

厌氧降解中互营产甲烷代谢机制的探讨

东 秀 珠

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

厌氧降解是厌氧微生物将复杂有机物转化为简单碳化物的过程。在无光、无硝酸盐及硫酸盐存在时, 这些碳化物以甲烷和 CO_2 的形式

出现。整个生化过程包括了复杂有机物转化为简单碳化物的碳代谢途径和电子流方向。 ^{14}C 跟踪技术的应用和优势菌种的分离及特征研究已得出了准确的碳代谢流程图(图1), 但由于缺少精确的技术和手段, 电子流的途径, 即在有机物的氧化过程中, 电子是如何从被降解的底物传到终产物的尚不明了。

本文参考有关文献, 总结了几个关于互营产甲烷代谢中控制电子流机制的理论或假说, 比较了过去和现在对互营产乙酸菌与产甲烷菌之间电子偶联的看法。

(一) 产甲烷状态下有机物的厌氧降解

在产甲烷状态下, 有机物经一系列生化过程, 最终被分解为以 CO_2 为最高氧化态和以甲烷为最低还原态的碳化物。整个过程只有少量的能量产生, 而且靠三个生理群的细菌协同完

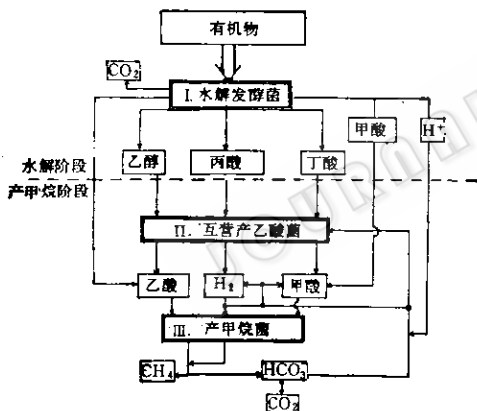


图1 有机物厌氧降解中几个营养群细菌之间的碳和电子流程图⁽¹⁾

(虚线表示水解阶段与互营产甲烷阶段的界限)

表 1 在无硫酸盐和硝酸盐时厌氧生态系中重要的反应^[1]

反 应	$\Delta G^{\circ'}(\text{KJ/mol})$
总反应: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+$	-403.6
水解发酵细菌: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{乙醇} + 2\text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+$	-225.4
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2 \text{乳酸} + 2\text{H}^+$	-198.1
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{丁酸} + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-254.4
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 3 \text{乙酸} + 3\text{H}^+$	-310.6
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{HCO}_3^- \longrightarrow \text{琥珀酸} + \text{乙酸} + \text{甲酸} + 3\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-144.0
$3 \text{乳酸} \longrightarrow 2 \text{丙酸} + \text{乙酸} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-164.8
$2 \text{乳酸} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{丁酸} + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-56.2
互营产乙酸细菌: $\text{乙醇} + 2\text{HCO}_3^- \longrightarrow \text{乙酸} + 2 \text{甲酸} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	+7.0
$\text{乙醇} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{乙酸} + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	+9.6
$\text{乳酸} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{乙醇} + 2\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	-3.96
$\text{丁酸} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{乙酸} + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	+48.1
$\text{苯甲酸} + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3 \text{乙酸} + 2\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{CO}_2$	+53.0
$\text{琥珀酸} + 4\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{乙酸} + 3\text{H}_2 + \text{H}^+ + 3\text{HCO}_3^-$	+56.1
$\text{丙酸} + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{乙酸} + 3\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	+76.1
产甲烷菌: $\text{乙酸} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
$4 \text{甲酸} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^-$	-130.4

成(图 1, 表 1)。

1. 营养群 I: 水解发酵微生物将复杂的有机物(如大分子碳水化合物、蛋白质及脂肪)水解为单体(低分子糖、氨基酸等),之后再发酵成短链脂肪酸及醇类(如丙酸、丁酸、及乙醇等), CO_2 和 H_2 或甲酸。

2. 营养群 II: 互营产乙酸菌(也称产氢产乙酸菌)能够氧化这些发酵产物为合成甲烷的前体——乙酸、 CO_2 和 H_2 或甲酸。这是一群特殊的真细菌, 每个种只专化代谢有限的几种发酵产物, 如只降解丙酸的 *Syntrophobacter wolinii*^[2] 和只降解 4—8 碳原子脂肪酸的 *Syntrophomonas wolfei*^[3]。在标准热力学条件下, 这些物质降解反应的自由能变化($\Delta G^{\circ'}$)多是正值, 是热力学上难进行的反应(表 1), 因此这步反应往往成为整个代谢的限速步骤。

3. 营养群 III: 产甲烷菌是厌氧消化系统中最重要的终端营养群。所有的产甲烷菌属于古细菌。它们只利用一碳和二碳化合物合成甲烷。消化器中的多数产甲烷菌对底物具有一定

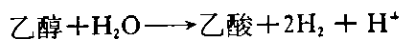
的专化性, 可分为利用乙酸的产甲烷菌和还原 CO_2 的产甲烷菌, 后者利用 H_2 、甲酸、甲醇和甲酰胺作为电子供体还原 CO_2 产甲烷。所有甲烷合成的自由能变化为负值。

(二) 种间氢转移理论

1967 年 Bryant 等发现, Barker^[4] 描述的一个可厌氧降解乙醇为甲烷和乙酸的菌株 (*Methanobacillus omelianskii*), 实际上是两种细菌的共培养物。其中 S 菌株(未定名)氧化乙醇为 H_2 和乙酸; 产甲烷菌(现定名 *Methanobacter bryantii*) 则利用 H_2 和 CO_2 合成甲烷。当产甲烷菌不存在时, S 菌株不能氧化乙醇且不能生长。Bryant 等^[5] 用乙醇氧化的热力学来解释这个现象。

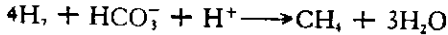
在标准热力学状态下, 乙醇氧化和甲烷生成的反应及自由能变化如下:

(1) S 菌株:



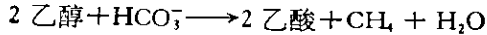
$$\Delta G^{\circ'} = +9.6 \text{ KJ/mol}$$

(2) 产甲烷菌:



$$\Delta G^{\circ'} = -135.6 \text{ KJ/mol}$$

(3) 二者互营生长:



$$\Delta G^{\circ'} = -116.4 \text{ KJ/mol}$$

在标准状态下, 乙醇氧化反应的自由能变化 ($\Delta G^{\circ'}$) 为正值, 反应不能发生。根据非标准热力学状态下自由能变化 ΔG° 和 $\Delta G^{\circ'}$ 的关系。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[\text{乙酸}][\text{H}_2]^2}{[\text{乙醇}]}$$

如果产生的乙酸和 H_2 被去除, ΔG° 应变为负值, 反应向氧化乙醇的方向进行。乙酸和 H_2 都是合成甲烷的底物, 它们的去除既提供了 *S* 菌株的生长条件, 又提供了产甲烷菌的碳源和能源。由此 Hungate^[6] 和 Wolin^[7] 提出了种间氢转移理论, 在厌氧生态中, 有机物的降解靠几个菌群协同完成, 其中一种微生物氧化底物后产生的氢转移到另一种微生物, 并作为其还原当量, 以此控制着整个生态系的电子流。种间氢转移的一个特征是, 嗜氢菌通过消耗氢可引起产氢菌产生比无嗜氢菌时较多的氢。如白色瘤胃球菌 (*Ruminococcus albus*)^[8] 在纯培养时, 发酵葡萄糖为乙酸、乙醇、 CO_2 和 H_2 ; 但在与一个还原延胡索酸为琥珀酸的细菌 (*Wolinella succinogenes*) 共培养时, 葡萄糖发酵为乙醇一步终止。其原因是 *W. succinogenes* 消耗了更多的氢用于还原延胡索酸, 使得 *R. albus* 增加了丙酮酸流向乙酸, 而不是电子库的发酵产物——乙醇。而且共培养时, 从一个分子的葡萄糖得到的 ATP 分子数比纯培养时多。种间氢转移的另一个特征是, 这些菌的产氢系统常被氢抑制, 只有当氢从环境中移走时才能产生大量的氢。这些菌几乎完全依赖于这个抑制系统进行有机物的氧化, 所以必须和嗜氢菌互营生长在底物上。这就是所谓的严格互营产氢产乙酸菌, 如降解丁酸的产乙酸菌沃氏互营单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*), 只有和 *M. bryantii* 或 *Methanobrevibacter arboriphilus* 共培养时才能降解丁酸产甲烷^[9]。

H_2 分压对各种有机酸和醇类的自由能变化的影响(图2)表明, 不同的互营代谢只能在一定的 H_2 分压范围内发生^[9]。互营产甲烷的丙酸氧化 H_2 分压范围在 1.1×10^{-4} — 2.5×10^{-6} atm., 而乙醇氧化的范围就宽些。

这个种间电子转移机制的生态生理学结论一种间 H_2 转移理论是基于以下假说: (1)生态学的现象可用平衡热力学来解释; (2)标准状态(单位活力)接近生态学上有关的底物和产物浓度; (3)所有有关的成份都均匀分布在这个环境中; (4)当把 H_2 加入一个复杂的生态学或一确定的共培养物时, 只有一种可预料的效应, 即热力学抑制。

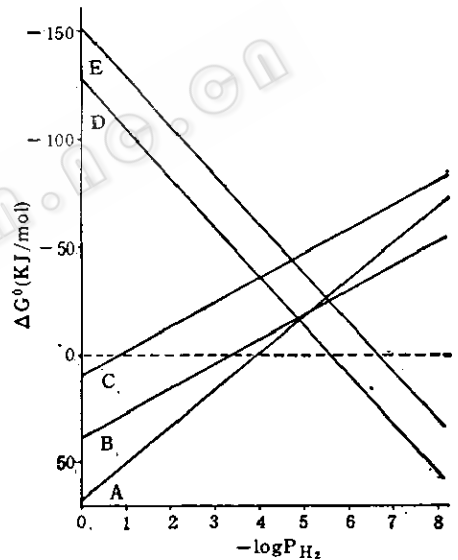


图2 氢分压对丙酸(A)、丁酸(B)和乙醇(C)氧化的自由能变化的影响以及氢分压对从 H_2 和 HCO_3^- 合成甲烷(D)和 H_2 还原硫酸盐(E)的自由能变化的影响^[9]

(这些计算的前提是假设 HCO_3^- 的浓度为 30 mmol/L, 其他物质的浓度为 20 mmol/L, 甲烷的分压为 0.7 atm., 温度为 25°C, pH = 7。计算所用的 $\Delta G^{\circ'}$ 值引自文献[10])

(三) 种间甲酸转移理论

1. 对种间 H_2 转移理论的怀疑: 1988年 Thiele 和 Zeikus^[11] 综述了过去有关文献, 发现种间 H_2 转移理论作为连接电子流机制的矛盾。

根据种间 H_2 转移理论所基于的热力学基础, 耗氢菌—产甲烷菌应维持 H_2 分压远远低于 10 pa 以使互营代谢顺利进行, 但纯培养研究

表明,即使在无产乙酸的产 H_2 时, *M. formosicum*, *M. bryantii* 和 *M. hungatei* 都不能使 H_2 分压低于 6.5pa。产甲烷菌合成甲烷时的最低域值大约比表 2 中列出的生态系的 H_2 浓度高 6 倍。因此产甲烷菌不能维持互营产乙酸菌所要求的 H_2 浓度^[11]。

表 2 不同厌氧生态系中 H_2 甲酸浓度及利用的表观值

生态系	水平 (μmmol)		表 观 Ks(μmmol)		参考文献
	甲酸	H_2	甲酸	H_2	
淡水沉积	10—20	$1-3 \times 10^{-2}$	NM	3—7	[20]
瘤胃系统	5—30	0.2—1.5	NM	NM	[6,21]
消化器	<10—20	0.2—2.5	NM	4—6	[22]

NM: 未测定

Boone 等^[12]计算了 H_2 和甲酸在微生物细胞之间可能的扩散能力,发现自然界中低的 H_2 浓度使得它不可能快速扩散到产甲烷细胞,以达到那些生态系中高的甲烷合成速率,但甲酸的浓度和扩散力却有此能力。

甲酸与 H_2 在热计量学和能量学上相当,许多产甲烷菌既可利用 H_2 还原 CO_2 ,又可利用甲酸合成甲烷。如在不同生态系中常见的 *M. hungatei* 和 *M. formosicum*^[13]。另外有些产 H_2 产乙酸菌也产生甲酸脱氢酶^[14]。

Thiele 和 Zeikus 认为 H_2 转移理论与自然界现象产生矛盾的原因在于: (1) 生活细胞不是处于热力学平衡状态,而且是开放系统,因此只能作为非平衡热力学体系来处理; (2) 自然界中或应用生态系中的底物与产物浓度的化学活力通常为 $10^{-2}-10^{-5}$; (3) 微生物及其产物通常有一定的空间组织; (4) H_2 是互营产乙酸的抑制剂又是产甲烷的底物,当把 H_2 加到产甲烷的互营培养物中,它可通过热力学效应直接抑制产乙酸,也通过与未知的中间产物 XH_2 (例如甲酸) 竞争作为产甲烷的底物而间接抑制互营产乙酸。因此不可能用热力学理论去确定互营降解中种间电子转移的机制。另外热力学所研究的只是初始状态和终了状态,而不涉及反应的途径。只有动力学的研究才能决定哪条途径是重要的。

2. 种间甲酸转移理论的依据: 为了探讨互营降解中电子转移的机制, Thiele 和 Zeikus^[15,16] 用一个处理秸秆消化器中分离出的活性絮块作为模式系统,设计了一套乙醇转化为甲烷的实验, Chartrain 和 Zeikus^[17,18] 曾用这个消化器对由乳糖产甲烷的微生物及其代谢特征进行了研究。已知其中的互营产乙酸菌以 *D. vulgaris* 为代表,它与 *M. formosicum* 一起将乙醇和乳酸互营代谢为乙酸和还原当量; 分解乙酸的产甲烷菌包括 *Methanosarcina*

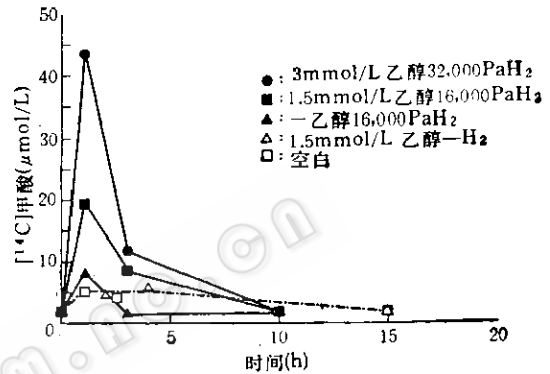


图 3 厌氧消化液的互营甲烷产生对乙醇和 H_2 的依赖性

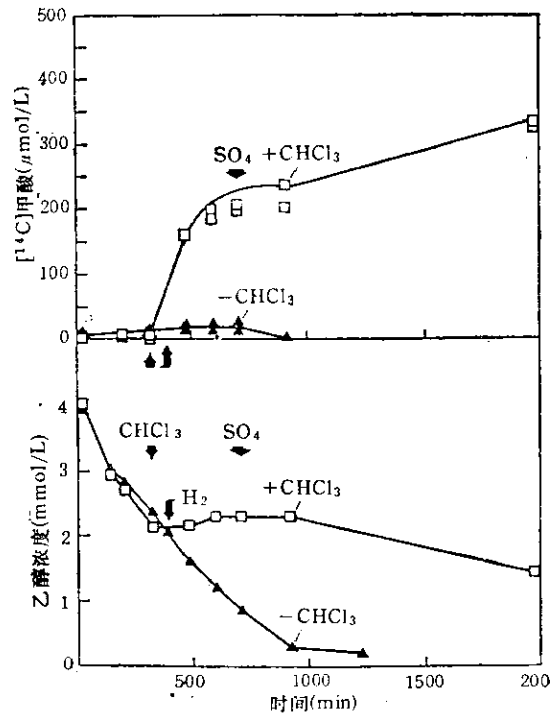


图 4 在有产甲烷抑制剂氯仿 ($CHCl_3$) 存在和不存在时,外源 H_2 和硫酸盐对乙醇转化为甲烷的影响。

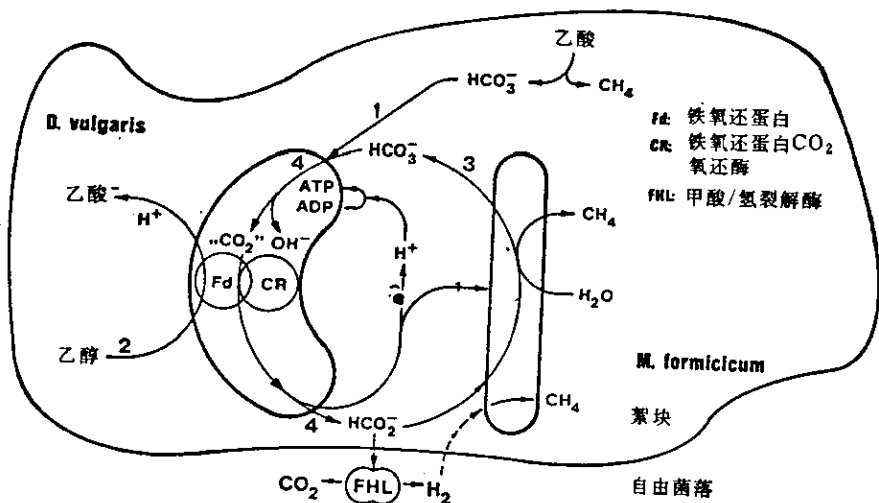


图5 互营乙醇转化中控制电子流的假定模式: 甲酸-碳酸氢钠电子阀循环

barkeri 和 *Methanothrix soehngeni*。

图3比较了 H_2 和乙醇的加入对秸秆消化液将 ^{14}C 结合为甲酸的影响。在只加入外源的乙醇 (1.5mmol/L) 或只加入 H_2 (16000pa) 时, ^{14}C -甲酸的水平总在 $10\mu mol$ 以下; 只有同时乙醇和 H_2 时, 大量的 CO_2 才能合成甲酸, 而且形成的 ^{14}C -甲酸的量取决于乙醇的浓度。如果 H_2 是 CO_2 还原的生理学的电子供体, 那么在只有 H_2 (16000pa) 和 H_2 (16000pa) 与乙醇同时存在时, ^{14}C -甲酸的水平应当相同, 但结果并非如此。从这个实验得知, 甲酸不是 H_2 还原 CO_2 的产物, 而与乙醇的浓度有关。

Thiele 和 Zeikus 又在此实验中加入氯仿抑制甲烷的形成, 从而阻断了甲酸的消耗; 并用 50% H_2 、30% CO_2 和 20% N_2 作为气相以减少液相中由于甲酸: H_2 裂解酶引起的甲酸分解。结果表明, 在 330 分钟时, 乙醇降解和甲烷产生停止, ^{14}C -甲酸积累达到 $330\mu mol$ (图4); 而在不加氯仿时, 甲酸浓度总在 10— $20\mu mol$ 之间。这表明在无氯仿时, 尽管有 50% H_2 存在, 利用甲酸的产甲烷菌也能快速利用甲酸。三个平行实验中 H_2 的加入并没有抑制乙醇的降解。

为了证实乙醇的降解是否被所积累的甲酸抑制, Thiele 等在氯仿抑制的实验瓶中加入 10mmol/L 的硫酸盐。因为乙醇氧化菌 (*D.*

vulgaris) 可利用硫酸盐作为电子受体。结果乙醇氧化又重新开始, 但甲酸的水平仍增加。这表明: (1) 甲酸是由乙醇和 CO_2 (HCO_3^-) 合成; (2) 当高浓度的甲酸存在时, 电子受体的缺乏抑制了乙醇的氧化。

他们的结论是: (1) 甲酸是重要的中间代谢物和有机物互营产甲烷中控制电子流的关键的还原当量; (2) 当乙醇或乳酸被氧化为乙酸时, 种间甲酸转移具有偶联电子流到甲烷的还原 CO_2 的功能。

3. 互营能量贮存中的甲酸-碳酸氢钠电子阀循环

根据以上的研究结果 Thiele 和 Zeikus^[4] 提出了控制电子流的甲酸-碳酸氢钠电子阀循环模式 (图5), 说明了在互营乙醇转化为甲烷时, 两个种之间电子流的偶联和能量贮存。

此模式认为, 在活性絮块中, 氧化乙醇的 *D. vulgaris* 和产甲烷的 *N. formicicum* 具有一定的位置排列使得产甲烷的 CO_2 再生与产乙酸的 CO_2 还原为甲酸得以偶联。其中甲酸作为种间电子流的中间载体。 HCO_3^- 是产乙酸菌的底物。产乙酸菌 *D. vulgaris* 将 4 个分子的 HCO_3^- 转移到细胞质中, 然后由假设的铁氧还蛋白- CO_2 氧还酶形成 CO_2 和 OH^- 。 CO_2 是此酶的生理学底物, 它可氧化来自产乙酸的乙

醇代谢中还原的铁氧还蛋白分子。4 个分子的甲酸形成后,在生理学 pH 下分解成甲酸盐和质子。产甲烷菌 *M. formicicum* 利用 4 个分子的甲酸盐、一个质子和一个水形成一分子甲酸和 3 分子的 HCO_3^- , 另一分子的 HCO_3^- 或 CO_2 由此系统中的乙酸分解产甲烷菌提供。如果产乙酸的 CO_2 还原酶与外膜表面相联,且碳酸酐酶在产乙酸菌的细胞质内,那么分解代谢的 CO_2 还原也将导致水的裂解、胞质膜空隙的酸化及在产乙酸菌内产生质子动力 (PMF)。可见产乙酸的 CO_2 还原在理论上有可能通过电子转移偶联磷酸化而产生 ATP。

此模式表明了消化生态系中甲酸代谢的动力学, 90% 以上的依赖于 CO_2 还原的乙醇代谢通过种间甲酸转移来完成, 只有少于 10% 的通过种间 H_2 转移来完成, 而这些 H_2 可能由絮块内扩散到消化器可溶部分的甲酸分解产生。

(四) 其他机制存在的可能性

Stams 等(待发表)从一个产甲烷的丙酸降解富集物中分离到了只含丙酸降解菌而无电子受体伙伴—产甲烷菌的“纯”培养物。这对互营产乙酸机制的研究提供了很大的方便。我们曾用这个丙酸降解培养物(简称 PDC)设计了一套实验(待发表),发现 PDC 只在与 *Methanospirillum hungatei* 及 *Methanobacter formicicum* 的共培养物中能有效地降解丙酸, 并产生乙酸和甲烷。这两个甲烷菌既可利用 H_2/CO_2 又可利用甲酸。而 PDC 与只利用 H_2/CO_2 的产甲烷菌 *M. arboriphilus* 的共培养物几乎不降解丙酸, 这又是一个支持种间甲酸转移理论的实例。

我们又组成了 PDC 与脱硫弧菌 (*Desulfovibrio* sp.) G11 的共培养物。*Desulfovibrio* G11^[19] 既可利用 H_2 又可利用甲酸作为电子供体去还原硫酸盐, 但不利用 C_2 以上的有机酸或醇类。G11 对 H_2 和甲酸的亲和力都比产甲烷菌高^[20], 从理论上讲, 这个共培养物应具有更高的丙酸降解效率。但结果是它并不降解丙酸(图 6B)。在 PDC 和 *M. hungatei* 的共培养

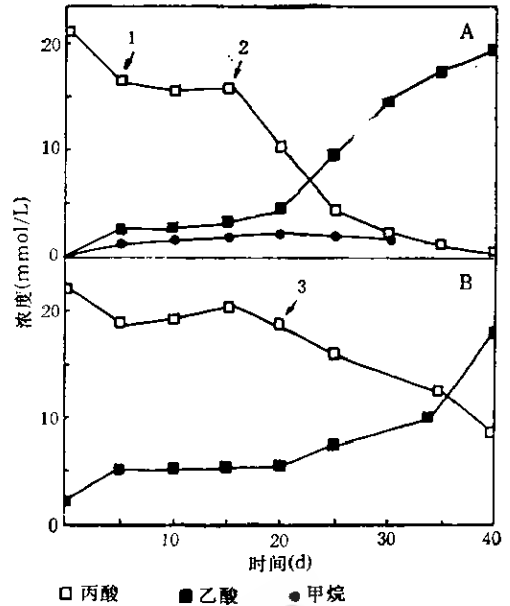


图 6 *M. hungatei* 对丙酸降解的影响

1. 加 BrES; 2. 加 G11 和 20mmol/L SO_4^{2-} ;
3. 加 *M. hungatei* 无细胞抽提液

物中加入 10mmol BrES (溴乙烷磺酸盐)——一个特异的产甲烷抑制剂, 甲烷合成完全被抑制, 同时丙酸降解和乙酸产生也停止。当加入 G11 培养物和 20mmol 硫酸盐时, 丙酸降解和乙酸产生又重新开始, 似乎 *M. hungatei* 是 PDC 降解丙酸必需的伙伴(图 6A)。为确证这点, 我们在 PDC 和 G11 的共培养物中加入 1% 的 *M. hungatei* 无细胞抽提液, 丙酸降解开始并产生乙酸, 但无甲烷形成(图 6B)。由此可见, 在丙酸的互营降解中, 甲烷菌除了去除丙酸降解的抑制性产物外, 可能还为其提供某种必需的生长因子。即在互营产乙酸中, 除了控制电子流的氢转移或甲酸转移之外, 在降解伙伴之间还存在着其他的机制, 这点尚需进一步的探讨。

(五) 结论

产氢和/或产甲酸的产乙酸与还原 CO_2 的产甲烷之间的互营反应, 对控制厌氧消化中的限速代谢步骤非常重要。

从处理秸秆的活性污泥转化乙醇的实验得知, 无论从动力学还是热力学, 种间甲酸转移在控制互营降解中的电子流方面都比种间氢转移

更重要。

在互营降解中,降解伙伴之间除了通过种间氢或甲酸转移来协同完成有机物降解外,可能还有营养物质的提供。要确证这点需要进一步的研究。

参 考 文 献

1. Thiele J H and Zeikus J G: Handbook on anaerobic fermentation Marcel Dekker, New York, p537—595, 1988.
2. Boone D R and Bryant M P: *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626, 1980.
3. McInerney M J, Bryant M P, Hespell R B and Costerton J W: *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1029—1039, 1981.
4. Barker H A: *J. Biol. Chem.* 137: 153—167, 1941.
5. Bryant M P, Wolin E A, Wolin M J and Wolfe R S: *Arch. Microbiol.* 59: 20, 1967.
6. Hungate R E: *Arch. Microbiol.* 59: 153—164, 1967.
7. Wolin M J and Miller T L: *ASM News* 48: 561—565, 1982.
8. Ianotti E L, Kafkewitz P, Wolin M J and Bryant M P: *J. Bacteriol.* 114: 1231—1240, 1973.
9. Houwen F P: ph. D. thesis p17. Dept. of Microbiology, Wageningen Agriculture University, The Netherlands. 1990.
10. Thauer R K, Jungermann K and Decker K: *Bacteriol. Rev.* 41: 109—180, 1977.
11. Lovey D R: *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1530—1531, 1985.
12. Boone D R Jojnsen R L and Y T Liu: *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1735—1741, 1989.
13. Ferry J G, Smith P H and Wolfe R S: *Inter. J. System. Bacteriol.* 24: 465—469, 1974.
14. Houwen F P, Plokker J, Stams A J M and A J B Zehnder: *Arch. Microbiol.* 155: 52—55, 1990.
15. Thiele J H and Zeikus J G: *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 20—29, 1988.
16. Thiele J H, Chartrain M and Zeikus J G: *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 10—19, 1988.
17. Chartrain M and Zeikus J G: *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 188—196, 1986.
18. Chartrain M, Bhatnagar and Zeikus J G: *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 180—187, 1986.
19. McInerney M J et al: *Arch. Microbiol.* 122: 129—135, 1979.
20. Lovey D, Dwyer D F and Klug M J: *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1373—1379, 1982.
21. Hungate R E, Smith W, Bandrop T, Yu T and Rabinowitz J C: *J. Bacteriol.* 102: 389—397, 1970.
22. Chartrain M, Bhatnagar L and Zeikus J G: *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1147—1156, 1987.

(1991-10-17 收稿)