up to 0.1 mol/L	Only up to 0.05 mol/L [7]	+ [7]
Tolerance of NaCl/(% ; w/v)	up to 3.2	ND	up to 1.0 [7]
the major end products from glucose	ethanol, acetic acid, CO ₂	ethanol, acetic acid, CO ₂ [7]	ethanol, lactate, acetic acid, CO ₂ , H ₂ [6]

2.5 16S rRNA 序列的测定及系统发育树构建

HL-3 的 16S rRNA 部分序列长 1576 bp, 在 GenBank 核酸登录号为 GU561619。根据菌株 HL-316S rRNA 测序结果进行 BLASTn 分析, 菌株 HL-3 与 *T. uzonensis* DSM 18761^T (EF530067) 和 *T.*

sulfuriginens DSM 17917^T (AF234164) 的相似性分别为 98.8% 和 98.1%。菌株 HL-3 与热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 其他菌株的系统发育分析结果见图 8。

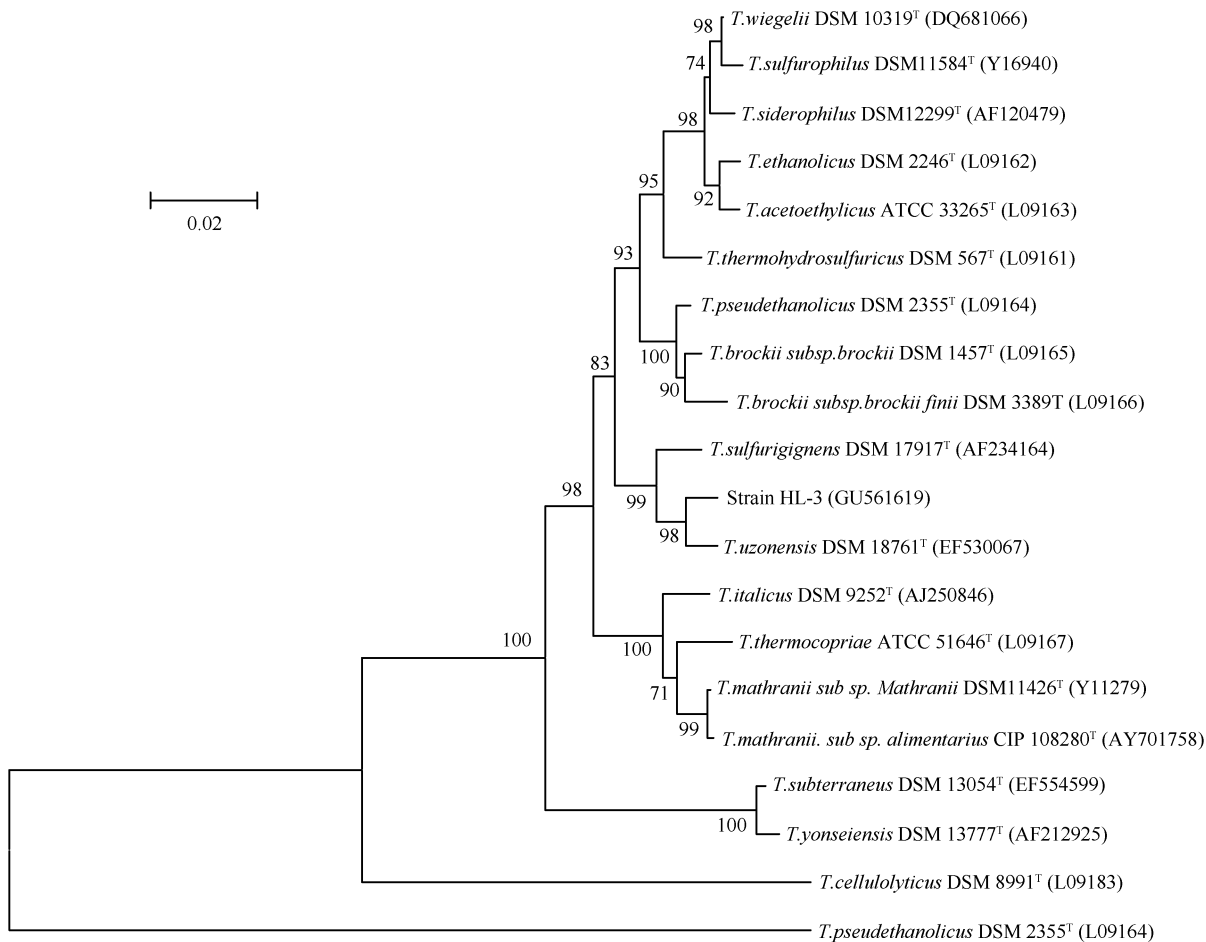


图 8 基于 16S rRNA 序列相似性构建的系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. The tree rooted was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank. (Bar, 2% sequence divergence; T, type strain).

2.6 菌株 HL-3 (G + C) mol% 含量结果

(G + C) mol% 含量的测定结果显示, 菌株 HL-3 的含量为 33.9%。

3 讨论

(1) *T. uzonensis* 是 2008 年才发现的热厌氧杆菌属中的一个新种, 菌株 HL-3 的 16S rRNA 与 *T. uzonensis* strain JW/IW010 相似度最高为 98.8%, 与 *T. sulfurigignens* DSM 17917^T (AF234164) 的相似度次之为 98.1%。若仅仅从系统发育学上来判断 HL-3 的分类地位, 显然 HL-3 属于 *T. uzonensis*, 但是生理生化试验表明 HL-3 与 *T. uzonensis* strain JW/IW010 与在倍增时间、最适 pH 以及对亚硫酸根和硫代硫酸根的耐受性上具有明显的不同。HL-3 与 *T. sulfurigignens* DSM 17917^T (AF234164) 在对亚硫酸根和硫代硫酸根的耐受性^[16]上很接近, 但是二者

在代谢途径^[6-7] (以葡萄糖为例) 上具有明显的不同。因此, HL-3 的分类地位有待于用 DNA 杂交的方法做进一步的鉴定。

(2) 硫代硫酸根是地球沉积层厌氧环境生物硫代谢中最重要的中间代谢物, 既可以作为生物电子受体又可以作为生物电子供体^[16-17]。关于硫元素在油藏微生物系统的流动和调节机制, 目前尚未有系统的论述。随着被发现油藏微生物种类不断增多, 油藏中微生物的硫循环必定会逐渐被人们所认识。本菌株硫元素代谢转换机制的发现, 可以作为高温油藏中单质硫沉积生物成因的一个重要解释。

(3) 包括菌株 HL-3 在内的许多从高温油藏分离到的发酵型细菌都能利用五碳糖 (如木糖) 等多种非葡萄糖的碳水化合物高效产生乙醇、乙酸, 因此油藏是我们寻找二代乙醇发酵微生物种质资源的理想宝库^[18]。在油藏环境中, 发酵产生的乙醇可有效降低原油粘稠度, 提高原油的流动性; 产生的乙酸等

酸性物质在地层中可溶解碳酸盐生成二氧化碳,气体在油藏中的聚集使油藏压力提高,有利于采油作业^[19]。

参考文献

- [1] Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles*, 2005, 9:75-79.
- [2] Liu YJ, Chen YP, Jin PK, Wang XC. Bacterial communities in a crude oil gathering and transferring system (China). *Anaerobe*, 2009, 15:214-218.
- [3] R ling WFM, Head IM, Larter SR. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, 2003, 154:321-328.
- [4] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 77:103-116.
- [5] Grassia GS, McLean KM, Glénat P, Bauld J, Sheehy AJ. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 21:47-58.
- [6] Lee YJ, Dashti M, Prange A, Rainey FA, Rohde M, Whitman WB, Wiegel J. *Thermoanaerobacter sulfurignens* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium that reduces 1 M thiosulfate to elemental sulfur and tolerates 90 mM sulfite. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57:1429-1434.
- [7] Wagner ID, Zhao W, Zhang CL, Romanek CS, Rohde M, Wiegel J. *Thermoanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a hot spring within the Uzon Caldera, Kamchatka, Far East Russia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2008, 58:2565-2573.
- [8] Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1979, 43:260-296.
- [9] 仇天雷, 承磊, 罗辉, 张辉, 吴晓磊, 邓宇. 一株近海沉积物中产甲烷菌的分离及鉴定. *中国沼气 (China Biogas)*, 2007, 25:3-6.
- [10] Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Archives of microbiology*, 1997, 168:114-119.
- [11] 伍晓林, 侯兆伟, 陈坚, 伦世仪. 采油微生物发酵液中有有机酸(醇)的 GC-MS 分析. *大庆石油地质与开发 (Petroleum Geology And Oilfield Development in Daqing)*, 2005, 24:93-95.
- [12] 黎霞, 承磊, 汪卫东, 邓宇, 尹小波, 张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离, 鉴定及代谢产物特征. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48:995-1000.
- [13] 李旭, 吕归宝. 薄层扫描法测定中药复方制剂中单质硫的含量. *中药新药与临床药理 (Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology)*, 1994, 5:35-38.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 1987, 4:406-425.
- [15] Mandel M, Marmur J. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol*, 1968, 12:195-206.
- [16] Ravot G, Ollivier B, Magot M, Patel BKC, Crolet J, Fardeau M, Garcia J. Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order Thermotogales. *Applied and environmental microbiology*, 1995, 61:2053-2055.
- [17] Jorgensen BB. A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, 1990, 249:152.
- [18] Bakken HE. BioEthanol: fuel of the future?. 10th ed. Akureyri: The Press of University of Akureyri, 2009.
- [19] 洪新, 杨翔华, 唐克. 利用微生物提高采油率. *辽宁石油化工大学学报 (Journal of Liaoning University of Petroleum and Chemical)*, 2004, 24:43-46.

Isolation and identification of a thermophilic anaerobic bacterium

Haichang Liu¹, Guihong Lan³, Quanquan Liu¹, Yi Cao³, Yu Deng^{1,2}, Hui Zhang^{1,2*}

(¹Biogas Institute of Ministry of Agricultural, ²Key Laboratory of Energy Microbiology and Application, Chengdu 610041, China)

(³College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: [**Objective**] To find new microbial resources from a high-temperature oil reservoir. [**Methods**] Strain HL-3 was isolated by Hungate Anaerobic Technique from oil reservoir water sampled from Dagang oilfield, China. Through physiological, biochemical and phylogenetic analysis, the strain HL-3 was classified. [**Results**] Cells were Gram-positive. The temperature range for growth was 40°C – 75°C (optimum at 60°C) and the pH range was 5.0 – 8.0 (optimum at 6.5). The isolate could grow in the presence of 0% – 3.2% NaCl (optimum at 0.25%). Glucose, ribose, mannose, xylose and cellobiose could be metabolized. Metabolites of glucose were ethanol, acetate, CO₂ and trace amount of propionate and butanol. The G + C content of DNA was 33.9mol%. Based on 16S rRNA studies, strain HL-3 was most close to *T. uzonensis* DSM 18761^T (EF530067) with 98.8% similarity and to *T. sulfurignens* DSM 17917^T (AF234164) with the 98.1% similarity. Strain HL-3 tolerated to high sulfite (0.1mol/L) ions and extremely high concentration of thiosulfate (0.8 mol/L). When the concentration of thiosulfate was higher than 0.075 mol/L, the cell would generate S element granular. The presence of H₂S gas was detected inside of space at the top of serum bottle. Strain HL-3 together with *T. uzonensis* DSM 18761^T differed greatly in toleration of thiosulfate and sulfite. The toleration of strain HL-3 to thiosulfate and sulfite was most close to *T. sulfurignens* DSM 17917^T (AF234164). In addition, strain HL-3 to metabolite thiosulfate and sulfite was also similar with *T. sulfurignens* DSM 17917^T (AF234164). However, it differs largely from both of them to metabolize glucose. [**Conclusion**] Therefore, strain HL-3 may be a new species of the *Thermoanaerobacter*, and the definitive classification positioning is still awaiting for further verified with the method of determination of whole-genome DNA-DNA similarity^[1].

Keywords: thermophilic anaerobic bacterium; identification; thiosulfate; sulfite

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation (40973059)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

Received : 28 April 2010/Revised: 9 June 2010