



一种产氢产乙酸菌互营共培养体的筛选及其群落结构解析

李建政, 孙倩, 刘枫, 高晨晨

哈尔滨工业大学市政与环境工程学院; 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090

摘要 厌氧消化系统中的产氢产乙酸菌在营养生态位上位于产酸发酵菌群和产甲烷菌群之间, 在功能上起着承上启下的重要作用。该菌群具有与耗氢菌互营共生的特性, 其分离纯化非常困难。为了深入了解其生理生态特性, 为开发高效的厌氧生物处理技术提供理论基础, 采用丙酸和丁酸混合培养基, 以具有甲烷发酵功能的厌氧活性污泥为出发菌群, 进行了产氢产乙酸菌互营共培养体的选育, 并借助于 PCR-DGGE 技术对其菌群结构进行了解析。经过选择培养基的不断传代培养, 最终筛选到 2 个产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 和 11-O-1。这 2 个共培养体不仅对丙酸和丁酸具有很强的降解和产乙酸能力, 而且不产甲烷和硫化氢。在这种非产甲烷菌和非硫酸盐还原菌与产氢产乙酸菌组成的互营共培养体中, 含有专性的互营产乙酸菌 *Desulfotomaculum* sp. Iso-W2 及其伴生菌, 其中的伴生菌是能利用甲酸盐和 H_2/CO_2 的 Uncultured bacterium 054E12_B_DI_P58 和 *Sedimentibacter* sp. JN18_A14_H。对这一新的产氢产乙酸菌互营共培养体的发现和选育成功, 为更全面地研究产氢产乙酸菌的生理生态特性提供了样本。

关键词 厌氧消化; 产氢产乙酸菌; 共培养体; 菌群结构

中图分类号 X382

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)16-0078-05

Selection and Community Structure Analysis of Two New Syntrophic Acetogen Cocultures

LI Jianzheng, SUN Qian, LIU Feng, GAO Chencheng

State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment; School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract Among the bacteria colony in the anaerobic digestion system, the Hydrogen-Producing Acetogens (HPAs) are in between acidogenic fermentation bacteria and those with methanogens in the functional niche. They can digest or translate volatile fatty acids and ethanol, produced by acidogenic fermentation bacteria, into acetic acid and CO_2/H_2 which can be directly derived by methanogens while methane is being produced. HPAs are quite difficult to be isolated by pure and ampliative cultures due to their accrete characteristics. In order to study HPA's physiological and ecological characteristics and to establish the scientific basis for the

development of highly efficient anaerobic biological treatment processes, the syntrophic acetogen cocultures are enriched and selectively bred from the anaerobic activated sludge with methanogens by selective medium, using propionic and butyric acids as the only carbon source. Furthermore, the community structure of the selected syntrophic acetogen cocultures are analyzed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE). With the medium and the culture condition being improved, two syntrophic acetogen cocultures, namely 7-m-2a and 11-O-1, are obtained. These two cocultures show a high ability in degrading propionic and butyric acids and producing acetic acid, with no CH_4 or H_2S evolved in both culture systems. The analysis results of PCR-DGGE indicate that specialized syntrophic acetogen bacteria *Desulfotomaculum* sp. Iso-W2 and its associated bacterias are dominated in the syntrophic acetogen cocultures. The associated bacteria are uncultured bacteria 054E12_B_DI_P58 and *Sedimentibacter* sp. JN18_A14_H, which can use formate and H_2/CO_2 . The two new syntrophic acetogen cocultures obtained can provide a sample for investigating the physiological characteristics of HPA in depth.

Keywords anaerobic digestion; hydrogen -producing acetogen; coculture; community structure

收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA05Z109)

作者简介: 李建政, 教授, 研究方向为城市水资源与水环境, 电子信箱: ljz6677@163.com

0 引言

在参与厌氧消化的各微生物类群中,产氢产乙酸菌群在营养生态位上位于产酸发酵菌群和产甲烷菌群之间,在功能生态位上起到承上启下的重要作用,能将产酸发酵菌群代谢产生的丙酸、丁酸等挥发性有机酸(VFAs)和乙醇等进一步降解转化为乙酸和 CO_2/H_2 ,为后续的产甲烷菌群提供了可以直接利用的底物^[1-4]。产氢产乙酸代谢活性作用的增强,有望使厌氧生物处理系统的效能得到显著提高^[5]。产氢产乙酸菌的代谢特点是以质子作为唯一的电子受体,所进行的大多数氧化反应在标准热力学状态下是吸能的,其生长和代谢依赖于代谢产物氢或甲酸的消除,因而必须与诸如产甲烷菌和硫酸盐还原菌之类的耗氢菌组成共培养体才能维持生长^[3,6]。由于生理生态习性的特殊性,产氢产乙酸菌的分离培养十分困难,目前得到的纯培养物很少,制约了基于强化产氢产乙酸作用的高效厌氧生物处理技术的研发^[3,7-9]。鉴于大部分产氢产乙酸菌是依靠与其伴生菌的共生作用来实现菌体生长这一事实,从工程应用角度来看,分离和选育产氢产乙酸菌共培养体不失为一个好的选择。本文以厌氧活性污泥为出发菌群,利用底物与培养条件对微生物的选择作用,获得了一种非产甲烷菌和非硫酸盐还原菌与产氢产乙酸菌共培养体,并利用 PCR-DGGE 现代环境微生物分析方法对其菌群结构进行了解析,为研究其生长繁殖规律、生理生态特性、扩大培养和工程应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 污泥样品

用于筛选产氢产乙酸互营共培养体的污泥样品,采自本研究中心正在运行的一个用于处理大豆蛋白废水的四格室厌氧折流板反应器(ABR)^[5]。采集过程使用氮气保护。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

丁酸钠 20 g,丙酸钠 20 g,微量元素液 10 mL,维生素溶液 10 mL,瘤胃液 20 mL,无菌发酵上清液 30 mL,矿质元素液 50 mL,酵母膏 1.0 g,半胱氨酸 0.5 g, CaCl_2 1.96 g,加蒸馏水定容到 1 L,调节 pH 值为 7.0。

1.2.2 分离培养基

丁酸钠 20 g,丙酸钠 20 g,微量元素液 10 mL,维生素溶液 10 mL,瘤胃液 20 mL,半胱氨酸 1 g, NaCl 3 g, MgCl_2 0.1 g, K_2HPO_4 0.75 g, KH_2PO_4 0.75 g, NH_4Cl 1 g, 酵母膏 1.0 g, 胰蛋白胨 1 g, CaCl_2 1.96 g,加蒸馏水定容到 1 L,调节 pH 为 7.0。

1.2.3 矿质元素溶液

KH_2PO_4 10.0 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6.6 g/L, NaCl 8.0 g/L, NH_4Cl 8.0 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L。

1.2.4 微量元素溶液

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, H_3BO_3 0.3 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L。

1.2.5 维生素液

烟酸 20 mg/L, B_1 和对氨基苯甲酸各 10 mg/L, B_6 50 mg/L, 生物素 2 mg/L, 叶酸 2 mg/L, 盐酸吡哆醇 10 mg/L, 核黄素(VB₂) 5 mg/L, 硫胺素 5 mg/L。

1.3 产氢产乙酸共培养体的富集与分离

1.3.1 富集

富集培养基制备完成后,在高压蒸汽灭菌锅中 115℃ 灭菌 30 min,备用。取灭菌且装有玻璃珠和 60 mL 富集培养基的 250 mL 血清瓶,在氮气保护下移入适量具有甲烷发酵功能的活性污泥,封口,在 35℃、130 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 2 h;在氮气保护下,将振荡培养后的污泥接种到含有 60 mL 新鲜富集培养基的血清瓶中,每个样品接种 3 个平行样。将接种污泥后的培养体系置于 35℃、130 r/min 的恒温摇床中培养,定期(7 d)检测其甲烷生成量、底物降解量和液相产物浓度。在培养 30 d 后,挑选底物降解快、甲烷产量大的培养物转接至含有相同底物的新鲜液体培养基中进行新一轮培养,接种量为 10%~20%(V/V)。重复此过程,不断淘汰底物降解和产气效果不好的样品,直至连续几代培养物的底物降解时间和甲烷产量达到稳定为止。

1.3.2 分离与优选

产氢产乙酸菌互营共培养体的分离与优选,借助于容积为 25 mL 的厌氧管,采用液体培养基和固体培养基交替传代培养的方法进行。其中,固体培养基 5 mL 滚管,种子液接种量为 0.5 mL;液体培养基 10 mL,挑取固体培养基上的单菌落接种。操作过程为:取稳定富集物,在氮气保护下,用脱氧无菌水进行 10 倍为基准的梯度稀释,将梯度稀释后的菌液接种于固体培养基,35℃ 恒温培养;待出现单菌落后,在氮气保护下挑取单菌落转接于液体培养基中,35℃、130 r/min 恒温振荡培养;待检测到有较多乙酸、 CH_4 和少量的 H_2/CO_2 产生时,用脱氧无菌水进行 10 倍为基准的梯度稀释后,再一次接种于固体培养基上。重复以上操作若干次,直至连续几代在固体培养基上形成的菌落形态一致,液相和气相末端产物稳定,显微镜下只能观察到几种固定形态的菌体为止。为在传代培养过程中逐步淘汰产甲烷菌,液体培养基接种物的培养时间控制在 12 d 左右。

1.4 群落结构分析

对所筛选产氢产乙酸菌互营共培养体的菌群结构分析,借助于变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分子生物学技术进行,其主要操作步骤包括:基因组 DNA 的提取及其扩增(PCR)、变性梯度凝胶电泳、条带的回收、T 载体连接与转化、挑选阳性克隆、测序、序列比对及系统发育树构建等。具体方法参见邢德峰等的报道^[10]。

1.5 主要分析项目及方法

挥发性脂肪酸(VFAs)、乙醇,以及发酵气组分 CH_4 、 CO_2 和 H_2 的检测,均采用气相色谱法^[11]。产硫化氢试验,采用含有半胱氨酸的分离培养基,具体操作为:将普通滤纸剪成 0.5 cm 宽的纸条,长约 5 cm,用 5% 醋酸铅将纸条浸透,然后用烘

箱烘干,放入培养皿中灭菌备用;在氮气保护下,用新鲜滚管培养物接种液体培养基,接种后,用无菌镊子夹取一条醋酸铅纸条,在封口的同时,用胶塞将其悬挂于滚管中,下端接近培养基表面,但不接触液面;35℃恒温培养,定期观察试纸颜色变化,变黑者为阳性(+),不变者为阴性(-)。

2 结果与讨论

2.1 产氢产乙酸菌互营共培养体的富集

从 ABR 反应器的 4 个格式中取出具有甲烷发酵功能的厌氧活性污泥进行富集,第 1~4 格室的污泥样品分别标号为 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]。同时,将取自第 2 格室和第 3 格室的部分污泥样

品进行混合培养,标记为(2+3)[#]。以 30 d 为周期,于 35℃、130 r/min 恒温摇床中对污泥样品进行传代富集培养。经过 5~7 代的富集,各富集物在底物降解量、液相产物生成量、累积产气量以及产气组分等指标达到了相对稳定。各富集体系最后一代培养结果如表 1 所示。结果显示,经过 30 d 的培养,在 5 个稳定的富集培养物中,(2+3)[#] 和 3[#] 对底物(丙酸和丁酸)的降解量和累积产气量最大,分别达到 13 713、14 470 mg/L 和 526、461 mL,显著高于其他富集培养物。从乙酸产量来看,3[#] 要略高于(2+3)[#],其产气总量及甲烷含量却远低于(2+3)[#]。根据这一富集结果,选择(2+3)[#] 富集物作为后续产氢产乙酸菌互营共培养体分离筛选的样本。

表 1 富集物的代谢特性
Table 1 Characteristics of the enriched mix cultures on degrading substrates

富集物	底物降解量/(mg·L ⁻¹)			液相产物量/(mg·L ⁻¹)					发酵气累积产量和组分			
	丙酸	丁酸	总量	乙醇	乙酸	戊酸	乳酸	总量	产量/mL	CH ₄ /%	CO ₂ /%	H ₂ /%
1 [#]	1 602	1 388	2 990	775	931	185	71	1 962	187	23.68	74.66	1.58
2 [#]	3 582	7 309	10 891	694	1 823	145	59	2 721	421	31.21	68.05	0.05
(2+3) [#]	4 494	9 219	13 713	699	2 091	237	69	3 096	526	60.13	39.05	0.07
3 [#]	5 723	8 747	14 470	382	2 336	294	98	3 110	461	22.44	77.58	0.10
4 [#]	913	911	1 824	408	650	360	5	1 423	234	23.62	76.10	0.04

2.2 产氢产乙酸菌互营共培养体的分离与初选

以(2+3)[#] 富集培养物为样本,采用固体培养基和液体培养基交替传代培养的方法分离产氢产乙酸菌互营共培养体,直到固体培养基上形成的菌落形态趋于一致,液体培养体系的底物降解量、液相产物生成量、累积产气量以及产气组分等指标达到相对稳定为止。传代培养过程中,挑选产氢、产乙

酸较多的培养物优先转接并进行传代培养,液体培养基接种物的培养时间控制在 12 d 左右。经过 35 代的选择培养,一些培养物中的产甲烷菌和硫酸盐还原菌被逐步淘汰,最终筛选出编号分别为 W-1、B2、B4、7-m-2a、7-m-5a 和 11-O-1 的 6 个不产甲烷且产硫化氢试验阴性的共培养体,结果如表 2 所示。

表 2 6 个共培养体在传代培养过程中的气相成分变化
Table 2 Changes in gas components of the cocultures from generation to generation

传代数	气体组分/%			产硫化氢试验					
	CH ₄	CO ₂	H ₂	W-1	B2	B4	7-m-2a	7-m-5a	11-O-1
第 1 代	9.16	20.22	0	+	+	+	+	+	+
第 5 代	16.24	22.25	0	+	+	+	+	+	+
第 10 代	12.70	18.25	0	+	+	+	+	+	+
第 15 代	10.89	19.14	0.03	+	+	+	+	+	+
第 20 代	0.46	7.68	2.80	+	+	+	+	+	+
第 25 代	0.02	0.48	7.16	+	-	-	+	-	+
第 30 代	0	0.77	11.46	+	-	-	+	-	-
第 35 代	0	0.80	11.55	-	-	-	-	-	-

注:发酵气中各组分含量为 6 个培养物的平均值;产硫化氢试验中,“+”为阳性,“-”为阴性。
Notes: The percentages of CH₄, CO₂ and H₂ in biogas were the average values of the 6 cultures. “+” for positive while “-” for negative in H₂S production test.

2.3 产氢产乙酸菌互营共培养体的优选

利用液体培养基,对初选得到的 6 个共培养物进行为期 30 d 的发酵试验和测试。结果(表 3)表明,共培养体 W-1 虽未产生 CH₄,却有 H₂S 的生成。在其他共培养体中均未检测到 CH₄ 和 H₂S 的生成,是一种非产甲烷菌和非硫酸盐还原菌与产氢产乙酸菌的互营共生体,关于该类互营共培养体的研

究,至今尚未见报道。B2、7-m-2a 和 11-O-1 3 个培养物的乙酸和氢气产量分别超过了 2 300 和 310 mL/L,其中以 11-O-1 的最大,分别为 3 061 和 485 mL/L,其底物降解总量也高达 14 862 mg/L。B2 的乙酸产量虽然比 7-m-2a 的高,但其底物降解总量和产氢量均低于后者的 15 524 和 448 mL/L。因此,选择 11-O-1 和 7-m-2a 作为进一步研究的对象。

表 3 6 个共培养体中底物与气相组成的变化
Table 3 Changes in substrate degradation and gas components of the selected cocultures

培养物	底物降解量/(mg·L ⁻¹)			乙酸产量 /(mg·L ⁻¹)	氢气产量 /(mg·L ⁻¹)	CH ₄ 和 H ₂ S 测试	
	丙酸	丁酸	总量			CH ₄	H ₂ S
W-1	4 500	5 878	10 378	1 737	269	-	+
B2	7 096	4 600	11 696	2 738	312	-	-
B4	3 894	5 328	9 222	1 491	277	-	-
7-m-2a	6 313	9 211	15 524	2 385	448	-	-
7-m-5a	4 360	6 484	10 844	1 953	274	-	-
11-O-1	7 037	7 825	14 862	3 061	485	-	-

注:发酵气中各组分含量为 6 个培养物的平均值;“+”为阳性,“-”为阴性。
Notes: The percentages of CH₄, CO₂ and H₂ in biogas were the average values of the 6 cultures. "+" for positive while "-" for negative.

2.4 生物相观察

从 7-m-2a 和 11-O-1 两个培养物的电子显微镜扫描照片 (图 1)中可以观察到,无论是 7-m-2a 还是 11-O-1,其中都有两种形态以上的菌体存在。在共培养体 7-m-2a 中(图 1(a)),可以观察到典型的短杆菌和弧菌;而在共培养体 11-O-1 中 (图 1 (b)),典型菌体形态为杆菌和短杆菌。

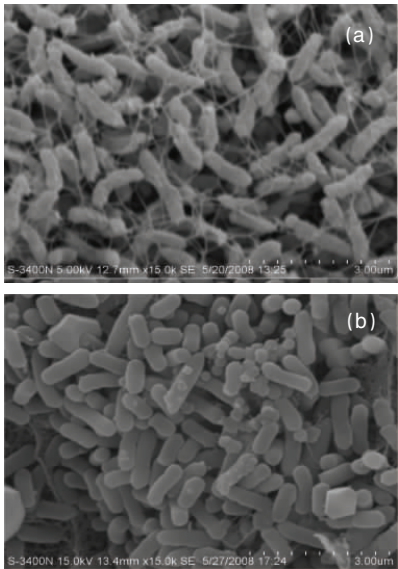


图 1 共培养体 7-m-2a (a)和 11-O-1(b)的电子显微镜扫描照片
Fig. 1 Photos of 7-m-2a (a) and 11-O-1 (b) by scanning electron microscope

2.5 分子生物学分析

图 2 是 7-m-2a 和 11-O-1 两个共培养体的 PCR-DGGE 图谱。图谱显示,在产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 和 11-O-1 的样品泳道上,分别共有 7 个和 9 个明显条带,其中有 4 个条带(在图 2 中的标号为 2、3、4 和 9)是相互平行的,说明在这两个共培养体中有相同的菌属存在。但从显示强度分析,共同菌属在两个共培养体中的数量存在一定的差异。
从 DGGE 图谱中切取标号的 9 个条带进行目的条带回收,T 载体连接后转化到感受态细胞中,经过蓝白筛选阳性克

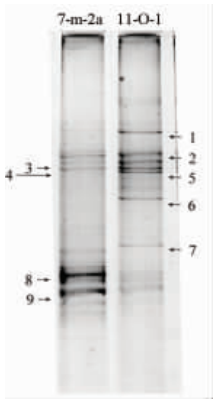


图 2 产氢产乙酸共培养体 DGGE 图谱
Fig. 2 DGGE electrophoretogram of the selected cocultures

隆,最后交生物公司进行 DNA 测序^[10]。将所得的序列片段在 GenBank 数据库进行序列比对和相似性分析。如表 4 所示的比对结果表明,在产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 和 11-O-1 中,主要存在 4 类细菌:① 降解丙酸的专性质子还原菌,即产氢产乙酸菌,如 *Desulfotomaculum* sp. Iso-W2;② 产氢产乙酸菌的共生菌,有的能利用乙酸和氢气,如 *Sedimentibacter* sp. JN18_A14_H;有的能利用甲酸盐和 H₂/CO₂,如 Uncultured bacterium 054E12_B_DI_P5;③ 降解氨基酸、苯甲酸、甲苯等的细菌,如 *Clostridium hydroxybenzoicum*,但是否属于产氢产乙酸菌,尚待进一步研究证实;④ 互营“微生境”中的细菌,表 4 中的克隆 2、6、9 与 Horz、Godon 等^[12-13]在研究产氢产乙酸菌互营“微生境”时得到的序列有很高的相似性,而条带 7 与 Lueders、Pommerenke 等^[14]利用同位素示踪法研究水底淤泥中的互营丙酸氧化过程时测得的序列有很高的相似性。值得注意的是,虽然 7-m-2a 和 11-O-1 两个共培养体对丁酸有较强的降解能力(表 3),但在比对结果中并未得到降解丁酸的同源性细菌或克隆。分析认为,它们可能被包含在③和④两类细菌中,这一判断的正确性,尚需进一步证明。

表 4 16S rDNA 序列比对结果
Table 4 Comparison result of 16S rDNA from 7-m-2a and 11-O-1 in GenBank

克隆	最高同源性细菌或克隆	16S rDNA 同源性/%	16S rDNA 高同源性生物的特征
1	<i>Aminobacterium mobilis</i>	94	厌氧降解氨基酸的细菌
2	Uncultured bacterium clone synarJH09	96	利用分子生物学手段，研究非培养物的厌氧微环境时得到的样品中特定菌株序列
3	Uncultured Peptostreptococcaceae bacterium clone D12_24	94	利用非培养物的分子生物学技术得到的序列，可厌氧降解甲苯
4	Uncultured bacterium054E12_B_DI_P58	92	利用非培养物的分子生物学技术，在测定厌氧生物消化系统原核生物多样性时得到的序列，该种群可利用甲酸盐和 H ₂ /CO ₂ 进行生长
5	<i>Sedimentibacter</i> sp. JN18_A14_H 16S	94	从芳香族化合物脱氯菌群中分离得到，可利用丙酮酸、丁酸，或者乙酸和氢气
6	Uncultured bacterium clone synarJH09	97	利用分子生物学手段，研究非培养物的厌氧微环境时得到的样品中特定菌株序列
7	Uncultured Clostridia bacterium clone X3Ba26	92	用同位素示踪法研究水底淤泥中的互营丙酸氧化过程时测得样品中特定菌株序列
8	<i>Desulfotomaculum</i> sp. Iso-W2	99	氧化丙酸的专性互营质子还原菌
9	Uncultured bacterium clone synarJH09	97	利用分子生物学手段，研究非培养物的厌氧微环境时得到的样品中特定菌株序列

3 结论

1) 用以丙酸和丁酸为碳源的选择性培养基进行产氢产乙酸菌的富集和分离,筛选到 2 个非产甲烷菌和非硫酸盐还原菌与产氢产乙酸菌的互营共生体,即 7-m-2a 和 11-O-1。

2) 7-m-2a 和 11-O-1 两个共培养体中含有专性的互营产乙酸菌 *Desulfotomaculum* sp. Iso-W2 及其伴生菌，其中的伴生菌是能利用甲酸盐和 H₂/CO₂ 的 Uncultured bacterium 054E12_B_DI_P58 和 *Sedimentibacter* sp. JN18_A14_H。

参考文献(References)

[1] Pratap C P, David P C. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78: 165-169.

[2] McHugh S, Carton M, Mahony T, *et al.* Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219, 219(2): 297-304.

[3] 葛源, 贺纪正, 郑袁明, 等. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学中的应用. *生态学报*, 2006, 26(5): 1574-1582.

Ge Yuan, He Jizheng, Zheng Yuanming, *et al.* *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1574-1582.

[4] Lange M, Ahring B K. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 5(12): 553-571.

[5] Zhu G F, Li J Z, Wu P, *et al.* The performance and phase separated characteristics of an anaerobic baffled reactor treating soybean protein processing wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 8027-8033.

[6] 聂艳秋, 刘和, 堵国成, 等. 初始 pH 值对产氢产乙酸/耗氢产乙酸两段耦合工艺定向生产乙酸的影响[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 686-691.

Nie Yanqiu, Liu He, Du Guocheng, *et al.* *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(4): 686-691.

[7] 赵宇华, 钱泽澍. 硬脂酸降解菌与嗜氢产甲烷杆菌共培养物的研究[J]. *浙江农业大学报: 农业与生命科学版*, 1991, 17(1): 75-79.

Zhao Yuhua, Qian Zeshu. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science Edition*, 1991, 17(1): 75-79.

[8] Jackson B E, Bhupathiraju V K, Tanner R S, *et al.* Syntrophus aciditrophicus sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen -using microorganisms[J]. *Arch Microbiol*, 1999, 171: 107-114.

[9] Elshahed M S, McNerney M J. Benzoate fermentation by the anaerobic bacterium syntrophus aciditrophicus in the absence of hydrogen - using microorganisms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (12): 5520-5525.

[10] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. *环境科学*, 2005, 26(2): 172-176.

Xing Defeng, Ren Nanqi, Gong Manli. *Environmental Science*, 2005, 26 (2): 172-176.

[11] Li J Z, Zheng G C, He J G, *et al.* Zhi Qin Hydrogen -producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 573-577.

[12] Horz H P, Vianna M E, Gomes B P F A, *et al.* Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(10): 5332-5337.

[13] Godon J J, Morinière J, Moletta M, *et al.* Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the "Synergistes" example[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(2): 213-224.

[14] Lueders T, Pommerenke B, Friedrich M W. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5778-5786.

(责任编辑 王芷)