

豬糞尿厭氣處理污泥中之甲烷菌分布探討⁽¹⁾

程梅萍⁽²⁾ 蕭庭訓⁽²⁾ 廖仁寶⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：97年12月28日；接受日期：98年2月23日

摘要

本研究目的在探討不同豬糞尿廢水處理系統厭氣污泥中之甲烷菌分布，及其對有機物處理效率之影響。因此，利用 16S rDNA 聚合酶鏈反應、限制酶圖譜、序列分析及親緣分析法進行三段式豬糞尿廢水處理系統厭氣污泥（T）與北卡州立大學農場上流式厭氣處理模場污泥（A）中甲烷菌分布探討。結果在厭氣處理污泥 T 和 A 中，分別得到 63 和 51 個株系，並依限制酶分析結果，分為 13 和 15 個操作型分類單位（OTU）。親緣分析結果顯示污泥 T 中，50.8% 甲烷菌屬於 *Methanosarcinales* 目，42.9% 屬於 *Methanomicrobiales* 目，另外 6.3% 則未能歸於已知菌目。然而，污泥 A 中未有 *Methanosarcinales* 與 *Methanomicrobiales* 目，僅 9.8% 屬於 *Methanobacteriales* 目，29.4% *Methanococcales* 目，60.8% 未能歸於已知菌目。兩種污泥之甲烷菌分布顯然差異很大，而嗜乙酸甲烷菌 *Methanosaeta concilii* 佔多數，應是三段式系統有機物去除率高之原因。

關鍵詞：厭氣污泥、甲烷菌、操作型分類單位。

緒言

環境污染相關問題能否解決是畜牧業能否永續發展的重要因素之一，因此畜牧廢水與廢棄物處理再利用是重要工作。過去行政院農業委員會畜產試驗所開發之三段式畜糞尿廢水處理系統，即固液分離、厭氣處理及好氣處理三種程序，已大量推廣至農戶，能符合環保標準，解決階段性的環保問題。

厭氣處理有機廢水，需要經過複雜微生物群的共同代謝作用，使有機物分子經過水解（hydrolysis）、酸化（acidogenesis）及甲烷化（methanogenesis）的反應，產生最終產物甲烷與二氧化碳。水解作用將複雜有機物如碳水化合物、蛋白質、脂肪等，先經微生物之胞外酵素轉

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1505 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(4) 通訊作者：liawrb@mail.tlri.gov.tw。

化成可溶性、簡單之有機物。酸化作用將簡單有機物轉化為有機酸，如乙酸、丙酸、丁酸等，與氫氣及二氧化碳。丙酸、丁酸再由產氫乙酸菌繼續分解為乙酸與氫氣及二氧化碳。甲烷化作用將乙酸或氫氣及二氧化碳轉化為甲烷與二氧化碳。甲烷菌在厭氣處理程序中，參與末端生化反應，也是厭氣處理的關鍵與限制步驟。處理效率與厭氣槽是否能培養出高活性甲烷菌，則有重大關連。

甲烷菌、嗜鹼菌及嗜熱菌同屬古細菌（archaea），其細胞壁不含肽聚糖（peptidoglycan）成分，在生化特性方面與細菌不同。甲烷菌為絕對厭氣菌，在合成甲烷的過程中可以得到生長所需能量。在自然界中存在於反芻動物之瘤胃、水稻田、湖和海底泥及溫泉等厭氣環境中。在廢水處理厭氣反應器中，也可分離出甲烷菌。親緣分類上甲烷菌分為甲烷桿菌目 *Mrthanobacteriales*、甲烷球菌目 *Methanococcales*、甲烷八疊球菌目 *Methanosarcinales*、甲烷微菌目 *Methanomicrobiales* 及甲烷火菌目 *Methanopyrales*。甲烷菌又依營養來源分為嗜氫（hydrogenotroph，氧化氫氣還原二氧化碳以生成甲烷）、嗜甲酸（formatotroph，氧化甲酸）、嗜甲基（methylotroph，利用含甲基化合物）及嗜乙酸（acetotroph，利用乙酸產生甲烷）甲烷菌。由於，由氫氣與二氧化碳轉換為甲烷之自由能最低，由乙酸轉換為甲烷之自由能則最高，因此嗜氫甲烷菌種類多於嗜乙酸甲烷菌（Garcia *et al.*, 2000）。

在廢水處理系統中，這些菌種的活性比例是造成沼氣中甲烷含量不同的原因。在製酒廢水厭氣處理系統中，95% 的古細菌與 *Methanosarcina barkeri*、*Methanosarcina frisius* 及 *Methanobacterium formicicum* 相似（Godon *et al.*, 1997）。在數種低、中、高溫厭氣生物反應器中，主要的甲烷菌為類似 *Methanosaeta* 屬的菌株（Mchugh *et al.*, 2003）。

然而，目前對於豬糞尿廢水處理系統厭氣槽中何種甲烷菌為主要菌種無法確知，傳統上對甲烷菌的研究，常將其純化、培養，並以性狀（phenotype）分類，鑑定時過程複雜，包含外觀、生化反應等觀察及測定。然而，文獻指出能培養的微生物只佔總量的 0.001-15%（Amann *et al.*, 1995），而厭氣性甲烷菌培養更加困難。對現代的生物分類學而言，以基因型（genotype）分類，除了快速簡便外，核糖體 DNA（ribosomal DNA, rDNA）基因序列分析儼然成為研究系統分類學的標準方法。此外，以傳統方式分析廢水處理系統之甲烷菌族群分布，可能因培養的方式利於某些菌種，而得到與實際族群不符的結果。

本研究擬以不需培養的基因序列分析方法，探討豬糞尿廢水厭氣處理污泥中甲烷菌主要菌種，並探討甲烷菌分布與甲烷化效率之相關性。

材料與方法

I. 厭氣污泥來源

厭氣污泥來自畜產試驗所廢水集中處理場（T）與北卡州立大學農場（A）。前者為常溫塞流式（plug flow）以紅泥膠皮密封之實場（設計為 3000 頭豬規模）厭氣槽，後者為中溫（35℃）接觸生長（contact growth）上流式厭氣槽（upflow anaerobic sludge blanket, UASB），為試驗場規模（pilot scale）處理部分來自 250 頭母豬之一貫場廢水，其豬舍為條狀地面，每 4-6 小時沖洗糞溝一次，全日廢水收集後經初步沉澱後部分進入厭氣槽，主要廢水進入厭氣塘（lagoon）。兩場操作條件與處理效率如下表：

表 1. 厭氣污泥樣品來源及其處理效率

Table 1. The sources of anaerobic sludge samples and their efficiency

Sludge	A ^a	T ^b
Type	UASB	Plug flow
Volume (m ³)	2	900
Temperature(°C)	35	24 ^c
HRT (day)	10	10
Influent COD(mg/L)	1925-2033	8912
Influent TSS(mg/L)	1051-1184	3767
COD removal(%)	65	94.6
TS removal (%)	57	98.6

a. Sludge A was sampled from UASB pilot plant in North Carolina State University, data of this column was from Cheng and Liu, 2002.

b. Sludge T was sampled from three-step swine wastewater treatment system of Livestock Research Institute, Taiwan.

c. Ambient temperature, year average about 24°C.

II. 污泥 DNA 萃取與純化

污泥 DNA 萃取方式依據 Pender *et al.* (2004) 方法修改。污泥樣品加乾冰以研鉢與杵磨碎，然後加入溶菌酶 (lysozyme, 10mg/ml) 在 37°C 下反應 5 min。然後在離心管中加入樣品及 3 ml 萃取溶液 (30% 4-aminosalicylate, 5% SDS) 在 70°C 下反應 10 min，之後以 STE 飽合酚溶劑、酚-氯仿及氯仿反覆萃取。加入 1/10 體積的 3M 醋酸鈉及同體積的異丙醇，以 10000×g 離心 10 min 沉澱 DNA。萃取出的 DNA 溶解於 STE (pH=8) 緩衝液，再以氯化銫 (CsCl) 梯度離心純化之。

III. 16S rDNA clone library

以古細菌專一 (archaeal-specific) 的 16S rDNA 引子 8FAPL (5'-GGCTGCAGTCTAGATCCG GTTGATCCTGCCGG-3') 和 1492RPL (5'-GGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGTTACCTTGTTACGAC TT-3') 進行聚合酶鏈反應 (PCR)。反應試劑 (50 µl) 含 200 µM dNTP, 100 ng 引子, 10ng 污泥 DNA 及 0.5 U Taq DNA 聚合酶。反應之條件為 94°C, 2min, 然後進行 30 個溫度循環，每個循環為 92°C 下 1.5 min、55°C 下 1.5 min 及 72°C 下 0.5 min，最後在 72°C 下 7 min 進行延長反應。PCR 產物使用 TA 選殖套組 (Novagen)，接在 pST-Blue vector 上，然後轉形至 *Escherichia coli*。

IV. 限制酶分析 (Amplified rDNA Restriction analysis, ARDRA)

轉殖株先以 T7 及 SP6 引子進行 PCR 反應，確認其插入基因片段之大小正確。然後將大小正確的 PCR 產物以限制酶 *Hae*III 和 *Rsa*I 反應後，在 2% agarose 膠片進行電泳。依電泳圖譜之亮帶 (band) 型態做為區分操作型分類單位 (operational taxonomy unit, OTU) 之依據。

V. 序列分析

自每個 OTU 取出一個代表株系進行序列分析。這些株系進行隔夜培養後以 alkaline miniprep kit (Qiagen) 抽取質體 DNA。再以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster

City, CA) 進行定序反應，所使用之定序引子包括 T7 及 SP6，之後以 DNA 自動定序儀 (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer) 解序，將所得之 DNA 序列貼於 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上，以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行比對，用以確認株系可能代表之菌種身分，再以 PHYLIP 程式作親緣分析 (phylogenetic analysis)。

結果與討論

I. 厭氣污泥放大之古細菌 16S rDNA 操作型分類單位 (OTU) 與序列比對

由厭氣污泥 A 和 T 中抽取之 DNA 以 PCR 放大 16S rDNA 後轉殖，分別得到 51 和 63 個株系 (clone)。這些株系再利用限制酶水解分析 (ARDRA) 後，依據不同之電泳圖譜 (圖 1) 分為 15 及 13 個 OTU。由每個 OTU 中隨機選一個株系進行定序，這些序列資料與 NCBI 資料庫比對結果，如表 2。厭氣污泥 A 中，OTU A2 (5/51) 之 16S DNA 序列與 *Methanococcus vannielii* 相似，相似度 99%；OTU A3 (5/51) 則與 *Methanobacterium formicicum* 相似，相似度 98%；OTU A4 (10/51) 亦與 *Methanococcus vannielii* 相似，相似度 96%。其他由厭氣污泥 A 選殖出之株系 16S rDNA 序列皆與由北卡州開瑞市之都市廢水處理場 (Cary south municipal treatment plant) 厭氣污泥所得之株系序列相近 (Williams *et al.*, 2001)，相似度為 98-99%。其中，OTU A8 (1/51)、A9 (6/51) 及 A14 (1/51) 與未培養之古細菌株系 39-2 序列相似；A6 (1/51) 與 A13 (1/51) 與株系 44A-1 序列相似；A7 (8/51)、A10 (1/51)、A12 (2/51) 及 A15 (2/51) 與株系 69-1 序列相似；A1 (5/51) 與 A5 (1/51) 與與株系 62-2 序列相似；A11 (2/51) 株系及 72-1 序列相似 (表 2)。

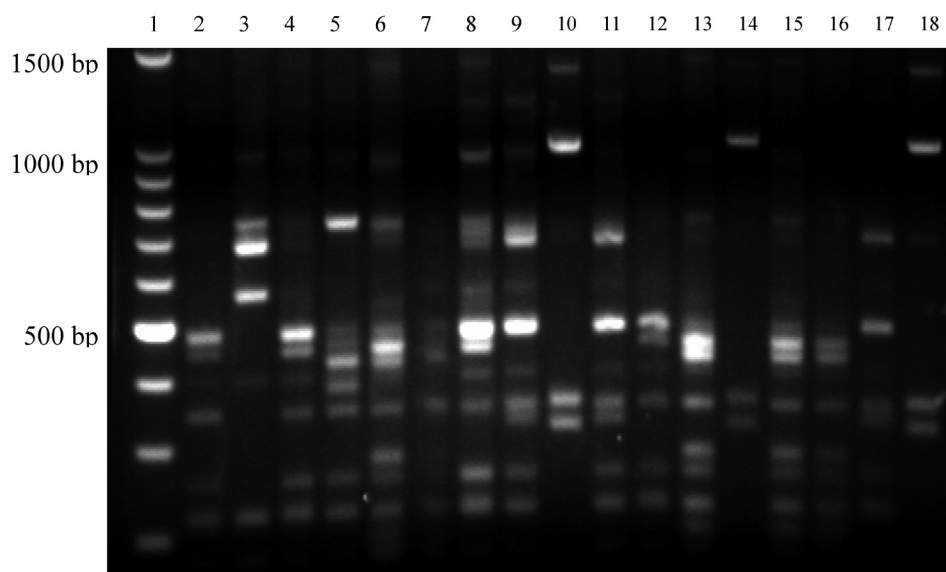


圖 1. 厭氣污泥放大之古細菌 16S rDNA 限制酶分析電泳圖譜。

Lane1 : DNA 分子標記, Lane2-18: 株系301-317.

Fig. 1 Electrophoresis of amplified rDNA restriction analysis(ARDRA) of anaerobic sludges.

Lane1 : DNA maker, Lane2-18: clone 301-317.

表 2. 由厭氣污泥放大之古細菌 16S rDNA 操作型分類單位及與其最接近的序列

Table 2. Operational taxonomy units of archaeal 16S rDNA amplified from anaerobic sludges and their closest sequences

OTU	Frequency	Closest sequence		Closest strain	
		Name	Identities	Speices	Identities
T01	16/63	Uncultured archaeon TA02 ^a	545/556 (98%)	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	433/484 (89%)
T02	16/63	Uncultured archaeon clone LH-02 ^b	525/558 (94%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	508/555 (91%)
T03	13/63	Uncultured archaeon 61-2 ^c	539/550 (98%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	525/545 (96%)
T04	4/63	Uncultured archaeon 39-2 ^c	527/543 (97%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	183/206 (88%)
T05	4/63	Uncultured archaeon 57-1 ^c	527/552 (95%)	--	--
T06	3/63	Uncultured archaeon isolate MUAHR 12 ^d	430/439 (97%)	<i>Methanospirillum hungatei</i>	573/586 (97%)
T07	1/63	Uncultured archaeon isolate MUAHR 12 ^d	421/433 (97%)	<i>Methanospirillum hungatei</i>	522/545 (95%)
T08	1/63	Uncultured archaeon TA03 ^a	535/555 (96%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	349/351 (99%)
T09	1/63	Uncultured archaeon clone LH-02 ^b	444/475 (93%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	431/472 (91%)
T10	1/63	Uncultured archaeon 57-1 ^c	528/555 (95%)	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	337/370 (91%)
T11	1/63	Uncultured archaeon clone LK2 ^c	472/489 (96%)	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	534/559 (95%)
T12	1/63	Uncultured archaeon 57-1 ^c	545/576 (94%)	--	--
T13	1/63	Uncultured archaeon TA03 ^a	534/551 (96%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	373/382 (97%)
A01	5/51	Uncultured archaeon 72-1 ^c	491/491 (100%)	--	--
A02	5/51			<i>Methanococcus vannieli</i>	887/895 (99%)
A03	5/51	--	--	<i>Methanobacterium formicicum</i>	478/485 (98%)
A04	10/51			<i>Methanococcus vannieli</i>	525/545 (96%)
A05	1/51	Uncultured archaeon 72-1 ^c	490/491 (99%)	--	--
A06	1/51	Uncultured archaeon 44A-1 ^c	488/491 (99%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	244/279 (87%)
A07	8/51	Uncultured archaeon 69-1 ^c	490/491 (99%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	242/279 (86%)
A08	1/51	Uncultured archaeon 39-2 ^c	483/491 (98%)	--	--
A09	6/51	Uncultured archaeon 39-2 ^c	488/493 (98%)	--	--
A10	1/51	Uncultured archaeon 69-1 ^c	490/491 (99%)	--	--
A11	2/51	Uncultured archaeon 62-2 ^c	483/492 (98%)	--	--
A12	2/51	Uncultured archaeon 69-1 ^c	489/491 (99%)	--	--
A13	1/51	Uncultured archaeon 44A-1 ^c	489/491 (99%)	--	--
A14	1/51	Uncultured archaeon 39-2 ^c	488/490 (99%)	--	--
A15	2/51	Uncultured archaeon 69-1 ^c	487/491 (99%)	--	--

^a from the terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system, Wu *et al.*, 2001.

^b from the northern peatland, Cadillo-Quiroz *et al.*, 2006.

^c from the municipal wastewater sludge, William *et al.*, 2004.

^d from the methanogenic upflow anaerobic hybrid reactor. Pendera *et al.*, 2004.

^e from the landfill site, Huang *et al.*, 2002.

厭氣處理污泥 T 中，主要的 OTU 是 T01 (16/63)、T02 (16/63) 及 T03 (13/63)。T01 和台灣研究者由對苯二甲酸酯 (terephthalate) 顆粒污泥厭氣處理系統中得到之未培養古細菌株系 TA02 (Wu *et al.*, 2001) 有 98% 相似度；又和 *Methanoculleus chikugoensis* 有 89% 相似度。T02 和泥炭地 (peatland) 得到的未培養古細菌株系 LH-02 (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2002) 有 94% 相似度；又和 *Methanosaeta concilii* 有 91% 相似度。T03 則和開瑞市都市廢水處理系統得到古細菌之株系 61-2 有 98% 相似度，並與 *Methanosaeta concilii* 96% 相似。T05 (4/63)、T10 (1/63) 及 T12 (1/63) 與上述系統所古細菌之株系 61-2 相似，T04 (4/63) 則與該系統株系 39-2 相似。T06 (3/63) 與 T07 (1/63) 與上流式厭氣混合反應器 (upflow anaerobic hybrid reactor, Pendera *et al.*, 2004) 之未培養株序列相似，又與 *Methanospirillum hungatei* 有 95-97% 相似度。T08 和 T13 與台灣之污泥厭氣處理系統中得到之未培養古細菌序列 TA03 (Wu *et al.*, 2001) 相似，其部份序列與 *Methanosaeta concilii* 有 97-99% 相似度 (表 2)。

本研究中 2 個不同地區之不同型態豬糞尿厭氣處理系統中甲烷菌之族群分布顯然不同，在北卡州 UASB 厭氣處理模場污泥中 60.8% (31/61) 古細菌 16S rDNA 株系與鄰近之都市廢水處理系統之未培養甲烷菌株相似，29.4% (15/51) 株系則與利用氫氣與甲酸之 *Methanococcus vannielii* (Garcia *et al.*, 2000) 相近，9.8% (5/51) 與嗜甲酸之 *Methanobacterium formicicum* 相近，未發現有嗜乙酸之 *Methanosarcinales* 目甲烷菌。然而，在台灣塞流式厭氣處理實場污泥中，50.8% (32/63) 株系近似於 *Methanosaeta concilii*，其為絕對嗜乙酸 (acetotrophic) 甲烷菌 (Garcia *et al.*, 2000)；6.3% (4/63) 株系近似於嗜氫與甲酸之 *Methanospirillum hungatei*；而 25.4% (16/63) 株系接近於嗜甲酸之 *Methanoculleus chikugoensis*；另外，9.5% (36/63) 株系與北卡州都市廢水處理系統之未培養古細菌株系 57-1 相似。

II. 厭氣污泥甲烷菌親緣分析

由親緣分析結果顯示，污泥 T 所得之甲烷菌 16S rDNA 序列 50.8% 屬於 *Methanosarcinales* 目，42.9% 屬於 *Methanomicrobiales* 目，另外 6.3% 則未能歸於已知菌目。然而，污泥 A 未有 *Methanosarcinales* 與 *Methanomicrobiales* 目，僅 9.8% 屬於 *Methanobacteriales* 目，29.4% *Methanococcales* 目，大部分 (60.8%) 未能歸於已知菌目 (表 3)。而這群未能歸類之株系，在親緣分析樹狀圖 (圖 2) 可以看出與 *Methanococcales* 目較為接近，且其中 OTU A6 和 A07 在序列比對上，部份序列與 *Methanococcus maripaludis* 有 86-87% 相似度 (表 2)。

表 3. 厭氣污泥甲烷菌分布

Table 3. Distribution of methanogens within anaerobic sludges

	No. of clones		% of clones		No. of OTUs ^c		% of OTUs	
	T ^a	A ^b	T	A	T	A	T	A
<i>Methanosarcinales</i>	32	0	50.8	0.0	5	0	38.5	0
<i>Methanomicrobiales</i>	27	0	42.9	0.0	7	0	53.8	0
<i>Methanobacteriales</i>	0	5	0	9.8	0	1	0	6.7
<i>Methanococcales</i>	0	15	0	29.4	0	2	0	13.3
unclassified	4	31	6.3	60.8	1	12	7.7	80.0
Total	63	51	100	100	13	15	100	100

a. sludge T was sampled from three-step swine wastewater treatment system of Taiwan Livestock Research Institute.

b. sludge A was sampled from UASB pilot plant in North Carolina State University.

c. OTU: operational taxonomy unit.

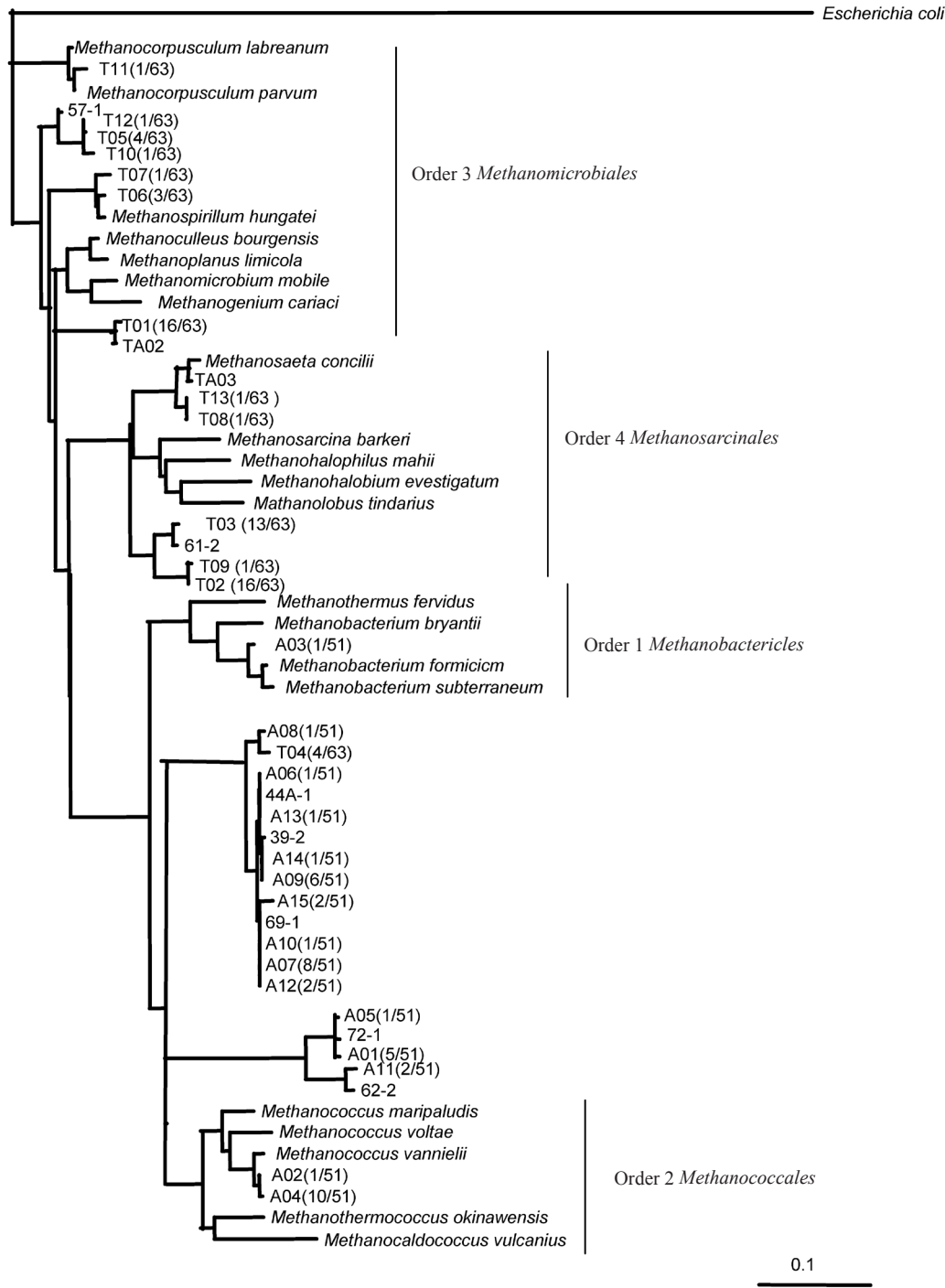


圖 2. 本研所得各操作型分類單位 16S rDNA 序列與資料庫已知甲烷菌序列之親緣分析樹狀圖。
Fig. 2. Phylogenetic tree of partial 16S rDNA sequences from OTUs studied and sequences from identified methanogens in the databases.

III. 嗜乙酸甲烷菌之比例

三段式豬糞尿廢水處理場(T)長達5年之操作與監測結果,其厭氣處理化學需氧量(COD)去除率高達94.6%(表1),本研究發現其厭氣污泥中接近 *Methanosaeta concilii* 之嗜乙酸甲烷菌佔50.8%。而在台灣某一處理對苯二甲酸酯(terephthalate)廢水的UASB污泥中,82%株系近似於 *Methanosaeta* sp. (Wu *et al.*, 2001)。McHugh *et al.* (2003)在3個實場與3個實驗室規模,處理不同性質有機廢水,COD去除率皆達90%以上之厭氣顆粒污泥中,發現56%古細菌株系近似之嗜乙酸甲烷菌 *Methanosaeta* 屬,並指出不論厭氣槽形式、廢水性質及操作溫度如何, *Methanosaeta* 屬絲狀的甲烷菌佔多數,是為高穩定度與高處理效率之指標。而本研究在COD去除率僅65%之北卡州UASB厭氣處理模場污泥未能發現有 *Methanosarcinales* 目嗜乙酸甲烷菌,可佐證 *Methanosaeta* 屬在厭氣處理效率之重要性。

除了應用於廢水處理之厭氣發酵外,在其他厭氣系統中之嗜乙酸甲烷菌亦非常重要。Klocke *et al.* (2008)進行利用作物生質產生能源(biogas)的兩相式厭氣發酵試驗,結果發現在實驗室規模較模場規模之發酵槽單位體積產生約2倍多的甲烷。其甲烷菌分析結果,實驗室規模發酵槽中以 *Methanosaeta* 屬為主之嗜乙酸 *Methanosarcinales* 佔56%,為主要之甲烷菌目;而在甲烷產生效率差的模場則是以嗜氫甲烷菌 *Methanomicrobiales* 目為主,佔76%,僅10%為以 *Methanosarcina* 屬為主之嗜乙酸甲烷菌 *Methanosarcinales*。

IV. 嗜氫甲烷菌之分布

本研究結果發現年均溫24℃之厭氣處理實場厭氣污泥(T)中嗜氫甲烷菌 *Methanomicrobiales* 目佔全部甲烷菌42.9%,另外2目嗜氫甲烷菌 *Methanobacteriales* 與 *Methanococcales* 則未發現。相反的,在UASB厭氣處理模場(35℃)厭氣污泥(A)則是以 *Methanococcales* 為主, *Methanobacteriales* 次之,未發現 *Methanomicrobiales*。McHugh *et al.* (2003)亦發現發酵溫度顯然與嗜氫甲烷菌之種類分布有關,實驗室規模之AHR(anaerobic hybrid reactor)低溫(10-14℃)發酵槽中嗜氫甲烷菌以 *Methanobacteriales* 為主,佔全部甲烷菌之17.5%, *Methanomicrobiales* 佔5%, *Methanococcales* 佔2.5%;在中溫發酵槽(37℃)僅發現 *Methanococcales*, 佔43.3%。在高溫(55℃)發酵槽則僅發現 *Methanobacteriales*, 佔45.5%。

此外,Angenent *et al.* (2002)在3000頭肥育豬場加熱到約25℃的ASBR(anaerobic sequencing batch reactor)試驗發現,當廢水氨氮濃度提高至3500mg/L時,嗜乙酸甲烷菌 *Methanosarcinales* 減少,但是嗜氫甲烷菌 *Methanomicrobiales* 增加,甲烷產生效率不變,表示在高氨氮濃度下,甲烷化作用主要由乙酸氧化細菌及嗜氫甲烷菌共同完成。而在此系統中之嗜氫甲烷菌中 *Methanomicrobiales* 目明顯較 *Methanobacteriales* 與 *Methanococcales* 多。此結果與本研究中24℃之厭氣污泥T中嗜氫甲烷菌以 *Methanomicrobiales* 目為主之結果相符。

結論

在高處理效率之厭氣污泥T中,近似 *Methanosaeta concili* 之嗜乙酸甲烷菌佔50.8%;在低處理效率之厭氣污泥A中則僅有嗜氫甲烷菌。由此可知,豬糞尿廢水處理系統厭氣槽中,污泥之甲烷菌種類分布與處理效率息息相關。

誌謝

感謝美國北卡州立大學農工系教授 J. Cheng 提供試驗樣品、微生物系教授 J. Brown 及家禽系石家興教授之協助與指導。

參考文獻

- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Angenent, L. T., S. Sung and L. Raskin. 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Research* 36: 4648-4654.
- Cadillo-Quiroz, H., S. Bräuer, E. Yashiro, C. Sun, J. Yavitt and S. Zinder. 2006. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ. Microbiol.* 8(8):1428-40.
- Cheng, J. and B. Liu. 2002. Swine wastewater treatment in anaerobic digesters with floating medium. *Trans ASAE.* 45(3):799-805.
- Garcia, J., B. K. C. Patel and B. Ollivier. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe.* 6:205-226.
- Godon, J., E. Zumstein, P. Dabert, F., Habouzit and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2802-2813.
- Huang, L. N., H. Zhou, Y. Q. Chen, S. Luo, C.Y. Lan and L. H. Qu. 2002. Diversity and structure of the archaeal community in the leachate of a full-scale recirculating landfill as examined by direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *FEMS Microbiol. Lett.* 214 (2):235-240.
- Klocke, M., E. Nettmann, I. Bergmann, K. Mundt, K. Souidi, J. Mumme and B. Linke. 2008. Characterization of the methanogenic archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst. App. Microbiol.* 31:190-205.
- McHugh, S., M. Carton, T. Mahony and V. O'flaherty. 2003. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:297-304.
- Nercessian, D., M. Upton, D. Lloyd and C. Edwards. 1999. Phylogenetic analysis of peat bog methanogen populations. *FEMS Microbiol. Lett.* 173:425-429.
- Pender, S., M. Toomey, M. Carton, D. Eardly, J. W. Patching, E. Collerana and V. O'Flaherty. 2004. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research* 38:619-630.
- Williams, D., E. S. Haas and J. W. Brown, 2004. Surprising archaeal diversity in a municipal wastewater sludge. *GenBank database* AY032982-AY032996.
- Wu, J., W. Liu, I. Tseng and S. Cheng. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147:373-382.

Distributions of methanogens in anaerobic sludges from swine wastewater treatment systems ⁽¹⁾

Mei-Ping Cheng⁽²⁾ Ting-Shun Hsiao⁽²⁾ and Ren-Bao Liaw⁽³⁾⁽⁴⁾

Received : Dec. 28, 2008 ; Accepted : Feb. 23, 2009

Abstract

The aim of this study was to examine the methanogenic population structures of different anaerobic bioreactors treating swine wastewater, to evaluate their influence on the efficiency of bioreactors. This was accomplished by 16S rDNA clone library construction, amplified rDNA restriction analysis (ARDRA), DNA sequence analysis and phylogenetic analysis of archaeal gene sequences, which were amplified from the anaerobic sludges sampled from the three-step swine wastewater treatment system(T) and UASB pilot plant(A). Of 63 and 51 clones obtained from sludge T and A, respectively, 13 and 15 OTUs were defined by ARDRA. And, the results of phylogenetic analysis showed 50.8% of methanogenic clones were classified as order *Methanosarcinales*, 42.9% of those as order *Methanomicrobiales*, and the other 6.3% as unknown archaea in sludge T. However, there was no clones classified as order *Methanosarcinales* or *Methanomicrobiales*, while 8% of those were classified as order *Methanobacteriales*, 29.4% as order *Methanococcales*, and 60.8% as unknown archaea in sludge A. It was clear that the methanogenic population structures between these two kinds of sludges were different. And the result suggested that the domination of acetotrophic *Methanosaeta concilii* in sludge T might be the reason for high organic removal efficiency of three-step swine wastewater treatment system.

Key words : Anaerobic sludge, Methanogen, Operational taxonomy unit (OTU).

(1) Contribution No.1505 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Management Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Animal Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 712, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw