

# 一株嗜热厌氧杆菌的分离、鉴定及其代谢特征

兰贵红<sup>1,2</sup> 葛菊<sup>2</sup> 刘海昌<sup>3</sup> 唐全武<sup>2</sup> 张辉<sup>3</sup> 乔代容<sup>1</sup> 曹毅<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学 生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 西南石油大学 化学化工学院 四川 成都 610500)

(3. 农业部能源微生物与利用重点开放实验室 四川 成都 610041)

**摘要:**【目的】分离、保护油藏嗜热微生物资源,解析其主要的代谢特征。【方法】利用 Hungte 厌氧分离技术从大港油田埕海一区油层采出液中分离出厌氧菌株 BF1。通过生理生化特征分析、16S rRNA 基因序列比对与电化学分析,确定 BF1 的分类地位及其 S 元素代谢对腐蚀电流的影响。【结果】菌株 BF1 为严格嗜热厌氧革兰氏阴性杆菌,顶端产芽孢、不运动,菌体大小为  $0.42 \mu\text{m} \times (1.6-5.4) \mu\text{m}$ ,单生、成对或成串生长。其温度生长范围为  $45^\circ\text{C}-75^\circ\text{C}$  (最适温度  $60^\circ\text{C}$ ); pH 生长范围在 4.5–8.5 (最适 pH 6.5) 之间,比生长速率( $\mu_m$ )  $0.99 \text{ h}^{-1}$ ,倍增时间为 42 min。能利用葡萄糖、松三糖、棉子糖、甘露糖、乳糖、纤维二糖、果糖、核糖等碳水化合物,利用葡萄糖发酵的产物是乙醇、乙酸、 $\text{CO}_2$  及少量的  $\text{H}_2$ 。菌株 BF1 能还原亚硫酸盐与硫代硫酸盐产生  $\text{H}_2\text{S}$ ,其耐受上限分别为 50 mmol/L 和 75 mmol/L; 还原硫代硫酸钠(50 mmol/L) 后其极化电阻由  $2\,099 \Omega/\text{cm}^2$  降低至  $776 \Omega/\text{cm}^2$ ,腐蚀电流由  $9.936\text{e-}006 \text{ A}$  提高至  $3.25\text{e-}005 \text{ A}$ 。细胞膜脂肪酸主要由高级饱和脂肪酸组成,含量最丰富的为十五烷酸占 70.6%。菌株 BF1 的 DNA (G+C)mol% 含量为 34.0%,其 16S rRNA 与 *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> 相似性最高,为 98.3%,与 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T</sup> 次之,为 98.0%。菌株 BF1 的许多生理、生化特征与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> 和 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T</sup> 有着明显的差别,如倍增时间、最适生长温度及底物利用等;而菌株 BF1 的细胞膜脂肪酸组成与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> 也不相同。【结论】菌株 BF1 可能是 *Thermoanaerobacter* 属中的一个新种,其确切分类地位还需要进一步进行 DNA 分子杂交;其代谢元素硫提高腐蚀电流密度,可能会对油田管道与设备造成腐蚀。

**关键词:** 嗜热厌氧菌, 鉴定, 代谢特征, 硫代谢, 腐蚀

基金项目: 国家基础性工作专项项目(No. SB2007FY400)

\*通讯作者: ✉: caoyi\_01@163.com

收稿日期: 2011-07-01; 接受日期: 2011-10-26

# Isolation, identification and metabolic characterization of an anaerobic thermophilic bacterium

LAN Gui-Hong<sup>1,2</sup> GE Ju<sup>2</sup> LIU Hai-Chang<sup>3</sup> TANG Quan-Wu<sup>2</sup> ZHANG Hui<sup>3</sup>  
QIAO Dai-Rong<sup>1</sup> CAO Yi<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest Petroleum University, Chengdu, Sichuan 610500, China)

(3. Biogas Institute of Ministry of Agriculture P. R. China, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract: [Objective]** To isolate, protect thermophilic microbial resources from petroleum reservoirs and analyze these main metabolic characterization. **[Methods]** The strain BF1 was isolated by Hungte anaerobic technique from Chenghai 1 Unit of Dagang oil field in China. Its taxonomic status determined by physiological, biochemical and 16S rRNA gene sequence analysis. Its effect of sulfur metabolism on the corrosion current was measured by electrochemical analysis. **[Results]** The strain BF1 was Gram-negative, strictly thermophilic anaerobic, top-sporulating, non-motile, rods,  $0.42\ \mu\text{m} \times (1.6\text{--}5.4)\ \mu\text{m}$ , grew solitary, in pairs or in chains. Growth occurred at  $45\ \text{°C}\text{--}75\ \text{°C}$  (optimum  $60\ \text{°C}$ ), at pH 4.5–8.5 (optimum 6.5). Specific growth rate ( $\mu\text{m}$ ) was  $0.99\ \text{h}^{-1}$  and doubling time was 42 min. Substrates included glucose, melizitose, raffinose, mannose, lactose, fructose and ribose. The main products of glucose fermentation were  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , acetate and ethanol. The strain could reduce thiosulfate and sulfite to sulfide, and its tolerance limits were 75 mmol/L and 50 mmol/L, respectively. The electrochemical impedance reduced from  $2\ 099\ \Omega/\text{cm}^2$  to  $776\ \Omega/\text{cm}^2$  and the corrosion current increased from  $9.936\text{e-}006\ \text{A}$  to  $3.25\text{e-}005\ \text{A}$  after thiosulfate (50 mmol/L) was reduced. The fatty acids were mainly composed of saturated long chain fatty acids, with C15:0 the most, accounting for 70.6%. The G+C content of DNA was 34.0 mol%. The 16S rRNA gene sequence analysis indicated that the closest phylogenetic relatives were *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* DSM2355<sup>T</sup> and *T. Brockii* subsp. *brockii* DSM1457<sup>T</sup>, 98.3% and 98.0%, respectively. However, the strain BF1 was different with *T. pseudethanolicus* DSM2355<sup>T</sup> and *T. Brockii* subsp. *brockii* DSM1457<sup>T</sup> in doubling time, optimum temperature and substrates utilized, and different with *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> in fatty acid profile. **[Conclusion]** The strain BF1 may be a new species of *Thermoanaerobacter* genus, the exact taxonomic status of it requires DNA hybridization further. The corrosion current density improved by its metabolic element sulfur may cause corrosion of oil pipelines and equipments.

**Keywords:** Thermophilic anaerobic bacteria, Identification, Metabolic characterization, Sulfur metabolism, Corrosion

油藏作为一个特殊的地热环境, 具有高温、高压、缺氧及富含石油烃等理化特征, 致使油藏

形成了独特微生物生态系统<sup>[1]</sup>。研究显示油藏中的微生物以厌氧消化产甲烷为其主要代谢途径,

其优势菌群由发酵菌、硫酸盐还原菌、甲烷生产菌及金属还原菌等<sup>[2-3]</sup>组成,分子生态的研究结果表明嗜热厌氧发酵菌,特别是嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter*)属于油藏中最重要的优势菌群<sup>[3-4]</sup>,由此推测嗜热厌氧杆菌属在油藏微生物系统中可能起着重要的作用,嗜热厌氧发酵细菌的分离、鉴定有助于丰富油藏微生物资源,而菌株代谢特征的研究,特别是嗜热厌氧杆菌硫元素代谢引起腐蚀电化学性质的改变,将有助于解析高温油藏微生物的代谢过程,同时也为防治油田管道与设备的腐蚀提供一定的理论基础。

本研究从大港油田高温油藏采出液中分离出一株嗜热厌氧菌 BF1,通过形态观察、生理生化试验、16S rRNA 基因序列测定、基因组 G+C(%)含量测定、代谢产物特征、细胞膜脂肪酸组成及电化学分析后,发现菌株 BF1 与其 16S rRNA 基因序列相似性最高的 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T[5-6]</sup> (98.3%)和 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T[7-9]</sup> (98.0%)在几个重要的生理生化特征上具有显著的区别,菌株 BF1 在细胞膜脂肪酸的组成与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> 差异明显,菌株 BF1 可能是嗜热厌氧杆菌属的一个新种,其分类地位还有待于进一步的 DNA 分子杂交进行鉴定;同时其还原硫代硫酸盐能降低极化电阻,增加腐蚀电流。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 样品:** 样品取自于大港油田埕海一区的油层采出液,油藏深度 1 927 m-2 007 m,地层温度 75 °C,水总矿化度于 4 780 mg/L, pH 在 8.38-9.40 之间,水型属重碳酸钠型,样品收集于无菌密封试剂瓶中 48 h 内于实验室富集培养。

**1.1.2 主要的试剂与仪器:** 酵母粉购于 OXOID 公司,载体 PMD-19T 购于 TaKaRa 公司,16S rRNA

引物和序列测定于上海英俊公司完成。气相色谱 GC-7AG 购于日本 Shimadzu 公司,DU800 分光光度计购于 Beckman 公司。

**1.1.3 分离培养基(g/L):** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.50, NaCl 1.00, MgSO<sub>4</sub> 0.50, NaNO<sub>3</sub> 0.50, NH<sub>4</sub>Cl 1.00, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05, Cys-HCl·H<sub>2</sub>O 0.50, 葡萄糖 5.00, 微量元素 1 mL<sup>[10]</sup>, 刃天青 1 mL。

### 1.2 形态观察

采用革兰氏染色判断菌株革兰氏属性,利用扫描电子显微镜观察菌体形态<sup>[11]</sup>。

### 1.3 菌株 BF1 的生理生化特征鉴定

采用葡萄糖(0.5%)作为碳源,分别添加酵母粉、BBL 聚蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨等不同的氮源(2 g/L),通过测定菌体密度判断其对菌体生长的影响。以不同的 pH (4.2-9.0)、盐浓度(0.25%-5.2%)、温度(45 °C-78 °C),测定菌体的最适生长条件;在最适生长条件下通过测定菌体的密度测定菌株 BF1 的倍增时间。底物试验采用不同碳源代替葡萄糖(终浓度均为 5 g/L)<sup>[12]</sup>,抗生素试验以加入不同的抗生素(100 mg/L),测定菌体密度确定菌株对抗生素的抗性。以不同浓度的硫代硫酸钠和亚硫酸钠代替加入到不含硫酸盐和 Cys-HCl·H<sub>2</sub>O 培养基中测定菌株对硫代硫酸盐与亚硫酸盐的抗性。

### 1.4 16S rRNA 基因序列扩增、测序及系统进化树的构建

**1.4.1 16S rRNA 基因序列扩增与测序:** 通过天根细菌基因组提取试剂盒提取菌株 BF1 的 DNA,利用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')与 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增,扩增体系参照文献[13],回收 PCR 产物,连接至载体 PMD-19T 后,转化至 *E. coli* JM109 中挑取阳性克隆测序。

**1.4.2 系统发育树的构建:** 提交菌株 BF1 的 16S rRNA 基因序列到 NCBI 数据库进行比对,选取与

之相似性较高的嗜热模式菌株 16S rRNA 基因序列, 进行 ClustalX 比对, MEGA 4.1 分析, 利用 Neighbor-Joining 法进行系统发育树的构建, Bootstrap 1 000 次进行稳定性的验证。

### 1.5 (G+C)mol%含量的测定

依据变性温度法<sup>[14]</sup>测定基因组中(G+C)mol%, 对照菌采用 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。

### 1.6 代谢产物测定

以葡萄糖作为底物, 在最适生长条件下接入 1.5%浓度的菌体, 培养 3 d 后通过气相色谱测定其主要产物。

### 1.7 细胞脂肪酸组成的测定

细菌 BF1 在 TYE 培养基中培养以 0.5%的葡萄糖作为碳源, 细胞培养至对数生长中期, 离心收集菌体, 用蒸馏水洗涤, 进行甲酯化后<sup>[15]</sup>, 取 2  $\mu$ L 通过气相色谱-质谱仪分析。

### 1.8 菌株进行硫代硫酸盐代谢对腐蚀电化学的影响

分别接入 2%的 BF1 菌株到含 50 mmol/L 硫代硫酸钠的与不含硫代硫酸钠的培养基中培养 72 h 后, 参照文献<sup>[16]</sup>测定其阻抗与极化曲线的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的形态特征

菌株 BF1 是严格的厌氧菌, 呈直杆状, G<sup>-</sup>, 无鞭毛, 不运动, 直径 0.42  $\mu$ m, 长 1.6  $\mu$ m–5.4  $\mu$ m, 单生、成对或成串生长, 产顶端芽孢(图 1)。

### 2.2 生理生化特征

**2.2.1 生理特征:** 不同氮源对菌株 BF1 的生长影响很大, 其中酵母粉对 BF1 的刺激作用最强(图 2), 而空白对照基本没有菌体生长, 所以在所有生理生化试验过程中均加入酵母粉。菌株 BF1 的温度生长范围为 45  $^{\circ}$ C–75  $^{\circ}$ C, 最适生长温度为

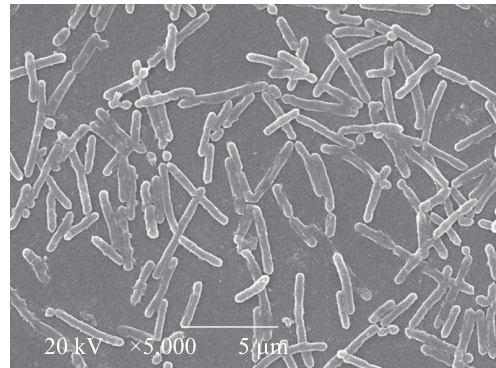


图 1 BF1 扫描电镜照片

Fig. 1 Electron micrograph of BF1

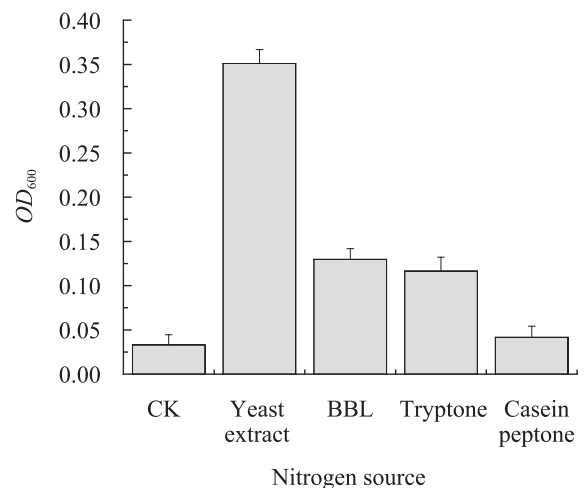


图 2 不同的氮源对菌株 BF1 生长的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on cell growth

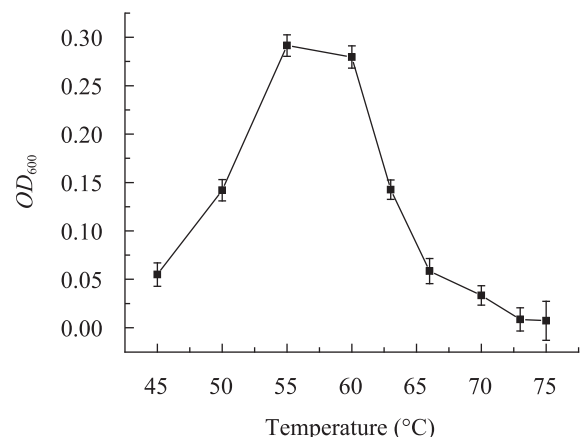


图 3 温度对菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on cell growth

60 °C (图 3); 生长 pH 范围为 4.5–8.5, 最适 pH 为 6.5 (图 4)。菌株 BF1 生长的 NaCl 浓度范围为 0–5.0% (图 5), 最适浓度为 0.5%。倍增时间为 42 min (60 °C、pH 6.5), 比生长速率( $\mu$ )为 0.99 h<sup>-1</sup>。

**2.2.2 生化特征:** 菌株 BF1 能利用葡萄糖、松三糖、棉子糖、甘露糖、乳糖、纤维二糖、果糖、核糖作为底物生长, 而不能利用苦杏仁苷、阿拉伯糖、蜜二糖、麦芽糖、甘露醇、松三糖、蔗糖、木聚糖、木糖、淀粉、半乳糖、甘油、鼠李糖、水杨苷、山梨糖、山梨糖醇、羧甲基纤维素钠、延胡索酸等作为底物生长。抗生素试验显示菌株 BF1 对氨苄青霉素和硫酸链霉素有抗性, 而对红霉素、氯霉素、新霉素、四环素、卡那霉素敏感。菌株 BF1 能耐受一定浓度的硫代硫酸钠和亚硫酸钠, 其抑制上线分别为 75 mmol/L 和 50 mmol/L, 在含硫代硫酸钠与亚硫酸钠的培养瓶顶空均检测到 H<sub>2</sub>S。

### 2.3 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树构建

菌株 BF1 的 16S rRNA 基因部分序列长 1 656 bp, 在 GenBank 核酸登录号为 HM228407。将序列进行 BLASTn 和构建进化树分析, 菌株 BF1 与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> 相似性最

高(98.3%), 其次是 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T</sup>(98.0%) 和 *T. brockii* subsp. *finii* DSM 3389<sup>T</sup>(97.9%), 相似性高于 97%的还有 *T. wiegelii* DSM 101319<sup>T</sup> (97.5%)、*T. siderophilus* DSM 12299<sup>T</sup> (97.4%)、*T. sulfuriginens* DSM 17917<sup>T</sup> (97.3%)、*T. brockii* subsp. *lactiethylicus* DSM 9801<sup>T</sup> (97.1%)。菌株 BF1 与热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 模式菌株的系统发育分析结果如图 6 所示。

### 2.4 菌株 BF1 的 G+C 含量

根据热变性温度法测定基因组(G+C)mol%。依据公式(G+C)mol%=51.2+2.08×[T<sub>m</sub>(X)-T<sub>m</sub>(DH5 $\alpha$ )]计算基因组(G+C)mol%。计算出菌株 BF1 的 (G+C)mol%为 34.0%。

### 2.5 菌体产物测定

在初始 pH 6.5、培养温度 60 °C、葡萄糖含量 5 g/L 的条件下, 接入 1.5%菌株 BF1 于培养基中, 培养 72 h 后测定其产物主要为乙醇、乙酸、CO<sub>2</sub> 和少量 H<sub>2</sub>。乙醇和乙酸的浓度分别为 0.20 g/L 和 0.21 g/L。

### 2.6 菌株脂肪酸的组成

气质联用分析细胞脂肪酸发现(图 7, 表 1) 主要由高级饱和脂肪酸组成, 其含量最丰富的

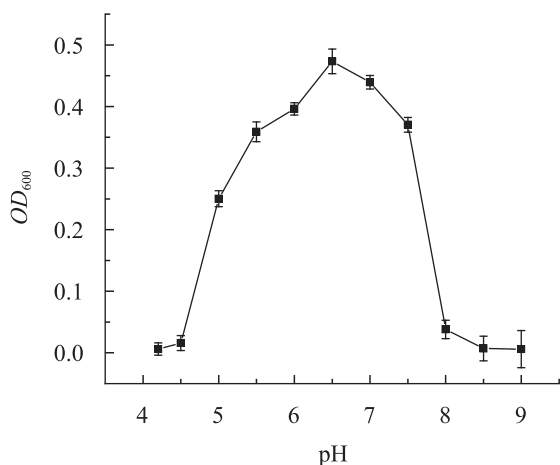


图 4 pH 对菌株生长的影响  
Fig. 4 Effect of pH on cell growth

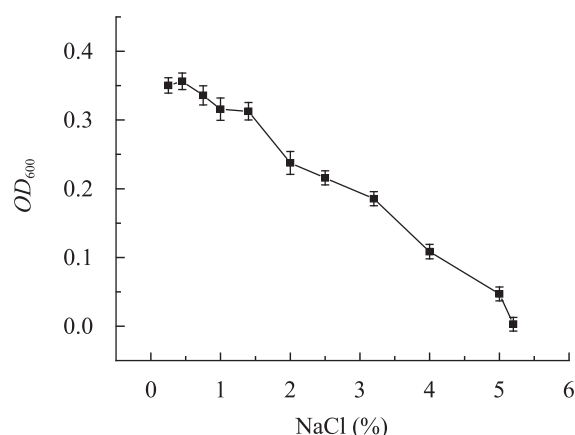


图 5 NaCl 值对菌株生长的影响  
Fig. 5 Effect of NaCl on cell growth

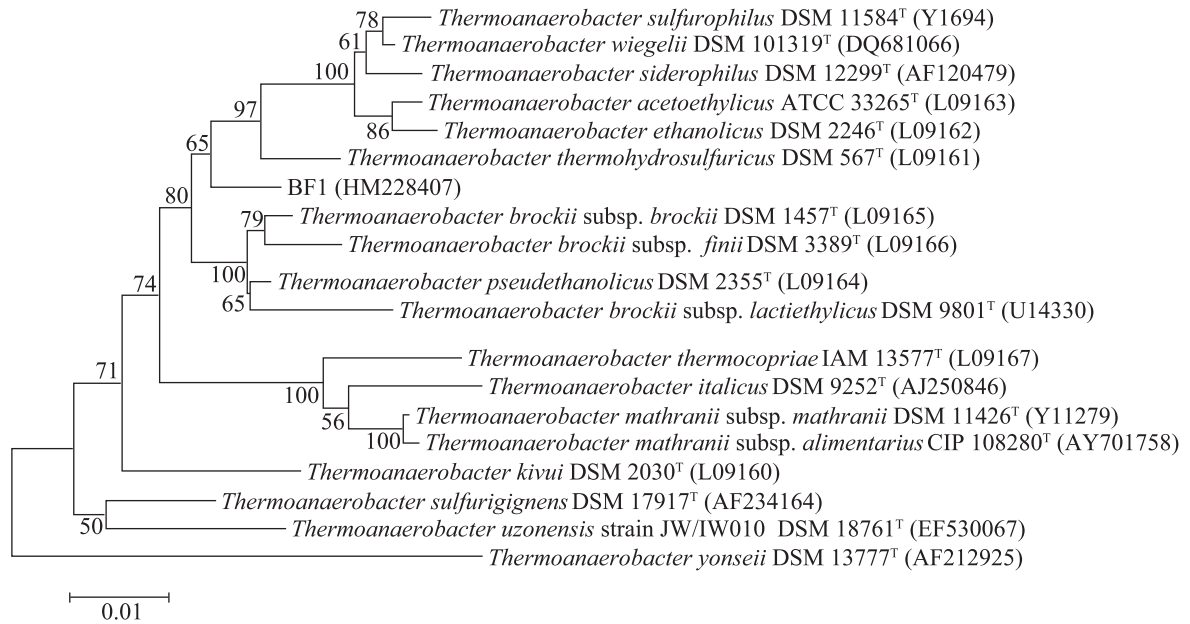


图 6 基于 16S rRNA 基因序列相似性构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of BF1 and its related bacteria constructed using 16S rRNA sequences

为十五烷酸达 70.6%，其次为十六烷酸 9.2%及十七烷酸 8.7%，而不饱和脂肪酸的含量很低，C<sub>16:1ω9C</sub> 与 C<sub>18:1ω9C</sub> 含量分别为 0.7%与 2.5%。

### 2.7 硫代硫酸盐存在时其腐蚀电化学的变化

通过电化学工作检测发现，在含有硫代硫酸盐与不含硫代硫酸盐培养条件下其极化电阻  $R_p$  (图 8) 分别为 776  $\Omega/cm^2$  与 2 099  $\Omega/cm^2$ ，其腐蚀电流(图 9)分别为 3.25e-005A 与 9.936e-006A，说明菌株 BF1 在含有硫代硫酸盐的培养基生长后明显提高了其腐蚀性。其主要原因可能是还原硫代硫酸盐产生 H<sub>2</sub>S 所致。

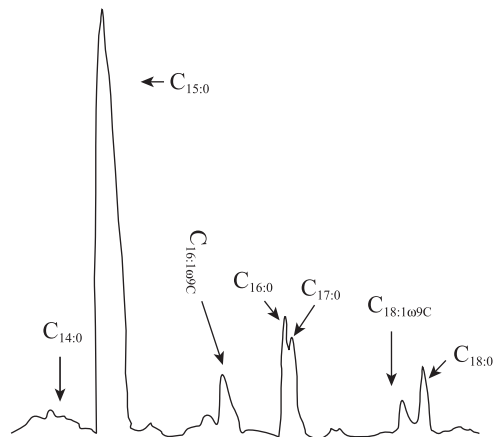


图 7 菌株 BF1 的脂肪酸色谱图

Fig. 7 Fatty acid chromatogram of strain BF1

表 1 BF1 的细胞膜脂肪酸的主要组成成分

Table 1 The main composition of membrane fatty acids of stain BF1

脂肪酸组成 Fatty acid composition	C14:0	C15:0	C16:1	C16:0	C17:0	C18:1	C18:0
停留时间 Remain time (min)	5.76	6.6	8.25	8.58	9.55	11.35	11.79
百分含量 Percentage (%)	3.1	70.6	0.7	9.2	8.7	2.5	5.2
合计 Amount (%)							100

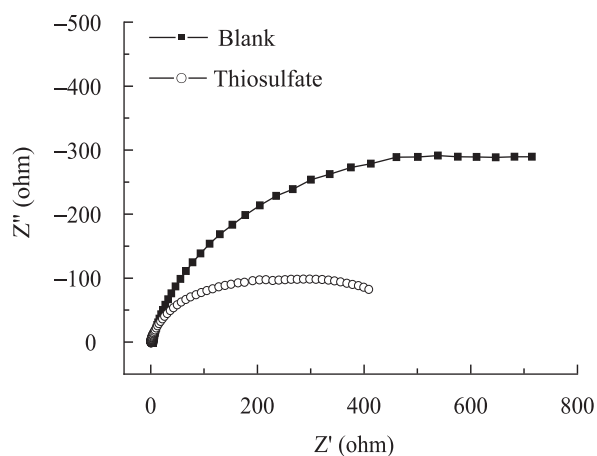


图8 菌株BF1还原硫代硫酸钠的阻抗谱  
Fig. 8 EIS of BF1 reducing thiosulfate

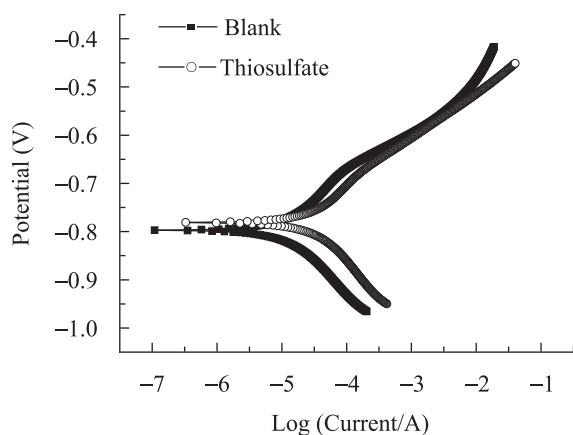


图9 菌株BF1还原硫代硫酸钠的极化曲线  
Fig. 9 Polarization curves of BF1 reducing thiosulfate

### 3 讨论

(1) *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup> [5-6]与 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T</sup> [7-9]均分离于美国黄石公园的地热温泉。菌株BF1分离于高温油藏,其16S rRNA基因序列与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup>相似度最高,为98.3%,与 *T. brockii* subsp. *brockii* DSM 1457<sup>T</sup>相似度次之,为98.0%。菌株BF1的生理、生化特征与模式菌株在许多方面有着明显的差异,如倍增时间、最适生长温度

及底物利用等(表2);同时菌株的细胞膜脂肪酸组成与 *T. pseudethanolicus* DSM 2355<sup>T</sup>也不相同(表2)。考虑菌株BF1的分离生境、生理生化特征及细胞膜脂肪酸的组成等,推测BF1可能是嗜热厌氧杆菌属的一个新种,其分类地位还有待于进一步的DNA分子杂交进行鉴定。

(2) 油藏作为一个重要的厌氧生态系统,目前研究表明嗜热厌氧发酵菌,特别是嗜热厌氧杆菌可能是其主要的优势菌群[2-3],分离与研究油藏中嗜热厌氧杆菌的生理特征可能会有助于油藏微生物的代谢机制,而且嗜热厌氧杆菌的代谢产物主要为小分子的有机物如乙酸、乙醇及CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>等。乙醇可作为有机溶剂能有效降低粘度提高其流动性,乙酸可以腐蚀储油层碳酸盐提高孔隙度,CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>能提高油藏压力改善原油流动性,对提高原油采收率有重要的意义;这些小分子物质同时能作为甲烷生产菌的底物,促进油藏的厌氧消化产甲烷的过程,可能是石油烃降解产甲烷过程重要的中间代谢产物[19-20]。嗜热厌氧杆菌的研究可能会对提高原油采收率及改变目前的开采方式提供一定的理论依据。

(3) 硫代硫酸盐作为研究厌氧环境中元素硫代谢与循环十分重要的物质,它可能被微生物歧化生成硫酸盐或亚硫酸盐,甚至被还原产生H<sub>2</sub>S[21-23],H<sub>2</sub>S的产生可能会导致油层酸化、油田管道与设备腐蚀等。H<sub>2</sub>S的腐蚀机理为产生阴极去极化作用,降低腐蚀电位形成氢蚀。结合电化学分析发现,菌株BF1还原硫代硫酸盐产H<sub>2</sub>S的同时降低了极化电阻,提高了腐蚀电流密度,说明油藏中的H<sub>2</sub>S不仅由硫酸盐还原菌产生,也有可能由发酵微生物代谢产生,这为防治油田管道与设备的腐蚀提供了更全面的思路。

表 2 菌株 BF1 与两个亲缘关系密切菌株的主要特征比较  
Table 2 Characteristics of strain BF1 compared with two of its closest relatives

特征 Characteristic	Strain BF1	<i>T. pseudethanolicus</i> DSM2355 <sup>T</sup> [5,17-18]	<i>T. brockii</i> subsp. <i>brockii</i> DSM1457 <sup>T[7]</sup>
分离源 Source	Oil reservoir	Hot spring	Hot spring
生长温度 Temperature range (optimum) (°C)	45-75 (60)	40-78 (65)	35-85 (65-70)
生长 pH pH range (optimum)	4.5-8.5 (6.5)	5.0-9.0 (6.5-7.3)	5.5-9.5 (6.5)
倍增时间 Doubling time under optimal Condition (min)	42	75	About 1 hour
DNA (G+C)含量 DNA (G+C) content (mol%)	34.0	34.0-34.7	30.0-31.4
细胞膜脂肪酸组成 Cell main fatty acid composition	C15:0、C16:0、C17:0	C15:0、C17:0、C30:0	NR
底物利用 Substrate			
蔗糖 Sucrose	-	+	+
木糖 Xylose	-	+	+
淀粉 Starch	-	+	+
代谢葡萄糖主要产物 The major end products from glucose	Ethanol, acetic acid, H <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub>	Ethanol, acetic acid, H <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub>	Ethanol, lactic acid, acetic acid, H <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub>

注: NR: 没有相关报道; -: 无生长; +: 生长。

Note: NR: Not reported; -: Negative; +: Positive.

## 参 考 文 献

- [1] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 77(2): 103-116.
- [2] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 700-711.
- [3] Li H, Yang SZ, Mu BZ, et al. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oilfield[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(1): 74-84.
- [4] Kaster KM, Bonaunet K, Berland H, et al. Characterisation of culture-independent and -dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 96(4): 423-439.
- [5] Hollaus F, Sleytr U. On the taxonomy and fine structure of some hyperthermophilic saccharolytic Clostridia[J]. *Archives of Microbiology*, 1972, 86(2), 129-146.
- [6] Onyenwoke RU, Kevbrin VV, Lysenko AM, et al. *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* sp. nov., a thermophilic heterotrophic anaerobe from Yellowstone National Park[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007,



- 57(10): 2191–2193.
- [7] Zeikus J G, Hegge PW, Anderson MA. *Thermoanaerobium brockii* gen. nov. and sp. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium[J]. Archives of Microbiology, 1979, 122(1): 41–48.
- [8] Lee YE, Jain MK, Lee C, et al. Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter hrockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1993, 43(1): 41–51.
- [9] Cayol JL, Ollivier B, Patel BKC, et al. Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *lactiethylicus* subsp. nov., isolated from a deep subsurface French oil well, a proposal to reclassify *Thermoanaerobacter finnii* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnii* comb. nov., and an emended description of *Thermoanaerobacter brockii*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995, 45(4): 783–789.
- [10] Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1979, 43(2): 260–296.
- [11] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.
- [12] Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland[J]. Archives of Microbiology, 1997, 168(2): 114–119.
- [13] 刘海昌, 兰贵红, 刘全全, 等. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离鉴定和代谢特征的分析[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1525–1531.
- [14] Mandel M, Marmur J. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA[J]. Methods Enzymol, 1968, 12: 195–206.
- [15] Sasser M. Technical note 101: identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids[M]. Newark: MIDI, Inc. North, 1990: 1–7.
- [16] 匡飞, 王佳, 张盾, 等. 硫酸盐还原菌的生长过程及其对D36钢海水腐蚀行为的影响[J]. 材料开发与应用, 2008, 23(3): 49–52.
- [17] Wiegel J, Ljungdahl LG, Rawson JR. Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*[J]. Journal of Bacteriology, 1979, 139(3): 800–810.
- [18] Jung S, Zeikus JG, Hollingsworth RI. A new family of very long chain alpha, omega-dicarboxylic acids is a major structural fatty acyl component of the membrane lipids of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E[J]. Journal of Lipid Research, 1994, 35(6): 1057–1065.
- [19] Jones DM, Head IM, Gray ND, et al. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs[J]. Nature, 2008, 451(7175): 176–180.
- [20] Widdel F, Boetius A, Rabus R. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane[J]. The Prokaryotes, 2006, 3: 1028–1049.
- [21] Jorgensen BA. A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments[J]. Science, 1990, 249(4965): 152–154.
- [22] Ravot G, Ollivier B, Magot M, et al. Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 2053–2055.
- [23] Finster K, Liesack W, Thamdrup B. Elemental Sulfur and Thiosulfate Disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a New Anaerobic Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 119–125.