

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(8):994-1001; 4 August 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

浮霉菌门严格厌氧产氢细菌 (*Thermopirellula anaerolimosa*) 的分离及其生理特性

刘冬英^{1,4}, 刘奕^{1,4}, 门学慧², 郭群群³, 郭荣波¹, 邱艳玲^{1*}

¹ 中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室, 青岛 266101

² 新疆农业大学草业与环境科学学院, 乌鲁木齐 830052

³ 青岛大学生物系, 青岛 266071

⁴ 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 【目的】厌氧颗粒污泥中含有大量未知微生物资源, 利用低浓度底物及添加抗生素的培养基进行厌氧发酵细菌的筛选, 并对分离菌株进行生理生化特性研究。【方法】利用系列稀释法及亨盖特厌氧滚管技术从制糖废水厌氧处理反应器的颗粒污泥中分离到一株高温厌氧产氢细菌 VM20-7^T, 通过 16S rRNA 基因序列同源性确定其系统发育地位。【结果】菌株 VM20-7^T 为高温、严格厌氧、革兰氏阴性梨形细菌, 细胞大小为 (0.7-2.0) μm × (0.7-2.0) μm, 不运动, 不产芽胞。其生长温度范围为 35℃-50℃ (最适温度 45℃), pH 范围为 6.0-8.3 (最适 pH 7.0-7.5), NaCl 耐受范围为 0%-0.5% (w/v, 最适浓度 0%)。菌株 VM20-7^T 可利用葡萄糖、麦芽糖、核糖等多种糖类为唯一碳源生长, 葡萄糖发酵终产物是乙酸和 H₂。该菌株不利用硝酸盐、硫酸盐等作为电子受体生长。G+C 含量为 60.9 mol%, 16S rRNA 基因序列同源性显示菌株属于浮霉菌门, 但与已培养菌株的同源性较低, 与梨形菌属-红小梨形菌属-芽殖小小梨形菌属 (*Pirellula-Rhodopirellula-Blastopirellula*, PRB) 分支的亲缘关系最近, 但序列相似性也仅为 82.7%-84.3%。【结论】利用低浓度糖类并添加抗生素分离厌氧颗粒污泥中的微生物, 获得了浮霉菌门首例严格厌氧细菌 VM20-7^T。生理生化特性和系统发育分析显示, 菌株 VM20-7^T 为浮霉菌目的新属新种, 命名为 *Thermopirellula anaerolimosa*。该菌株的菌种保藏号为 CGMCC 1.5169^T = JCM 17478^T = DSM 24165^T。

关键词: 浮霉菌门, 高温厌氧产氢菌, 16S rRNA 基因同源性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0994-08

上流式厌氧污泥床反应器 (UASB) 在高浓度有机废水处理中具有广泛的应用, 其特点是反应器中具有高活性的颗粒污泥, 厌氧颗粒污泥是高密度微

生物的聚集体。分子生物学技术的应用, 揭示了厌氧颗粒污泥中的微生物群落结构, 认为其中的细菌主要属于变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门

基金项目: 国家自然科学基金 (51078344); 山东省自然科学基金项目 (Y2008F45); 国家科技支撑计划项目 (2010BAC67B03); 知识创新工程项目 (KSCX2-YW-G-054, KSCX2-YW-G-052, KSCX2-EW-J-10); 青岛市人才引进专项计划项目 (11-2-4-15-XX); 泰山学者建设工程专项

* 通信作者。Tel/Fax: +86-532-80662750; E-mail: qiuyl@qibebt.ac.cn

作者简介: 刘冬英 (1986-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: liudy@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2012-002-13; **修回日期:** 2012-04-11

(Firmicutes) 及拟杆菌门 (Bacteroidetes) 等, 此外还含有很多丰度较低的门, 如浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、*Synergistetes* 等^[1-2]。浮霉菌门被认为是细菌中分支多样性最高的门^[3-4], 最近, Fuerst 提出浮霉菌门是细菌与古菌过渡的菌门^[5]。因此, 探索浮霉菌门微生物资源, 研究浮霉菌门各物种的生化遗传特征, 对于揭示生物物种多样性具有重要意义。

浮霉菌门主要分为 3 个纲^[6-8]: (1) 浮霉菌纲 (*Planctomycetacia*), 包括了可培养的主要种属; (2) *Phycisphaerae* 纲曾被命名为 WSP-1, 目前培养的种只有一个, 即 *Phycisphaera mikurensis*^[9-10]; (3) 厌氧氨氧化菌, 一类和已发现的浮霉菌属关系较远的细菌, 如 '*Brocadia*' 及 '*Kuenenia*' 属等。厌氧氨氧化菌广泛存在于海洋、湖泊底泥等自然环境及人工脱氮反应器中, 但至今没有得到纯菌株。目前浮霉菌门中已发现 10 属 16 种微生物, 其中多数为好氧异养微生物。尽管研究者采用分子生态学技术发现浮霉菌门微生物广泛存在于厌氧环境中, 但至今还没有分离培养出专性厌氧浮霉菌门的物种。本研究以厌氧颗粒污泥为接种源, 采用低浓度底物及抗生素添加的选择性富集培养, 获得一株严格厌氧浮霉菌门细菌。本文报道了该菌株的分离方法、生理生化特性及基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Taq 酶、PCR 引物等分子试剂购自金思特科技 (南京) 有限公司, DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司, 化学试剂均为分析纯。主要实验仪器有: Z61-1LST 体式显微镜 (日本), Olympus BX51 光学显微镜 (日本), 721 型可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂), Varian Cary 50 UV-Vis 紫外分光光度计 (美国), 气相色谱 SP-6890 (山东鲁南瑞虹化工有限公司), 高效液相色谱 Shimadzu LC-6A (日本) 等。

1.2 接种污泥与分离培养方法

厌氧颗粒污泥取自中温 (35℃) 制糖废水厌氧处理 UASB 反应器。颗粒污泥 (约 0.1 g) 用 PBS 磷酸缓冲液清洗捣碎后加入到 10 mL 系列稀释的厌氧管中。为了从颗粒污泥中获得厌氧微生物资源, 采用低浓度糖类作为碳源 (0.1 mmol/L), 同时添加各

种抗生素 (20 mg/L)。微生物分离培养使用 widdel 培养基^[11], 用氮气与二氧化碳混合气体 ($N_2:CO_2 = 80:20, v/v$) 置换液体培养基及瓶中的气体, 培养基 pH 为 7.0 左右, 置于 37℃ 避光静止培养。微生物的分离纯化, 采用液体系列稀释法及亨盖特滚管技术等传统分离培养方法, 固体培养基采用高纯琼脂 (2%) 作为凝胶物质。

1.3 生理生化特性分析

1.3.1 最适生长温度、pH、NaCl 浓度耐受范围及耐氧性^[11]: 菌株生长温度实验, 接种菌体到 pH 为 7.0 的液体培养基中, 分别于 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃ 及 60℃ 静置培养; 菌株生长 pH 实验, 预先用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调整培养基初始 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 及 9.0, 于 37℃ 静置培养; NaCl 耐受实验, 接种菌体至 NaCl 浓度为 0%、0.5%、1.0%、1.5% 及 2.0% (w/v) 的液体培养基中 (pH = 7.0), 37℃ 下避光静置培养; 好氧及微好氧实验: 好氧实验培养基不采用 N_2-CO_2 曝气、不添加还原剂, 微好氧实验培养基采用 N_2-CO_2 曝气、但不添加还原剂。以上实验平行 2 组, 均以 2 mmol/L 葡萄糖及 0.01% 酵母提取物作为碳源, 测定波长 600 nm 下 OD 值。

1.3.2 底物利用及葡萄糖发酵产物: 测试底物包括各种糖类、短链脂肪酸、醇类、铵盐与亚硝酸盐。以对数生长期的培养物为接种源, 接种于事先添加各种碳源的培养基中, 碳源浓度为 1 - 5 mmol/L。底物利用以微生物生长浊度、显微镜观察及氢气的产生作为判断指标。葡萄糖采用 Agilent 1200 高效液相色谱 (HPLC) 测定, 检测条件: 示差折光检测器, 流动相 EDTA 钙盐 (0.05 g/L), 流速 0.5 mL/min, 柱温 80℃。氢气利用 TCD 气相色谱检测, 检测条件: 气化室温度 80℃, 检测器温度 100℃, 柱温 50℃。有机酸及醇类利用采用 FID 检测器, 检测条件: 气化室温度 220℃, 检测器温度 250℃, 柱温 150℃。硝酸盐、硫酸盐等电子受体利用性实验, 在 pH 7.0、温度 37℃ 条件下, 以 2 mmol/L 葡萄糖及 0.01% 酵母提取物作为电子供体, 硝酸盐、硫酸盐、亚硫酸盐等作为唯一电子受体, 利用离子色谱检测硫酸根、硝酸根、亚硫酸根等的浓度变化。离子色谱检测条件: 流动相水, 流速 1 mL/min, 离子条件 OH^- 30 mmol/L (水电解产生), 抑制电流 75 mA, 柱温 30℃。

1.3.3 抗生素抗性:选取 9 种有代表性的抗生素进行耐性实验:包括氨基青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、万古霉素、青霉素、氯霉素、林肯霉素及四环素,浓度采用 50 mg/L,以 2 mmol/L 葡萄糖及 0.01% 酵母提取物作为底物,于 pH 7.0、45℃ 避光静置培养。

1.4 G + C 含量和主要脂肪酸测定

细菌基因组提取及纯化参考文献 [12], G + C 含量测定采用高效液相色谱 (HPLC) (Shimadzu LC-6A) [13]。脂肪酸测定采用对数生长期的培养物,将收获的菌体用盐酸及甲醇酯化,其测定采用 GC-MS (Hitachi M7200AFC/3DQMS) [14]。

1.5 16S rRNA 基因的系统发育学分析及原位杂交检测

细菌 16S rRNA 基因扩增引物采用细菌通用引物:正向引物为 EUB10F (序列为 5' > AGAGTTTGATCCTGGCTCAG < 3'),反向引物为 UNIV1492R (序列为 5' > TACGGYTACCTTGTTACGACTT < 3')。PCR 反应条件为:95℃ 9 min;95℃ 40 s,50℃ 30 s,72℃ 2 min (共 45 个循环);72℃ 10 min。扩增 PCR 产物用 TIAN quick MiDi purification Kit DNA 纯化试剂盒纯化。由上海桑尼生物科技有限公司完成测序。所得短序列用 Contig 软件拼接、编辑成完整序列,将序列输入 GenBank 数据库比对,使用 MEGA3.1 序列分析软件,采用邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树。分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价,Bootstrap 次数设为 1000。荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 采用浮霉菌门特异探针 Pla46 (5' > GACTTGCATGCCTAATCC < 3'),实验操作参考文献 [15],甲酰胺 (FA) 浓度为 30% (NaCl 浓度为 900 mmol/L),杂交温度为 46℃。

2 结果

2.1 分离菌株形态特征

菌株 VM20-7^T 为梨形菌,细胞大小为 (0.7 - 2.0) μm × (0.7 - 2.0) μm,不运动,单生也聚集成团,革兰氏染色阴性。在葡萄糖 (1 mmol/L) 及酵母提取物 (0.01%) 的固体培养基上,经过 1 - 2 个月培养形成茶色菌落,滚管操作重复 3 次直到菌株纯化。16S rRNA 测序结果表明,菌株 VM20-7^T 属于浮

霉菌门。Pla46 探针是检测浮霉菌门微生物最基本最常用的探针,本文采用原位杂交法 (FISH) 对纯培养系进行了检测,结果如图 1 所示,纯培养系中的梨形细菌均与浮霉菌门特异探针 Pla46 显示亮黄色荧光,说明该菌株属于浮霉菌门。

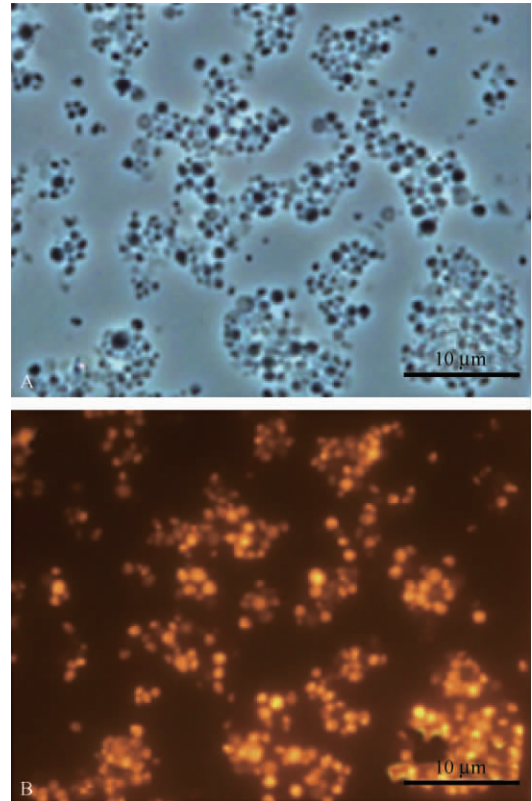


图 1 菌株 VM20-7^T 的浮霉菌门特异探针 Pla46 荧光原位杂交

Fig. 1 Fluorescence *in situ* hybridization of strain VM20-7^T with Cy3-labeled probe Pla46. A: phase-contrast micrograph; B: fluorescence micrograph of the same field.

2.2 生理生化特性

菌株 VM20-7^T 严格厌氧,生长温度范围为 35℃ - 50℃ (最适 45℃),pH 范围为 6.0 - 8.3 (最适 7.0 - 7.5),NaCl 耐受范围为 0% - 0.5% (w/v, 最适 0%)。菌株 VM20-7^T 生长缓慢,传代频率为 1 个月左右 (v/v, 10% 接种量),根据氢气产生计算其生长速率 μ_{\max} 为 0.3 day⁻¹。菌株 VM20-7^T 可利用底物包括:酵母提取物、葡萄糖、麦芽糖、核糖、木糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、蜜三糖、果胶糖及木聚糖,此外微弱利用果糖、阿拉伯糖及淀粉。菌株 VM20-7^T 主要利用糖类,不能利用有机酸、醇类、氨基酸作为碳源生长。葡萄糖发酵终产物是乙酸和 H₂, 1 mol 葡

葡萄糖经厌氧发酵产生 1.48 mol 乙酸及 5.92 mol^{H₂}, 电子回收率为 98%。该菌株不能利用以下底物: 0.1% 酪蛋白氨基酸、0.1% 蛋白胨、醋酸纤维素、巴豆酸、丙酮酸、H₂/CO₂ (1 × 10⁵ Pa) 及乙酸、乳酸、丙三醇、乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、异丁酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、延胡索酸盐、甲酸盐、乙二醇、乙醇、甲醇、正丙醇、正丁醇、安息香酸盐、对苯二酚、苯酚及铵盐/亚硝酸盐。抗生素耐受性实验表明, 菌株 VM20-7^T 对氨苄、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、万古霉素及青霉素有耐受性, 对氯霉素、林肯霉素及四环素敏感。菌株 VM20-7^T 不能利用亚硝酸盐 (5 mmol/L)、硫酸盐 (5 mmol/L)、硫代硫酸盐 (2 mmol/L)、单质硫 (5 mmol/L)、Fe (III) 次氨基三乙酸酯 (NTA) (2 mmol/L) 及亚硫酸盐 (1 mmol/L) 作为电子受体。

菌株生长不需要酵母提取物作为营养因子, 但添加 0.01% 酵母提取物明显加快生长速度。该菌株主要脂肪酸为 C_{16:0} (63.14%)、10-meC_{16:0} (19.33%) 及 10-meC_{18:0} (11.65%)。

2.3 系统发育分析及 G + C 含量

菌株 VM20-7^T 的 G + C 含量为 60.9 mol%。16S rRNA 基因序列全长 1450bp, GenBank 登录号为 AB558583。GenBank blast 比对结果显示 (图 2), 其 16S rRNA 基因序列与浮霉菌门已知菌的遗传距离较远, 近缘的主要为环境克隆 (JF935188, 相似性 99%), 这些克隆主要来自温泉及高温厌氧消化系统。菌株 VM20-7^T 与浮霉菌目的梨形菌属-红小梨形菌属-芽殖小小梨形菌 (*Pirellula-Rhodopirellula-Blastopirellula*, PRB) 分支较近, 相似性在 82.7% -

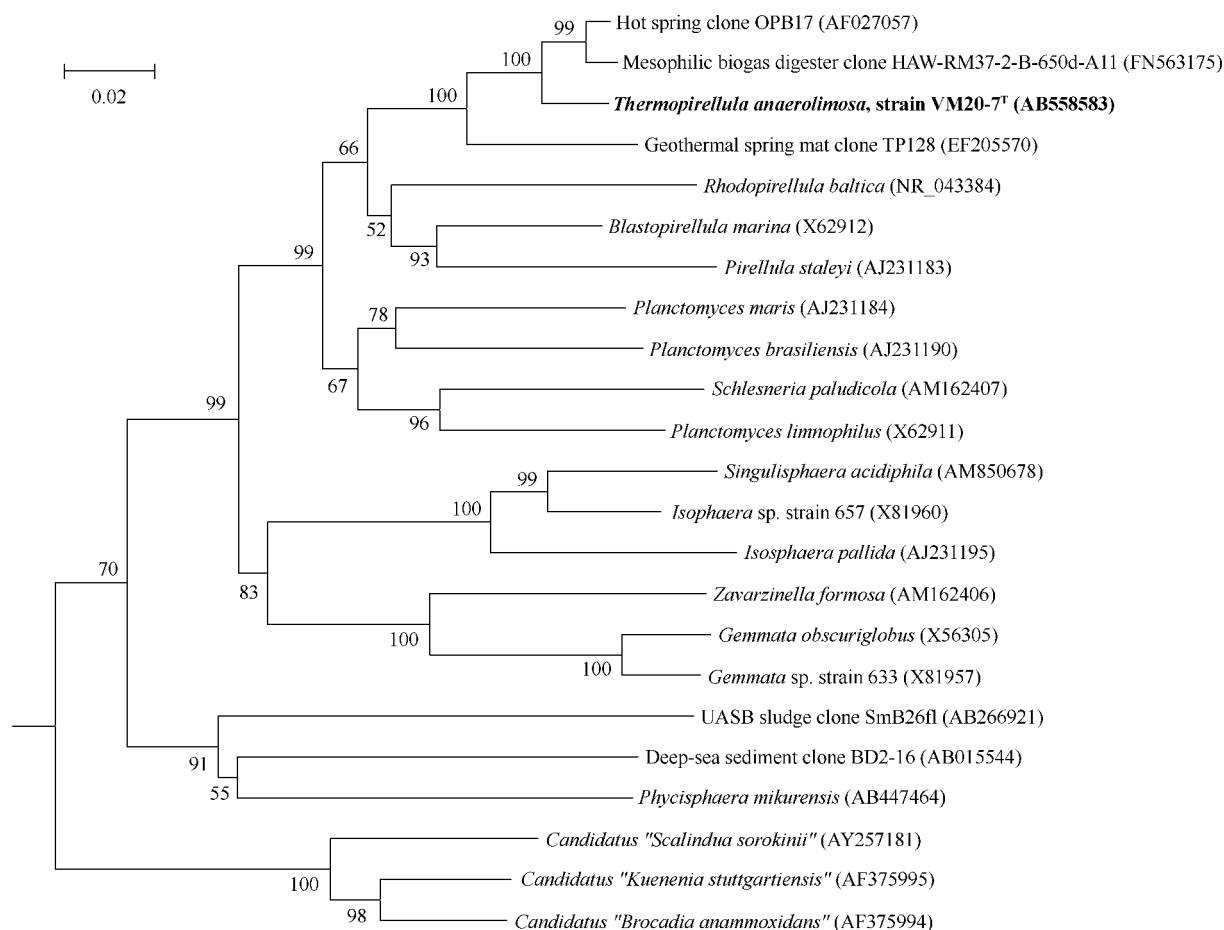


图 2 菌株 VM20-7^T 与相关细菌构建的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain VM20-7^T and related species based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values (1000 data resamplings) > 50% are shown. The 16S rRNA gene sequence of *Chlorobium limicola* (Y10642) (not shown) was used as an outgroup. Bar, 2% sequence divergence.

84.3% 之间, 同源性较高的已知菌为海洋芽殖小小梨形菌 (*Blastopirellula marina*, 原名为 *Pirellula marina*) (相似性 84.3%)^[16-17], 波罗的海红小梨形菌 (*Rhodopirellula baltica*) (相似性 84.1%)^[17] 及斯氏小梨形菌 (*Pirellula staleyii*) (相似性 82.7%)^[18]。鉴于分离菌株 VM20-7^T 与近缘的 PRB 分支的 16S rRNA 序列差异大于 15%, 故将其定为新属新种, 命名为 *Thermopirellula anaerolimosa*。

3 讨论

本研究利用低浓度底物及抗生素添加选择性富集培养, 获得了一株新型高温厌氧产氢细菌 VM20-

7^T。浮霉菌门微生物的细胞壁中不含胞壁质, 抗生素不能阻碍其细胞壁的合成, 因此, 利用抗生素可以选择性分离浮霉菌门微生物, 已报道的浮霉菌门细菌如 *Planctomyces*、*Phycisphaera* 等菌属都是通过添加抗生素纯化获得^[16,20]。本研究结果也证实了添加抗生素是分离纯化浮霉菌门微生物的有效方法。菌株 VM20-7^T 可利用多种糖类, 如葡萄糖、麦芽糖、核糖、木糖及蔗糖产生氢气。该菌株具有很高的产氢特性, 以葡萄糖为例, 理论上 1 mol 葡萄糖厌氧发酵最高产生 4 mol 氢气, 而本菌株可以将 1 mol 葡萄糖转化为 1.48 mol 乙酸及 5.92 mol 氢气, 达到最高理论产值, 表明该菌株在生物制氢方面具有很好的开发潜力。

表 1 菌株 VM20-7^T 与浮霉菌纲相关细菌的鉴别特性

Table 1 Table 1 Phenotypic characteristics of strain VM20-7^T and related genera within class *Planctomycea*.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Cell shape	Spherical to pear shaped	Ovoid to pear shaped	Pear to teardrop shaped	Ovoid to pear shaped	Ellipsoid-shaped	Spherical to ovoid
Motility	-	+	+	+	+	+
Temp for growth (°C)	35-50 (45-50)	ND-38 (27-33)	17.7-29.6 (20-25)	ND-32 (28-30)	4-32 (15-26)	6-38 (30-33)
pH (optimum)	6.0-8.3 (7.0-7.5)	ND	ND	ND	4.2-7.5 (5.0-6.2)	(7.3-7.5)
Range of NaCl (% w/v)	0-0.5	0.4-6.0	0-1.7	0.4-6.9	0-0.5	1.5-4.0
Oxygen requirement	Strictly anaerobic	Strictly aerobic	Aerobic	Strictly aerobic	Facultatively aerobic	Strictly aerobic
Anaerobic fermentation	+	-	-	-	-	-
Anaerobic fermentation	+	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	+	-
Sulfur reduction	-	ND	ND	ND	ND	ND
Major cellular fatty acids	C _{16:0} , C _{17:0} , 10-MeC _{18:0}	C _{16:0} , C _{18:1Δ9}	C _{16:0} , C _{20:1Δ11} , C _{17:1Δ9} , C _{18:1Δ9}	C _{16:0} , C _{18:1Δ9}	C _{16:0} , C _{16:1ω7c}	C _{16:0} , C _{16:1ω7c} , C _{17:0}
G + C content (mol%)	60.9	57	57.1	55	56.3	50.5
Substrate utilization:						
Pyruvate	-	+	+	-	-	-
Glycerol	-	+	-	+	-	ND
Glutamate	-	+	-	-	ND	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Fructose	±	+	-	+	-	-
Isolation source	Anaerobic sludge	Baltic sea	Lake	Marine	Acidic wetland	Marine

1. Strain VM20-7^T; 2. *Blastopirellula marina* DSM 3645^{T[16-17]}; 3. *Pirellula staleyii* DSM 6068^{T[17-19]}; 4. *Rhodopirellula baltica* DSM 10527^{T[17]}; 5. *Schlesneria paludicola* DSM 19928^{T[21]}; 6. 海洋浮霉状菌 (*Planctomyces maris*) DSM 8797^{T[22-23]}. +, positive, -, negative, ±, weakly positive; ND, no data available.

菌株 VM20-7^T 与相关近缘菌的生理特性比较如表 1 所示, 它们的共同点是: 菌体形态均为梨形, G + C 含量较高 (55% - 65%), 化能异养生长, 可利用葡萄糖等多种糖类作为底物。而与近缘菌最显著的差别是, 菌株 VM20-7^T 为浮霉菌门首例专性厌氧菌。目前浮霉菌门中已发现 10 属 16 种微生物, 这些已发现的微生物多数为好氧微生物。在浮霉菌目中, 除菌株 Zi62^[8]、*Phycisphaera mikurensis*^[10] 及栖沼泽夏斯勒氏菌 (*Schlesneria paludicola*)^[21] 为兼性厌氧菌外, 其他微生物均为专性好氧菌。故菌株 VM20-7^T 的发现对于研究浮霉菌门微生物的多样性及生理功能具有重要意义。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析可知, 该细菌的 16S rRNA 基因序列与报道的浮霉菌门微生物的相似性仅为 82.7% - 84.3%。故该菌株为浮霉菌目的新菌株, 命名为 *Thermopirellula anaerolimosa*。菌株 VM20-7^T 作为该新属的模式种保藏于中国科学院微生物研究所、日本微生物菌种保藏中心及德国微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 CGMCC 1.5169^T = JCM 17478^T = DSM 24165^T。

参考文献

- [1] Yang C, Zhang W, Liu RH, Li Q, Li BB, Wang SF, Song CJ, Qiao CL, Mulchandani A. Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (17): 7408-7415.
- [2] Narihiro T, Terada T, Kikuchi K, Iguchi A, Ikeda M, Yamauchi T, Shiraishi K, Kamagata Y, Nakamura K, Sekiguchi Y. Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes and Environments*, 2009, 24 (2): 88-96.
- [3] Brochier C, Philippe H. Phylogeny: A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature*, 2002, 417 (6866): 244.
- [4] Jun SR, Sims GE, Wu GA, Kim SH. Whole-proteome phylogeny of prokaryotes by feature frequency profiles: An alignment-free method with optimal feature resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (1): 133-138.
- [5] Fuerst JA. Beyond prokaryotes and eukaryotes: planctomycetes and cell organization. *Nature Education*, 2010, 3 (9): 44.
- [6] Dojka MA, Harris JK, Pace NR. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (4): 1617-1621.
- [7] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (3): 1719-1728.
- [8] Elshahed MS, Youssef NH, Luo Q, Najjar FZ, Roe BA, Sisk TM, Buhring SI, Hinrichs KU, Krumholz LR. Phylogenetic and metabolic diversity of *Planctomycetes* from anaerobic, sulfide- and sulfur-rich Zodletone Spring, Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (15): 4707-4716.
- [9] Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rosello-Mora R, Amann R, Timmis KN. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16SrRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (4): 1874-1884.
- [10] Fukunaga Y, Kurahashi M, Sakiyama Y, Ohuchi M, Yokota A, Harayama S. *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2009, 55 (4): 267-275.
- [11] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, Ohashi A, Harada H. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50 (2): 771-779.
- [12] Kamagata Y, Mikami E. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41 (2): 191-196.
- [13] Shintani T, Liu WT, Hanada S, Kamagata Y, Miyaoka S, Suzuki T, Nakamura K. *Micropruina glycoenica* gen.

- nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50 (1) : 201-207.
- [14] Hanada S, Takaichi S, Matsuura K, Nakamura K. *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks chlorosomes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52 (1) : 187-193.
- [15] 刘冬英, 邱艳玲, 袁宪正, 师晓爽, 郭荣波. 厌氧氨氧化菌的富集培养与分子鉴定. 环境科学 (*Environmental Science*), 2012, 33 (9) (in press).
- [16] Schlesner H. The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp, *Pirellula* spp, and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. *Systematic and Applied Microbiology*, 1994, 17 (1) : 135-145.
- [17] Schlesner H, Rendsmann C, Tindall BJ, Gade D, Rabus R, Pfeiffer S, Hirsch P. Taxonomic heterogeneity within the *Planctomycetales* as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov., and emended description of the genus *Pirellula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 (5) : 1567-1580.
- [18] Clum A, Tindall BJ, Sikorski J, Ivanova N, Mavromatis K, Lucas S, Glavina DRT, Nolan M, Chen F, Tice H, Pitluck S, Cheng JF, Chertkov O, Brettin T, Han C, Detter JC, Kuske C, Bruce D, Goodwin L, Ovchinnikova G, Pati A, Mikhailova N, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Chain P, Rohde M, Kerker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Lenk HP, Lapidus A. Complete genome sequence of *Pirellula staleyi* type strain (ATCC 27377^T). *Standards in Genomic Sciences*, 2009, 1 (3) : 308-316.
- [19] Franzmann PD, Skerman VBD. *Gemmata obscuriglobus*, a new genus and species of the budding bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1984, 50 (3) : 261-268.
- [20] Wang J, Jenkins C, Webb RI, Fuerst JA. Isolation of *Gemmata*-like and *Isosphaera*-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (1) : 417-422.
- [21] Kulichevskaya IS, Ivanova AO, Belova SE, Baulina OI, Bodelier PLE, Rijpstra WIC, Sinninghe Damsté JS, Zavarzin GA, Dedysh SN. *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order *Planctomycetales*, from *Sphagnum*-dominated boreal wetlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 (11) : 2680-2687.
- [22] Bauld BJ, Staley JT. *Planctomyces maris* sp. nov.: a marine isolate of the *Planctomyces-Blastocaulis* group of budding bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1976, 97 (1) : 45-55.
- [23] Kerger BD, Mancuso CA, Nichols PD, White DC, Langworthy T, Sittig M, Schlesner H, Hirsch P. The budding bacteria, *Pirellula* and *Planctomyces*, with atypical 16S rRNA and absence of peptidoglycan, show eubacterial phospholipids and uniquely high proportions of long chain beta-hydroxy fatty acids in the lipopolysaccharide lipid A. *Archives of Microbiology*, 1988, 149 (3) : 255-260.

Isolation and characterization of *Thermopirellula anaerolimosa* gen. nov., sp. nov., an obligate anaerobic hydrogen-producing bacterium of the phylum *Planctomycetes*

Dongying Liu^{1,4}, Yi Liu^{1,4}, Xuehui Men², Qunqun Guo³, Rongbo Guo¹, Yanling Qiu^{1*}

¹ Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China

² College of Pratacultural and Environmental Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

³ Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China

⁴ Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To cultivate various yet-to-be cultured heterotrophs from anaerobic granule sludge, we used a selective culture medium with low concentrations of substrates supplemented a variety of antibiotics. [Methods] An obligate anaerobic, thermophilic, hydrogen-producing bacterium, strain VM20-7^T, was isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating high-strength organic wastewater from isomerized sugar production processes. [Results] Cells of strain VM20-7^T are non-motile, spherical, pear or teardrop shaped, occurring singly or as aggregates (0.7 – 2.0 μm × 0.7 – 2.0 μm). Spore formation was not observed. Growth temperature ranges from 35 – 50°C (optimum 45°C), pH ranges from 6.0 – 8.3 (optimum 7.0 – 7.5), NaCl tolerant concentration ranges from 0% – 0.5% (w/v, optimum 0%). Nitrate, sulfate, thiosulfate, sulfite, elemental sulfur and Fe (III)-NTA were not used as terminal electron acceptors. Strain VM20-7^T utilizes a wide range of carbohydrates, including glucose, maltose, ribose, xylose, sucrose, galactose, mannose, raffinose, pectin, yeast extract and xylan. Acetate and H₂ are the main end products of glucose fermentation. The G + C content of the genomic DNA was 60.9 mol%. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that it is related to the *Pirellula-Rhodopirellula-Blastopirellula* (PRB) clade within the order *Planctomycetales* (82.7 – 84.3% similarity with 16S rRNA genes of other known related species). [Conclusion] The first obligate anaerobic bacterium within the phylum *Planctomycetes* was isolated with low concentration of carbohydrates and antibiotics. On the basis of the physiological and phylogenetic data, the name *Thermopirellula anaerolimosa* gen. nov., sp. nov. is proposed for strain VM20-7^T (= CGMCC 1.5169^T = JCM 17478^T = DSM 24165^T).

Keywords: *Planctomycetes*, thermophilic anaerobic hydrogen-producing bacterium, 16S rRNA gene

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51078344), by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Y2008F45), by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2010BAC67B03), by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-G-054, KSCX2-YW-G-052, KSCX2-EW-J-10), by the Program Foundation for the Talent Introduction by Qingdao City (11-2-4-15-YY) and by the Taishan Scholar Program of Shandong Province

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-80662750; E-mail: qiuy1@qibebt.ac.cn

Received: 13 February 2012 / Revised: 11 April 2012