

厭氣微生物轉變有機廢棄物成甲烷的近展

(原著 Stephen H. Zinder)

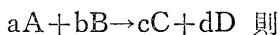
胡 茄 莉* 方 靜 文** 譯

利用微生物將有機物轉變成甲烷的過程，已成為目前處理廢棄物及能源回收最引人的方法。最近 Switzenbaum (ASM News 49:532-536, 1983) 發表一篇就環境能源觀點以及以反應器設計為重點的文章。本文則以微生物之觀點來看，並欲補足 Switzenbaum 文中之不足。主要著重於敍述這幾年來的研究發展結果，以便我們更了解參與有機物轉變成甲烷作用的微生物，以及探討未來如何利用微生物學使整個處理步驟更加以改善。

微生物轉變有機物成甲烷之過程中有三個重點

第一：厭氣代謝比好氣代謝來得特殊。例如，很多好氣菌可將纖維素完全分解成 CO_2 。然而，若欲將纖維素轉化成 CH_4 和 CO_2 ，則同時需要有幾種厭氣微生物共同參與方可達成。

第二：大部分存於基質中的自由能，可於 CH_4 中發現。這也是為什麼有機廢棄物轉變成甲烷之過程吸引人的原因，因為生成的 CH_4 可供給能源。對微生物而言，同時也表示微生物分解基質所需的能量也少了。例如， glucose 好氣氧化生成 CO_2 的反應， $\Delta G^{\circ\prime} = -2840 \text{ KJ}$ ，然而將其轉變成 CH_4 和 CO_2 則大約只有 $1/7$ 的能量 [表一，反應一]。但這也就是厭氣消化的優點，因為厭氣消化產生的生質量 (biomass)，較好氣消化來得少，所以對於消化後的生質量或污泥量之處理較無問題。同時也表示要了解厭氣反應槽的過程，我們必需考慮到熱力學。表一中例舉了一些在厭氣反應槽中之反應及其自由能。 $\Delta G^{\circ\prime}$ 表示在標準狀況下之值， $\Delta G'$ 是在中溫厭氣反應槽之自由能， $\Delta G'$ 值是利用 Nernst 公式計算而得，在 37°C 下其反應式為：



$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + 5.94 \log \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

[A], [B], [C], [D] 為溶質濃度或氣體的分壓⁽²²⁾。

反應物和生成物之濃度對自由能之影響很大 (表一)，若反應中有 H_2 之參與則需特別注意，因為其可大量地參與反應且其分壓濃度分佈極廣 ($10^0 - 10^{-5} \text{ atm}$)。 H_2 利用菌如甲烷生成菌 (methanogens)，利用 H_2 後可使 H_2 之分壓維持很低，因此可促進 H_2 生成之反應，所謂菌種和菌種之間的 H 原子傳遞作用，就是基於這種原理。

第三：許多重要的厭氣生物轉化菌是絕對厭氣性且生長得很慢。這些細菌在培養上和分離上很困難，也因此減低了很多微生物學家的研究興趣。近幾年來發展出一套很簡便的厭氣培養法包含有特製橡皮塞培養法 (crimp-on butyl rubber) 和可靈活操作的厭氣手套箱⁽¹⁾，使新的厭氣性菌的分離速度大為增加。

* 逢甲大學環境科學系副教授

** 逢甲大學環境科學系助教

表一：在厭氣反應槽中典型反應以及在標準和特定狀況^(a) 下的自由能

反應號碼和種類	反應物	產物	自由能(KJ/reaction) $\Delta G^\circ / \Delta G'$
1. Conversion of glucose to CH ₄ and CO ₂	Glucose+3H ₂ O	3CH ₄ +3HCO ₃ ⁻ +3H ⁺	-403.6 -399.1
2. Conversion of glucose to acetate and H ₂	Glucose+4H ₂ O	2CH ₃ COO ⁻ +2HCO ₃ ⁻ +4H ⁺ +4H ₂	-206.3 -318.5
3. Methanogenesis from acetate	CH ₃ COO ⁻ +H ₂ O	CH ₄ +HCO ₃ ⁻ +H ⁺	- 31.0 - 24.5
4. Methanogenesis from H ₂ and CO ₂	4H ₂ +HCO ₃ ⁻ +H ⁺	CH ₄ +3H ₂ O	-135.6 - 31.6
5. Acetogenesis from H ₂ and CO ₂	4H ₂ +2HCO ₃ ⁻ +H ⁺	CH ₃ COO ⁻ +2H ₂ O	-104.6 - 7.0
6. Amino acid oxidation	Leucine+3H ₂ O	Isovalerate ⁻ +HOO ₃ ⁻ +H ⁺ +NH ₄ ⁺ +2H ₂	+ 4.2 - 59.5
7. Butyrate oxidation to acetate	Butyrate+2H ₂ O	2CH ₃ COO ⁻ +H ⁺ +2H ₂	+ 48.1 - 17.4
8. Propionate oxidation to acetate	Propionate+3H ₂ O	CH ₃ COO ⁻ +HCO ₃ ⁻ -HCO ₃ ⁻ +H ⁺ +3H ₂	+ 76.1 - 5.5
9. Benzoate oxidation to acetate	Benzoate+4H ₂ O	3CH ₃ COO ⁻ +HCO ₃ ⁻ -3H ⁺ +3H ₂	+ 89.7 - 15.7
10. Reductive dechlorination	H ₂ +CH ₃ Cl	CH ₄ +H ⁺ +Cl ⁻	-163.4 -121.3

(a)熱力學的數據可由 Thauer et al⁽²²⁾ 和 Weast⁽²⁵⁾ 得到。標準狀況是：溶質/molar，氣體1atm, 25°C, pH7，特定狀況是：厭氣消化物在37°C, pH7，產物和反應物的濃度如次：glucose, leucine, benzoate，和 CH₃Cl, 10micromolar; acetate, butyrate, propionate，和 isovalerate 1millimolar; HCO₃⁻ 和 Cl⁻ 為 20millimolar; CH₄:0.6 atm, H₂:10⁻⁴atm。

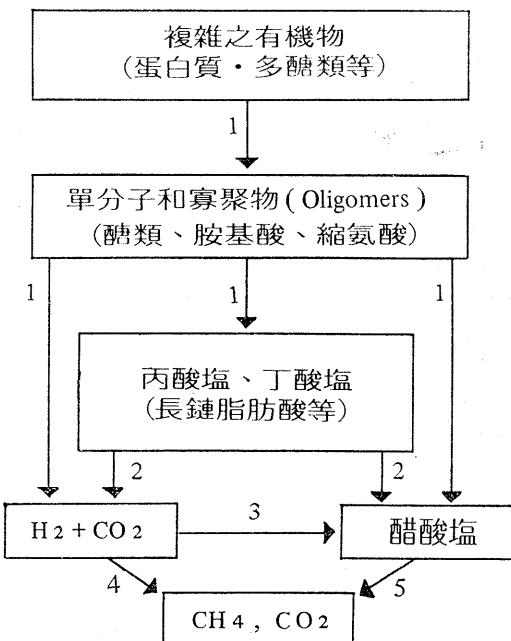
由 C 至 CH₄ 之反應途徑

1983年 Switzenbaum 曾詳細介紹過厭氣反應槽 (anaerobic bioreactor) (ASM News)。固體廢棄物如污泥、堆肥、木質纖維 (lignozellulose) 廢棄物或是大分子的聚合物，通常都是在 37°C 下，14~30天之水力停留時間利用連續或半連續性的槽型反應器來處理。從食品和工廠所排出的可溶性廢棄物可利用接觸薄膜式 (attached-film) 或污泥毯反應槽 (Sludge blanket reactor) 來處理 (ASM News 1983)。圖一顯示參與將複雜之聚合物轉變或甲烷作用中之微生物羣，此模式是以 McInerney 和 Bryant⁽¹⁴⁾ 之模式為基礎。複雜聚合物被醣酵性細菌所產生的酵素，如纖維分解酵素 (cellulases)，澱粉分解酵素 (amylases) 和蛋白分解酵素 (proteases) 等，分解成可溶性的產物 (圖一，第1組)。然後這些產物再被醣酵成短鏈的脂肪酸，H₂ 和 CO₂。氫產生醋酸菌 (hydrogen-producing acetogenic bacteria, 第2組) 又會將碳數為 C₂ 以上之脂肪酸分解成醋酸 (acetic acid) (圖一，第2組)。這兩組菌的主要作用是將大分子之基質轉變成 acetate, H₂ 和 CO₂。H₂ 和 CO₂ 可經由氫氧化醋酸菌 (H₂-oxidizing acetogens) 轉變成醋酸 (第3組) 或由二氧化

碳還原氫氧化甲烷生成菌 (CO_2 -reducing, H_2 -oxidizing methanogens) 產生 CH_4 (圖一，第 4 組)。Acetate 亦可經由醋酸化甲烷生成菌 (aceticlastic methanogens)，(圖一，第 5 組) 分解成 CH_4 和 CO_2 。一般都認為在厭氣反應槽中，甲烷之生成至少有 $2/3$ 是由 acetate 而來，而 $1/3$ 才為經由二二氧化碳還原作用之過程。

微生物種類以及其間的反應關係

醣酵菌包括各式各樣的細菌，代表許多不同的代謝作用。厭氣反應槽之生長環境就如同反芻動物的瘤胃 (rumen) 在瘤胃中至少有 17 種扮演著很重要角色⁽²⁶⁾ 的醣酵性菌種存在，然而幾乎沒有對於反應槽中醣酵性族羣之研究報告。Iannotti 等⁽⁹⁾以非選擇性培養基，研究在中溫豬糞消化槽中微生物族羣分佈的情形，其中以 **Bacteroides**, **Peptostreptococcus**, **Peptococcus**, **Eubacterium** **Lactobacillus** 和二種未確認的微生物為主。**Clostridia** 也可能在其中扮演一個很重要的角色。顯然的，基質的本性將可決定那一種醣酵性菌佔優勢。



圖一：厭氣反應槽中參與由複雜有機物轉變成 CH_4 過程中之微生物羣。

第 1 組醣酵性菌 (fermentative bacteria) ,

第 2 組氫產生醋的生成菌 (hydrogen-producing acetogenic bacteria) ,

第 3 組氫利用醋酸生成菌 (hydrogen-consuming acetogenic bacteria) ,

第 4 組二氧化碳還原甲烷生成菌 (CO_2 -reducing methanogens) ,

第 5 組醋酸化甲烷生成菌 (aceticlastic methanogens)

以碳水化合物而言，雖然碳水化合物在純菌之醣酵下可生成多種產物，顯然的，揮發性的脂肪酸為主要產物。 H_2 的分壓會影響到碳水化合物代謝的產物；如氫利用甲烷生成菌可

將 H_2 之分壓保持在 10^{-3} atm 以下，使 $NAPH_2$ 氧化成 H_2 之反應得以進行（表一，反應 2），而有助於六碳糖經糖解作用及醋酸磷酸化作用釀酵成醋酸之反應，同時產生 H_2 , CO_2 以及 4mole 的 ATP。而在 H_2 的分壓較高的情形下，則較有利於還原性產物之產生，其順序為：丙酸（propionate）、丁酸（butyrate）、乙醇（ethanol）及乳酸（lactate）。六碳糖的釀酵經由糖解作用以產生酒精及乳酸的情形下，只可得 2mole 之 ATP。

胺基酸之分解可利用 Stickland 反應模式，以單獨或成對之方式進行釀酵作用。在胺基酸代謝中，菌種間 H_2 的傳遞也扮演了重要的角色。Widdel 和 Schnell (Abstracts of the 3rd International Symposium on Microbial Ecology, A-2, 1983) 曾經分離一些可氧化 alanine, aspartate 或 glutamate 成 acetate 之細菌，而它們是利用以 H_2 氧化 (H_2 -oxidizing) 菌或 glycine 來作為電子接收者。許多胺基酸包括具支鏈的胺基酸也都有以上的反應（表一，反應 6）。如果醋酸為碳水化合物唯一的釀酵產物，對一些胺基酸和含脂肪酸之脂質而言，長鏈的飽和脂肪酸則為其釀酵產物。

釀酵菌最為人激賞的或許就是那些與鹵化物有關的脫鹵反應。這些反應以熱力學觀點來看是可行的，而且可維持細菌的生長（表一，反應 10）。鹵化苯環物⁽²¹⁾，氯酚（chlorophenols）⁽⁴⁾，甚至對氯酚（pentachlorophenol）⁽⁷⁾都已知可以完全被厭氣性之微生物族羣分解掉。 C_1 及 C_2 之鹵化有機物如氯仿（chloroform）、四氯化碳（ CCl_4 ）、溴仿（bromoform）和三氯乙烯（trichloroethylene）等在低濃度下，可被甲烷生成菌在一種固定薄膜之生物反應器中完全分解⁽³⁾。有趣的是，以 ^{14}C 標識之氯仿及四氯化碳其分解之主要產物為 $^{14}CO_2$ 。雖然對這類有毒物質之分解作用，還有許多需要去探討研究之處，但是這個發現，對以厭氣去處理許多工業廢棄物之可行性提高了許多。

產氫醋酸菌之主要作用是將碳鏈長於醋酸的脂肪酸氧化，如 *Syntropho Wolfei*⁽¹⁵⁾ 可利用 β 氧化方式將含 4 至 7 碳數的脂肪酸分解成醋酸（表一，反應 7），*Syntrophobacter Welinii*⁽²⁾ 則可將丙酸氧化成醋酸， H_2 和 CO_2 （表一，反應 8）。這些反應都需在 H_2 的分壓小於 10^{-3} atm 或更低（以丙酸而言）時才會進行。因此這些細菌是絕對需氫氧化菌（hydrogen oxidizer）的配合以生存（ASM News 1982）。而這些產生甲烷之混合菌（Coculture）之生長相當慢，如 *S. wolfei* 與氫氧化菌之混合菌其世代時間為 84 小時，*S. welinii*^(2,15) 則為 161 小時。一種具有氧化安息香酸（benzoate）成醋酸的細菌（表一，反應 9）已經被分離出來，但此菌必需與硫酸還原菌或甲烷生成菌形成混合菌株（因在甲烷生成菌中仍有少數硫酸還原菌存在）⁽¹⁶⁾。而此甲烷生成混合菌株的世代時間為 166 小時。因此芳香族有機化合物的厭氣消化作用也可能需要依賴氫利用菌的存在方可。

氫利用醋酸產生菌（表一，反應 5），如 *Acetobacterium spp.* 和甲烷生成菌爭奪 H_2 。它們在厭氣反應槽中之活性並不常被估計。但曾有人研究在中溫及高溫之牛糞消化槽中，醋酸之產生只有 5 % 是由 CO_2 還原而得⁽¹²⁾，若氫利用醋酸菌有很高的活性的話是應該可以提高甲烷的產量。

在厭氣反應槽中的最終反應是由甲烷生成菌來完成。甲烷生成菌在生化上獨特之特性及其屬於古生代細菌屬（Archaeabacteria）之性質，已有人報導⁽¹⁾。甲烷生成菌雖為一羣細菌，它仍只利用醋酸或 C_1 之化合物（如 H_2 、 CO_2 、甲酸、甲基胺、甲醇、或 CO 等），以合成 CH_{40} 大多數的甲烷生成菌含有大量的電子傳遞者 F_{420} ，當用螢光顯微鏡觀察甲烷時⁽¹⁵⁾

可看見 F_{420} 所發出的螢光，除此之外，甲烷菌所含 pterin 之 F_{342} 產生之藍色螢光也可做為在厭氣槽中，甲烷菌存在之初步鑑定。

幾乎所有已知的甲烷生成菌均可將 H_2 , CO_2 轉換為 CH_4 (表一，反應 4)。在培養此菌時，當 H_2 之分壓為 1 大氣壓下，此反應之自由能為 $\Delta G^\circ = -135\text{KJ/reaction}$ 。然而在厭氣反應槽和其他自然系統中， H_2 分壓往往小於 10^{-3} 大氣壓，所以可用於反應的能量就少了 (在 H_2 分壓為 10^{-4} 大氣壓時，約為 -32KJ/reaction)。表示在相同條件下， CO_2 和醋酸作用以形成甲烷之能量，與上所述並無不同。由 H_2 及 CO_2 的甲烷生成作用的 ΔG° 值和醋酸生成作用是相似的，但是在非標準狀況下的反應槽中，甲烷生成菌顯現出特殊的能量優勢 (表一，反應 4 和 5)。中溫性的二氣還原甲烷生成菌的世代時間為 3 小時或更長些，同時自然界中或純粹培養甲烷菌時 H_2 的消耗速率之 km 值一般是 $2\text{--}12\text{micromole}$ (約 10^{-2} 大氣壓)。

在許多甲烷生成菌中僅有 2 種 *Methanosaicina* 和 *Methanotherrix* 是利用醋酸來生長的^(8, 20)。*Methanosaicina* 常呈團狀構造，是已知甲烷生成菌中最多才多藝的，它可利用 H_2 , CO_2 , 甲烷，甲基胺和醋酸，而在以醋酸為基質時的世代時間為 24 小時⁽²⁰⁾。*Methanotherrix* 為一種具外套膜的絲狀細菌，只可利用醋酸，且長得很慢，其世代時間為 $4 \sim 9$ 天⁽⁸⁾。*Methanotherrix* 將醋酸合成甲烷作用之 km 值是小於 1 millimolar，而同樣作用之 *Methanosaicina* 是 $3\text{--}5\text{ millimolar}$ ^(8, 20)。因此在停留時間短的系統中，*Methanosaicina* 佔優勢，同時在此系統中醋酸的濃度也高，反之 *Methanotherrix spp.* 則在慢速，停留時間長的系統中佔優勢。另外要加以說明之處為 *Methanotherrix spp.*，這種在厭氣反應槽中最重要的菌，其在菌體內 F_{420} 之含量很低，並不會產生螢光，但是 F_{420} 在 *Methanosaicina* 中會發螢光。

二氣還原及醋酸化甲烷生成菌在維持反應槽的穩定性上扮演很重要的角色。 H_2 濃度變化會特別激烈。在 H_2 的分壓為 10^{-4} 大氣壓下，反應槽每公升每天產生一公升甲烷時， H_2 的轉變速率為少於 15 秒。因此，如果 CO_2 還原甲烷生成菌不能有效的利用 H_2 ， H_2 的濃度則很快的增加，如此抑制了氧化芳香族化合物及一些短鏈、長鏈脂肪酸的醋酸化作用，因此也可能使整個醣酵途徑改變而不產生醋酸。脂肪酸濃度的增加可造成反應槽內 pH 之下降，而最後影響到整個厭氣消化作用。由於甲烷生成菌利用 H_2 時之 km 值為約 10^{-2} 大氣壓，而對脂肪酸氧化成醋酸時之 H_2 必需在 10^{-8} 大氣壓以下才行，因此在一個作用情形很好的反應槽中， CO_2 還原甲烷生成菌並未與 H_2 完全結合。對於醋酸化甲烷生成菌不能配合醋酸產生之速度來生長時，也可造成反應槽中 pH 之下降及反應槽作用之失敗。

1964 年 McCarty⁽¹⁸⁾ 認為混合反應槽需長停留時間及反應槽中酸濃度有增加的趨勢主要是由於脂肪酸利用菌之生長速度過慢所致。這說法和將脂肪酸氧化菌及醋酸化甲烷生成菌混合培養時，此混合菌株的世代時間為幾天的事實是一致的。事實上厭氣反應槽或接觸薄膜反應槽及污泥懸反應槽，也都可以用幾小時的水力停留時間，且這些處理系統也較能承受環境的變動。

高溫厭氣系統

雖然幾乎所有反應槽均在中溫下 ($35\text{--}40^\circ\text{C}$) 操作，但高溫系統 ($50\text{--}60^\circ\text{C}$) 逐漸受

重視。此系統的優點是停留時間短⁽²⁴⁾，木質纖維素的分解速度快且可消滅病原菌。缺點是此系統必需加熱以維持溫度，因此不能省能源，且整個高溫厭氣醣酵系統之操作過程，還不十分明瞭。Rimkuset et al⁽¹⁸⁾ 研究 chicago 之廢水處理廠之處理系統，同時說明了短停留時間的好處。他發現若將溫度提高到 50°C，水力停留時間可縮短 7 天（原為 14 天），而處理效率並未降低。因此可以將整個處理系統之容量增大一倍，而節省市政府的預算以建造一個新的處理系統。此系統產生的甲烷能量比加熱所需的能量還多。高溫處理系統可降低水力停留時間之主因可能是高溫酸利用菌 (thermophilic acid-consuming organisms) 生長速率很快。我曾發現高溫之 *Methanosaerina* 其世代時間只有 12 小時，高溫之 *Methanotherix* 其世代時間則為 24~36 小時⁽²⁸⁾。而這兩者都要比中溫菌長的快。我們也曾估計過高溫性的丁酸氧化菌株之生長世代為 1 小時，而高溫性丙酸氧化菌株則為 4~5 天。

微生物學在未來所扮演的角色

這幾年來，我們對於厭氣菌之生理以及生化方面特性，都有更進一步地了解。尤其是自 1978 年後，更是收穫很多。在這期間分離出好多新的甲烷生成菌，醋酸生成菌，加成性之混合菌株，和醣酵性細菌。證明了可以在醋酸上生長的甲烷生成純菌株，確認了古生代細菌屬，且對於甲烷生成菌的獨特生化也加以說明了。但是在此領域中還有很多學習和研究的地方，從已知的知識中，由這些細菌所進行的各式各樣作用，可幫助我們了解在厭氣反應槽之反應過程，對於在反應槽中微生物間相互作用的關係還是有許多地方待研究。同時在接觸薄膜式反應槽中，微生物如何在表面形成菌落，以及在污泥毯反應槽中，微生物如何形成顆粒狀的資料都很少。反應槽中決定微生物之特性及種類之診斷技術是很值得發展的，另外對於利用抗體技術⁽¹¹⁾ 來鑑定甲烷生成菌也是很值得研究推展。

將來我們可接種以理論為基礎所設計之混合菌株於厭氣反應槽，這些菌種可包含酸利用菌，此類菌之緩慢生長可限制反應槽初步作用的速度，或許也可以擴展到利用經過遺傳工程處理的微生物作為菌種。這點是最適於用在那些基因交換之機構已全明瞭，同時相當易操作的醣酵菌。利用最新的技術可以使某微生物具有新的分解能力，如增加菌株的纖維分解能力，或菌株對金屬之耐力等。對於是否可利用遺傳工程技術來改良加成性醋酸生成菌是值得懷疑的，因為此菌一方面長的太慢，另一方面也不可能純粹單獨培養。而甲烷生成菌之遺傳工程技術的可行性就比較高。雖然最近有篇報告描述甲烷生成菌中有質體 (plasmid)⁽²⁹⁾ 及噬菌體 (phage) (Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984, 174, P. 133) 存在，但是有關甲烷生成菌之基因交換系統方面卻一無所知。

基因重組技術也曾運用在甲烷生成菌上，且也有些成功的例子。*Methanosaerina backeri*⁽¹⁷⁾ 或 *Methanococcus voltae*⁽²⁷⁾ 的 DNA 可植入 *E. coli* 之質體中，同時發現此組合之 DNA 和 *E. coli* 之 Arg G 及 *M. voltae* 之 his A 變異株之 DNA 可互補配合，這種結果表示至少屬於古生代細菌的某些甲烷菌屬可以將 *E. coli* 變成某種功能性之細菌。基因重組技術在研究甲烷生成菌之基因構造和甲烷生成菌之功能上是很有用的，但要利用遺傳工程技術於甲烷菌似乎還是很遙遠的事。

原作者 Stephen H. Zinder,

本文譯自 American Society for microbiology News, Vol 50,
No. 7, 294~298, 1984.

參 考 文 獻 :

1. Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43: 260-296.
2. Boone, D. R., and M. P. Bryant. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolini* sp. nov. gen. nov., from meth. anogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626-632.
3. Bouwer, E. J., and P. L. McCarty. 1983. Transformations of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1286-1294.
4. Boyd, S. A., and D. R. Shelton. 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 272-277.
5. Doddema, H. J., and G. D. Vogels. 1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 752-754.
6. Gottschalk, G. 1979. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag New York.
7. Hakulinen, R., and M. Sallkinnoja-Salonen, 1982. Treatment of pulp and paper industry wastewaters in an anaerobic fluidized bed reactor. *Proc. Biochem.* 2: 18-22.
8. Huser, B. A., K. Wuhrmann, and A. J. B. Zehnder. 1982. *Methanotherix soehngenii* gen. nov., sp. nov., a new acetotrophic nonhydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* 132: 1-9.
9. Iannotti, E. L., J. R. Fischer, and D. M. Sievers. 1982. Characterization of bacteria from a swine manure digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 136-143.
10. Kaspar, H. F., and K. Wuhrmann. 1978. Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 1-7.
11. Macario, A. J. L., and E. Conway de Macario. 1983. Antigenic fingerprinting of methanogenic bacteria with polyclonal antibody probes. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 451-458.
12. Mackie, R. I., and M. P. Bryant. 1981. Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1363-1373.

13. McCarty, P. L. 1982. One hundred years of anaerobic treatment, p. 3-22. In D. E. Hughes and D. A. Stafford (ed.), Anaerobic digestion, 1981. Elsevier Biomedical Press, New York.
14. McInerney, M. J., and M. P. Bryant, 1981. Review of methane fermentation fundamentals, p. 26-40. In L. L. Wise (ed.) Fuel gas production from biomass. Chemical Rubber Co. Press, Inc., West Palm Beach, Fla.
15. McInerney, M. J., M. P. Bryant, R. B. Hespel, and J. W. Costerton. 1981 *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1029-1039.
16. Mountfort, D. M., and M. P. Bryant. 1982 Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. Arch. Microbiol. 133: 249-256.
17. Reeve, J. N., N. J. Trun, and P. Hamilton. 1982. Beginning genetics with methanogens, p. 233-244. In A. Hollaender (ed.), Genetic engineering of anerobic organisms for chemicals. Plenum Publishing Corp., New York.
18. Rimkus, R. R., J. M. Ryan, and E. J. Cook. 1982. Full-scale thermophilic digestion at the West-Southwest Sewage Treatment Works, Chicago, Illinois. J. Water Pollut. Control Fed. 54: 1447-1457.
19. Robinson, J. A., and J. M. Tiedje. 1984. Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. Arch. Microbiol. 137: 26-32.
20. Smith, M. R., S. H. Zinder, and R. A. Mah. 1980 Microbial methanogenesis from acetate. Proc. Biochem. 15: 34-39.
21. Sulflita, J. M., A. Horowitz, D. R. Shelton, and J. M. Tiedje. 1982. Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. Science 218: 1115-1117.
22. Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41: 100-180.
23. Thomm, J., J. Altenbuchner, and K. O. Stetter. 1983. Evidence for a plasmid in a methanogenic bacterium. J. Bacteriol. 153: 1060-1062.
24. Varel, V. H., H. R. Isaacson and M. P. Bryant. 1977. Thermophilic methane production from catole waste. Annu. Environ. Microbiol. 33: 298-307.
25. Weast, R. C. (ed.), 1968. Handbook of chemistry and physics. 49th ed. Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.

26. Wolin, M. J. 1979. The rumen fermentation model for microbial interactions in anaerobic ecosystems, p. 49-77. In M. Alexander (ed.), Advances in microbial ecology, vol. 3. Plenum Publishing Corp. New York.
27. Wood, A. G., A. H. Redborg, D. R. Cue, W. B. Whrman, and J. Konisky. 1983. Complementation of *argG* and *his A* mutations of *Escherichia coli* by DNA cloned from the archaebacterium *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.* 156: 19-29.
28. Zinder, S. H., S. C. Cardwell, T. Anguish, M. Lee, and M. Koch. 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic chevstor: *Methanotherix* sp. as an important aceticlastic metrmnegen Appl. Environ. Microbiol. 48: 796-807.