

# 一个新的高温产氢菌及产氢特性的研究

牛莉莉, 刘晓黎, 陈双雅, 东秀珠\*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 利用 Hungate 滚管技术从西藏山南地区热泉淤泥中分离到一株高温产氢的厌氧发酵细菌 T42。菌株 T42 革兰氏染色反应为阴性, 但 KOH 裂解试验证实其为革兰氏阳性杆菌。菌体大小为  $0.7\mu\text{m} \sim 0.9\mu\text{m} \times 3.2\mu\text{m} \sim 7\mu\text{m}$ , 不运动, 不产芽孢。其生长温度范围为  $32^\circ\text{C} \sim 69^\circ\text{C}$ , 最适生长温度为  $60^\circ\text{C} \sim 62^\circ\text{C}$ , 生长 pH 范围为  $5.0 \sim 8.8$ , 最适生长 pH 为  $7.0 \sim 7.5$ , 代时 30min。有机氮源是 T42 菌株的必需生长因子。菌株 T42 利用淀粉、纤维二糖、蔗糖、麦芽糖、糊精、果糖、糖原和海藻糖等底物生长并发酵产氢, 发酵葡萄糖的终产物为乙酸、乙醇、 $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$ 。G + C 含量为 31.2mol%。系统发育分析表明菌株 T42 与 *Thermobrachium celere* 和 *Caloramator indicus* 位于同一分支, 生理生化特征也表明菌株 T42 应是 *Thermobrachium* 属的一个新菌株, 在中国普通微生物菌种保藏中心的保藏号为 AS1.5039。菌株 T42 的最佳产氢初始 pH 为 7.2, 最佳产氢温度为  $62^\circ\text{C}$ , 其氢转化率为  $1.06\text{mol H}_2/\text{mol}$  葡萄糖, 最大产氢速率为  $24.0\text{mmol H}_2/\text{gDW/h}$ 。20mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$  和 2mmol/L 的  $\text{Fe}^{2+}$  可分别提高菌株 T42 的产氢量 20% 和 23.3%, 而  $\text{Ni}^{2+}$  对其产氢无明显的作用。当菌株 T42 和热自养甲烷热杆菌 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*) Z245 共培养时, 由于降低了氢分压, 使其葡萄糖利用率和氢产量分别提高 1 倍和 2.8 倍, 发酵产物乙酸和乙醇的比例也从 1 提高到 1.7。

**关键词** 高温产氢菌, 鉴定, 产氢特性

中图分类号: Q939, Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0280-05

氢能体系将为人类社会提供清洁、高效、可持续发展、充足的能源, 从而缓解能源危机和环境污染问题<sup>[1]</sup>。氢气可以通过石油燃料的转化和水的电解产生, 但这些方法本身需要耗费大量的能源, 而使产氢成本昂贵<sup>[2]</sup>。生物发酵制氢是具有吸引力的产氢技术, 尤其当废水或其它生物质作为原料时, 不仅使产氢成本可以大幅度降低<sup>[3]</sup>, 而且还可实现废物的资源化。生物制氢主要包括光合制氢和厌氧发酵制氢。与光合制氢相比, 厌氧发酵产氢由于不需要光源、可利用多种底物, 速率较高, 及生产条件要求简单而使成本更低<sup>[4]</sup>。高温产氢过程除了热力学上有利于氢转化及发酵速度快两个显著的优点外, 还有其它中温产氢所无法比拟的优点, 如高温条件为产氢菌创造了选择压力, 在一定程度上阻止了耗氢菌的生长或阻止与产氢菌竞争底物的反应; 另外高温过程不易被其它杂菌污染, 而且, 超高温菌分泌的各种胞外酶, 可水解大分子有机物如淀粉、纤维素、半纤维素、木聚糖及多肽等, 简化了生物质的降解<sup>[5]</sup>。因此高温产氢可能更有生产潜力。

我们在研究混合培养物的产氢特性过程中, 利

用 Hungate 滚管技术从西藏山南地区热泉淤泥中分离到一株高温产氢的厌氧发酵细菌, 本文报道该菌株的分离、生物学特性和对产氢特性的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养条件** 嗜热自养甲烷热杆菌 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*) Z245 由荷兰 Wageningen 大学微生物系 Stams A. J. M. 教授惠赠。菌株 T42 分离自西藏山南地区热泉淤泥。分离和培养的培养基采用以 1%(W/V) 葡萄糖为碳源的预还原基础培养基<sup>[6]</sup>, 并添加酵母膏和蛋白胨各 0.2%(W/V) 作为生长因子。在厌氧条件下 ( $100\% \text{N}_2$ ) 于  $60^\circ\text{C}$  培养。按照 Hungate 厌氧操作方法<sup>[7]</sup> 进行滚管分离获得单菌落。

**1.1.2 主要试剂和仪器** DNA 聚合酶, pUCm-T 载体, T4 DNA 连接酶, DNA 凝胶回收试剂盒均来自上海申能博彩生物科技有限公司, 其它试剂均为分析纯。本实验所用的主要仪器有 Olympus-BH<sub>2</sub> 光学显

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展规划项目(2004CB719602); 中国科学院创新基金领域前沿项目资助

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

作者简介: 牛莉莉 (1978 - ), 女, 山东莱州人, 博士研究生, 主要从事生物制氢技术研究。E-mail: lilinyu@126.com

收稿日期: 2005-10-09; 接受日期: 2005-11-08; 修回日期: 2005-12-20

微镜 ,H-600A 透射电镜 ,752 分光光度计 ,气相色谱 GC-14B 和 GC-14C ( Shimadzu ) ,Thermolyne Amplitron I PCR 仪。

1.2 形态观察

菌株 T42 于液体培养基中 60℃ 厌氧培养 3h 后 ,观察细胞形态、革兰氏染色反应及菌体结构。

1.3 生理特性测定

生长实验均在葡萄糖为底物的液体培养基中进行。生长测定波长为 600nm 处的 OD 值。最适生长 pH 测定用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 溶液调整培养液至不同的 pH 值 ,接种后于 60℃ 培养。最适生长温度的测定在带有温控仪的水浴中进行。底物利用实验参照文献 [ 8 ] 进行。

1.4 代谢产物测定

用气相色谱检测细菌发酵葡萄糖的产物 ,N<sub>2</sub> 为载气。有机酸检测用 FID 检测器 ,挥发酸检测条件 :柱温 230℃ ,进样器温度 250℃ ,检测器温度 280℃ ;非挥发酸检测条件 :柱温 150℃ ,进样器温度 180℃ ,检测器温度 200℃。氢气、甲烷及二氧化碳的检测用 TCD 检测器 ,检测条件 :柱温 30℃ ,进样器温度 50℃ ,检测器温度 100℃ ,TCD 室 100℃ ,电流 70mA。

1.5 葡萄糖的测定

采用 3 ,5-二硝基水杨酸 ( DNS ) 测糖法 [ 9 ]。

1.6 ( G + C ) mol% 含量测定

按 Marmur 的方法 [ 10 ] 提取基因组 DNA ,并溶于 0.1× SSC 溶液 ,用 DU800 分光光度仪 ( Beckman ) 测定 DNA 的热变性温度 ( T<sub>m</sub> ) [ 11 ] ,计算 ( G + C ) mol%。

1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增与测序

以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rDNA ,扩增引物采用细菌通用引物 27F ( 5'-AGAGTTTGATCCP ATGGCTCAG-3' ) 和 1541R ( 5'-AAGGAGGTGATC2 CAGCC-3' ) ( 上海生工生物工程有限公司合成 ) ,它们分别对应于大肠杆菌 ( *Escherichia coli* ) 16S rDNA 8 ~ 27 位和 1525 ~ 1541 位的核苷酸。PCR 反应体系 ( 25 μL ) : 10 × PCR 缓冲液 ( 含 MgCl<sub>2</sub> 20mmol/L ) 2.5μL , 2.5mmol/L dNTP 混合液 2.5μL , 10μmol/L 引物各 2.5μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.2μL , DNA 模板 1μL , 去离子水 13.8μL。PCR 扩增条件 : 94℃ 5min ; 94℃ 0.5min , 55℃ 1min , 72℃ 1.5min , 共 30 个循环 ; 72℃ 10min。扩增的 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离 , 经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。将纯化的 PCR 产物连接到载体 pUCm-T 上 , 转化大肠杆

菌 ( *Escherichia coli* ) DH5α。提取有 16S rDNA 插入的质粒并测序 , 序列测定由上海博亚公司完成。

1.8 系统发育树的构建

将菌株 T42 细胞的 16S rDNA 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列同源性比较 , 通过 CLUSTAL X、BIOEDIT 和 MEGA 等软件进行多重序列比对分析 , 并以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树 , 分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价。

2 结果和讨论

2.1 分离菌株的鉴定和系统发育学分析

2.1.1 形态特征 : 菌株 T42 为短杆状 , 大小为 0.7μm ~ 0.9μm × 3.2μm ~ 7μm , 单生或成对 , 不运动 , 不产芽孢。革兰氏染色反应为阴性 , 但 KOH 裂解试验证实其为革兰氏阳性细菌。固体培养基上的菌落形态为圆形 , 白色半透明 , 菌落中央颜色深 , 边缘整齐。

2.1.2 生理生化特征 : 菌株 T42 为严格厌氧的高温细菌 , 生长温度范围为 32℃ ~ 69℃ , 最适生长温度

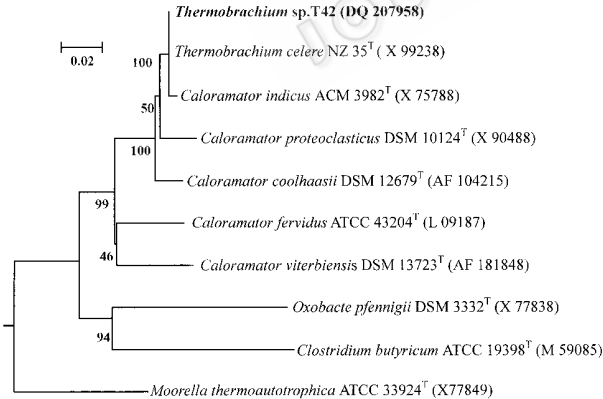
表 1 菌株 T42 和相关细菌的鉴别特性

Table 1 Differential characteristics between T42 and related species			
Characteristic	Strain T42	<i>Thermobrachium celere</i> DSM 8682 <sup>T a</sup>	<i>Caloramator indicus</i> ACM 3982 <sup>T b</sup>
Cell width ( μm )	0.7 ~ 0.9	0.5 ~ 0.8	0.6 ~ 0.8
Cell length ( μm )	3.2 ~ 7.0	1.5 ~ 13.0	10 ~ 100
Gram reaction	+	+	+
Spore	-	-	-
( G + C ) mol%	31.2	31.0	25.6 ± 0.3
H <sub>2</sub> produced	4	4	4
Motility	-	+	-
Growth pH/opt	5.0 ~ 8.8 / 7.0 ~ 7.5	5.4 ~ 9.5 / 8.2	6.2 ~ 9.2 / 7.5 ~ 8.1
Growth temp/opt ( °C )	32 ~ 69 / 60 ~ 62	48 ~ 75 / 66	37 ~ 75 / 60 ~ 65
Products from Glucose	AE	AK ( e )	AEI ( bibviv )
Utilization of substrates			
Maltose	+	+	NR
Sucrose	+	NR	+
Dextrin	+	NR	+
Ribose	+	-	NR
Raffinose	+ w	-	NR
Mannose	-	-	+
Galactose	+ w	+	-
Xylan	-	-	NR
Casamino acids	-	-	NR
Salicin	+	-	NR
Glycerol	-	-	NR

+ . Positive ; - . Negative ; + w. Weakly positive ; NR. not reported ; Numbers ( hydrogen ) represent abundant ( 4 ) . A. Acetate ; E or e. Ethanol ; F. Formate ; L. Lactate ; ib. isobutyrate ; b. n-butyrate ; iv. Isovalerate ; v. n-valerate . Upper-case and lower-case letters indicate major and minor fermentation products , respectively . <sup>a</sup> . Data from Engle *et al.* ( 1996 ) [ 12 ] ; <sup>b</sup> . Data from Chrisostomos *et al.* ( 1996 ) [ 13 ]  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

为 60℃ ~ 62℃ 起始 pH<sup>25℃</sup> 范围 5.0 ~ 8.8 , 最适起始 pH<sup>25℃</sup> 为 7.0 ~ 7.5。不利用无机氮源 ,如 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl 和 NaNO<sub>3</sub> 等 ,而有机氮源酵母膏或蛋白胨是必需的。发酵葡萄糖的最终代谢终产物为乙酸、乙醇、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。代时为 30min。菌株 T42 和相关细菌的鉴别特性见表 1。

**2.1.3 系统发育分析和 (G + C)mol% :**菌株 T42 的 16S rDNA 全序列长 1516bp ,在 GenBank 中的核酸序列号为 DQ207958。以 16S rDNA(长 1407bp)同源性为基础 ,构建了包括菌株 T42 在内的 10 株相关细菌的系统发育树(图 1)。系统发育分析和 (G + C)mol% 含量(31.2 mol%)表明菌株 T42 属于低 GC 含量的革兰氏阳性细菌的梭菌第 I 群 ,并与群中的 *Thermobrachium celere* 和 *Caloramator indicus* 关系密切 ,位于同一分支中。菌株 T42 的 16S rDNA 和 *T. celere* DSM 8682<sup>T</sup> 相似性为 100% ,与 *C. indicus* ACM 3982<sup>T</sup> 相似性为 99.7%。但菌株 T42 不运动 ,发酵葡萄糖产物为乙酸和乙醇 ,而 *T. celere* 细胞运动 ,葡萄糖的发酵产物除乙酸和少量的乙醇外 ,还有甲酸。所以菌株 T42 应定为 *Thermobrachium* 属中的一个新的菌株 ,在中国普通微生物菌种保藏中心的保藏号为 AS1.5039。但该菌株目前尚不能定种 ,还需要与模式种进行 DNA-DNA 同源性杂交 ,根据同源性作进一步分析。



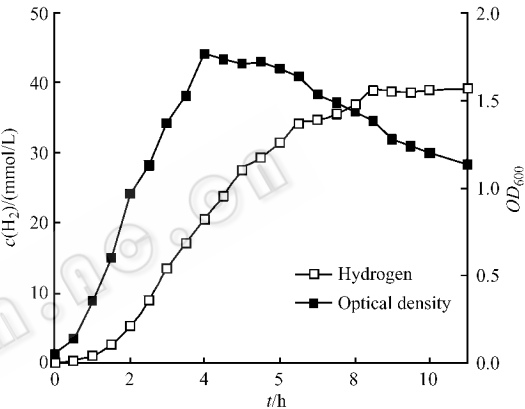
**图 1 菌株 T42 和相关细菌的 16S rDNA 系统发育树**  
Fig.1 16S rDNA Phylogenetic tree of strain T42 and related bacteria. The dendrogram was reconstructed by using the neighbor-joining method and the bootstrap values calculated from 1000 trees. The numbers at each clustering node indicate the percentage of bootstrap supporting , and in the brackets after each bacterial name are 16S rDNA accession numbers in GenBank. ( Bar , 2% sequence divergence ).

**2.2 菌株 T42 的产氢特性**

影响厌氧发酵产氢的因素有很多 ,如 pH 值、温度、氢分压、营养因子等 ,通过调控这些因素有可能

提高厌氧产氢反应的产氢效率。

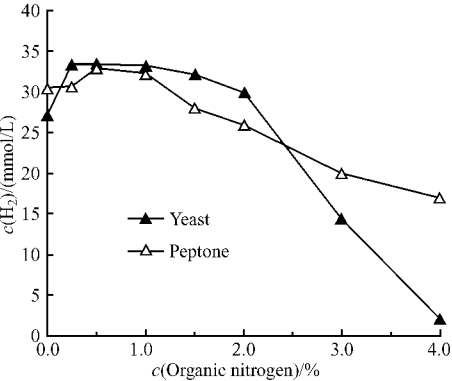
**2.2.1 菌株 T42 的生长和产氢关系 :**将对数期的菌液以 1% 的接种量接种至液体培养基中 ,于 60℃ 培养 ,每隔 0.5h 测定生长液的 OD<sub>600</sub> ,共测定 12h ,绘制生长曲线并计算生长代时。同时测定氢的产生 ,绘制产氢曲线并计算最大产氢速率。图 2 显示菌株 T42 接种后 ,几乎无生长延滞期而迅速进入对数生长期 ,同时氢的产量随之提高 ;但 4h 后菌体开始自溶而导致 OD 值下降。尽管菌株自溶 ,但产氢量持续增加直到 8h 后趋于稳定。这可能是氢化酶和铁氧还蛋白氧化还原酶等参与放氢反应的酶系在细胞自溶后短时间内仍能催化放氢反应。



**图 2 菌株 T42 的生长曲线和产氢过程**  
Fig.2 The growth curve of strain T42 and hydrogen production.

**2.2.2 温度和 pH 对产氢量的影响 :**接种不同 pH 的预还原的基础培养基 ,以 1% 葡萄糖为碳源 ,60℃ 培养 1d 后测定氢浓度。结果表明 ,初始 pH 为 7.2 时可获得最大产氢量。将菌株 T42 接种后 ,分别在不同温度下培养 1d 后测定产氢量 ,结果显示在 62℃ 培养时菌株 T42 产氢量最大。

**2.2.3 有机氮源对产氢的影响 :**将菌株 T42 分别接种至含不同浓度酵母膏和蛋白胨的 1% 葡萄糖的培



**图 3 有机氮源对菌株 T42 产氢的影响**  
Fig.3 Effect of nitrogen sources on hydrogen production by strain T42.

培养基中,1d后测定氢气产量(图3)。实验表明,菌株T42只在含酵母膏或蛋白胨的培养基中才能产氢,在酵母膏和蛋白胨浓度分别为0.25%~1.00%和0.5%~1.0%时产氢量最高。但是高于2%的酵母膏和蛋白胨则对产氢有明显的抑制作用,酵母膏的抑制作用更为明显。

**2.2.4 金属离子对产氢的影响** 金属离子是微生物生理代谢和产氢反应必不可少的营养因子,它们是厌氧微生物合成的必需微量元素,与细菌的辅因子、转运系统及脱氢酶相关。Lin和Lay<sup>[14]</sup>研究了微量元素对污泥菌群厌氧发酵产氢的影响,结果表明镁离子、钠离子、锌离子和铁离子对产氢影响较大,尤其是镁离子。

本实验在1%葡萄糖的基础培养基中分别添加不同浓度的 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NiCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,以测定3种金属离子对菌株T42产氢的影响。试验表明, $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{2+}$ 对菌株T42产氢有影响,最佳的 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度分别是20mmol/L和2mmol/L,可分别提高产氢量20%和23.3%,而 $\text{Ni}^{2+}$ 对产氢无明显的影响。已发现的氢酶有铁氢酶和镍铁氢酶,根据实验结果可推测菌株T42的氢酶为铁氢酶,其具体的特性有待进一步研究。

**2.2.5 氢分压对产氢的影响** 在厌氧发酵过程中,氢分压是影响产氢效率的一个重要因素。氢压高时,代谢的电子流更容易流向乳酸、乙醇、丙酮、丁醇或丙氨酸等还原型产物,伴随着这些产物的形成,产氢率会大大减少<sup>[15]</sup>。而低的氢压更倾向于生成氧化还原电势高的乙酸。所以要提高氢的产量就必须保持气相中低的氢分压<sup>[16]</sup>。

*M. thermotrophicus* Z245能够在60℃利用 $\text{H}_2$ 和 $\text{CO}_2$ 合成甲烷,并可将氢分压降至 $10^{-3}$ atm。为了检测氢分压对菌株T42产氢的抑制作用,构建了产氢菌T42和*M. thermotrophicus* Z245的人工共培养物。将在 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 上培养4d生长活跃的*M. thermotrophicus* Z245和在1%葡萄糖的液体培养基上培养1d的菌株T42以30:1的比例接种到含1%葡萄糖的新鲜基础培养基中( $\text{N}_2$ ,100%),并将该共培养物在60℃培养2d后,测定代谢产物和葡萄糖消耗。试验表明,共培养物产生80mmol  $\text{CH}_4$ 且检测不到 $\text{H}_2$ ,说明产氢菌产生的 $\text{H}_2$ 完全被甲烷菌利用。由于产生1mol  $\text{CH}_4$ 需要4mol  $\text{H}_2$ ,因此推算菌株T42与*M. thermotrophicus* Z245共培养时,氢的理论产量为320mmol  $\text{H}_2$ ,与产氢菌T42纯培养时产生

114mmol  $\text{H}_2$ 相比,氢的理论产量可提高2.8倍。同时氢分压对葡萄糖的消耗和代谢产物的比例也有影响,产甲烷菌使产氢菌的葡萄糖消耗提高了一倍,并且乙酸与乙醇的比例由1:1提高到1.7:1。说明减小氢分压,改变电子流的方向,使代谢产物的比例改变,即产生更多的乙酸和较少的乙醇,从而提高氢的产量。

与*M. thermotrophicus* Z245共培养时,菌株T42的形态和细胞数量发生了变化(图4)。与菌株T42单一培养相比,共培养48h后菌株T42的细胞数量相对较少,且形态完整(图4-A)。而产氢菌菌株T42在48h纯培养物中细胞完全自溶(图4-B)。结果表明氢压降低时,尽管产氢菌细胞量低于纯培养,但由于细胞不自溶而能够实现较高的氢转化率。共培养物中菌株T42不易自溶的原因可能是细胞密度降低或甲烷菌提供了某种因子抑制了其自溶反应,其机理有待于进一步探讨。

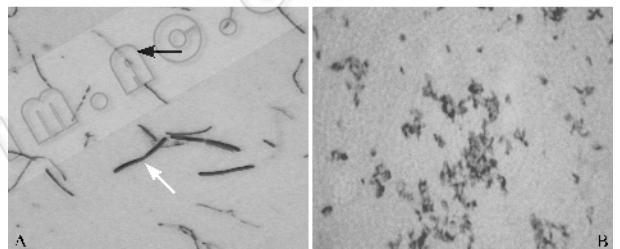


图4 共培养对产氢菌细胞形态和数量的影响

Fig.4 Effect of co-cultivation with *M. thermotrophicus* Z245 on cell morphology and quantity of strain T42. A :co-cultivation of strain T42 and Z245 for 48h ; B : cell autolysis of cultivation of strain T42 after 48h pure culture → strain *M. thermotrophicus* Z245 ; ⇨ strain T42.

菌株T42是乙酸乙醇型高温高效产氢菌。在62℃ pH7.2的条件下,其氢转化率为1.06mol  $\text{H}_2$ /mol葡萄糖,最大产氢速率为24.0mmol  $\text{H}_2$ /gDW/h。Niel等<sup>[17]</sup>报道了两株高温产氢菌*C. saccharolyticus*和*T. elfii*的最大产氢速率分别为11.7mmol  $\text{H}_2$ /gDW/h和5.1mmol  $\text{H}_2$ /gDW/h,二者的转化率分别为5.9mol  $\text{H}_2$ /mol蔗糖和3.3mol  $\text{H}_2$ /mol葡萄糖。*T. elfii*的氢转化率是最大产氢理论值4mol  $\text{H}_2$ /mol葡萄糖的83%,是至今文献报道中产氢最高的一株菌。这与高温产氢及代谢产物只有乙酸和 $\text{H}_2$ 有关。菌株T42的产氢速率虽较高,但是转化率有待通过降低氢分压和改造代谢途径等手段提高。另外,菌株T42可利用多种底物产氢,如葡萄糖、淀粉、纤维二糖、蔗糖、麦芽糖、糊精、果糖、糖原和海藻糖等。因此在以工业废水为基质的生物制氢方面具有很好的利用前景。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Veziroglu TN. Quarter century of hydrogen movement 1974 – 2000. *Int J Hydrogen Energy*, 2000, **25**: 1143 – 1150.
- [ 2 ] Hansel A, Lindblad P. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**: 153 – 160.
- [ 3 ] Benemann J. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotech*, 1996, **14**: 1101 – 1103.
- [ 4 ] Ren NQ, Wang BZ, Huang JC. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol & Bioeng*, 1997, **54**: 428 – 433.
- [ 5 ] Yokoi H, Mori S, Hirose J, *et al.* H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M-19. *Biotechnol Lett*, 1998, **20**: 890 – 895.
- [ 6 ] Stams AJM, Grolle KCF, Frijters CTM, *et al.* Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 346 – 352.
- [ 7 ] Hungate RE. A roll – tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol*, 1996, **3B**: 117 – 132.
- [ 8 ] Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual. 4<sup>th</sup> ed. Virginia: The V. P. I Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977, 125 – 149.
- [ 9 ] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **311**: 426 – 427.
- [ 10 ] Mammur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *Journal of Molecular Biology*, 1961, **3**: 208 – 218.
- [ 11 ] Mammur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 1962, **5**: 109 – 118.
- [ 12 ] Engle M, Li YH, Rainery F, *et al.* *Thermobrachium celere* gen. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1996, **46**: 1025 – 1033.
- [ 13 ] Chrisostomos S, Patel BKC, Dwivedi PP, *et al.* *Caloramator indicus* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from the deep-seated nonvolcanically heated waters of an Indian artesian aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1996, **46**: 497 – 501.
- [ 14 ] Lin CY, Lay CH. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005, **30**: 285 – 292.
- [ 15 ] Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**: 173 – 185.
- [ 16 ] Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1185 – 1193.
- [ 17 ] Niel EWJ, Budde MAW, Haas GG, *et al.* Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1391 – 1398.

## A new hydrogen-producing strain and its characterization of hydrogen production

NIU Li-li, LIU Xiao-li, CHEN Shuang-ya, DONG Xiu-zhu\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** : An anaerobic, thermophilic, hydrogen-producing strain T42 was obtained from a hot spring of South Mountain District, Tibet. Cells are Gram-positive, mobile rod-shaped. Spores were not observed. Temperature range for growth is 32°C to 69°C (optimum temperature, 60°C ~ 62°C), and pH range for growth is 5.0 to 8.8 (optimum pH, 7.0 ~ 7.5). The generation time is around 30 min. Organic nitrogen source is required for growth. Strain T42 utilizes a wide range of carbohydrates, including starch, dextrin, sucrose, cellobiose, fructose, maltose, ribose, glycogen and galactose. Acetate, ethanol, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are the end products of glucose fermentation. The (G + C) content of strain T42 is 31.2mol%. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA sequence similarity indicates that strain T42 is the closest relative to *Thermobrachium celere* and *Caloramator indicus*. Biological characteristics and phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene indicate the new strain belongs to the genus *Thermobrachium*. Strain T42 produces H<sub>2</sub> from glucose at maximal level when growing at 62°C and initial pH 7.2, the hydrogen yields and maximal hydrogen production rate are 1.06mol H<sub>2</sub>/mol glucose and 24.0mmol H<sub>2</sub>/gDW/h, respectively. Strain T42 also produced H<sub>2</sub> by fermenting from a variety of carbohydrates. 20mmol/L Magnesium and 2mmol/L iron increase the hydrogen production content by 20% and 23.3%, respectively, but nickel has no effect on the hydrogen production. In the co-culture of strain T42 and methane-producing strain M. thermoautotrophicus Z245, hydrogen pressure is dramatically decreased, meanwhile deduced H<sub>2</sub> production and the consumption of glucose are increased markedly by 2.8 fold and 1 fold, and the ratio of acetate/ethanol is enhanced from 1 to 1.7.

**Keywords** : Thermophilic hydrogen-producing bacterium; Identification; Hydrogen-producing characteristics

Foundation item: National Basic Research Program of China (2004CB719602); Field Frontier Program of Innovation Foundation of Chinese Academy of Sciences

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

Received: 9 October 2005/Accepted: 8 November 2005/Revised: 20 December 2005