

研究报告

## 一株新型同型产乙酸菌 *Clostridium* sp. 的自养和异养生长特性

朱慧<sup>1</sup> 符波<sup>1,2\*</sup> 鲁帅领<sup>1</sup> 刘宏波<sup>1,2</sup> 刘和<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学环境与土木工程学院 江苏省厌氧生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心 江苏 苏州 215009)

**摘要:**【背景】同型产乙酸菌是一类利用乙酰辅酶 A 途径固定 CO<sub>2</sub> 合成自身细胞物质并生成乙酸、乙醇等代谢产物的厌氧菌群, 其分布广泛、种类繁多且代谢多样。深入研究同型产乙酸菌菌株的代谢能力及特性, 对探索该种群的生理生化特性及其环境作用至关重要。【目的】研究一株同型产乙酸菌 *Clostridium* sp. BXX 的最适培养条件及其自养与异养生长特性。【方法】设置 BXX 菌株培养温度 10–55 °C、初始 pH 6.0–9.0、NaCl 浓度 0–2.0%、不同氮源, 测定菌体细胞含量和产物生成浓度, 确定菌株最适培养条件。研究 BXX 菌株分别以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、合成气、CO、葡萄糖、1,2-丙二醇、甲酸钠、乙二醇甲醚、甘油、丙酮酸和乳酸为底物时的底物消耗、产物生成、菌体细胞含量和 pH 等, 探究其自养和异养生长特性。【结果】BXX 菌株的最适培养温度为 30 °C, 初始 pH 为 7.0, NaCl 浓度为 1.0%, 氮源为酵母粉。BXX 菌株能以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、合成气、葡萄糖、1,2-丙二醇、甲酸钠、乙二醇甲醚和甘油为底物生长, 不能以 CO、丙酮酸或乳酸为底物生长。【结论】BXX 菌株既能自养生长产乙酸, 又能异养生长产乙醇。BXX 菌株是乙酸发酵的优良菌种资源, 有较好的工业应用潜力。

**关键词:** *Clostridium*, 同型产乙酸菌, 自养, 异养, 乙醇

## Autotrophic and heterotrophic characteristics of a novel acetogenic *Clostridium* sp.

ZHU Hui<sup>1</sup> FU Bo<sup>1,2\*</sup> LU Shuai-Ling<sup>1</sup> LIU Hong-Bo<sup>1,2</sup> LIU He<sup>1,2</sup>

(1. College of Environment and Civil Engineering, Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology & Material, Suzhou, Jiangsu 215009, China)

**Abstract:** [Background] Acetogens are a group of anaerobic bacteria that use Wood-Ljungdahl pathway for the assimilation of CO<sub>2</sub> into cell carbon and production of acetate or ethanol. They are widely distributed in nature and highly phylogenetically and metabolically diverse. The investigation on the metabolic capabilities of acetogenic bacteria is important to understand their physiological and

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (21206056, 51678280); National Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2012121, BK20141112)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85197464; E-mail: fubo@jiangnan.edu.cn

Received: December 25, 2017; Accepted: March 29, 2018; Published online (www.cnki.net): May 15, 2018  
基金项目: 国家自然科学基金(21206056, 51678280); 江苏省自然科学基金(BK2012121, BK20141112)

\*通信作者: Tel: 86-510-85197464; E-mail: fubo@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-12-25; 接受日期: 2018-03-29; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-15

biochemical characteristics as well as environment roles. **[Objective]** This study aims to optimize the culture conditions and understand the autotrophic and heterotrophic characteristics of a strain of novel acetogenic bacterium *Clostridium* sp. **[Methods]** The incubation was performed at temperature of 10–55 °C, initial pH of 6.0–9.0, NaCl concentration of 0–2.0% or with different nitrogen source to optimize the culture condition of strain BXX by determining the cell and product concentration. The autotrophic or heterotrophic growth characteristics of strain BXX were studied by measuring substrate consumption, product generation, bacterial concentration and pH with CO, syngas, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, glucose and other organic matters as substrates. **[Results]** The optimum temperature, initial pH, NaCl concentration and nitrogen source of strain BXX was 30 °C, 7.0, 1.0% and yeast extract, respectively. Strain BXX grew on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, syngas, glucose, 1,2-propanediol, sodium formate, 2-methoxyethanol and glycerol, and did not grow on CO, pyruvate or lactate. **[Conclusion]** Strain BXX grew autotrophically to produce acetate and grew heterotrophically to produce ethanol. Strain BXX was an excellent strain resource for acetate fermentation and had good potential of industrial application.

**Keywords:** *Clostridium*, Acetogen, Autotrophic, Heterotrophic, Ethanol

同型产乙酸菌在自然界中分布范围广泛, 其乙酸合成量约占厌氧微生物合成量的 10%, 在全球碳循环中发挥着非常重要的作用<sup>[1]</sup>。这与其代谢能力强、底物范围广密不可分, 很多同型产乙酸菌同时具备自养与异养两种代谢能力<sup>[2-3]</sup>。以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为基质进行自养生长是同型产乙酸菌最显著的代谢特点, 它们通过厌氧乙酰辅酶 A 途径固定 CO<sub>2</sub> 合成自身细胞物质以及乙酸、乙醇等代谢产物<sup>[4]</sup>。除此之外, 它们也具备利用各式各样有机物进行异养生长的代谢灵活性<sup>[5]</sup>。相比于竞争力弱的自养生长, 多样化的有机底物代谢能力可能是其在厌氧环境中广泛分布的主要原因<sup>[6]</sup>。

目前分离纯化的同型产乙酸菌分布于 22 个种属, 形态和生理生化特点存在着明显差异, 底物范围及代谢能力也差别较大<sup>[7]</sup>。菌株 *Clostridium difficile* 可利用纤维二糖、麦芽糖和甘露糖为基质, *Eubacterium aggregans* 则以乳酸、甲醇、甜菜碱为基质<sup>[8-9]</sup>。*Acetobacterium woodii* 和 *Clostridium ljungdahlii* 可高效转化 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 而 *Clostridium formicoaceticum* 和 *Clostridium magnum* 的转化能力则较弱<sup>[10-13]</sup>。可见, 深入研究同型产乙酸菌菌株的代谢能力及特性, 对探索该种群的生理生化特性及其环境作用至关重要; 同时, 作为一种极具发展潜力的工业微生物, 对其代谢特性的研究可为工业生

产应用提供理论依据。

本实验室分离纯化了一株同型产乙酸菌, 经过形态观察、16S rRNA 基因系统发育分析和生理生化实验鉴定为 *Clostridium* 属的一个新种。本研究分别以不同底物为唯一碳源, 优化最适生长条件, 通过测定细菌生长、底物消耗和产物生成, 研究该菌株的自养和异养生长特性, 以期为同型产乙酸菌代谢特性研究及其潜在的工业应用提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种来源

菌种来源于本实验室分离纯化的一株新型同型产乙酸菌 *Clostridium* sp. BXX, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(编号为 CGMCC 1.5228)和日本微生物保藏中心(编号为 JCM 32382), 16S rRNA 基因序列已上传至 GenBank (登录号为 KY130462)。

### 1.2 主要试剂和仪器

试剂均为国产分析纯。紫外可见光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 气相色谱仪, 岛津公司; 厌氧操作箱, Electrotek 厌氧工作站。

### 1.3 培养基及溶液

培养基: NH<sub>4</sub>Cl 0.50 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25 g, NaCl 10 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.00 mg, 微量元素 1.00 mL, 亚硒酸钨酸盐溶液 1.00 mL, 酵

母粉 4.00 g, 刃天青(0.1% 质量体积比) 0.50 mL,  $K_2HPO_4$  0.35 g,  $KH_2PO_4$  0.23 g,  $NaHCO_3$  4.00 g, 维生素液 10.00 mL, L-半胱氨酸 0.30 g,  $Na_2S \cdot 9H_2O$  0.30 g, 添加蒸馏水至 1 L。调整 pH 为 7.0。

微量元素溶液: 硝基三乙酸 1.50 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.00 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.50 g,  $NaCl$  1.00 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.10 g,  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  0.18 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.10 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.18 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.01 g,  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  0.02 g,  $H_3BO_3$  0.01 g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.01 g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.03 g,  $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$  0.30 mg,  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  0.40 mg, 添加蒸馏水至 1 L。调整 pH 为 7.0。

亚硒酸钨酸盐溶液:  $NaOH$  0.50 g,  $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$  3.00 mg,  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  4.00 mg, 添加蒸馏水至 1 L。调整 pH 至 7.0。

维生素溶液(mg/L): 生物素 2.00, 叶酸 2.00, 维生素  $B_6$  10.00, 维生素  $B_1$  5.00, 维生素  $B_2$  5.00, 烟酸 5.00, D 泛酸钙 5.00, 维生素  $B_{12}$  0.10, 对氨基苯甲酸 5.00, 硫辛酸 5.00, 添加蒸馏水至 1 L。

#### 1.4 菌体细胞含量的测定

利用分光光度计在 500–700 nm 波长范围扫描, 确定最大吸收峰对应的波长为 600 nm。将菌悬液分别稀释 2、5、10、20、30 和 50 倍, 波长 600 nm 下以蒸馏水为参照测定分光光度值。将菌液稀释至适当浓度, 利用血球计数板确定菌体细胞含量, 绘制分光光度值与菌体细胞含量的标准曲线。测量待测菌悬液的分光光度值, 通过标准曲线计算出菌体细胞含量。

#### 1.5 BXX 菌株最适培养条件

##### 1.5.1 最适温度和最适初始 pH

40 mL 厌氧管中装入 15 mL 灭菌培养基, 加入初始浓度为 23 mmol/L 的葡萄糖, 以及初始菌体细胞含量为  $6.30 \times 10^6$ – $7.90 \times 10^6$  个/mL 的 BXX 菌株, 顶空通入  $H_2/CO_2$  ( $H_2:CO_2=4:1$ , 体积比) 气体至压力为 0.16 MPa。调节培养基初始 pH 为 8.5 后置于 10、15、20、25、30、35、40、45、50 和 55 °C 培养用于研究最适温度, 调节培养基初始 pH 为

6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 置于 25 °C 培养以研究最适初始 pH。每个实验组均设置 3 组平行, 培养 14 d, 每天取样一次测定菌体细胞含量和产物生成。

##### 1.5.2 最适 NaCl 浓度和最适氮源

调节培养基 NaCl 浓度分别为 0、0.2%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 用于研究最适 NaCl 浓度, 分别添加 4 g/L 氯化铵、尿素、酵母粉、胰蛋白胍、酪蛋白胍和硝酸钾用于研究最适氮源, 其它培养基成分不变。40 mL 厌氧管中装入 15 mL 灭菌培养基, 加入初始浓度为 23 mmol/L 的葡萄糖, 以及初始菌体细胞含量为  $1.80 \times 10^6$ – $1.87 \times 10^6$  个/mL 的 BXX 菌株, 调节培养基初始 pH 为 7.0, 顶空通入  $H_2/CO_2$  ( $H_2:CO_2=4:1$ , 体积比) 气体至压力 0.16 MPa, 置于 30 °C 培养。每个实验组均设置 3 组平行, 培养 8 d, 每天取样一次测定菌体细胞含量和产物生成。

#### 1.6 BXX 菌株的自养生长实验

40 mL 厌氧管中装入 15 mL 灭菌培养基, 调整 pH 为 7.0, BXX 菌株初始菌体细胞含量为  $1.97 \times 10^6$ – $2.14 \times 10^6$  个/mL, 顶空通入  $H_2/CO_2$  ( $H_2:CO_2=4:1$ , 体积比)、纯 CO 或合成气( $CO:CO_2:H_2=4:3:3$ , 体积比)至压力 0.16 MPa 并置于 30 °C 培养。每个实验组均设置 3 组平行, 培养 104 h, 每 8 h 取样一次测定菌体细胞含量和产物生成。

#### 1.7 BXX 菌株异养生长实验

40 mL 厌氧管中装入 15 mL 灭菌培养基, 调整 pH 为 7.0, 分别加入葡萄糖、1,2-丙二醇、甲酸钠、乙二醇甲醚、甘油、丙酮酸和乳酸至 23、10、10、20、20、20 和 20 mmol/L, BXX 菌株初始细胞含量为  $1.47 \times 10^6$ – $2.24 \times 10^6$  个/mL, 顶空通入高纯  $N_2$  至压力 0.16 MPa 并置于 30 °C 培养。每个实验组均设置 3 组平行, 培养 160 h, 每 8 h 取样一次测定菌体细胞含量和产物生成。

#### 1.8 有机酸和气体的测定方法

采用气相色谱(GC-2010)法测定挥发性脂肪酸

(VFAs)和顶空气体,具体测定方法见参考文献[14-15]。

## 2 结果与分析

### 2.1 BXX 菌株的最适培养条件

#### 2.1.1 BXX 菌株的最适温度

当培养基 NaCl 浓度为 0.2%, 酵母粉为唯一氮源, 初始 pH 为 8.5, 葡萄糖和 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为底物, BXX 菌株初始菌体细胞含量为  $6.37 \times 10^6$  个/mL, 菌株于 10–55 °C 下培养 13 d 后, 其生长状况如图 1 所示。温度低于 15 °C 和高于 50 °C 时, 菌体细胞含量与初始含量无明显变化; 温度为 15、20、25、30、35、40、45 和 50 °C 时, 菌体细胞终含量分别为  $8.56 \times 10^6$ 、 $1.50 \times 10^7$ 、 $5.45 \times 10^7$ 、 $5.60 \times 10^7$ 、 $4.65 \times 10^7$ 、 $4.11 \times 10^7$ 、 $2.97 \times 10^7$  和  $9.23 \times 10^6$  个/mL, 指数期生长速率分别为  $2.60 \times 10^4$ 、 $1.56 \times 10^5$ 、 $8.40 \times 10^5$ 、 $9.61 \times 10^5$ 、 $7.52 \times 10^5$ 、 $6.58 \times 10^5$ 、 $3.77 \times 10^5$  和  $4.92 \times 10^5$  个/(mL·h)。综合菌体细胞终含量、指数期生长速率等情况, 发现菌株 BXX 的生长温度范围为 15–45 °C, 最适生长温度为 30 °C。

#### 2.1.2 BXX 菌株最适初始 pH

当培养基 NaCl 浓度为 0.2%, 酵母粉为唯一氮源, 温度 25 °C, 葡萄糖和 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为底物, BXX 菌株初始细胞含量为  $7.95 \times 10^6$  个/mL, 菌体于 pH 6.0–9.0 下培养 14 d 后, 其生长状况如图 2A、B 和 C 所示。初始 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 时, 菌体细胞终含量分别为  $5.49 \times 10^7$ 、

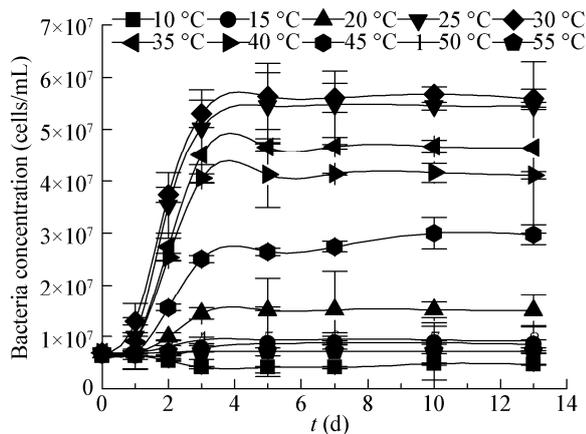


图 1 不同温度下 BXX 菌株的生长  
Figure 1 Growth of strain BXX under different temperatures

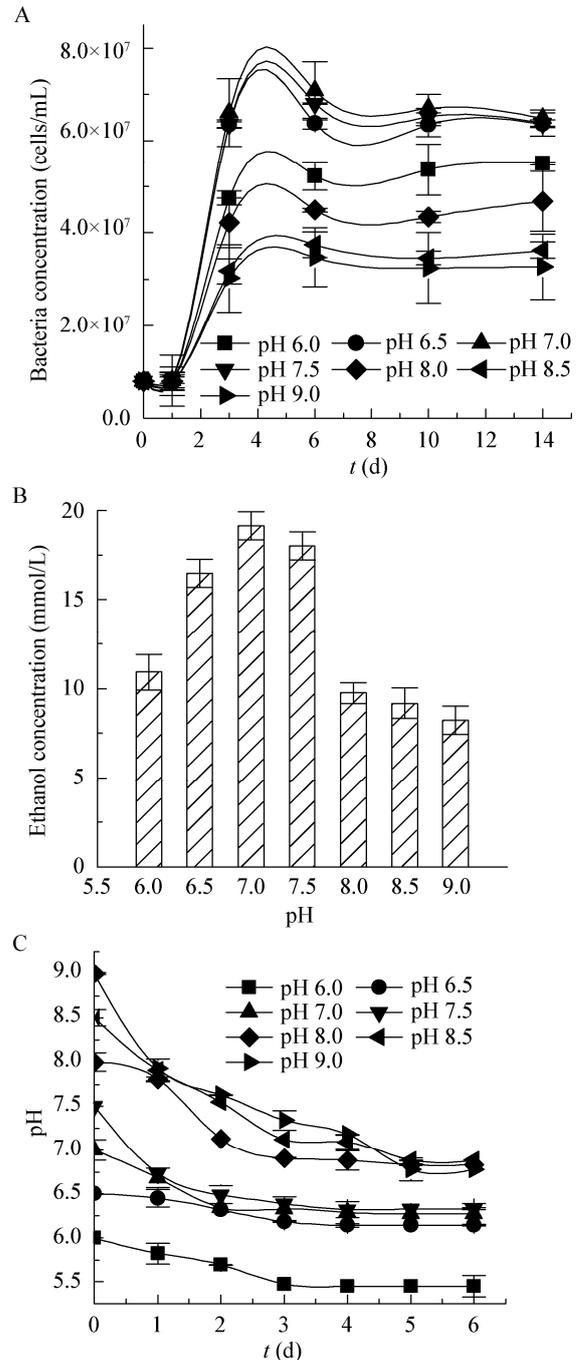


图 2 不同 pH 下 BXX 菌株的生长(A)和乙醇浓度(B)及 pH 的变化(C)

Figure 2 The growth (A), ethanol concentration (B) and change of pH (C) of strain BXX under different pH

$6.35 \times 10^7$ 、 $6.47 \times 10^7$ 、 $6.37 \times 10^7$ 、 $4.68 \times 10^7$ 、 $3.62 \times 10^7$  和  $3.26 \times 10^7$  个/mL, 指数期生长速率分别为  $8.25 \times 10^5$ 、 $1.16 \times 10^6$ 、 $1.21 \times 10^6$ 、 $1.17 \times 10^6$ 、 $7.13 \times 10^5$ 、 $4.95 \times 10^5$  和  $4.64 \times 10^5$  个/(mL·h); 乙醇初

始浓度为 0, 终浓度分别为 10.91、16.47、19.14、18.01、9.74、9.17 和 8.22 mmol/L, 分别累积乙醇  $1.63 \times 10^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-1}$ 、 $2.9 \times 10^{-1}$ 、 $2.7 \times 10^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $1.34 \times 10^{-2}$  和  $1.2 \times 10^{-2}$  mmol, 指数期乙醇产率分别为  $3.39 \times 10^{-3}$ 、 $5.21 \times 10^{-3}$ 、 $6.04 \times 10^{-3}$ 、 $5.63 \times 10^{-3}$ 、 $3.13 \times 10^{-4}$ 、 $2.79 \times 10^{-4}$  和  $2.50 \times 10^{-4}$  mmol/h。综合菌体细胞终含量、指数期生长速率、乙醇终浓度、乙醇产量、指数期乙醇产率等情况, 发现菌株可在初始 pH 6.0–9.0 下生长, 最适生长初始 pH 值为 7.0。

### 2.1.3 BXX 菌株最适 NaCl 浓度

当培养基初始 pH 为 7.0, 酵母粉为唯一氮源, 温度 30 °C, 葡萄糖和 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为底物, BXX 菌株初始细胞含量为  $1.80 \times 10^6$  个/mL, 菌体于 NaCl 浓度 0–2.0% 培养 7 d 后, 生长状况如图 3A 和 B 所示。NaCl 浓度在 0、0.2%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 下, 菌体细胞终含量分别为  $1.13 \times 10^7$ 、 $1.50 \times 10^7$ 、 $2.63 \times 10^7$ 、 $4.50 \times 10^7$ 、 $3.37 \times 10^7$  和  $2.74 \times 10^7$  个/mL, 指数期生长速率分别为  $1.89 \times 10^5$ 、 $2.39 \times 10^5$ 、 $4.21 \times 10^5$ 、 $5.92 \times 10^5$ 、 $5.79 \times 10^5$  和  $4.63 \times 10^5$  个/(mL·h); 乙醇初始浓度为 0, 乙醇终浓度分别为 6.47、7.22、10.01、14.20、13.11 和 10.78 mmol/L, 分别累积乙醇  $9.71 \times 10^{-2}$ 、 $1.08 \times 10^{-1}$ 、 $1.50 \times 10^{-1}$ 、 $2.13 \times 10^{-1}$ 、 $1.97 \times 10^{-1}$  和  $1.62 \times 10^{-1}$  mmol, 指数期乙醇产率分别为  $2.02 \times 10^{-3}$ 、 $2.25 \times 10^{-3}$ 、 $3.12 \times 10^{-3}$ 、 $2.95 \times 10^{-3}$ 、 $4.10 \times 10^{-3}$  和  $3.37 \times 10^{-3}$  mmol/h。综合菌体细胞终含量、指数期生长速率、乙醇终浓度、乙醇产量、指数期乙醇产率等情况, 发现菌株可在 NaCl 浓度 0–2.0% 下生长, 最适生长 NaCl 浓度为 1.0%。

### 2.1.4 BXX 菌株最适氮源

当培养基初始 pH 为 7.0, NaCl 浓度为 1.0%, 温度为 30 °C, 葡萄糖和 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为底物, BXX 菌株初始浓度为  $1.87 \times 10^6$  个/mL, 菌体于不同氮源的条件培养 7 d 后, 其生长状况如图 3C 和 D 所示。

以尿素、氯化铵或硝酸钾为唯一氮源时, 菌体细胞含量无明显变化; 以酵母粉、胰蛋白胨或酪蛋白胨为唯一氮源进行生长, 细胞终含量为  $4.70 \times 10^7$ 、 $2.29 \times 10^7$  和  $2.44 \times 10^7$  个/mL, 指数期生长速率分别为  $6.22 \times 10^5$ 、 $2.89 \times 10^5$  和  $3.07 \times 10^5$  个/(mL·h)。乙醇初始浓度为 0, 乙醇终浓度分别为 15.18、7.20 和 9.36 mmol/L, 分别累积乙醇  $2.28 \times 10^{-1}$ 、 $1.08 \times 10^{-1}$  和  $1.40 \times 10^{-1}$  mmol, 指数期乙醇产率分别为  $3.17 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-3}$  和  $1.94 \times 10^{-3}$  mmol/h。综合菌体细胞终含量、指数期生长速率、乙醇终浓度、乙醇产量、指数期乙醇产率等情况, 发现菌株能以酵母粉、胰蛋白胨和酪蛋白胨为氮源生长, 并且最适氮源为酵母粉。

## 2.2 BXX 菌株的自养生长特性

当 BXX 菌株以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为唯一碳源生长时, 菌体细胞含量、H<sub>2</sub> 利用和乙酸生成如图 4 所示。菌体生长经过 24 h 的滞后期后进入指数期, 菌体细胞含量从  $1.84 \times 10^6$  个/mL 增加到  $3.77 \times 10^6$  个/mL。培养 56 h 后, 菌体生长进入稳定期(图 4A), 顶空气体中的 H<sub>2</sub> 含量由 36.86 mmol/L 下降到 31.75 mmol/L。顶空 H<sub>2</sub> 浓度下降了 5.11 mmol/L, 累积 1.56 mmol/L 乙酸(图 4B)。稳定期结束时, 顶空气体中的 H<sub>2</sub> 含量由 36.86 mmol/L 下降到 29.23 mmol/L, 共消耗顶空 H<sub>2</sub> 气体 7.63 mmol/L, 获得乙酸 1.98 mmol/L (图 4B)。

当 BXX 菌株以合成气为唯一碳源生长时, 菌体细胞含量和乙酸生成如图 5A 和 B 所示。菌体细胞含量经历了滞后期和指数期后最终达到稳定期, 菌体细胞含量从  $2.14 \times 10^6$  个/mL 增加到  $4.00 \times 10^6$  个/mL, 累积 2.00 mmol/L 乙酸。稳定期结束时顶空气体中的 CO 含量由 24.68 mmol/L 下降到 20.27 mmol/L, 产生 H<sub>2</sub> 气体 2.02 mmol/L, 菌株自养共消耗 H<sub>2</sub> 气体 8.12 mmol/L。当 BXX 菌株以纯 CO 为唯一碳源生长时, 菌体细胞含量和乙酸浓度都没有发生变化(图 5C 和 D)。

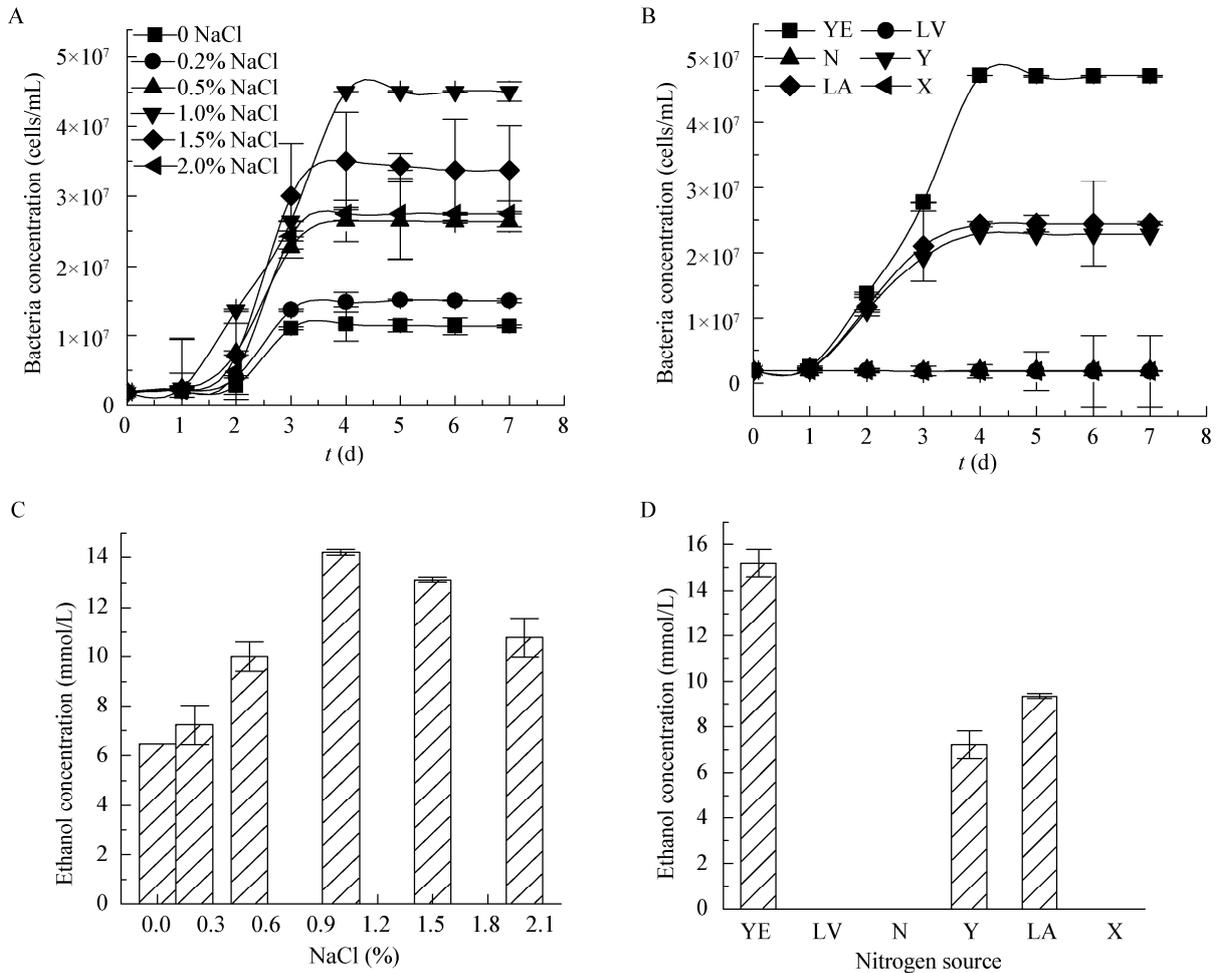


图 3 不同 NaCl 浓度、氮源下 BXX 菌株的生长(A、B)和乙醇浓度(C、D)

Figure 3 The growth (A, B) and ethanol concentration (C, D) of strain BXX under different NaCl concentration and nitrogen source

注: YE: 酵母粉; LV: 氯化铵; N: 尿素; Y: 胰蛋白胨; LA: 酪蛋白胨; X: 硝酸钾。

Note: YE: Yeast extract; LV: Ammonium chloride; N: Carbamide; Y: Tryptone; LA: Casein peptone; X: Potassium nitrate.

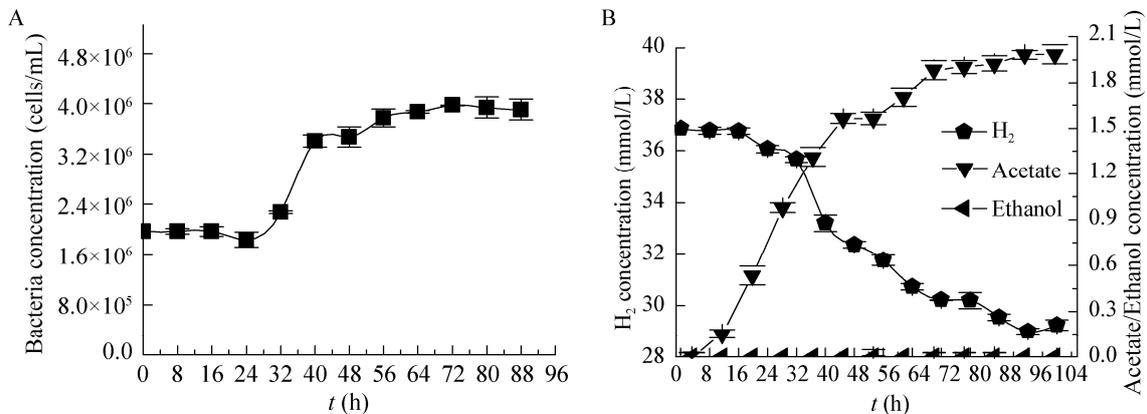


图 4 BXX 菌株以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 为底物的自养生长情况(A)及产乙酸和乙醇浓度(B)

Figure 4 Autotrophic growth (A) and acetate/ethanol concentration (B) of strain BXX with H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> as substrate

### 2.3 BXX 菌株的异养生长

当 BXX 菌株以葡萄糖为唯一碳源生长时, 菌体细胞含量、葡萄糖利用和乙醇生成如图 6 所示。菌体生长经过 16 h 滞后期后进入指数期, 菌体细胞含量从

$2.00 \times 10^6$  个/mL 增加到  $1.08 \times 10^7$  个/mL。培养 40 h 后, 菌体生长进入稳定期。共消耗葡萄糖 10.22 mmol/L, 累积乙醇 16.90 mmol/L (图 6B)。稳定期结束时, 共消耗葡萄糖  $1.53 \times 10^{-1}$  mmol, 累积乙醇  $2.52 \times 10^{-1}$  mmol。

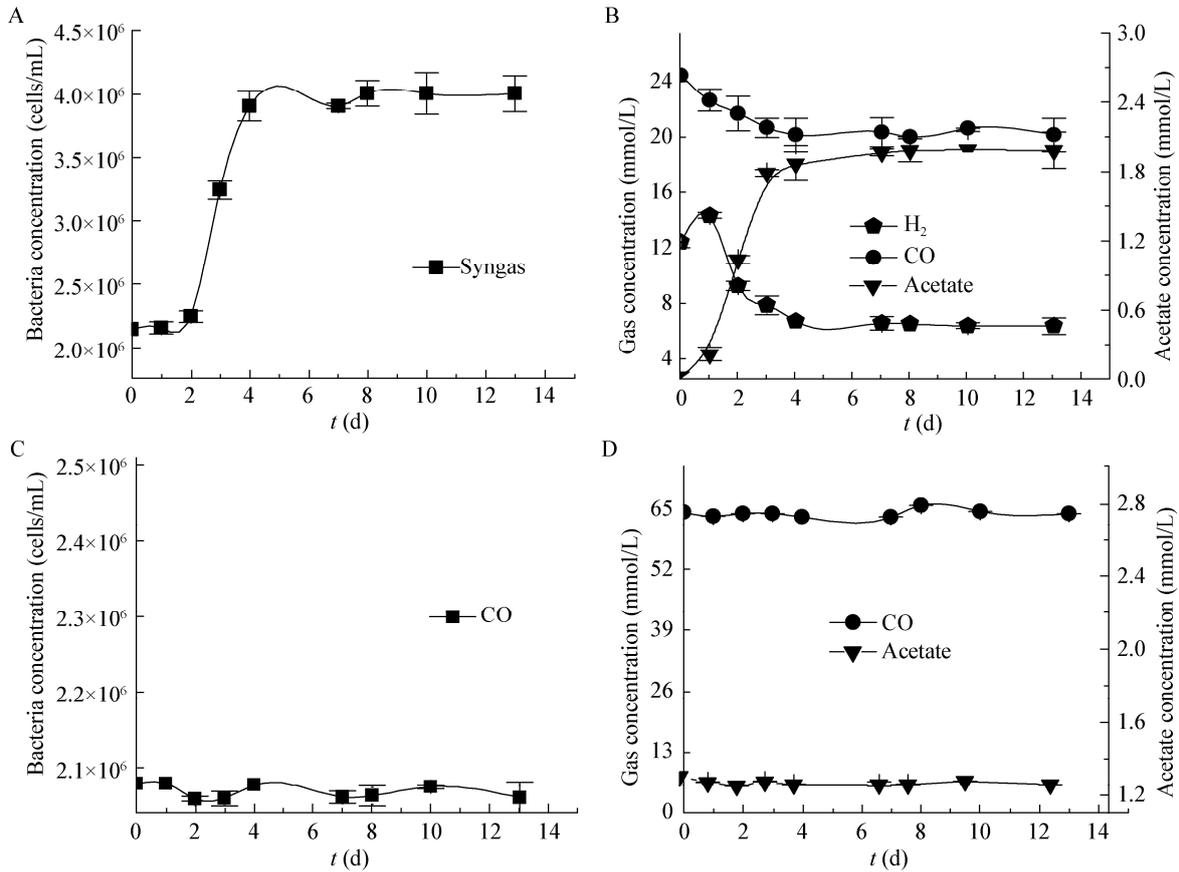


图 5 BXX 菌株分别以合成气(A、B)和 CO (C、D)为底物的自养生长情况

Figure 5 Autotrophic growth of strain BXX with syngas (A, B) and CO (C, D) as substrates

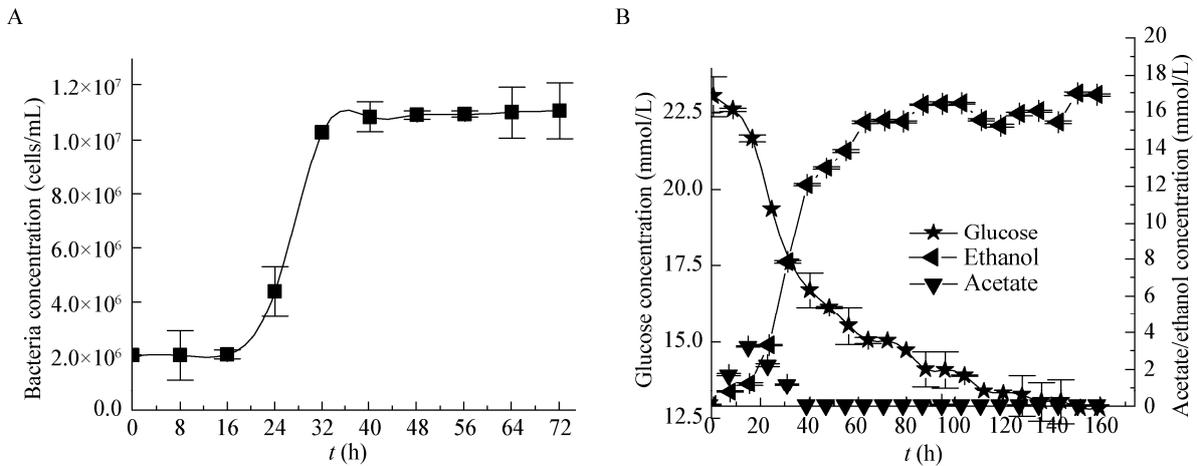


图 6 BXX 菌株以葡萄糖为底物的异养生长情况(A)及产乙酸和乙醇浓度(B)

Figure 6 Heterotrophic growth (A) and acetate/ethanol concentration (B) of strain BXX with glucose as substrate

BXX 菌株能以 1,2-丙二醇、甲酸钠、乙二醇甲醚和甘油为唯一碳源生长, 菌体细胞含量和产乙醇浓度如图 7 和 8 所示, 菌体生长经历了滞后期、指

数期后达到稳定期(图 7)。当 BXX 菌株以丙酮酸或乳酸为唯一碳源生长时, 菌体细胞含量和乙醇浓度无明显变化(图 7E、F 和图 8)。

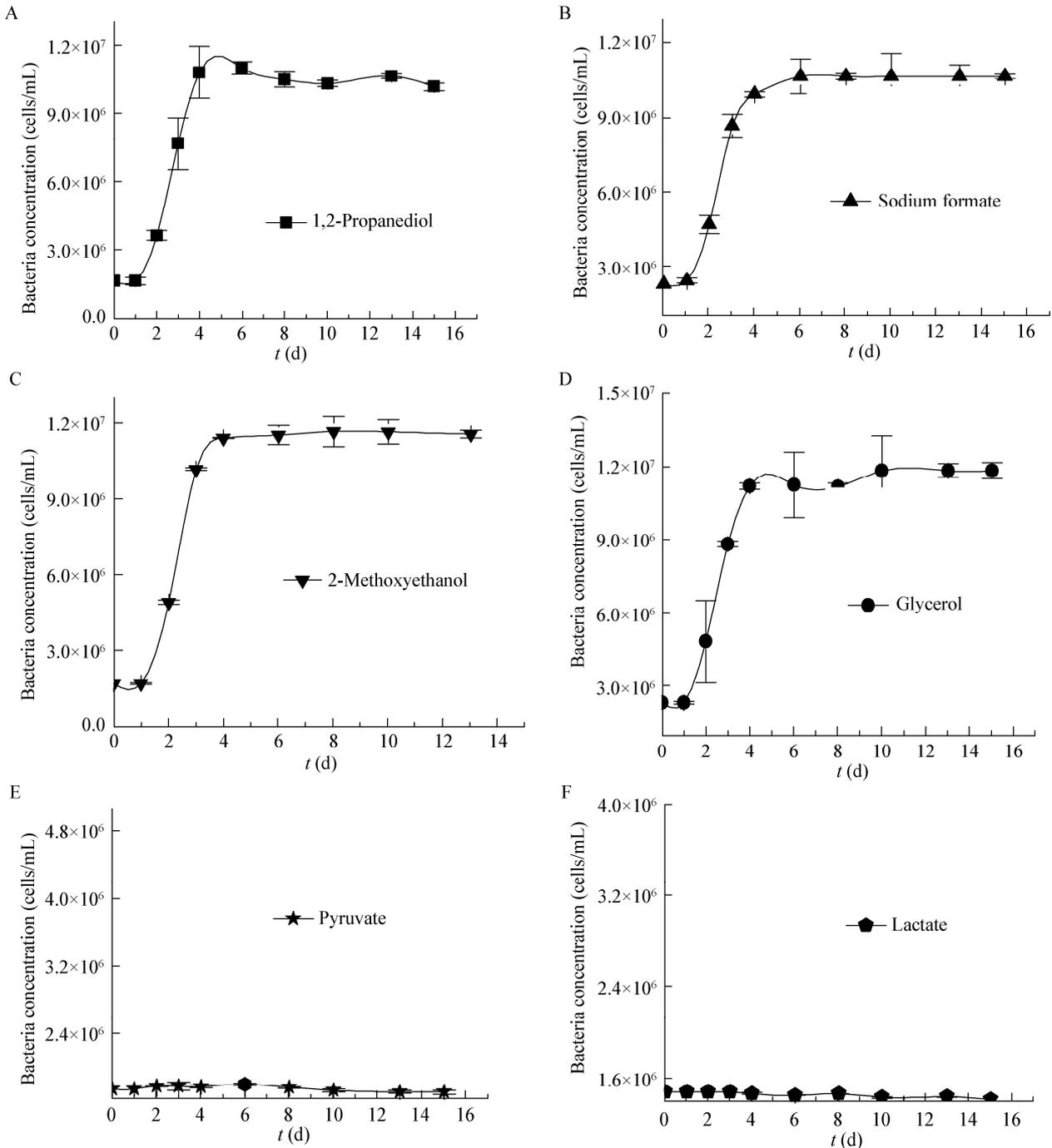


图 7 BXX 菌株分别以 1,2-丙二醇(A)、甲酸钠(B)、乙二醇甲醚(C)、甘油(D)、丙酮酸(E)和乳酸(F)为底物异养生长情况  
Figure 7 Heterotrophic growth of strain BXX with 1,2-propanediol (A), sodium formate (B), 2-methoxyethanol (C), glycerol (D), pyruvate (E) and lactate (F) as substrate

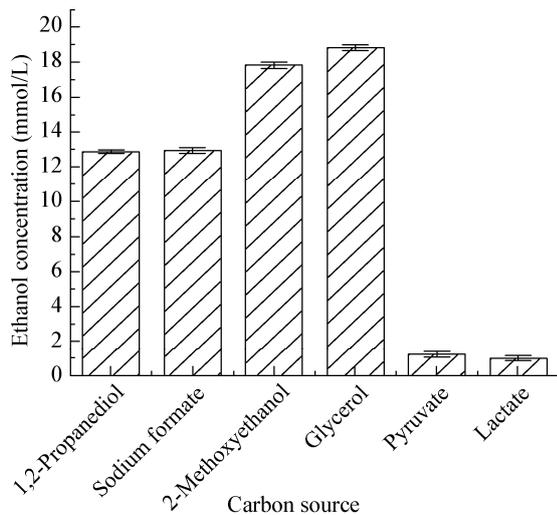


图 8 菌株利用不同碳源异养生产乙醇浓度  
Figure 8 Ethanol concentration of strain BXX with different carbon source

### 3 讨论

同型产乙酸菌以  $H_2/CO_2$  为底物时, 分别通过甲基支路和羰基支路固定两分子  $CO_2$  合成一分子乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 转化为乙酰磷酸并最终转化成乙酸, 该过程中  $H_2$  提供电子, 反应方程式为<sup>[16-18]</sup>:

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O.$$

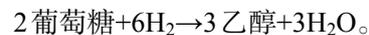
同型产乙酸菌以  $CO$  为底物时, 一方面,  $CO$  可在一氧化碳脱氢酶作用下氧化成  $CO_2$ , 再通过甲基和羰基支路固定合成乙酰辅酶 A 并逐步生成乙酸; 另一方面,  $CO$  可与甲基、辅酶 A 在一氧化碳脱氢酶作用下直接合成乙酰辅酶 A, 再逐步转化生成乙酸<sup>[19]</sup>. 该过程中  $CO$  同时为同型产乙酸菌生长提供了电子供体和碳源. 有研究报道部分同型产乙酸菌例如 *Clostridium aceticum* 和 *Moorella thermoacetica* 等均能以  $CO$  气体为唯一碳源进行生长<sup>[10,20]</sup>.

BXX 菌株以  $H_2/CO_2$  为底物时, 消耗顶空  $H_2$  气体 7.63 mmol/L, 理论生成乙酸 1.90 mmol/L, 而实际获得乙酸 1.98 mmol/L. 菌株 BXX 利用  $H_2/CO_2$  为底物生成乙酸的转化率为 104.00%. 以纯  $CO$  气体为底物时, BXX 菌体不能生长, 但以合成气为底物时可进行自养生长, 消耗  $CO$  气体 4.41 mmol/L, 共消耗  $H_2$  气体 8.12 mmol/L.

同型产乙酸菌以葡萄糖为底物时, 1 mol 葡萄糖通过糖酵解氧化生成 2 mol 丙酮酸并进一步氧化生成 2 mol 乙酰辅酶 A, 再转化成乙酸. 该反应产生的额外 2 mol 的  $CO_2$  和 8 mol 的  $[H]$  通过乙酰辅酶 A 途径进一步转化为 1 mol 乙酸<sup>[21]</sup>. 据此推断, 当产物为乙酸时, 同型产乙酸菌菌株利用 1 mol 葡萄糖共生成 3 mol 乙酸, 反应方程式为<sup>[22]</sup>:



反应式中的  $CO_2$  是细菌生长的第二底物, 反应实质是混合营养过程<sup>[6]</sup>. 研究表明, 并非所有同型产乙酸菌都产生乙酸作为终产物<sup>[23]</sup>. 如 *Clostridium autoethanogenum* 转化  $CO$  生成乙醇, *Clostridium ljungdahlii* 以合成气为唯一碳源时则生成乙醇和乙酸<sup>[23-24]</sup>. 当以葡萄糖为底物、产物为乙醇时, 只生成 2 mol 乙醇. 这是因为水解 1 mol 葡萄糖生成 2 mol 乙醇的同时释放两分子的  $CO_2$ , 但受限于氧化还原平衡, 2 mol  $CO_2$  无法继续与  $[H]$  反应生成第三分子的乙醇. 因此, 要想最大限度获取乙醇, 可顶空冲入  $H_2$  提供还原力, 此时的反应方程式为<sup>[25-26]</sup>:



BXX 菌株以葡萄糖为底物(顶空不充入  $H_2$ )异养生长时主要产物为乙醇. 因此, 1 mol 葡萄糖仅生成 2 mol 的乙醇, 即消耗葡萄糖  $1.53 \times 10^{-1}$  mmol 理论上产生乙醇  $3.06 \times 10^{-1}$  mmol. 乙醇实际产量为  $2.52 \times 10^{-1}$  mmol, 因而以葡萄糖为底物时生成乙醇的转化率为 82.6%.

自养生长指数期内细菌增长速度可达  $6.03 \times 10^4$  个/(mL·h), 异养生长指数期内细菌增长速度为  $3.67 \times 10^5$  个/(mL·h). 因此, 与自养生长相比, BXX 具有更强的异养生长能力.

同型产乙酸菌代谢底物多样化, 不同菌株代谢能力的差异或不同的环境条件都会改变产物的产量和组成<sup>[5]</sup>. 与多数同型产乙酸菌相比, 菌株 BXX 葡萄糖异养生长的乙醇转化率较低,  $H_2/CO_2$  自养生长的乙酸转化率较高(表 1). 此外, 菌株在中温和中

表 1 同型产乙酸菌不同菌株对 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、葡萄糖的转化情况Table 1 Transformation of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> and glucose by different strains of acetogens

菌种 Strains	底物 Substrate	主要产物 Main product	底物转化率 Carbon recovery (%)
<i>Clostridium</i> sp. BXX	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetate	104.00
<i>Acetobacterium malicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetate	95.00
<i>Acetonea longum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetate	102.20
<i>Acetanaerobium noterae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetate	117.00
<i>Clostridium mayombei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetate	91.65
<i>Clostridium</i> sp. BXX	Glucose	Ethanol	82.60
<i>Acetobacterium woodii</i>	Glucose	Acetate	92.00–95.00
<i>Clostridium magnum</i>	Glucose	Acetate	106.80
<i>Acetonea longum</i>	Glucose	Acetate	99.30
<i>Clostridium mayombei</i>	Glucose	Acetate	85.50

性 pH 培养条件下生长良好, 代谢底物广泛, 耐盐性较高。因此, 与多数已知同型产乙酸菌相比, 菌株 BXX 是乙酸发酵的优良菌种资源, 在以生物发酵气(主要成分为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>)、工业燃料废气(主要为 CO<sub>2</sub>)和合成气(主要成分为 CO、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>)生产乙酸等方面具有工业应用潜力<sup>[5]</sup>。

#### 4 结论

(1) *Clostridium* sp. 菌株 BXX 是一株中温、中性 pH、耐盐环境下生长的同型产乙酸菌。该菌株能以 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、合成气、葡萄糖、1,2-丙二醇、甲酸钠、乙二醇甲醚和甘油为唯一碳源进行生长, 不能以纯 CO、丙酮酸和乳酸为唯一碳源进行生长。

(2) BXX 菌株自养生长时主要生成乙酸, 异养生长时主要生成乙醇。从指数期内细菌增长速度和底物转化率水平来看, BXX 菌株具有更强的异养生长能力。

(3) BXX 菌株是乙酸发酵的优良菌种资源, 有较好的工业应用潜力。

#### REFERENCES

- [1] Wood HG, Ljungdahl LG. Autotrophic character of the acetogenic bacteria[A]//Variations in Autotrophic Life[M]. San Diego, CA: Academic Press, 1991: 201-250
- [2] Fast AG, Schmidt ED, Jones SW, et al. Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 60-72
- [3] You LJ. Isolation of homoacetogenic bacteria and research on their ecophysiology[D]. Harbin: Master's Thesis of Institute of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)  
尤立剑. 同型产乙酸菌的分离纯化及生理生态研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2013
- [4] Guo W, Liu C, Zou SL, et al. Progress in research and application of homoacetogen[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(6): 874-877 (in Chinese)  
郭蔚, 刘成, 邹少兰, 等. 同型乙酸菌研究进展及应用前景[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 874-877
- [5] Liu C. Multiple taxonomy of a novel homoacetogen *Blautia coccoides* strain GA-1 and its metabolic mechanism in mixotrophism[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Institute of Harbin Institute of Technology, 2016 (in Chinese)  
刘崇. 同型产乙酸菌 *Blautia coccoides* GA-1 的多相分类学鉴定及混合营养代谢机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2016
- [6] Schuchmann K, Müller V, Stams AJM. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(14): 4056-4069
- [7] Drake HL, Küsel K, Matthies C. Acetogenic Prokaryotes[M]. New York: Springer, 2006: 354-420
- [8] Curry SR. *Clostridium difficile*[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 1987, 41(4): 198
- [9] Mechichi T, Labat M, Woo THS, et al. *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester[J]. Anaerobe, 1998, 4(6): 283-291
- [10] Braun K, Gottschalk G. Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium acetum*[J]. Archives of Microbiology, 1981, 128(3): 294-298
- [11] Tanner RS, Miller LM, Yang DC. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, 43(2): 232-236

- [12] Schink B. *Clostridium magnum* sp. nov., a non-autotrophic homoacetogenic bacterium[J]. Archives of Microbiology, 1984, 137(3): 250-255
- [13] Andreesen JR, Gottschalk G, Schlegel HG. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*[J]. Archives of Microbiology, 1970, 72(2): 154-174
- [14] Xu KW, Liu H, Du GC, et al. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments[J]. Anaerobe, 2009, 15(5): 204-213
- [15] Liu XL, Liu H, Chen YY, et al. Effects of organic matter and initial carbon-nitrogen ratio on the bioconversion of volatile fatty acids from sewage sludge[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2008, 83(7): 1049-1055
- [16] Wieringa KT. Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1936, 3(1/4): 263-273
- [17] Wieringa KT. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1939, 6(1): 251-262
- [18] Drake HL, Gößner AS, Daniel SL. Old acetogens, new light[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1125(1): 100-128
- [19] Drake HL, Horn MA, Wüst PK. Intermediary ecosystem metabolism as a main driver of methanogenesis in acidic wetland soil[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(5): 307-318
- [20] Drake HL, Daniel SL. Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*[J]. Research in Microbiology, 2004, 155(10): 869-883
- [21] Ragsdale SW. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate[J]. Chemical Reviews, 2003, 103(6): 2333-2346
- [22] Fontaine FE, Peterson WH, McCoy E, et al. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1942, 43(6): 701-715
- [23] Abrini J, Naveau H, Nyns EJ. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide[J]. Archives of Microbiology, 1994, 161(4): 345-351
- [24] Köpke M, Held C, Hujer S, et al. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(29): 13087-13092
- [25] Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, et al. eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1): D770-D775
- [26] Noor E, Haraldsdóttir HS, Milo R, et al. Consistent estimation of gibbs energy using component contributions[J]. PLoS Computational Biology, 2013, 9(7): e1003098