

## 厌氧降解丁酸共培养物中产氢产乙酸细菌与产甲烷细菌的分离与再组合\*

程光胜 屠雄海 东秀珠 苏京军

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 由处理啤酒厂废水的厌氧消化器颗粒污泥中分离和纯化了一个能厌氧降解丁酸产生甲烷的共培养物 BF2。共培养物 BF2 可降解包括异丁酸在内的含 4~18 个碳原子的脂肪酸, 最适生长温度 37℃, 最适 pH7.7。以巴豆酸为底物, 成功地将共培养物 BF2 分离为专性质子还原产乙酸细菌沃尔夫互营单胞菌嗜脂肪亚种菌株 CF2 和产甲烷细菌甲酸甲烷杆菌菌株 MF2 两个纯培养, 将它们再组合后仍可降解丁酸。菌株 CF2 与亨氏甲烷螺菌、布氏甲烷短杆菌菌株 1125、甲酸甲烷杆菌菌株 1535 和普通脱硫弧菌 G11 组合成人工共培养物, 可以厌氧降解丁酸。

**关键词** 丁酸, 厌氧降解, 共培养物, 沃尔夫互营单胞菌嗜脂肪亚种, 甲酸甲烷杆菌

在厌氧消化研究中, 互营共生降解丁酸的共培养物的构成、分离及其生理学研究是探讨有机物厌氧降解过程中不同功能细菌间相互关系的基础。由于不易获得较纯的共培养物, 专性质子还原产乙酸细菌的纯培养更难得到, 目前国际上报道的不多<sup>[1-9]</sup>。国内曾报道过分离得到的几个共培养物<sup>[10-12]</sup>。我们参考 Beaty 和 McInerney<sup>[8]</sup> 的方法, 从处理啤酒厂废水的厌氧消化器颗粒污泥中分离和纯化了一个能厌氧降解丁酸产生甲烷的共培养物 BF2, 并以巴豆酸为底物, 成功地将组成该共培养物的专性质子还原产乙酸的沃尔夫互营单胞菌嗜脂肪亚种(*Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida*) 和产甲烷细菌甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*) 菌株 MF2 分离为两个纯培养物。将上述两个纯培养物重新组合后仍可降解丁酸产生甲烷; 将菌株 CF2 与亨氏甲烷螺菌、布氏甲烷短杆菌、甲酸甲烷杆菌组合成的人工共培养物, 也可厌氧降解丁酸产生甲烷; 与普通脱硫弧菌 G11 组合成的人工共培养物也可厌氧降解丁酸。现将结果报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

分离和纯化共培养物的污泥样品取自处理啤酒厂污水的上流式厌氧污泥床(UASB)的颗粒污泥; 亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*) 菌株 JF1、布氏甲烷杆菌(*Methanobacterium bryantii*) 菌株 1125、甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*) 菌株 1535 和脱硫弧菌(*Desulfovibrio* sp.) 菌株 G11 由荷兰 Wageningen 农业大学微

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 7 月 15 日收到。

生物学系惠赠。

## 1.2 共培养物及纯培养菌株的富集和分离

培养基: 富集和分离的基本培养基按 Houwen 等<sup>[13]</sup>所报道的方法配制, 但不加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  和  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ 。采用 Hungate 技术将培养基预还原后分别取 4.5、18 和 45 ml 装入厌氧管 (180 × 18 mm)、50 ml 和 100 ml 血清瓶中, 使用前按 18 份基础培养基各加一份的比例分别用无菌注射器加入无机盐、维生素溶液和还原剂溶液。各种待试验的底物分别配成 1 mol/L 或 60% 的溶液, 过滤除菌后, 装入充氮气的血清瓶中作为储备液, 使用时取一定量加入已灭菌的基础培养基中, 使其终浓度为 20~40 mmol/L 或 0.5%~1.0%。分离产甲烷菌采用同样的基础培养基, 但用由 80% 氢气和 20% 二氧化碳组成的混合气体作底物, 并加入终浓度为 3200 u/ml 的青霉素; 培养脱硫弧菌时用 20 mmol/L 的硫酸钠溶液作底物。分离用固体培养基中加入 2% 琼脂。

厌氧降解丁酸共培养物的富集和分离: 以终浓度为 20 mmol/L 的丁酸为底物, 在气相为氮气的装有 20 ml 培养基的 50 ml 血清瓶中, 接种入 1 ml 制备成匀浆状的污泥。37℃ 培养 14 d 后, 选出可降解丁酸产生甲烷和乙酸的培养物, 以 5 ml 接种到新鲜培养基中。如此重复 3 次, 可得到能稳定生长的富集培养物。将此富集物以  $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$  稀释度用 Hungate 滚管法, 37℃ 培养 42~45 d, 然后将滚管中的培养物在 Micro-star AO 型荧光显微镜下检查, 在厌氧手套箱中用无菌弯头吸管吸取在 420 nm 波长光照射下发强荧光, 圆形, 边缘整齐, 不透明, 可见光下呈淡黄色, 直径 1~1.5 mm 的菌落转入含丁酸盐的液体培养基中, 37℃ 培养 21 d 后, 选取可降解丁酸产生乙酸和甲烷的培养物再滚管纯化。如此反复多次, 直到获得纯培养物。最后选取在肉汤培养基中好氧、厌氧均不生长, 厌氧降解丁酸产生乙酸和甲烷, 不形成丙酸和异戊酸的培养物。共培养物的纯度按以下方法检查: 在基础培养基、葡萄糖培养基和普通肉汤培养基中, 于 37℃ 好氧和厌氧培养 42~56 d 不生长, 在上述培养基中滚管也不产生菌落; 在加有丁酸盐的固体滚管中培养 42~56 d 后长出形态一致、全部均发荧光的菌落。挑取活菌体涂片观察, 在显微镜下只见两种形态的细胞。

由共培养物分离降解巴豆酸细菌的纯培养: 培养基以终浓度为 20 mmol/L 的巴豆酸为底物, 同时加入终浓度为 10 mmol/L 溴乙烷磺酸钠抑制产甲烷作用, 接种上述纯化的共培养物 2 ml, 37℃ 培养 28 d 后, 巴豆酸消耗完了。再重复此分离操作 3 次后, 用含巴豆酸的固体培养基进行滚管分离, 37℃ 培养 30 d 后, 在试管管壁上长出单菌落。将单菌落挑入含巴豆酸的液体培养基中再培养 30 d, 在显微镜下观察只见一种形态的细菌, 将此菌株在基础培养基、葡萄糖培养基和普通肉汤培养基中, 于 37℃ 好氧和厌氧培养 42~56 d 不生长, 在固体培养基中滚管也不产生菌落, 用含巴豆酸的固体培养基进行滚管培养 30 d 后, 在试管管壁上长出形态一致的菌落。由此证明此培养物是纯培养。

由共培养物分离产甲烷细菌: 将纯化的共培养物 0.2 ml 接种到产甲烷培养基中, 37℃ 培养 14 d 后, 测定产甲烷情况, 并转接到新鲜培养基中。如此转移 5 次后, 用固体产甲烷培养基进行滚管分离, 管中气相为 80% 氢气和 20% 二氧化碳气组成的混合气体。37℃ 培养 30 d 后, 挑取在试管管壁上长出的在紫外光照射下荧光的单菌落。菌落淡黄色, 不透明, 边缘整齐, 圆形, 直径 1~1.5 mm。将单菌落挑出, 接种液体产甲烷培养基, 37℃

培养 14 d 后可产生甲烷。将此菌在基础培养基、葡萄糖培养基和普通肉汤培养基中, 37℃ 好氧和厌氧培养 42~56 d 不生长, 在固体培养基中滚管不产生菌落, 用固体产甲烷培养基进行滚管, 管中气相为 80% 氢气和 20% 二氧化碳气组成的混合气体。37℃ 培养 30 d 后, 在试管管壁上长出形态一致的菌落。在光学显微镜下检查, 只见同一种形态的细胞。由此证明此菌株是纯培养。

### 1.3 甲烷细菌和脱硫弧菌的培养方法

同文献[14]。

### 1.4 与已知耗氢菌匹配的人工共培养物对丁酸降解的试验方法

在 50 ml 血清瓶中装 20 ml 基础培养基, 气相为  $H_2/CO_2(1.5 \times 1.01325 \times 10^5 Pa, H_2:CO_2=3:1)$ , 接种产甲烷菌或硫酸盐还原菌培养液 0.2 ml, 37℃ 培养 15 d, 待培养液变混浊和产生甲烷或硫化氢(培养硫酸盐还原菌时基础培养基中加入 20 mmol/L 硫酸钠)后, 接种 2 ml 本实验中分离纯化的降解巴豆酸细菌菌株 CF2 的培养液, 再加入终浓度为 20 mmol/L 的丁酸盐, 并将血清瓶中的气相换成氮气。继续培养, 每 7 d 测定丁酸盐的降解情况。

### 1.5 分析测定方法

甲烷用 GC-7AG 气相色谱仪测定, 固定相 GDX-401, 60~80 目, 不锈钢填充柱 30 mm × 1m, 高纯氮气为载气, 流速 10 ml/min, 柱温 50℃, 进样口温度 110℃, 氢焰检测器; 挥发酸和巴豆酸等的测定方法, 同文献[14]。

### 1.6 试剂

溴乙烷磺酸钠为 E. Merck 产品, 其它为国产试剂, 辛酸以上的脂肪酸由本所徐家立先生惠赠。

## 2 结 果

### 2.1 共培养物 BF2 的形态和生理特性

**2.1.1 形态:** 共培养物在滚管中形成的菌落圆形, 直径 1~1.5 mm, 边缘整齐, 不透明, 在 430 nm 波长光照射下发强荧光, 可见光下呈淡黄色。

**2.1.2 丁酸降解的最适温度和最适 pH:** 共培养物 BF2 在 37~40℃ 时降解丁酸最快, 低于 25℃ 则降解甚慢; 在 pH7.7 时产甲烷最多, 在 pH5.8 以下时则不产生甲烷;

**2.1.3 厌氧降解丁酸盐的情况:** 在加有丁酸盐底物的 100 ml 血清瓶中接种 0.5 ml BF2 液体培养物, 37℃ 培养, 每 4 d 测定一次甲烷和有机酸, 结果见表 1。如果在瓶中充入按 3:1 体积比组成的氢气和二氧化碳的混合气体, 则产甲烷菌优先利用气体底物, 因而丁酸降解受到抑制。同样, 在以丁酸为底物时, 同时加入浓度为 20 mmol/L 的甲酸和 40 mmol/L 乙酸, 丁酸在培养 24 d 后也未被降解。

**2.1.4 抑制产甲烷菌活动后共培养物 BF2 对丁酸的降解:** 在 50 ml 血清瓶中以丁酸为底物培养 BF2, 待丁酸降解并产生甲烷和乙酸后, 加入终浓度为 10 mmol/L 的溴乙烷磺酸钠抑制产甲烷菌的活动, 则丁酸停止降解, 结果见表 2。此时, 还加入终浓度为 20 mmol/L 的硫酸钠, 未发现形成  $H_2S$ , 说明共培养物中不存在硫酸盐还原菌。

**2.1.5 对各类底物的利用:** 在盛有 5 ml 基础培养基的厌氧管中, 加入下列有机酸(括号

表 1 共培养物 BF2 降解丁酸产甲烷和的情况

Table 1 Degradation of butyrate and production of methane by coculture BF2

培养 时间 Time (d)	底物 Substrate 丁酸 Butyrate (mmol/L)	产物 Product	
		甲烷 Methane (mmol/L)	乙酸 Acetate (mmol/L)
0	16.8	0	0.9
4	16.5	$9.8 \times 10^{-3}$	0.9
8	16.3	0.4	4.1
12	6.7	4.1	27.2
16	0.5	6.7	30.9
20	0.1	7.1	31.1
24	0	7.1	31.2

表 2 溴乙烷磺酸钠对共培养物 BF2 降解丁酸的抑制作用

Table 2 Inhibition of butyrate degrading by addition of bromoethane sulfonate (BrES) to coculture BF2

培养 时间 Time (d)	底物 Substrate 丁酸 Butyrate (mmol/L)	产物 Product	
		甲烷 Methane (mmol/L)	乙酸 Acetate (mmol/L)
0	17.7	0	1.7
11	10.6	2.5	16.0
15*	9.9	2.5	15.6
22	10.0	2.5	16.0
29	9.3	2.5	15.6

\* 加入 10 mmol/L 溴乙烷磺酸钠。  
10mmol/L BrES was added.

内为终浓度,单位为 mmol/L,未加括号者未定量): 丙酸(14)、异丁酸(10)、异戊酸(15)、戊酸(15)、己酸(15)、庚酸(10)、辛酸(10)、壬酸(5)、癸酸(5)、十一酸(2)、十二酸(2)、十三酸(2)、十四酸(2)、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、二十酸、二十二酸、油酸、亚油酸、延胡索酸(10)、对氨基苯甲酸(10)、丙酮酸(20)、乳酸(60),接种共培养物 BF2 培养液 0.1 ml,在 37℃ 培养 50 d 后测定培养液中的有机酸和管中的甲烷含量。结果表明,共培养物 BF2 可降解从 5~18 个碳原子的直链脂肪酸,但不能降解丙酸、异戊酸、二十酸、二十二酸、油酸、亚油酸、延胡索酸、对氨基苯甲酸、丙酮酸、乳酸。同样试验表明,共培养物可降解异丙醇和微弱降解乙醇,不能降解甲醇、甲醛、正丙醇、正丁醇、异戊醇、苯甲醇和甘油。在基础培养基中加入终浓度为 1 g/ml 的糖类,接种共培养物 BF2,37℃ 培养 30 d 后测定甲烷和有机酸,结果表明,共培养物 BF2 不能降解葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、D-半乳糖、乳糖、木糖、纤维二糖和可溶性淀粉。

2.2 由共培养物 BF2 分离厌氧降解丁酸的专性质子还原产乙酸细菌的纯培养菌株CF2

由于用丁酸为底物不能得到无产甲烷细菌与其共生的专性质子还原产乙酸细菌,参

考 Beaty 和 McInerney<sup>[8]</sup> 的方法,利用巴豆酸为底物,成功地将共培养物 BF2 中的产甲烷菌与可降解丁酸的专性质子还原细菌分拆开来,获得了可单独降解巴豆酸产生乙酸和丁酸的细菌菌株纯培养——菌株 CF2。

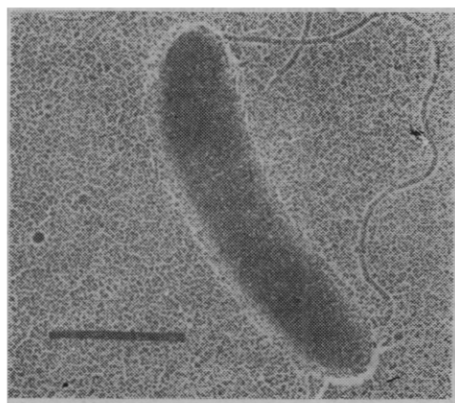


图1 菌株 CF2 细胞超薄切片的电子显微镜照片(标尺: 1 $\mu$ m)

Fig. 1 Electron micrograph of cell ultrathin sections of strain CF2

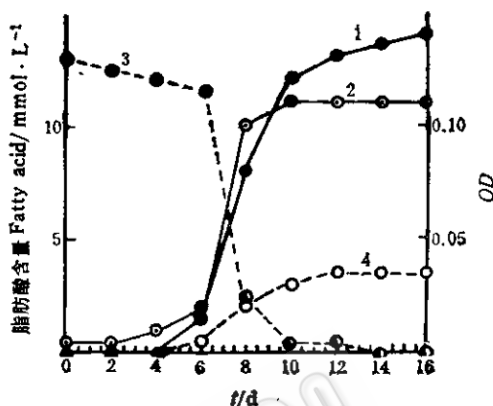


图2 菌株 CF2 厌氧降解巴豆酸过程

Fig. 2 Anaerobic degradation of crotonate by strain CF2

1. 乙酸 Acetate; 2. OD<sub>660nm</sub>; 3. 巴豆酸 Crotonate; 4. 丁酸 Butyrate.

**2.2.1 菌株 CF2 的形态描述:** 菌株 CF2 的细胞呈弯杆状, 两端钝圆, 有侧生鞭毛, 0.2~0.3  $\times$  2.0~3.0 $\mu$ m (图1), 在以巴豆酸为底物生长时, 可单个、成对或成串存在, 革兰氏染色阴性; 菌落白色, 透明, 边缘整齐, 圆形, 直径 1.0~1.5 mm。

**2.2.2 菌株 CF2 对巴豆酸的降解和生长:** 在 100 ml 血清瓶中, 以终浓度为 15 mmol/L 的巴豆酸为底物, 气相为氮气, 接种 0.4 ml 菌株 CF2 的培养液, 37 $^{\circ}$ C 培养, 每天取样测定其菌体的生长和有机酸, 结果见图2。由图2可见, 培养 15 d 后, 巴豆酸完全降解, 产生了乙酸和丁酸。其倍增时间为 20 h。

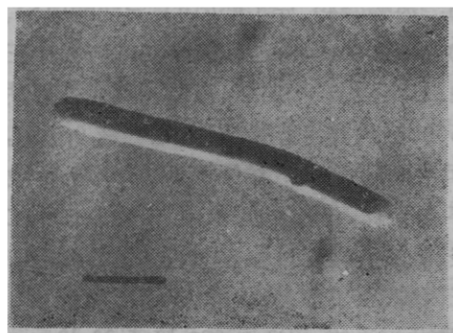


图3 菌株 MF2 细胞的电子显微镜照片(标尺: 1 $\mu$ m)

Fig. 3 Electron micrograph of cell of strain MF2

**2.2.3 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、甲酸和乙酸对菌株 CF2 降解巴豆酸的影响:** 在 50 ml 血清瓶中装入 20 ml 分别加有 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (1.5  $\times$  1.01325  $\times$  10<sup>5</sup> Pa, H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> = 3:1)、甲酸 (20 mmol/L) 或乙酸 (20 mmol/L) 的基础液体培养基中接种 0.2 ml 菌株 CF2 的培养液, 37 $^{\circ}$ C 培养 37 d, 每 7 d 测定有机酸生成。结果表明, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 和甲酸可延缓巴豆酸的降解, 37 d 后仍有巴豆酸未被完全降解; 外加乙酸则不影响巴豆酸的降解。

**2.2.4 菌株 CF2 的鉴定:** 从上述形态描述和底物利用情况看来, 菌株 CF2 应属于互营单胞菌属 (*Syntrophomonas*), 与沃尔夫互

营单胞菌嗜脂肪亚种 (*S. wolfei* subsp. *saponavida*) 的特征基本相同,但菌株 CF2 能降解异丁酸,并且不受氢和甲酸的抑制,故有其特殊之处,故命名为沃尔夫互营单胞菌嗜脂肪亚种菌株 CF2。

2.3 由共培养物 BF2 分离产甲烷菌的纯培养物菌株 MF2

由共培养物 BF2 分离到一株产甲烷菌的纯培养物菌株 MF2, 菌株 MF2 的细胞为长杆状,  $0.5 \times 2 \sim 4 \text{ }\mu\text{m}$ , 不运动, 革兰氏染色阴性 (图 3)。在厌氧试管中滚管长出的菌落为淡黄色, 不透明, 圆形, 边缘整齐, 直径为  $1 \sim 1.5 \text{ mm}$ 。菌株 MF2 在以甲酸为底物的不含氢的产甲烷培养基中可产生甲烷, 故初步认为属于甲酸甲烷杆菌。

2.4 菌株 CF2 与耗氢细菌相匹配的人工共培养物对丁酸的降解

菌株 CF2 与亨氏甲烷螺菌菌株 JF1、布氏甲烷短杆菌菌株 1125、甲酸甲烷杆菌菌株 1535 和脱硫弧菌菌株 G11 相匹配的人工共培养物对丁酸的降解情况见表 3 所示。表 3 结果说明, 以巴豆酸为底物分离到的纯培养菌株 CF2 与已知的耗氢菌相匹配后, 可组成能够互营降解丁酸的人工互营共生培养物。

表 3 菌株 CF2 与已知耗氢菌组成之共培养物对丁酸的降解

Table 3 Degradation of butyrate by defined coculture combined the strain CF2 with known hydrogen consumer

与菌株 CF2 匹配的耗氢菌 Hydrogen Consumer	亨氏甲烷螺菌 菌株 JF1 <i>Methanospirillum hungatei</i> JF1	布氏甲烷短杆 菌菌株 1125 <i>Methanobacterium bryantii</i> 1125	甲酸甲烷杆 菌菌株 1535 <i>Methanobacterium formicicum</i> 1535	脱硫弧菌 菌株 G11 <i>Desulfovibrio</i> sp. G11
培养时间 Time(d)	丁酸含量 Content of Butyrate (mmol/L)			
0	20.1	22.3	14.7	17.7
7	18.8	18.0	12.2	16.3
14	17.9	13.1	1.8	15.1
21	13.2	8.0	0.5	14.9
28	1.7	5.8	—	7.2
35	—	—	—	2.0

表 4 菌株 CF2 与甲酸甲烷杆菌菌株 MF2 再组合的共培养物降解丁酸产甲烷和乙酸的情况

Table 4 Degradation of butyrate and production of methane and acetate by reassociated coculture

培养 时间 Time (d)	底物 Substrat 丁酸 Butyrate (mmol/L)	产物 Product	
		甲烷 Methane ( $\mu\text{mol/L}$ )	乙酸 Acetate (mmol/L)
0	25.1	0	9.9
2	22.9	10	10.1
9	21.0	10	10.6
16	19.5	60	15.5
23	6.7	280	38.4

将菌株 CF2 与分离纯化后的原来与其组成共培养物的甲酸甲烷杆菌菌株 MF2 重新组合成共培养物,观察其产甲烷和降解丁酸的情况,结果见表 4。表 4 说明,所分离的两株菌确实是互营降解丁酸的共培养物中的基本成分。

### 3 讨 论

利用丁酸作为底物从厌氧颗粒污泥中分离到降解丁酸产甲烷的共培养物 BF2。实验证明,这个共培养物是由专性质子还原产乙酸细菌和产甲烷细菌组成的,其中没有硫酸盐还原菌。在此基础上,利用巴豆酸作底物,同时用抑制剂抑制产甲烷细菌生长,成功地将共培养物 BF2 分离为专性质子还原产乙酸细菌沃尔夫互营单胞菌嗜脂肪亚种菌株 CF2 和产甲烷细菌甲酸甲烷杆菌菌株 MF2 两个纯培养物,将它们再组合后仍可降解丁酸;将菌株 CF2 与亨氏甲烷螺菌、布氏甲烷杆菌菌株 1125、甲酸甲烷杆菌菌株 1535 和普通脱硫弧菌 G11 组合成人工共培养物,可以厌氧降解丁酸。

本文所述方法与前人<sup>[1,9]</sup>所不同的是,我们单独用巴豆酸,而不是用丁酸和巴豆酸二者的混合作底物,同时抑制产甲烷细菌的生长,将共培养 BF2 中两种互养细菌分离开来。实验结果表明,菌株 CF2 降解巴豆酸的能力受分子氢、甲酸和高浓度乙酸抑制(见 2.1.3),同时与不能利用甲酸产生甲烷的亨氏甲烷螺菌菌株 JF1 也能组成可降解丁酸产生甲烷的人工共培养物(见表 3),而且在此人工共培养物中加入甲酸后,虽然丁酸停止降解,却仍可产生甲烷(结果未列出)。这些结果表明,菌株 CF2 可能含有从甲酸产生氢的酶类,Boone 等<sup>[15]</sup>也曾作过类似的推断。

### 参 考 文 献

- [1] McInerney M J, Bryant M P, Hespell R B *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 1029~1039.
- [2] Roy F, Samain E, Dubauguier H C *et al.* *Arch Microbiol*, 1986, 145: 142~147.
- [3] Stieb M, Schink B. *Arch Microbiol*, 1985, 140: 387~390.
- [4] Lorowity W H, Zhao H, Bryant M P. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39: 122~126.
- [5] Shelton D R, Tiedje J M. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 840~848.
- [6] Henson J M, Smith P H. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49: 1461~1466.
- [7] Ahring B K, Westermann P. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 429~433.
- [8] Beaty P S, McInerney M J. *Arch Microbiol*, 1987, 147: 389~393.
- [9] Zhao H, Yang D, Woese C R *et al.* *Inter J Syst Bacteriol*, 1990, 40: 40~44.
- [10] 刘聿太,王大粗. 中国沼气, 1987, 5(3): 8~11.
- [11] 钱泽澍,马晓航. 微生物学报, 1989, 29(4): 321~329.
- [12] 赵宇华,钱泽澍. 微生物学报, 1991, 31(2): 133~138.
- [13] Houwen F P, Dijkema C, Schoenmakers C H H *et al.* *FEMS Microbiol Letters*, 1987, 41: 269~274.
- [14] 东秀珠,屠雄海,苏京军,等. 微生物学报, 1994, 34(2): 173~178.
- [15] Boone D R, Johnson R L, Liu Y *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1735~1741.
- [16] Dolfing J. Acetogenesis. In: Zehnder A J B ed. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: Wiley Interscience Pub, 1988. 417~468.

## ISOLATION AND REASSOCIATION OF ACETOGEN AND METHANOGEN IN A SYNTROPHOBIC COCULTURE DEGRADING BUTYRATE ANAEROBICALLY

Cheng Guangsheng Tu Xionghai Dong Xiuzhu Su Jingjun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 160080)

**Abstract** Anaerobic coculture BF2 which degraded butyrate into acetate and produced methane was isolated from granular methanogenic sludge. The coculture is associated syntrophically the *Syntrophomonas* subsp. *saponavida* strain CF2 with *Methanobacterium formicicum* strain MF2 and appeared to degraded  $C_4 \sim C_{18}$  fatty acids including isobutyrate. The optimal temperature and pH for growth was 37°C and 7.7 respectively. The strain CF2 was obtained in pure culture with crotonate as substrate and produces acetate and butyrate. The doubling time of strain CF2 in crotonate media was about 20 hours. Strain CF2 is Gram negative, slightly curved  $0.2 \sim 0.3 \times 2.0 \sim 3.0 \mu m$  with round ends, motile by lateral flagellation at the concave side, non sporeforming. With a hydrogen scavenging organism, such as *Methanospillum hungatei* JF1, *Methanobacterium formicicum* 1535, *Methanobrevibacterium bryantii* 1125 and *Desulfovibrio* sp. B11, the strain CF2 paired up and the defined coculture degraded butyrate to acetate. When the strain CF2 associated with the original accompanist, *Methanobacterium formicicum* strain MF2, the reassociated coculture degraded butyrate to acetate and produced methane again.

**Key words** Butyrate, Anaerobic degradation, Coculture, *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida*, *Methanobacterium formicicum*