

氯仿处理厌氧污泥发酵制氢中微生物多样性的解析

金大为 孙庆业 石先阳*

(安徽大学生命科学学院 安徽省生态工程与生物技术重点实验室 安徽 合肥 230039)

摘要: 研究了不同浓度氯仿对厌氧污泥产氢及其微生物多样性的影响。在氯仿浓度为 0.050% 时, 累积氢、氢气产率、VFA 和总糖降解率均达到最大, 分别为 639 mL、1.71 mol H₂/mol 消耗葡萄糖、2880 mg/L 和 85%。利用 PCR-DGGE 技术对不同浓度氯仿处理的污泥样品中微生物多样性和种群结构进行分析显示, 4 个细菌克隆属于 *Clostridia*, 2 个细菌克隆分别属于 *Acidobacteria* 和 δ -*proteobacteria*, 其他 4 个均属于不可培养细菌。*Clostridia* 中的 4 个菌群均属产氢菌群, 条带 7 中含有的细菌可能属于 HPB。发酵产氢后的污泥样品 C₃ (氯仿浓度 = 0.05%) 中细菌类型主要有: *Megasphaera sueciensis*、*Megasphaera paucivorans*、*Clostridium cellulosi*、*Clostridium* sp. 和不可培养细菌, 为最适产氢群落结构。

关键词: 厌氧产氢, 氯仿处理, PCR-DGGE, 产氢菌

Microbial Diversity Analysis of Anaerobic Sludge with Chloroform Treatment for Fermentive H₂ Production

JIN Da-Wei SUN Qing-Ye SHI Xian-Yang*

(Anhui Key Laboratory of Eco-engineering and Bio-technique, School of Life Science, Anhui University, Hefei, Anhui 230039, China)

Abstract: The effects of different CHCl₃ concentrations treatment on fermentative H₂ production and microbial diversity of anaerobic sludge were investigated. At CHCl₃ concentration of 0.050%, the cumulative H₂, maximum H₂ yield, VFA concentration and total sugar degradability all reached the maximum and were 639 mL, 1.71 mol H₂/mol consumed glucose, 2880 mg/L and 85%, respectively. The microbial diversity and community structure of sludge samples with different CHCl₃ concentrations treatment were analyzed by applying PCR-DGGE. The results showed that 4 bacteria clones belonged to *Clostridia*, 2 bacteria clones belonged to *Acidobacteria* and δ -*proteobacteria*, respectively, and other 4 bacteria clones were uncultured bacterium. All 4 microbes that belonged to *Clostridia* were H₂-producing bacteria (HPB) and bacteria of band 7 might belong to HPB. The optimum microbial community structure for H₂ production was observed

in sample C₃, which mainly contained *Megasphaera sueciensis*, *Megasphaera paucivorans*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium* sp. and uncultured bacterium.

Keywords: Anaerobic H₂ production, CHCl₃ treatment, PCR-DGGE, H₂-producing bacteria (HPB)

厌氧发酵制氢具有产氢速率快、不需要光能、反应器运行操作便利且能利用多种废弃物等优势,因而实用性强,具备产业化前景^[1]。产氢接种污泥为多种微生物的混合体,在厌氧发酵过程中,产氢菌产生的氢气易为嗜氢菌所利用,从而降低厌氧发酵产氢效率^[2]。大量研究证实^[3-4],对接种污泥进行预处理,能有效提高厌氧发酵产氢效能。

目前的方法有热处理,酸、碱处理,超声、微波处理,有机抑制剂处理^[2-3]等。其中采用有机溶剂如氯仿处理具有能快速抑制接种污泥中产甲烷菌活性、操作简便、对污泥中某些微生物类群如 HPB (H₂-producing bacteria, HPB)具有选择作用等优点,而受到广泛关注^[5]。但目前的相关研究中对氯仿处理污泥中微生物多样性的变化进行系统分析的报道仍较少,而污泥产氢效果与其菌群多样性密切相关。因此,本文运用 PCR-DGGE 技术,研究不同浓度氯仿处理厌氧污泥中的微生物种群多样性及初步的优势度;为最适发酵产氢微生物群落的构建和厌氧产氢效率的提高提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 接种污泥与产氢实验

厌氧污泥取自处理柠檬酸生产废水的内循环反应器,接种在文献[6]所报道的培养基中以维持其良好的生物活性。在 6 个容积为 600 mL 的玻璃反应器中,分别加入 100 mL 的厌氧污泥;然后再加入 3.0 g 葡萄糖与 0.3 mL 营养液^[7],定容至 300 mL, pH 调至 7.0;向反应器中充高纯氩气 2 min 以驱走其内空气,迅速用橡胶塞密封;按质量百分比 0、0.025%、0.050%、0.075%、0.100%、0.150% (发酵产氢结束后的污泥样品分别记为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅ 和 C₆,未进行厌氧发酵制氢的接种污泥样品记为 Y)的比例用微量进样器注入氯仿溶液,然后放入 36°C ± 1°C、120 r/min 的恒温摇床中进行厌氧发酵产氢,每组污泥发酵产氢实验均设置 3 个重复。

1.2 分析方法

氢气体积用排水法测定;氢气含量采用

SP6890A6 型气相色谱仪进行分析。挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acid, VFA)采用 SP6890 型气相色谱仪测定,色谱条件参照文献[6]。总糖用蒽酮比色法^[8]测定。挥发性悬浮固体 (Volatile suspended solids, VSS)和 pH 均按照标准方法测定^[9]。累积氢的变化用 Gompertz 方程进行分析^[10]:

$$H = P \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_m \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

式中 H : 累积氢(mL), P : 潜在累积氢(mL), R_m : 最大产氢速率(mL/h), λ : 延滞期(h)。

1.3 微生物多样性分析

1.3.1 厌氧污泥总 DNA 的提取: DNA 的提取参照文献[11]进行。取 1 mL 污泥,加入 540 μL 提取缓冲液 [0.1 mol/L PBS (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1.0% CTAB]和 8 μL 蛋白酶 K (10 g/L), 在 37°C、225 r/min 振荡 30 min 后,加入 60 μL 20%的 SDS, 65°C 水浴加热 2 h。将上述样品处理液以 8000 r/min 离心 10 min 后收集上清液,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀,离心 10 min,将上清液转入另一只离心管中,重复此步骤一次,加入 1:1 的氯仿/异戊醇(24:1)抽提上清液,8000 r/min 离心 10 min 后,在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇,4°C 沉淀 1 h, 12000 r/min 离心 20 min,弃上清液,70%冰乙醇清洗 2 次,无菌风吹干,30 μL TE 缓冲液溶解沉淀得到总 DNA 的粗提液,用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳进行检测分析,置于-20°C 保存备用。

1.3.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增: 采用嵌套 PCR 扩增^[12]。第 1 套 PCR 扩增:用细菌的通用引物 For/Dev 扩增 1500 bp 左右的 16S rRNA。反应体系 50 μL: 其中 5 μL PCR buffer, 上下游引物各 2 μL, 1 μL dNTPs, 0.5 μL *Taq* 酶, 2 μL 模版, 超纯水补至 50 μL。反应程序: 94°C 5 min; 94°C 60 s, 65°C (前 20 个循环每个循环降 0.5°C 降至 55°C) 45 s, 72°C 120 s (后 10 个循环每个循环增加 1 s) 共 30 个循环; 72°C 5 min。第 2 套 PCR 扩增:用 16S rRNA 的 V3-V5 区特异性引物 F357/R907 扩增细菌 16S rRNA 的 V3-V5 区 (550 bp 左右)。反应体系(50 μL): PCR buffer 5 μL,

引物各 2 μL , dNTPs 1 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , 模板是第 1 轮扩增产物的 100 倍稀释液 2 μL , 超纯水补至 50 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ –55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 20 个循环(其中每个循环后复性温度下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$); 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 10 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。扩增结果用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后用于 DGGE 分析。

1.3.3 DGGE 分析: 配制 6%聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 45%–65%。每孔上样 25 μL PCR 产物, 加 6 μL 的缓冲液, 在电压 100 V、60 $^{\circ}\text{C}$ 下电泳 17 h 后用核酸染料避光染色 30 min, 然后用 ddH₂O 清洗在 Tanon 凝胶成像系统上进行图像采集。各样品条带的迁移率、强度及数量的定量分析采用 Tanon GIS 软件; 样品条带图谱的细菌群落相似性分析按 UPGMA 算法进行。

1.3.4 切胶回收、克隆测序与聚类分析: 将含有目的条带的凝胶切下, 30 μL TE 浸泡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。以清液中浸出的 DNA 为模板, 引物为 F357 (不含 GC 夹)和 R907 进行 PCR 扩增, 电泳检测产物。目的条带回收纯化采用上海生工胶回收试剂盒。回收产物连接至 pEASY-T1 克隆载体, 转化至 *E. coli* 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 涂布于氨苄青霉素培养基平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取白色单菌落于氨苄青霉素液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 6–8 h, 用 T 载体特异性引物 M13 直接进行菌落 PCR。将阳性克隆子菌液送至上海生工进行测序, 测序结果在 GenBank 中进行比对后构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 底物的转化与产氢

图 1 显示累积氢, 氢气产率、VFA 和总糖降解率先随氯仿浓度(0–0.050%)的增加而增加, 在浓度为 0.050%时, 均达到最大, 分别为 639 mL、1.71 mol H₂/mol 消耗葡萄糖、2880 mg/L 和 85%; 然后随氯仿浓度(0.05%–0.150%)的增加而降低, 在浓度为 0.150%时, 各值均达到最小。综合分析不同氯仿浓度下产氢过程中产物浓度、累积氢、氢气产率和底物降解率的结果表明, 最适产氢的氯仿浓度为 0.050%, 这与 Hu 等人的研究结果相一致^[5]。而沈良等的研究证实最适产氢氯仿浓度为 0.25%^[4], 其原因是不同的研究中所使用的污泥中微生物的组成、培养条件、有机负荷等不同^[13]。

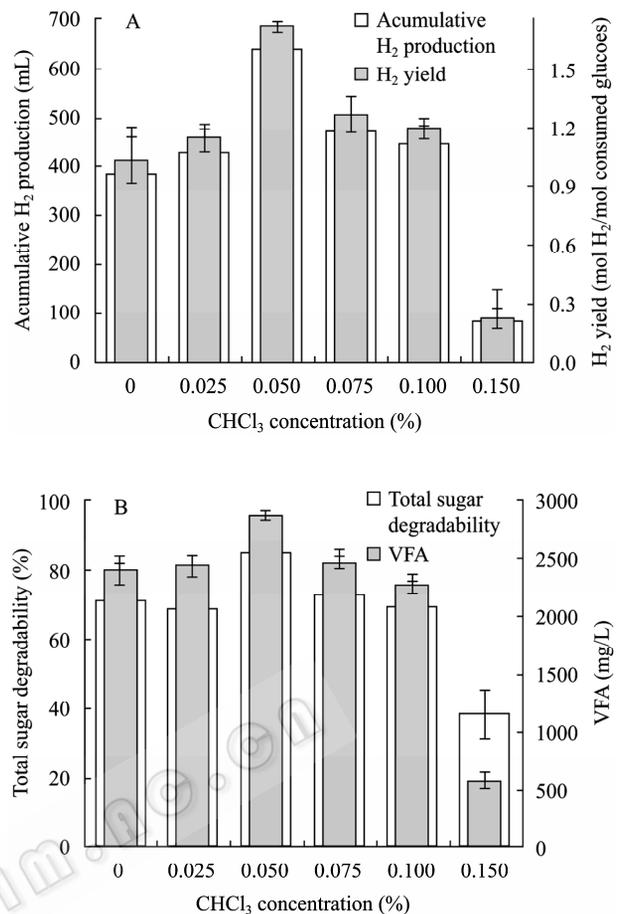


图 1 不同浓度氯仿处理污泥的厌氧发酵产氢

Fig. 1 The anaerobic fermentative H₂ production by sludges using different CHCl₃ concentrations pretreatment

注: A: 累积氢、氢气产率; B: VFA 和总糖降解率。

Note: A: Accumulative H₂ production and H₂ yield; B: VFA and degradability of total sugar.

2.2 微生物种群多样性分析

由图 2 可以看出, 样品 C₃ 与样品 Y 条带最多, 其微生物多样性最为复杂。氯仿浓度能显著影响厌氧污泥中微生物的种群结构。通过 DGGE 图谱可以半定量分析图谱中不同细菌种群的相对含量^[14]。氯仿浓度在 0–0.100% 范围内(图 2), 不同样品中菌群的相对含量有增加(条带 5)、减少(条带 7)、甚至消失(条带 8)。有一些菌群(条带 2、3)的量无明显变化。当氯仿浓度为 0.150% 时, 仅有少数菌群存在(条带 2、5 等)。

低浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)的氯仿可强烈抑制产甲烷菌的活性^[5]; 高浓度的氯仿能够杀死污泥中为 G⁻菌提供碳源的大部分微生物菌群(一些菌群含量的减少, 图 2), 使 G⁺菌在微生物群落中占主导(HPB 主要为 G⁺)^[4], 当氯仿浓度为 0.050% 时, 产氢效果最佳,

这与产氢 G^+ 菌的富集有关(一些菌群含量的增加, 图 2); 过高浓度的氯仿对微生物具有毒害作用, 可致大部分微生物死亡(一些菌群的消失, 图 2)。这表明, 通过对添加氯仿浓度的控制可以达到选择微生物种群的作用。

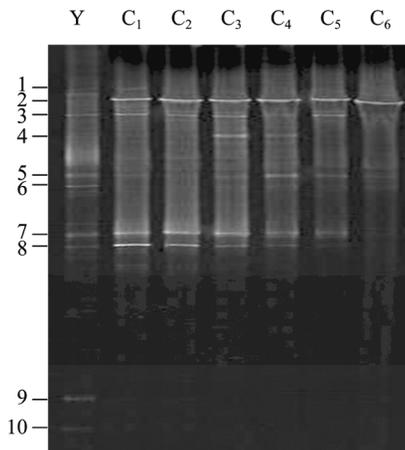


图 2 不同三氯甲烷浓度下污泥 DGGE 图谱
Fig. 2 DGGE profiles of sludge samples at different $CHCl_3$ concentrations

注: Y: 原始接种污泥样品; C_1 – C_6 : 添加不同浓度 $CHCl_3$ 发酵产氢结束后的污泥样品。

Note: Y: The initial seed sludge sample; C_1 – C_6 : The sludge samples using different $CHCl_3$ concentrations treatment at the end of experiment.

样品条带图谱细菌群落相似性聚类分析(图 3)表明: 接种污泥(Y)单独分成一支, 与其它样品的相似度仅为 51%, 说明它与其余样品种群结构差异较大。样品 C_3 、 C_4 、 C_5 与 C_1 , 样品 C_2 与 C_6 聚类在一起, 说明它们之间有相似的种群结构, 其中, 样品

C_3 和 C_4 之间的相似性最高, 达 90%。通过分析产氢效果与细菌群落结构之间的关系显示样品 C_3 的细菌群落结构为产氢效率最好, 与其相似度越高的样品产氢效果越佳。

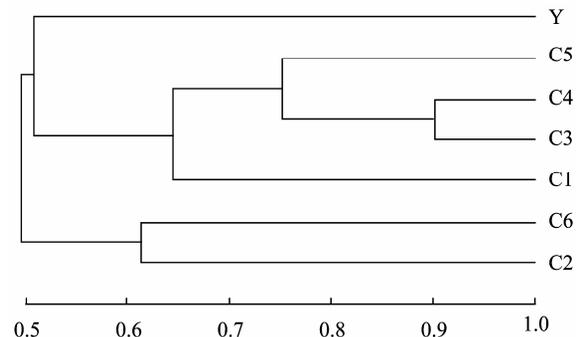


图 3 DGGE 图谱的聚类分析
Fig. 3 UPGMA cluster analysis of DGGE profiles

2.3 细菌群落鉴定

对 DGGE 图谱中的主要条带进行切胶回收、纯化和克隆, 然后测序。测序结果利用 GenBank 中的 BLASTn 进行比对(表1)。每个条带与其最相近的菌群的相似度均大于96%, 表明它们的属可能相同^[14]。结果见图4, 这10个克隆序列分属于 *Clostridia*, *Acidobacter* 和 δ -*proteobacteria*。Megasphaera (条带 3、4)是严格厌氧的 G^- 菌, 可能为 HPB^[15-17]。图2显示 *M. sueciensis* (条带4)的富集需在合适的氯仿浓度下, 浓度过高或过低都会影响其活性。结合表1可知, 有 *M. sueciensis* 的样品(C_3 、 C_4)产氢效果均较好, 表明 *M. sueciensis* 为高效 HPB^[15]。Xing 等已证

表 1 DGGE 优势条带的基因片段序列的比对结果
Table 1 Identity of genomic sequences in dominant DGGE bands by sequencing and BLAST analysis

条带 Band	序列大小 Sequence size (bp)	GenBank 相近的菌株 Related strains in GenBank	登录号 GenBank No.	相似度 Similarity (%)
1	564	Uncultured bacterium clone HPR93	DQ464550	98
2	588	Uncultured Acidobacteria bacterium	CU466687	98
3	587	<i>Megasphaera paucivorans</i> strain VTT E-032341	DQ223730	99
4	587	<i>Megasphaera sueciensis</i> strain VTT E-97791	DQ223729	99
5	562	<i>Clostridium</i> sp. HPB-16	AY862512	99
6	564	<i>Clostridium cellulosi</i> strain D3	FJ465164	96
7	561	Uncultured bacterium clone HPR94	DQ464551	98
8	564	Uncultured bacterium clone HPR93	DQ464550	99
9	584	<i>Desulfovibrio</i> sp. S14 PV-2008 strain S14	EF688238	100
10	584	Uncultured bacterium clone SR_FBR_E5	AY340820	99

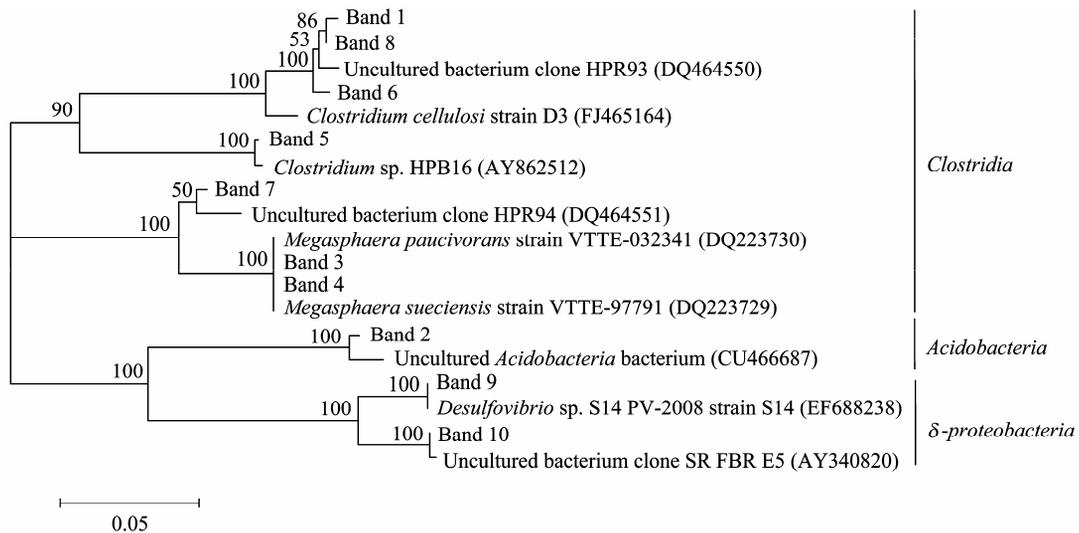


图 4 基于 16S rRNA 序列的优势种群的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of dominant microbial species based on 16S rRNA sequence

注: 采用 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, Band 标记为 DGGE 重新扩增条带的 16S rRNA 基因序列, 括号内为 NCBI 核酸数据库注册号; 节点数字为自展分析(Bootstrap1000 次)的支持率; 标尺 0.05 为 5%的核苷酸替换频率。

Note: Phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining algorithm. The marked band was reamplified 16S rRNA gene sequences from DGGE band (Accession numbers of NCBI database in parentheses). Numbers at each node indicate the supporting percentage by bootstrap analysis with 1000 iterations. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position.

实 *M. sueciensis* 能够以葡萄糖为碳源发酵产氢^[18]。每个样品中均有 *M. paucivorans* (条带 3), 其与污泥产氢效率高低的相关性不明确, 但该菌对氯仿有较高的耐受能力, 因此有必要进一步研究其生理功能。

有研究^[5,19]表明, *Clostridium* 是主要的产氢种属, 为严格厌氧 G⁺菌。其(条带 6)仅出现在样品 C₃、C₄、C₅ 中, 且相对含量随氯仿浓度的增加而降低(图 2)。样品 C₅ 比 C₄ 少了条带 4 和 8, 而产氢效果变化不明显, 这是由于 *C. cellulosi* 是高效 HPB^[20], 少量的 *C. cellulosi* 可以达到较高的产氢效果。样品 C₃ 和 C₄ 含有相同的条带, 而产氢效果却有明显差异, 其原因是高浓度的氯仿导致其它产氢菌活性降低。样品 C₆ 与 C₃ 相比, 产氢效果急剧下降(图 1), 这是因缺乏高效 HPB (*C. cellulosi*), 或是高浓度的氯仿对产氢菌产生了抑制作用, 使其活性降低^[4]。

条带 1、8 的克隆序列均为不可培养细菌, 目前对其生理特性研究较少。在本研究, 条带 1 具有的细菌仅出现在样品 C₁ 中, 表明氯仿对其具有强烈的抑制作用; 而条带 8 具有的细菌较条带 1 对氯仿有更高的耐性, 在氯仿浓度小于 0.100% 时, 菌体仍具有一定的活性(图 2)。条带 7 中具有细菌存在于所有样品中。随其相对含量的增加, 产氢效率随之提

高, 表明该菌与发酵产氢效率的高低有关, 亦可能属于 HPB, 但需继续研究证实。

2.4 最适产氢微生物群落结构分析

用 0.050% 氯仿处理的厌氧污泥产氢效果最好, 其微生物群落结构与各菌体的相对含量见 C₃ 泳道(图 2)。C₃ 样品中相对含量较多的微生物有 Uncultured Acidobacteria bacterium (条带 2), *M. paucivorans* (条带 3), *M. sueciensis* (条带 4), *Clostridium* sp. (条带 5) 和 uncultured bacterium (条带 7)。其中, *M. paucivorans* 与 *M. sueciensis* 为 HPB, 可培养^[21]。相对含量较少的 HPB 如 *C. cellulosi* 亦能达到较高的产氢效果。因此对这些微生物的生理特性和基因的表达进行研究对于提高厌氧发酵产氢的效率显得很重要。但是污泥经氯仿处理后, 微生物的群落结构是否稳定仍需要进一步系统研究。

对每个样品中微生物多样性的综合分析比较表明, 氯仿对厌氧污泥种群结构的多样性具有选择作用。因此, 可通过控制氯仿的添加浓度, 来构建最佳发酵产氢微生物群落, 同时也可以分离、培养出高效的 HPB。

3 结论

(1) 在氯仿浓度为 0.050% 时, 厌氧污泥产氢中

累积氢、氢气产率、VFA 和总糖降解率均达到最大值, 分别为639 mL、1.71 mol H₂/mol 消耗葡萄糖、2880 mg/L 和85%。

(2) DGGE 图谱切带测序结果表明, 10 个条带分别属于 *Clostridia*、*Acidobacteria* 和 δ -*proteobacteria*。*Clostridia* 中的 4 个菌群均属产氢菌群, 条带 7 具有的细菌也可能为 HPB, 但需继续研究证实。聚类分析表明与样品 C₃ 的细菌群落结构相似度越高的样品产氢效果越佳。

(3) 氯仿对厌氧污泥种群结构具有选择作用, 其浓度为0.050%时的细菌群落结构是最适产氢群落结构, 由 *M. sueciensis*、*M. paucivorans*、*C. cellulosi*、*Clostridium* sp.和不可培养细菌(Uncultured Acidobacteria bacterium、Uncultured bacterium clone HPR94 和 Uncultured bacterium clone HPR93)组成。通过控制氯仿的添加浓度, 可构建最适发酵产氢微生物群落。

参 考 文 献

- [1] Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, **29**(2): 173–185.
- [2] 刘常青, 赵由才, 张江山, 等. 酸性预处理污泥厌氧发酵产氢. *环境科学学报*, 2008, **28**(10): 2006–2011.
- [3] Mohan SV, Babu VL, Sarma PN. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour Technol*, 2008(99): 59–67.
- [4] 沈良, 严群, 阮文权, 等. 不同预处理方式对颗粒污泥厌氧发酵产氢性能的影响. *太阳能学报*, 2009, **30**(4): 532–537.
- [5] Hu B, Chen SL. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, 2007(32): 3266–3273.
- [6] Mu Y, Wang G, Yu HQ. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38**(7): 905–913.
- [7] Jiunn JL, Young JL, Tatsuya N. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res*, 1999, **33**(11): 2579–2586.
- [8] 毕颖, 刘燕, 张平, 等. 蒽酮比色法测定大豆乳清废水中总糖含量. *大豆通报*, 2006(3): 24–25.
- [9] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 102–107.
- [10] Lay JJ, Li YY, Noike T. Influence of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Res*, 1997, **31**(6): 1518–1524.
- [11] Zhou J, Bruns MA, Tiemdje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [12] 李友发, 宋兵, 宋亚娜, 等. 福建省稻田土壤细菌群落的 16S rDNA-PCR-DGGE 分析. *微生物学通报*, 2008, **35**(11): 1715–1720.
- [13] 刘雪梅, 任南琪, 宋福南. 微生物发酵生物制氢研究进展. *太阳能学报*, 2008, **29**(5): 544–549.
- [14] Wang XH, Zhang K, Ren NQ, et al. Monitoring microbial community structure and succession of an A/O SBR during start-up period using PCR-DGGE. *J Environ Sci*, 2009(21): 223–228.
- [15] Castello E, Santos CG, Iglesias T, et al. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy*, 2009(34): 5674–5682.
- [16] Helene M, Estelle JB, Bernard G, et al. Phylogenetic analysis of some *Sporomusa* sub-branch members isolated from human clinical specimens: description of *Megasphaera micronuciformis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003(53): 547–553.
- [17] Riikka J, Teija K, Auli H. Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class *Clostridia*. *Int J Food Microbiol*, 2008(125): 162–169.
- [18] Xing DF, Ren NQ, Wang AJ, et al. Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *Int J Hydrogen Energy*, 2008(33): 1489–1495.
- [19] Chang JJ, Chou CH, Ho CY, et al. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*, 2008(33): 5143–5146.
- [20] Ueno Y, Haruta S, Ishii M, et al. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [21] Riikka J, Maija LS. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006(56): 695–702.