

# 一个新的产氢细菌的鉴定及产氢特性的研究

陈双雅 东秀珠\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 利用 Hungate 滚管技术从福建省漳州垃圾处理厂厌氧消化器的颗粒污泥中分离到一株产氢的细菌 L15。菌株 L15 为严格厌氧的革兰氏阳性杆菌,菌体大小为  $0.5\mu\text{m} \sim 0.7\mu\text{m} \times 2.5\mu\text{m} \sim 5.0\mu\text{m}$ ,以侧生鞭毛运动。在孢肉培养基上产生端生的卵圆形芽孢。温度生长范围  $15^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ (最适温度  $30^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ ),pH 范围  $5.0 \sim 8.4$ (最适 pH  $6.3 \sim 6.8$ )。该菌株不水解明胶和七叶灵,不还原硫酸盐,牛奶变酸但不凝固,发酵多糖和少数的单糖、双糖和寡糖;发酵葡萄糖的最终产物为乙酸、丁酸、 $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$ 。G + C 含量为  $29.8\text{mol}\%$ 。16S rDNA 序列分析表明,该菌株属于梭菌的簇 I,与 *Clostridium paraputrificum* 较为接近(相似性为  $97.1\%$ )。通过生理特征和 16S rDNA 序列的同源性分析,表明菌株 L15 应是梭菌属簇 I 中的一个新种,命名为 *Clostridium defluvi*。菌株 L15 保藏在中国普通微生物菌种保藏中心,保藏号为 AS1.3489。菌株 L15 的最佳产氢温度为  $34^\circ\text{C}$ 、pH 为 7.0。当葡萄糖浓度为 0.4% 时,氢气产率可达到  $1.41\text{mol H}_2/\text{mol}$  葡萄糖。该菌可利用下列底物产酸产氢,括号内为产氢率(底物浓度 1%) :果糖 ( $1.00\text{mol H}_2/\text{mol}$ )、麦芽糖 ( $2.17\text{mol H}_2/\text{mol}$ )、蔗糖 ( $1.69\text{mol H}_2/\text{mol}$ )、菊糖 ( $4.70\text{mol H}_2/\text{mol}$ )、糖原 ( $5.49\text{mmol H}_2/\text{g}$ )、淀粉 ( $7.34\text{mmol H}_2/\text{g}$ )。

**关键词** 产氢细菌新种, *Clostridium defluvi* 鉴定,产氢特性

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0411-06

氢能源以其燃烧值高、清洁无污染、适用范围广等诸多优点,成为新世纪最理想的能源。制氢的方法包括热化学分解法、电解水和生物制氢。生物制氢技术可利用农业废料、城市垃圾、工业有机废水、废料和其它生物质制取氢气,其反应条件温和,具有废物利用、节省能量消耗、净化环境和生态平衡的重要意义。可进行生物制氢的微生物包括光合细菌、藻类和发酵细菌等。光合细菌和藻类都利用光能产氢,它们的特点是以小分子有机物为电子供体和还原当量,光能利用率低,并且光合反应器的成本和技术要求高,不利于应用和推广,而发酵细菌通过分解有机物,将其中的能量转化为氢能。与光合产氢相比,发酵产氢的优点是不需要光照,甚至有些细菌可以分解纤维素类、淀粉等大分子物质产氢,有可能实现废物的资源化和减少环境污染。人们已经从土壤、沉积物、厌氧反应器、白蚁等分离到了多个利用淀粉<sup>[1,2]</sup>、木聚糖<sup>[3,4]</sup>、几丁质<sup>[5]</sup>及微晶纤维素<sup>[3]</sup>产氢的菌株,其中主要是厌氧的梭菌,并对其产氢特性进行了研究。

我们在分离发酵产氢微生物的过程中,利用 Hungate 滚管技术从福建省漳州垃圾处理厂厌氧消

化器的颗粒污泥中分离到一株产氢的厌氧发酵细菌,本文报道该菌株的分离及其生物学特性和产氢特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养条件

菌株 L15 分离自福建省漳州垃圾处理厂厌氧消化器颗粒污泥。分离和培养的基础培养基采用预还原的 TPYG<sup>[6]</sup>,在厌氧条件下( $100\%\text{N}_2$ )于  $37^\circ\text{C}$  培养。按照 Hungate 厌氧操作方法进行滚管分离获得单菌落<sup>[7]</sup>。

### 1.2 形态观察

菌株 L15 于 TPYG 液体培养基中  $37^\circ\text{C}$  厌氧培养 1d,在 Olympus-BH<sub>2</sub> 光学显微镜下观察细胞形态和革兰氏染色反应,在 H-600A 透射电镜(HITACHI)下观察细菌菌体的形态和结构;在孢肉培养基<sup>[6]</sup>中  $37^\circ\text{C}$  厌氧培养至 21d 观察芽孢的形成。

### 1.3 生理特性测定

生长实验均在 TPYG 液体中进行。生长测定采用上海第三分析仪器厂 752 分光光度计,测定波长为 600nm 时的 OD 值。用 1mol/L NaOH 或 1mol/L

基金项目: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:陈双雅(1970-),女,江苏镇江人,博士研究生,主要从事微生物资源和系统发育学研究。E-mail: shuangyach@sina.com

收稿日期:2003-10-21,修回日期:2004-02-24

HCl 溶液调整 TPYG 培养液至不同的 pH 值,接种后于 37℃ 培养 3d 以测定最适生长 pH。在带有温控仪的水浴中进行最适生长温度的测定,接种后培养 1~14d 后检测  $OD_{600}$ 。在 TPYG 液体中加入不同量的 NaCl,接种后于 37℃ 培养 3d 检测 NaCl 耐受浓度。将对数期的菌液以 1% 的接种量接种至 TPYG 液体培养基中,于 37℃ 恒温培养,每隔 1h 取出菌液 3mL 测定  $OD_{600}$ ,共测定 20h,绘制生长曲线,计算生长代时。底物利用实验参考文献 [6]。

#### 1.4 (G+C)mol% 含量测定

按 Marmur<sup>[8]</sup> 的方法提取基因组 DNA,溶于  $0.1 \times \text{SSC}$  溶液,用 DU800 spectrophotometer (Beckman) 测定 DNA 的热变性温度 ( $T_m$ ),计算它的 (G+C)mol%<sup>[9]</sup>。

#### 1.5 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'-AGAGTTTGATCC/ATGGCTCAG-3') 和 1541R (5'-AAGGAGGTGATC-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 仪为 Thermolyne Amplitron I (Barnstead Thermolyne Corporation)。PCR 反应体系选用 25μL 反应体系:10×PCR 缓冲液(含  $\text{MgCl}_2$  20mmol/L) 2.5μL, 2.5mmol/L dNTP Mixture 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 0.7% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,经 UNIQ-10 PCR Product Purification Kit (Sangon and NSBC) 纯化。将纯化的 PCR 产物连接到载体 pUCm-T (上海生工生物工程有限公司) 上,转化 *E. 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。菌株 L15 的 16S rDNA 序列在 GenBank 核酸序列数据库中的注册号为 AY337519。

#### 1.6 系统发育树的构建

将菌株 L15 的 16S rDNA 序列输入 GenBank 核酸序列数据库进行比较,将与之同源性最高的 17 株细菌和梭菌属簇 I 中的其它 4 株细菌的 16S rDNA 序列,采用 DNAMAN V4.0 软件进行 16S rDNA 同源性分析,并以梭菌属簇 II 中的 *Clostridium pfenningii* 为树根构建系统发育树,分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价。

#### 1.7 代谢产物测定

将菌株 L15 接种于 TPYG 培养基中,同时以接种于不含葡萄糖的 PY 培养基和未接种的 TPYG 培养基作为对照,37℃ 培养 72h 后,用气相色谱 GC-14B (Shimadzu) 检测细菌发酵葡萄糖的产物,载气均用  $\text{N}_2$ 。有机酸检测用 FID 检测器,挥发酸检测条件:柱温 220℃,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。

#### 1.8 葡萄糖的测定

采用费林试剂测糖法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果和讨论

从福建省漳州垃圾处理厂厌氧消化器的颗粒污泥中分离到一株产氢细菌 L15,它在系统发育学和生理生化特征上均不同于梭菌属簇 I 中已描述的种。

#### 2.1 菌株 L15 的鉴定和系统发育学分析

2.1.1 形态特征:菌株 L15 为革兰氏阳性菌,在 TPYG 液体培养基中呈杆状,菌体大小为  $0.5\mu\text{m} \sim 0.7\mu\text{m} \times 2.5\mu\text{m} \sim 5.0\mu\text{m}$ ,侧生鞭毛(图 1);在孢肉培养基中 37℃ 培养 21d 产生端生的卵圆形芽孢。37℃ 培养 2d,在 TPYG 滚管琼脂表面的菌落直径约为 0.5mm~1.0mm,白色,圆形,光滑有光泽,边缘整齐,半透明,微凸起。

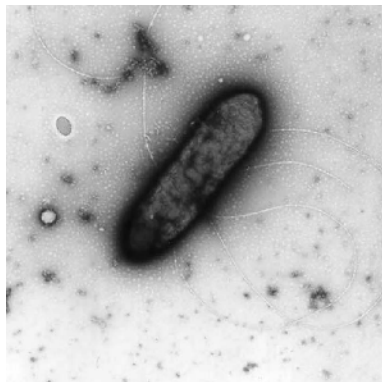


图 1 菌株 L15 的透射电镜照片(10000×)

Fig. 1 Transmission electron micrograph of strain L15 (10000×)

2.1.2 生理生化特征:菌株 L15 为严格厌氧中温细菌,生长温度范围 15℃~45℃,最适温度为 30℃~37℃;pH 范围 5.0~8.4,最适 pH 为 6.3~6.8。适合生长的 NaCl 浓度范围为 0mol/L~2.5mol/L。生长不需要微量维生素。不利用无机氮源,如  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、

NH<sub>4</sub>Cl 和 NaNO<sub>3</sub>。37℃在液体 TPYG 中培养时 ,葡萄糖的最终发酵产物为乙酸、丁酸、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> ,代时为 1.04h。

该菌株能分解多糖如菊糖、淀粉和糖原 ,而只利用少数的单糖、双糖和寡糖 ,包括果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、海藻糖和松三糖 ;发酵纤维二糖

和水杨苷能力较弱 ;不利用赤藓糖、山梨糖、核糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、乳糖、蜜二糖、鼠李糖、苦杏仁苷、山梨醇、甘露醇和核糖醇等 ;不水解明胶和七叶灵 ;不凝固牛奶 ;不还原 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ,不产生吲哚和脲酶。菌株 L15 和相关梭菌的鉴别特性见表 1。

表 1 菌株 L15 和相关梭菌的鉴别特性

Table 1 Differential characteristics between *Clostridium defluvi* L15 and related *Clostridium* species in the cluster I

	1	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
Product from PYG	BAF	BAI( sf )	ABF	BA( Fpls )	LBA	BAI( s )	BAF( L )	ABI( fse )
( G + C )mol%	29.8	26 ~ 27	33	26 ~ 28	27	28	28	24 ~ 26
Gelatin hydrolysis	-	-	NR	-	+	-	-	-
Starch hydrolysis	+	+	-	d	+	-	+	NR
Acid produced from								
Galactose	-	+	+	+	+ w	d	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	d	+	+
Mannose	-	+	+	+	+ w	+	+	+
Inulin	+	-	NR	d	-	-	-	-
Melezitose	+	-	NR	d	-	-	d	d
Trehalose	+	d	NR	d	-	-	+	d
Xylose	-	-	+	+	-	-	d	d
Milk	-	C	NR	C	C	-	-	C
Opticum (℃ )	30 ~ 37	30 ~ 37	12	37	37	37	37	37

1. Strain L15 ; 2. *C. paraputrificum* DSM 2630<sup>T</sup> ; 3. *C. vincentii* DSM 10228<sup>T</sup> ; 4. *C. beijerinckii* DSM 791<sup>T</sup> ; 5. *C. aurantibutyricum* NCIMB 10659<sup>T</sup> ; 6. *C. carnis* ATCC 25777<sup>T</sup> ; 7. *C. sartagoforme* DSM 1292 ; 8. *C. tertium* DSM 2485. +. Positive ; - . Negative ; + w. Weakly positive ; d. Variable ; ( milk ). Curd ; NR. Not reported. A. Acetate ; B. Butyrate ; F or f. Formate ; E or e. Ethanol ; L or l. Lactate ; p. Propionate ; s. Succinate. Upper-case and lower-case letters indicate major and minor fermentation products , respectively. <sup>a</sup>. Data from Cato *et al.* <sup>[11]</sup> ; <sup>b</sup>. Data from Mountfort *et al.* <sup>[12]</sup>.

2.1.3 系统发育分析和( G + C )mol% 含量 :菌株 L15 的 16S rDNA 全序列长 1512 bp ,在 GenBank 中的核酸序列号为 AY337519。以 16S rDNA( 长 1438bp ) 同源性为基础构建了包括菌株 L15 在内的 23 株相关细菌的系统发育树( 图 2 )。系统发育分析和 ( G + C )mol% 含量( 29.8mol% )表明菌株 L15 属于低 GC 革兰氏阳性细菌的梭菌属簇 I 中的成员 , 16S rDNA 序列同源性 与 *C. paraputrificum* 的最高 , 为 97.1% , 与梭菌属簇 I 中的其它种的同源性在 90.6% ~ 96.5% 之间。

梭菌属包括了严格厌氧或耐氧的产芽孢细菌 , 通常革兰氏阳性( 至少在生长早期 ) ,不能还原硫酸盐。由于属的定义过于简单 ,使得它成为细菌中最大和最异源的属。Collins 等<sup>[13]</sup>根据 16S rRNA 基因

序列同源性分析揭示了梭菌属高度的异源性 ,并将其分为 19 个系统发育群( 簇 I ~ 簇 XIX )。其中 , 簇 I 是梭菌属最大的群 ,该群的梭菌在生理上有很大的差异 ,包括了只利用糖或只利用蛋白质或二者皆分解的种 ,有低温、中温及高温的种 ,群内种间的同源性高于 90% ,最高达到 99%。

以 16S rDNA 同源性为基础的系统学分析表明菌株 L15 属于梭菌属簇 I ,而且和 *C. paraputrificum* 的同源性达 97.1% ,但本研究中菌株 L15 发酵葡萄糖的终产物除了 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 外 ,只有丁酸和乙酸 ,而 *C. paraputrificum* 发酵葡萄糖产生大量乳酸 ,说明二者代谢途径不同 ,应分属于不同的种。另外 ,菌株 L15 和 *C. paraputrificum* 等相近菌株发酵糖的范围也有明显差异( 表 1 ) ,如该菌株利用菊糖、海藻糖和

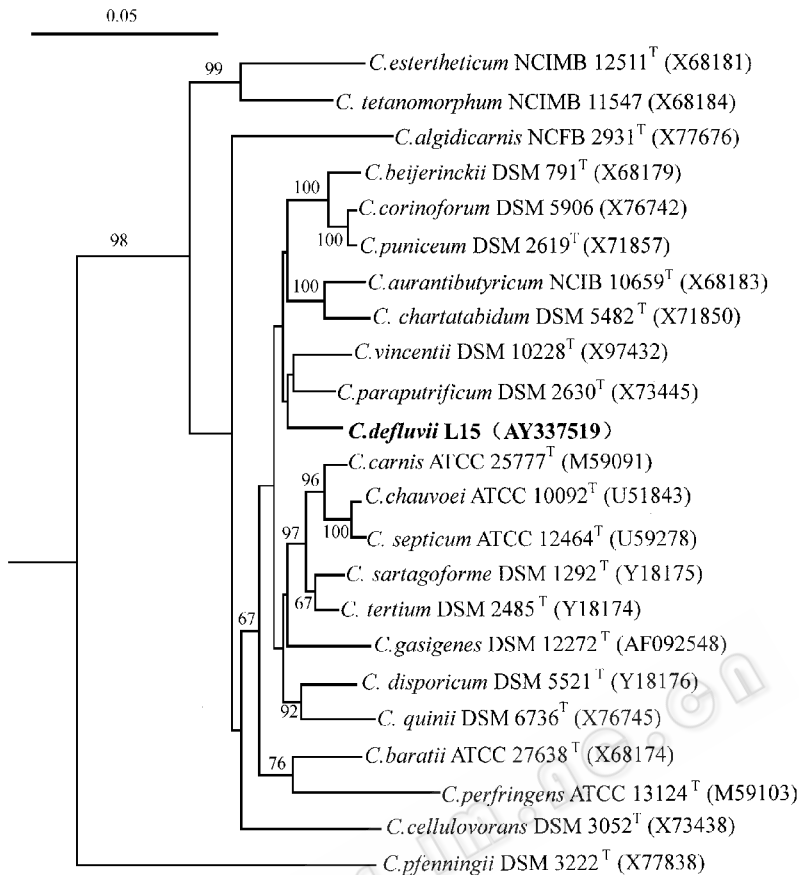


图 2 以 16S rDNA 同源性为基础的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 1438 bp-fragment of 16S rDNA sequences

The tree rooted with *C. pfennigii* was constructed by the neighbor-joining method with 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, 5% sequence divergence )

松三糖,不发酵乳糖、半乳糖和甘露糖;而相近菌株均发酵乳糖、半乳糖和甘露糖。综合生理特性、16S rDNA 序列的相似性及 GC 含量差异,菌株 L15 应当是不同于梭菌属已知种的新种,因此命名为污水梭菌(*Clostridium defluvii*),在中国普通微生物菌种保藏中心的保藏号为 AS1.3489。

## 2.2 菌株 L15 的产氢特性

**2.2.1 最佳产氢条件** 接种不同 pH 的 TPYQ 葡萄糖 1% 培养基,37℃ 培养 1d 后测定氢浓度,结果表明,初始 pH 为 7.0 时可得到最大产氢量。接种 pH7.0 的 TPYQ 葡萄糖浓度 1% 培养基,分别在不同温度下培养 1d 后测定产氢量,结果显示菌株 L15 在 34℃ 培养时产氢量最大。因此,菌株 L15 的最佳产氢条件为初始 pH 为 7.0,培养温度 34℃。

**2.2.2 不同底物浓度条件下的产氢效率** 配制不同葡萄糖浓度的 TPYQ 培养基,接种后 37℃ 培养 1d,测定氢浓度和葡萄糖剩余量,计算不同底物浓度条件下菌株 L15 的产氢率。表 2 显示,葡萄糖浓度为 0.6% 时可得到 100% 转化,此时产氢率为 0.91mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖;而葡萄糖浓度由 0.8% ~ 2.0% 递增时,浓度越高,葡萄糖利用率越低,产氢率也越低,菌株 L15 在 0.4% 葡萄糖培养时,产氢率可达到 1.41mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。以 0.6 % 的葡萄糖为底物时,每克干细胞的产氢量为 128.96mmol H<sub>2</sub>/g 干细胞。菌株 L15 可利用下列底物产酸产氢,产氢率(底物浓度 1%) 如下:果糖(1.00mol H<sub>2</sub>/mol) 麦芽糖(2.17mol H<sub>2</sub>/mol) 蔗糖(1.69mol H<sub>2</sub>/mol) 菊糖(4.70mol H<sub>2</sub>/mol) 糖原(5.49mmol H<sub>2</sub>/g) 淀粉

( 7.34mmol H<sub>2</sub>/g )

表 2 不同初始葡萄糖浓度对菌株 L15 产氢的影响

Table 2 Effects of initial glucose concentration on hydrogen production by strain L15

Initial glucose concentration ( g/L )	Glucose consumption ( g/L )	Hydrogen yields rate ( mol H <sub>2</sub> /mol )
20	6.9	0.26
15	6.9	0.35
12	7.1	0.43
10	6.9	0.55
8	7.3	0.65
6	6.0	0.91
4	4.0	1.41

1976 年 ,Karube 等<sup>[14]</sup>用聚丙烯酰胺凝胶固定 *C. butyricum* IFO 3847 24h 产氢率为 0.63mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。Brosseau 和 Zajic<sup>[15]</sup>利用 14L 的批量反应器培养 *C. pasteurianum* 时 ,在生长稳定期的产氢率为 1.5mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。Taguchi 等<sup>[1,2]</sup>也报道了菌株 *C. beijerincki* AM21B 的产氢情况。该菌株不但能利用葡萄糖产氢 ,还能利用淀粉产氢 ,二者的转化效率分别为 16.4mmol H<sub>2</sub>/g 葡萄糖和 12.2mmol H<sub>2</sub>/g 淀粉 ,每克干细胞从葡萄糖的产氢量为 61.7mmol H<sub>2</sub>。

虽然菌株 L15 发酵 1% 葡萄糖的产氢率低于 *C. pasteurianum* 和 *C. beijerincki* AM21B ,但该菌株发酵低浓度葡萄糖的产氢率却有很大提高 ,而且每克干细胞从葡萄糖的产氢量高于 *C. beijerincki* AM21B。由于该菌株在低于 pH5.0 时不生长 ,而底物发酵产酸会导致 pH 降低 ,因此推测 ,在控制 pH 条件下连续培养 ,可提高葡萄糖的转化率 ,而控制葡萄糖进量 ,有可能达到最大产氢率 ;另外 ,其利用淀粉产氢的特点 ,为利用廉价资源制氢提供了可能。由此 ,可以认为菌株 L15 具有生物制氢的潜在价值。

参 考 文 献

[ 1 ] Taguchi F , Chang J D , Takiguchi S , et al . Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites . *J Ferment Bioeng* , 1992 , **73** ( 3 ) 244 – 245 .

[ 2 ] Taguchi F , Chang J D , Mizukami N , et al . Isolation of a hydrogen-producing bacterium , *Clostridium beijerinckii* strain AM21B , from termites . *Can J Microbiol* , 1993 , **39** :726 – 730 .

[ 3 ] Taguchi F , Mizukami N , Yamada K , et al . Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. strain no. 2 . *Enzyme Microb Technol* , 1995 , **17** :147 – 150 .

[ 4 ] Taguchi F , Hasegawa K , Saito-Taki T , et al . Simultaneous production of xylanase and hydrogen using xylan in batch culture of *Clostridium* sp. strain X 53 . *J Ferment Bioeng* , 1996 , **81**( 2 ) :178 – 180 .

[ 5 ] Evvyernie D , Yamazaki S , Morimoto K , et al . Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21 , a chitinolytic , mesophilic and hydrogen-producing bacterium . *J Ferment Bioeng* , 2000 , **89**( 6 ) :596 – 601 .

[ 6 ] Holdeman L V , Cato E P , Moore W E C . Anaerobe Laboratory Manual . 4<sup>th</sup> ed . Virginia :The V . P . I Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University , 1977 , 125 – 149 .

[ 7 ] Hungate R E . A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes . *Methods Microbiol* , 1969 , **3B** :117 – 132 .

[ 8 ] Marmur J . A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism . *J Mol Biol* , 1961 , **3** :208 – 218 .

[ 9 ] Marmur J , Doty P . Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature . *J Mol Biol* , 1962 , **5** :109 – 118 .

[ 10 ] Somogyi M . Notes on sugar determination . *J Biol Chem* , 1952 , **195** :19 – 23 .

[ 11 ] Cato E P , George W L , Finegold S M . Genus *Clostridium* Prazmowski . In :Sneath P H A , et al . ed . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* . Baltimore :Williams and Wilkins ,1986 , **2** , 1141 – 1200 .

[ 12 ] Mountfort D O , Rainey F A , Burghardt J , et al . *Clostridium vincentii* sp. nov . , a new obligately anaerobic , saccharolytic , psychrophilic bacterium isolated from low-salinity pond sediment of the McMurdo Ice Shlf , Antarctica . *Arch Microbiol* , 1997 , **167** :54 – 60 .

[ 13 ] Collins M D , Lawson P A , Willems A , et al . The phylogeny of the genus *Clostridium* : proposal of five new genera and eleven new species combinations . *Int J Syst Bacteriol* , 1994 , **44** :812 – 826 .

[ 14 ] Karube I , Matsunaga T , Tsuru S , et al . Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum* . *Biochim Biophys Acta* , 1976 , **444** :338 – 343 .

[ 15 ] Brosseau J D , Zajic J E . Hydrogen gas production with *Citrobacter intermedius* and *Clostridium pasteurianum* . *J Chem Tech Biotechnol* , 1982 , **32** :496 – 502 .

Characterization of A New *Clostridium* Species and Its Hydrogen Production

CHEN Shuang-Ya DONG Xiu-Zhu\*

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

**Abstract :** An obligately anaerobic , mesophilic , hydrogen-producing *Clostridium* strain L15 was isolated from an upflow anaerobic sludge blanket ( UASB ) reactor treating manicipal sewage. The cells were Gram-positive , spore-forming , rod-shaped. Growth was observed in the temperature range of 15℃ ~ 45℃ ( optimum 30℃ ~ 37℃ ) and pH range of 5.0 ~ 8. 4 ( optimum pH 6.3 ~ 6.8 ). The strain fermented D-fructose , glycogen , D-glucose , inulin , maltose , melizitose , D-raffinose , starch , sucrose , D-trehalose , but did not ferment lactose , galactose and mannose. The end products formed from glucose were acetate , butyrate , carbon dioxide and hydrogen. Strain L15 hydrolyzed starch but not gelatin nor esculin. The G + C content of the strain was 29.8 mol% . Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA sequence similarity indicated that the novel strain belonged to cluster I of the genus *Clostridium* , most close to *Clostridium paraputrificum* , with 97.1% similarity. Therefore , a new *Clostridium* species *Clostridium defluwii* was designated. Strain L15 produced H<sub>2</sub> from glucose at maximal level when growing at 34℃ and initial pH in 7.0. When the glucose concentration reduced to 0.4% , the hydrogen yields was increased to 1.41 mol H<sub>2</sub>/mol glucose. Strain L15 also produced hydrogen from following carbohydrates : fructose ( 1.00mol H<sub>2</sub>/mol ) , maltose ( 2.17mol H<sub>2</sub>/mol ) , sucrose ( 1.69mol H<sub>2</sub>/mol ) , inulin ( 4.70mol H<sub>2</sub>/mol ) , glycogen ( 5.49mmol H<sub>2</sub>/g ) and starch ( 7.34mmol H<sub>2</sub>/g ).

**Key words :** New Hydrogen producing bacterium , *Clostridium defluwii* , Identification , Hydrogen producing characteristics

Foundation item : 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 date : 10-21-2003

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编 :李季伦 院 士 中国农业大学生物学院  
副主编 :谭华荣 研究员 中国科学院微生物研究所  
陆德如 研究员 第二军医大学遗传研究所  
王敖全 研究员 中国科学院微生物研究所  
曲音波 教 授 山东大学生命科学学院  
徐建国 研究员 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所

编 委 ( 按姓名拼音排序 , \* 2003 年 7 月新增补 )

蔡永峰	陈永青	程 池	东秀珠	范云六	郭 俊	胡福泉
胡远扬	黄 力	陆承平	闵 航	钱世钧	邵一鸣	盛 军
唐 宏	田 波	王 平	* 王华明( USA )	谢 红	杨苏声	翟中和
* 张耀平( USA )	郑天凌	朱宝泉	诸葛健			

编 辑 :王晋芳 王 敏