

甲酸盐和分子氢在丙酸和丁酸互营降解中的作用

东 秀 珠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

大分子有机物矿化为甲烷和 CO_2 的过程由发酵细菌、互营产乙酸细菌和产甲烷细菌共同完成。丙酸盐和丁酸盐是两个重要的中间代谢产物，由它们降解所产生的甲烷占全部甲烷生成量的 35% 和 8%。互营产乙酸细菌和产甲烷菌协同作用将丙酸盐和丁酸盐转化为甲烷和 CO_2 。种间分子氢转移和甲酸盐转移被认为是这个互营降解的机制，通过它们将丙、丁酸氧化中产生的还原当量传递给产甲烷细菌。由于厌氧环境及互营共培养物中的 H_2 和甲酸盐的含量很低，直接测定十分困难，因此究竟是 H_2 转移还是甲酸盐转移起主要作用目前仍不清楚。本文综述有关文献，从生理生化研究结果揭示 H_2 和甲酸盐转移在丙酸和丁酸互营降解中的相对重要性。

1 产甲烷环境中有机物的矿化

在产甲烷环境中，复杂的有机物矿化为碳的最高氧化态 CO_2 和碳的最高还原态 CH_4 是分步完成的。多种生理群的细菌参与此过程，产甲烷菌是这个厌氧食物链的终端微生物。

在产甲烷过程中，有机物大分子首先由发酵微生物水解并发酵为产甲烷的前体—— H_2 、 CO_2 、甲酸盐和乙酸盐，以及还原性有机物——丙酸、丁酸、乳酸和醇类。这些还原性有机物由产乙酸细菌进一步氧化为产甲烷的底物如 H_2 、甲酸盐和乙酸盐^[1,2]，最终产甲烷菌才能合成甲烷。图 1 表明，大约 76% 的有机物是

通过还原性中间物而降解的^[3,4]。在产甲烷环境中，乙酸产生是有机物矿化的关键步骤。

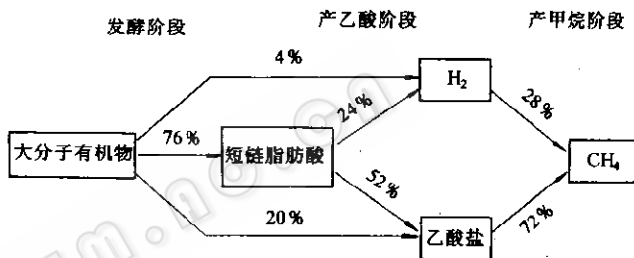


图 1 产甲烷状态下复杂有机物的矿化及矿化过程中能量的分配

2 互营降解

互营现象定义为生物的生长和代谢完全相互依赖、协同完成^[5]。在产甲烷生境中，几乎所有的产乙酸反应都是由专性互营培养物来完成^[2,5]。原因是这些化合物的氧化反应，或者至少有一步中间过程从能量学上是难以发生的，其产物 H_2 或甲酸盐须由产甲烷菌消耗掉才能“拉”着反应进行。因而低浓度的 H_2 和甲酸盐是互营反应的前提条件。互营氧化过程中可耐受的 H_2 和甲酸盐的最高浓度取决于其反应的热力学。如丙酸、丁酸氧化可耐受的 H_2 分压分别为 14.5

1995-04-14 收稿

和45Pa, 而乙醇氧化可耐受2500Pa。产甲烷菌能高效地代谢H₂和甲酸盐, 使它们的浓度低达约10Pa和10 μ mol/L^[67], 因而是互营降解中的理想伙伴。

3 互营培养物中H₂和甲酸盐的流量

由于互营反应由两种以上的生物群完成, 所以种间的物质转移是必要的。其反应速度取决于H₂或甲酸盐的流量(J); 而流量又取决于扩散系数(D)、产H₂/甲酸盐细胞与耗H₂/甲酸盐细胞之间的H₂/甲酸盐(C)梯度和扩散距离(d)及产H₂/甲酸盐细胞的表面积(A)。流量可用简单的Fick's扩散方程来表示^[8]:

$$J = -A \cdot D \cdot \frac{C_2 - C_1}{d} \text{ mol} \cdot \text{sec}^{-1}$$

在互营降解中, 细菌之间的聚合和排列似乎是很重要的, 因为当细菌密集时减小了扩散距离。UASB(上流厌氧污泥床)反应器之所以能高效地产生甲烷是因为含有高密度生物量的颗粒污泥。产甲烷污泥颗粒的破碎使丙酸降解的速度降低了90%^[9]。用透析膜分隔乙醇氧化菌和耗H₂细菌导致了培养物的倍增时间从7h增加到11h^[10]; 而在降解丙酸和丁酸的互营培养物中通过增加生物量而缩短细胞间的距离则增加了甲烷的生成率。

H₂和甲酸盐的梯度是影响其流量的另一个因素。如前所述, 互营产乙酸菌能够达到的最高H₂和甲酸盐浓度取决于反应的热力学, 而耗H₂(甲酸盐)菌可利用H₂/甲酸盐的最低阈值也取决于反应的热力学。产甲烷菌利用H₂的阈值为3~16Pa^[6,11~14], 而硫酸盐还原菌为1~3Pa。丙酸盐降解菌、丁酸盐降解菌和苯甲酸降解菌当与产甲烷菌共培养时, 其最高生长速率分别为0.10、0.19和0.10/d; 而当与硫酸盐还原菌共培养时分别为0.19、0.31和0.13/d^[14~16]。这些差异可解释为H₂梯度的差异造成的。

4 种间H₂转移

自从Bryant 1967年发现原来命名的澳氏产甲烷杆菌(*Methano bacillus Omelianskii*)实际是由氧化乙醇的S菌株和布氏产甲烷杆菌(*Methanobacterium bryantii*)组成之后, 他就设想H₂转移可能在互营降解中起着作用^[17]。Hungatt第一个证明了H₂是瘤胃发酵过程中的中间代谢物之一^[18], 由此导致了有机物厌氧消化三步理论的建立。Wolin又发展了种间H₂转移

的理论^[19]。支持此理论的证据如在氧化乙醇的澳氏产甲烷杆菌中^[17]、在降解丁酸的沃氏互营单胞菌(*Syntrophomonas wolfei*)共培养物中^[20]以及在一个嗜热的丙酸氧化培养物^[13]中, 只有耗H₂细菌存在。的确, 在这些培养物中H₂的分压可维持在热力学允许的范围之内。在一个互营降解乙醇的培养物中H₂分压在500~2000Pa之间^[10], 而在一个嗜热丙酸氧化共培养物中H₂分压只有30~34Pa^[13], 丁酸氧化的共培养物中H₂分压也只有95Pa^[11]。如果在丙、丁酸降解的共培养物中加入H₂则会抑制它们的降解^[21,22]。

5 种间甲酸盐转移

1967年Bryant首先提出了甲酸盐可能是互营降解中的另一个电子载体^[17], 而Thiele和Zeikus认为甲酸盐转移可能比H₂转移更重要^[23]。他们发现在有些厌氧生态系中, 其主要的甲烷菌群的H₂阈值比此环境中测到的H₂分压人约高6倍^[24], 因而H₂转移是不可能发生的。甲酸盐转移理论基于以下事实: (1)共培养物中许多耗H₂菌也能利用甲酸盐; (2)H⁺/H₂和HCO₃⁻/甲酸盐的氧化还原电势几乎相同; (3)有些互营产乙酸菌在互营降解中也产生甲酸盐。

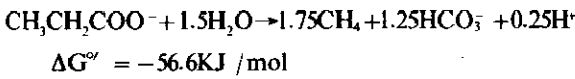
尽管沃氏互营单胞菌在与布氏产甲烷杆菌(只利用H₂的产甲烷菌)共培养时能够降解丁酸, 但当与亨氏甲烷螺菌(可利用H₂和甲酸盐的产甲烷菌)共培养时丁酸的降解速度和生长速度均有提高^[15]。而且亨氏甲烷螺菌常出现在互营共培养物中。在含有巴氏脱硫弧菌(*Desulfovibrio baarsii*)共培养物中甲酸盐转移是很明显的^[25], 因为此细菌只利用甲酸盐而不利用H₂。Thiele和Zeikus在一个处理乳清的微生物絮块中发现, 在乙醇互营转化为甲烷时有甲酸盐生成, 而且甲酸盐的积累取决于CO₂和乙醇的浓度, 而与H₂无关^[23]。1989年Boone等用一个沃氏互营单胞菌和产甲烷杆菌的共培养物的扩散模型得到了支持甲酸盐转移的证据^[12]。他们计算出甲酸盐在此共培养物中的扩散速度能够说明甲烷的生成速率, 而H₂的扩散速度却不能。然而Schink认为物质在种间转移时不但要通过培养介质水相, 而且必须通过细胞膜。这样无极性小分子的H₂更为容易, 因而H₂转移有可能更重要^[1]。

迄今仍不明确H₂转移还是甲酸盐转移在互营降解中更为重要。可能在同一个系统中二者同时发

生^[15], 或者在生物细胞聚集结构中 H₂ 转移起主要作用, 而在细胞分散的悬液中甲酸盐转移是主要的^[2]. 因为在降解丙酸的颗粒污泥中只利用 H₂ / CO₂ 的甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter*) 是主要的产甲烷菌^[9], 而在悬液培养物中它却不能启动布氏互营生孢菌和一个中温丙酸氧化菌 (MPOB) 降解丁酸和丙酸^[26,27].

6 丙酸氧化

丙酸是有机物矿化过程中一个重要的中间代谢物, 占甲烷生成量的 35%^[1]. 一个分子的丙酸完全降解为甲烷和 CO₂ 可释放出 56.6KJ 的自由能, 这恰是合成一个 ATP 所需的能量^[5].



整个过程由三类细菌完成: 产乙酸细菌降解丙酸产生 H₂ / 甲酸盐和乙酸, 而 H₂ / 甲酸盐和乙酸盐又分别由耗 H₂ / 甲酸盐的产甲烷菌和利用乙酸的产甲烷菌转化为甲烷. 因此由丙酸转化为甲烷的能量须被三种细菌分配利用.

迄今, 只有少数几个丙酸氧化的培养物见诸报道. 沃镰氏互营杆菌 (*Syntrophobacter wolinii*) 是第一个报道的丙酸氧化菌^[14]. 它来自城市污泥厌氧反应器的产甲烷富集物中, 并已分离到它与脱硫弧菌的人工共培养物. 最近才得到了沃镰氏互营杆菌和亨氏甲烷螺菌的共培养物^[28]. 1993 年 Siams 等报道了另一个中

温丙酸氧化菌 (MPOB) 与甲烷螺菌的共培养物^[29], 并在延胡索酸液中得到了这个菌的纯培养物. 当产甲烷菌不存在时, 这个菌有以下特征: (1) 以 H₂ 或甲酸盐为电子供体将延胡索酸还原为琥珀酸; (2) 发酵延胡索酸为琥珀酸和 CO₂; (3) 以延胡索酸为电子受体氧化丙酸. 16S rRNA 序列分析表明, 沃镰氏互营杆菌和 MPOB 与硫酸盐还原菌有一定的亲缘关系^[30]. 这两个细菌都能将丙酸氧化与硫酸盐还原相偶联.

通过与已知的产甲烷菌组成人工共培养物, 发现 MPOB 只有在和既利用 H₂ 又利用甲酸盐的产甲烷菌, 如亨氏甲烷螺菌共培养时能够互营降解丙酸; 而在只利用 H₂ 的甲烷菌如甲烷短杆菌的共培养物中无此能力^[27]. MPOB 降解丙酸时可产生的最高 H₂ 分压和甲酸盐浓度分别为 6.8Pa 和 24μmol / L. 用扩散方程^[8] 计算得知, 在 MPOB 与亨氏甲烷螺菌的共培养物中, 甲酸盐的流量比 H₂ 的约大 100 倍^[31], 说明甲酸盐转移在丙酸降解中起主要作用.

¹³C 和 ¹⁴C 标记的丙酸实验表明, 丙酸通过一个随机途径氧化^[32]. 有人提出了如图 2 所示的丙酸氧化途径, 与 *Desulfobulbus Propionicus* 的相似^[34]. 沃镰氏互营杆菌和 MPOB 的酶学测定确证了互营丙酸氧化是通过甲基丙二酸单酰辅酶 A (Methyl-malonyl-CoA) 途径完成的^[35, 36]. 首先丙酸被活化成为丙酰辅酶 A, 之后三对还原当量分别从琥珀酸氧化为延胡索

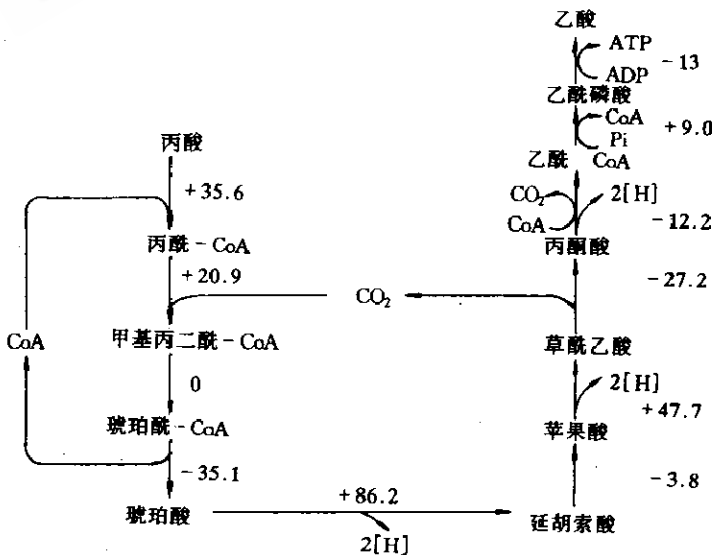


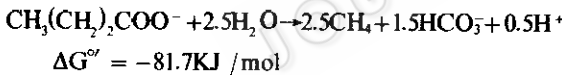
图 2 丙酸互营氧化的途径及当氧化反应与质子还原相偶联时各个中间代谢步骤的自由能变化(KJ / mol)

酸、苹果酸氧化为草酰乙酸及丙酮酸氧化为乙酰辅酶A中释放出来。延胡索酸 / 琥珀酸的氧化还原电势为 +30mV, 而 H^+ / H_2 和 $HCO_3^- / HCOO^-$ 的分别是 -414 和 -432mV。要使琥珀酸的氧化偶联于 H_2 和甲酸盐的形成, H_2 和甲酸盐的水平须低于 $10^{-9}Pa$ 和 $10^{-8}\mu mol / L$, 这个值远远低于耗 $H_2 /$ 甲酸盐的产甲烷菌所能维持的水平。因此一个电子反转移机制被提了出来, 并假设 2 / 3 的 ATP 用于这个电子转移^[2]。电子反转移机制已在一个羟基乙酸的互营降解培养物、丁酸氧化菌——沃氏互营单胞菌及一个氧化乙酸的硫酸盐还原菌 *Desulfuromonas acetoxidans* 中得到了证实^[37-39]。

丙酸氧化中的氧化还原酶在 MPOB 细胞中的定位表明, 在丙酸氧化过程中, 电子释放在细胞膜内发生, 甲酸盐在膜外形成, H_2 的形成部位尚不明确。酶定位的结果支持电子反转移机制的存在。甲酸盐在细胞膜外形成也为甲酸盐转移理论提供了依据^[40]。

7 丁酸氧化

丁酸是厌氧环境中生物大分子矿化的另一个重要的中间代谢物。它占全部甲烷生成量的 8%^[1]。与丙酸转化相同, 丁酸矿化为甲烷和 CO_2 也需要 3 种不同的细菌: 氧化丁酸的产乙酸菌、利用 $H_2 /$ 甲酸盐的产甲烷菌和利用乙酸盐的产甲烷菌。整个反应如下:



Schink 和 Thauer^[8] 曾设想, 丁酸氧化中每一部分反应所产生的自由能约为 20KJ, 因而反应中的每一类细菌只可以利用 20KJ 的能量。

已有几个丁酸氧化菌被分离和报道。它们是至今了解的较为清楚的专性互营菌。在 16S rRNA 序列分析的基础上, 已建立了一个细菌的新科——互营单胞菌科^[41]。沃氏互营单胞菌是第一个被描述的丁酸氧化菌^[15, 20]。这是个不产芽孢的革兰氏阴性的中温厌氧菌, 在与产甲烷菌共培养时降解 $C_4 \sim C_{18}$ 的直链脂肪酸。布氏互营生孢菌 (*Syntrophospora bryantii*) 是一个产生芽孢的丁酸降解菌, 能够降解 $C_4 \sim C_{10}$ 的脂肪酸^[242]。另外还有丁酸降解培养物的报道, 如嗜皂互营单胞菌 (*Syntrophomonas sapovorans*)^[43] 及与嗜热自养甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) 互营的嗜热丁酸降解菌^[44]。另有一个与甲酸甲烷杆菌及梅氏甲烷

八叠球菌 (*Methanosacina mazei*) 共培养的异丁酸降解菌^[45], 它能使丁酸和异丁酸可逆性地异构并将其降解为乙酸。

这些互营菌能在不饱和的短链脂肪酸上纯培养。用巴豆酸作为底物已得到了沃氏互营单胞菌和布氏互营生孢菌的纯培养物^[42, 45]。这两个菌都能发酵巴豆酸产生丁酸和乙酸。沃氏互营单胞菌可将丁酸氧化与不饱和烷烃相偶联^[46], 而布氏互营生孢菌可以 Pentenoate 为电子受体还原丁酸^[27]。与丙酸降解相似, 布氏互营单胞菌只有和利用甲酸的产甲烷菌共培养时才降解丁酸^[27]。它从丁酸氧化产生的 H_2 和甲酸盐的最高浓度分别为 170Pa 和 $280\mu mol / L$ 。经计算, 在产甲烷菌的共培养物中, 甲酸盐的流量比 H_2 的大 100 倍^[31]。这些结果表明, 在丁酸互营降解中甲酸盐转移也比 H_2 转移重要。

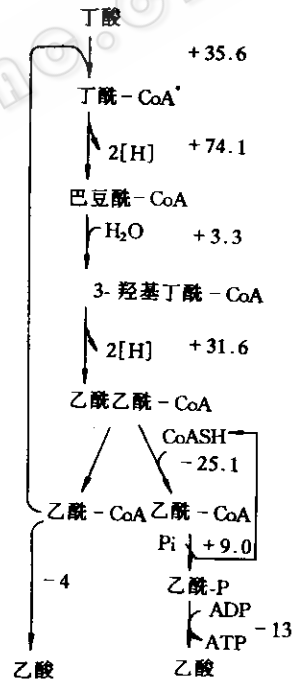


图3 丁酸互营氧化的途径及当氧化反应与质子还原相偶联时各个中间代谢步骤的自由能变化(KJ/mol)

互营丁酸氧化通过巴豆酰辅酶A途径完成(图3), 这个途径的存在已在沃氏互营单胞菌和布氏互营生孢菌中证实^[47, 2]。丁酸首先被活化为丁酰辅酶A, 最终生成两个分子的乙酸。两对还原当量分别在丁酰辅酶A氧化为巴豆酰辅酶A和3-羟基丁酰辅酶A氧化为

乙酰乙酰辅酶A时形成。一个ATP在乙酸激酶一步合成。由于这些还原当量分别在氧还电势为 -126Mv (丁酰辅酶A脱氢酶)和 -190Mv (3-羟基丁酰脱氢酶)时产生,如果它们以 H_2 和甲酸盐(氧还电势分别是 -414 和 -426Mv)形式出现,则 H_2 和甲酸盐的浓度必须低于 10^{-8}Pa 和 $10^{-7}\mu\text{mol/L}$ 时,丁酸氧化才能发生。Thauer和Morris曾设想,丁酸氧化菌利用ATP去驱动一个电子反转移反应,用于在低氧还电势时的电子释放^[48]。已证明沃氏互营单胞菌的丁酰辅酶A脱氢酶和氯化酶部分位于细胞膜上,而且 H_2 从丁酸氧化的产生可被一个质子偶联解链剂(CCCP)或ATP酶抑制剂(DCCD)所抑制^[28, 38]。这些发现都支持电子反转移机制在丁酸氧化中的存在。同时,丁酸降解中氧化还原酶在布氏互营单胞菌中的定位也支持以上假说。由丁酸氧化产生的电子在细胞膜内释放,然后被转移至细胞膜外侧还原碳酸氢盐形成甲酸盐;电子也在细胞质中偶联于质子产生 H_2 。甲酸盐在细胞膜外形成,不存在经脂相扩散到水相(培养液)的问题^[49]。这个发现为丁酸互营降解中甲酸盐转移的重要性提供了依据。

8 小结

尽管种间分子氢转移和种间甲酸盐转移都被认为是互营降解的可能机制,但二者在不同的环境中的相对重要性不同。

互营降解由两个以上的生理菌群完成,偶联两种细菌之间的物质—— H_2 /甲酸盐的流量大小决定了互营降解的速度,而 H_2 /甲酸盐的流量又取决于其扩散距离、梯度和扩散系数。由于 H_2 在水中溶解度低,在细胞均匀分布的悬液中甲酸盐转移占主导地位;而在细胞密集的结构(如颗粒污泥)中 H_2 转移显得更重要,因为当穿过脂相的细胞膜时,小分子的 H_2 占有优势。

丙酸和丁酸是大分子有机物矿化中两个重要的中间代谢物。它们的氧化是高度的吸能反应,只能靠互营降解完成。丙酸和丁酸氧化途径中的氧化还原酶在细胞中的定位表明,在丙酸和丁酸的氧化过程中电子在细胞内释放,经过一个电子反转移机制将电子传递到细胞膜外还原 HCO_3^- 形成甲酸盐或还原质子产生 H_2 。甲酸盐在细胞膜外产生为甲酸盐转移机制的存在提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Mah R A, Xeu I Y, Boone D R, *et al*. Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer. Plenum press, New york, 1990, 99 ~ 119.
- [2] Stams A J M, Antonie van Leeuwenhoek, 1994, 66: 271 ~ 294.
- [3] Toerien D F, Hattingh W H J. Water Research, 1969, 3: 385 ~ 416.
- [4] Zehnder A J B. Water pollution microbiology, vol. 2. John Wiley and Sons, London. 1978, 349 ~ 376.
- [5] Schink B. The Prokaryotes. Spinger Verlag, New York, 1992, 276 ~ 299.
- [6] Cord-Ruwisch R, Seitz H J, Conrad R. Arch Microbiol, 1988, 149: 350 ~ 357.
- [7] Schauer N L, Brown D P, Ferry J G. Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 540 ~ 554.
- [8] Schink B, Thauer R K. Granular anaerobic sludge, Microbiology and Technology, Pudoc, Wageningen. 1988, 5 ~ 17.
- [9] Grotenhuis J T C, Smit M, Plugge C M, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 1942 ~ 1949.
- [10] Stieb M, Schink B. FEMS Microbiol Ecol, 1987, 45: 71 ~ 76.
- [11] Dwyer D F, Weeg-Aerssens E, Shelton D R, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 1354 ~ 1359.
- [12] Boone D R, Johnson R L, Liu Y. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 1735 ~ 1741.
- [13] Stams A J M, Grolle K C F, Frijters, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 346 ~ 352.
- [14] Boone D R, Bryant M P. Appl Environ Microbiol, 1980, 40: 626 ~ 632.
- [15] McInerney M J, Bryant M P, Pfennig N. Arch Microbiol, 1979, 122: 129 ~ 135.
- [16] Mountfort D O, Bryant M P. Arch Microbiol, 1982, 133: 249 ~ 256.
- [17] Bryant M P, Wolin E A, Wolfe R S. Arch Microbiol, 1967, 59: 20 ~ 31.
- [18] Hungate R E. Arch Microbiol, 1967, 59: 158 ~ 164.
- [19] Wolin M J, Microbiol interaction and communities. Academic Press, London, 1982, 323 ~ 356.
- [20] McInerney M J, Bryant M P, Hespell R B, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1981, 41: 1029 ~ 1039.
- [21] Fukuzaki S, Nishio N, Shobayshi M, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 719 ~ 723.
- [22] Ahring B K, Westermann P. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 2393 ~ 2397.
- [23] Thiele J H, Zeikus J G. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 20 ~ 29.
- [24] Thiele J H, Chartrain M, Zeikus J G. Appl Environ

- Microbiol, 1988, **54**: 10 ~ 19.
- [25] Zindel U, Freudenberg W, Reith M, *et al.* Arch Microbiol, 1988, **150**: 254 ~ 266.
- [26] Dong X, Plugge C M, Stams A J M. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 2834 ~ 2838.
- [27] Dong X, Cheng G, Stams A J M. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, **42**: 647 ~ 652.
- [28] Doener C. Dissertation, University of Tuebingen, Germany, 1992.
- [29] Stams A J M, Van Dijk J, Dijkema C, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 1114 ~ 1119.
- [30] Harmsen H J M, Kengen H M P, Akkermans A D L, *et al.* Syst Appl Microbiol, 1995, **18**: 67 ~ 73.
- [31] Dong X, Stams A J M. Anaerobe, 1993, **1**: 35 ~ 39.
- [32] Koch M E, Dolfing J, Wuhmann K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1983, **45**: 1411 ~ 1414.
- [33] Houwen F P, Dijkema C, Stams A J M, *et al.* Biochim Biophys Acta, 1991, **1056**: 126 ~ 132.
- [34] Stams A J M, Hansen T A. Arch Microbiol, 1984, **137**: 329 ~ 337.
- [35] Houwen F P, Plokker J, Dijkema C, *et al.* Arch Microbiol, 1990, **155**: 52 ~ 55.
- [36] Plugge C M, Dijkema C, Stams A J M. FEMS Microbiol Lett, 1993, **110**: 71 ~ 76.
- [37] Friedrich M, Schink B. Eur J Biochem, 1993, **217**: 233 ~ 240.
- [38] Wallrabenstein C, Schink B. Arch Microbiol, 1994, **162**: 136 ~ 142.
- [39] Paulsen J, Kroeger A, Thauer R K. Arch. Microbiol, 1986, **144**: 78 ~ 83.
- [40] Dong X, Stams A J M. FEMS Microbiol Lett. (Accepted) 1995.
- [41] Zhao H, Yang D, Woese C R, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1993, **43**: 278 ~ 286.
- [42] Zhao H, Yang D, Woese C R, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1990, **40**: 40 ~ 44.
- [43] Roy F, Samain E, Dubourgauier H C, *et al.* Arch Microbiol, 1986, **145**: 142 ~ 147.
- [44] Ahring B K, Westermann P. Appl Environ Microbiol, 1987, **53**: 429 ~ 433.
- [45] Jain M K, Wu W M, Zeikus J G. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 1989, 0 ~ 52.
- [46] Beaty P S, McInerney M J. Arch Microbiol, 1987, **147**: 389 ~ 393.
- [47] Wofford N Q, Beaty P S, McInerney M J. J Bacteriol, 1986, **167**: 179 ~ 185.
- [48] Thauer R K, Morris J G. The microbe 1984 part 2, Cambridge, 1984, 12 ~ 168.
- [49] Dong X, Stams A J M. Antoine van Leeuwenhoek, 1995, **67**: 345 ~ 350.