

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：研究)

豬糞尿處理厭氣污泥中甲烷菌之分子學研究

服務機關： 行政院農業委員會畜產試驗所

出國人職稱： 助理研究員

姓名： 程梅萍

出國地區： 美國

出國期間： 91 年 12 月 17 日至 92 年 6 月 15 日

報告日期： 92 年 8 月 21 日

F10 / 009 > 990

系統識別號:C09202990

公務出國報告提要

頁數: 30 含附件: 否

報告名稱:

豬糞尿處理厭氣污泥中甲烷菌之分子學研究

主辦機關:

行政院農業委員會畜產試驗所

聯絡人／電話:

黃煥踰／06-5911211-209

出國人員:

程梅萍 行政院農業委員會畜產試驗所 經營組 助理研究員

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 12 月 17 日 -民國 92 年 06 月 15 日

報告日期: 民國 92 年 08 月 19 日

分類號/目: F10／畜牧業 F0／綜合（農業類）

關鍵詞: 厭氣生物處理,甲烷菌,豬糞尿

內容摘要: 為因應畜牧業廢水新排放標準之執行，提升畜牧廢水處理技術，本計畫獲行政院國家科學委員會補助，前往美國北卡羅來納州立大學進行六個月的短期研究。北卡州養豬頭數在美國排名第二位，在北卡州設有國家級動物與家禽廢棄物管理中心。目前，美國因養豬廢水厭氣塘儲存與噴灌系統造成水質污染與臭味等問題，正積極研發替代處理方式，其中，厭氣生物處理因能產生沼氣能源，為研發之重點。厭氣生物處理之甲烷菌為沼氣中甲烷產生之關鍵，本研究以ssu rRNA基因序列分析結果，發現台灣三段式豬糞尿處理系統之厭氣處理槽污泥中甲烷菌種類與北卡州立大學農場之接觸生長上流式厭氣生物反應槽污泥中甲烷菌種類不同，可能與地緣有關；另發現一群未能培養的甲烷菌，在甲烷化過程中的角色相當重要，值得進一步研究。此外，研究期間參加厭氣消化高峰會與美國微生物學會第103次年會，建議持續留意美國豬糞尿厭氣處理新技術的研發，並加強交流；在環境微生物的研究上，多源基因體學可應用於新酵素等的開發，且能篩選出有用基因的機率隨研究方法的改進將逐步提高，為極具開發潛力的研究新領域。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

摘 要

為因應畜牧業廢水新排放標準之執行，提升畜牧廢水處理技術，本計畫獲行政院國家科學委員會補助，前往美國北卡羅來納州立大學進行六個月的短期研究。北卡州養豬頭數在美國排名第二，在北卡州設有國家級動物與家禽廢棄物管理中心。目前，美國因養豬廢水厭氣塘儲存與噴灌系統造成水質污染與臭味等問題，正積極研發替代處理方式，其中，厭氣生物處理因能產生沼氣能源，為研發之重點。厭氣生物處理之甲烷菌為沼氣中甲烷產生之關鍵，本研究以 *ssu rRNA* 基因序列分析結果，發現台灣三段式豬糞尿處理系統之厭氣處理槽污泥中甲烷菌種類與北卡州立大學農場之接觸生長上流式厭氣生物反應槽污泥中甲烷菌種類不同，可能與地緣有關；另發現一群未能培養的甲烷菌，在甲烷化過程中的角色相當重要，值得進一步研究。此外，研究期間參加厭氣消化高峰會與美國微生物學會第 103 次年會，建議持續留意美國豬糞尿厭氣處理新技術的研發，並加強交流；在環境微生物的研究上，多源基因體學可應用於新酵素等的開發，且能篩選出有用基因的機率隨研究方法的改進將逐步提高，為極具開發潛力的研究新領域。

目 次

壹、 目的.....	3
一、 台灣畜牧業廢水處理技術瓶頸	3
二、 前往研究機構與研究計畫之相關性	3
三、 計畫目的	4
貳、 過程.....	4
參、 心得.....	5
一、 美國養豬業現況與水污染問題	5
二、 對策	6
1. 環保法規修正.....	6
2. 研發替代處理方式	7
3. 政府補助.....	8
三、 厭氣處理高峰會	9
1. 覆蓋式厭氣消化槽	10
2. 高溫厭氣消化槽.....	11
四、 厭氣處理之微生物	12
1. 總體反應.....	12
2. 微生物多樣性與分類	13
3. 甲烷菌.....	14
五、 參加美國微生物學會第 103 屆年會報告	15
1. 多源基因體學(Metagenomics)	15
2. 培養未培養(uncultured)微生物之策略與技術.....	17
3. 環境中的抗生素與抗藥性	17
肆、 建議.....	19
伍、 相關附錄.....	20
附錄 1 . 參考文獻.....	20
附錄 2 . 豬糞尿處理厭氣污泥中甲烷菌之分子學研究論文初稿.....	23

壹、 目的

一、台灣畜牧業廢水處理技術瓶頸

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，因此畜牧廢水及廢棄物處理與再利用是重要工作項目。過去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，能符合八十七年之前的環保標準，解決階段性的環保問題。

然而，環保署公告之八十七年放流水標準，畜牧業化學需氧量 (COD) 降低為 250 mg/L、生物需氧量 (BOD) 降低為 80 mg/L。正常操作下，畜牧廢水經三段式處理後，BOD 可達到標準，但是一般農戶 COD 要達到標準則有困難。面對愈來愈嚴格的環保標準，三段式畜糞尿廢水處理系統有機物去除效率已面臨挑戰。此外，對於農戶而言，三段式處理中之好氣處理除了消耗電力，提高處理成本外，活性污泥的操作需較專業的技術，活性污泥培養不良經常為水質無法達到標準的重要因素。因此，國內學者已評估利用化學處理法、水生植物及過濾法等改善水質之可行性，結果或無法達到環保標準、或成本太高，而可行性低，尚未推廣給農戶應用。

二、前往研究機構與研究計畫之相關性

北卡羅萊納州為美國畜牧業最發達的州之一，北卡羅萊納州立大學對畜牧污染防治研究及推廣工作相當重視，農業及生命科學院結合 16 個大學學者成立國家級動物廢棄物管理中心。2001 年評估各式畜牧廢水處理相關成果，包括上流式固定化生物濾膜好氣處理/固體分離、連續批式反應槽 (SBR)、聚合物增進固體分離、硝化脫氮系統、真空微泡曝氣、電反應槽/固體分離、覆蓋式厭氣塘、高溫厭氣發酵、水生植物二級處理等系統效率及經濟評估。該機構有豐富的廢水處理系統供研究，並且與台灣曾進行多次學術及技術交流。

三、計畫目的

本研究擬藉由提昇厭氣發酵甲烷化效率，提高厭氣處理效率，減低好氧處理之負荷及時間，使畜牧廢水處理成本降低並能達到環保標準。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，使分子有機物經過水解、酸化及甲烷化的反應，產生最終產物甲烷及二氧化碳。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及限制步驟。厭氣處理效率與厭氣槽是否能培養出高活性甲烷菌，有重大關係。目前對於豬糞尿廢水厭氣處理系統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(phynotype)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%，而厭氣性甲烷菌培養更加困難。對現代的細菌分類學而言，以基因型(genotype)分類，除了快速簡便外，rRNA 基因序列分析儼然成為研究系統發生學關係的標準方法。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分子生物的方法，研究豬糞尿廢水厭氣處理系統甲烷菌主要菌種，以提高甲烷化效率。

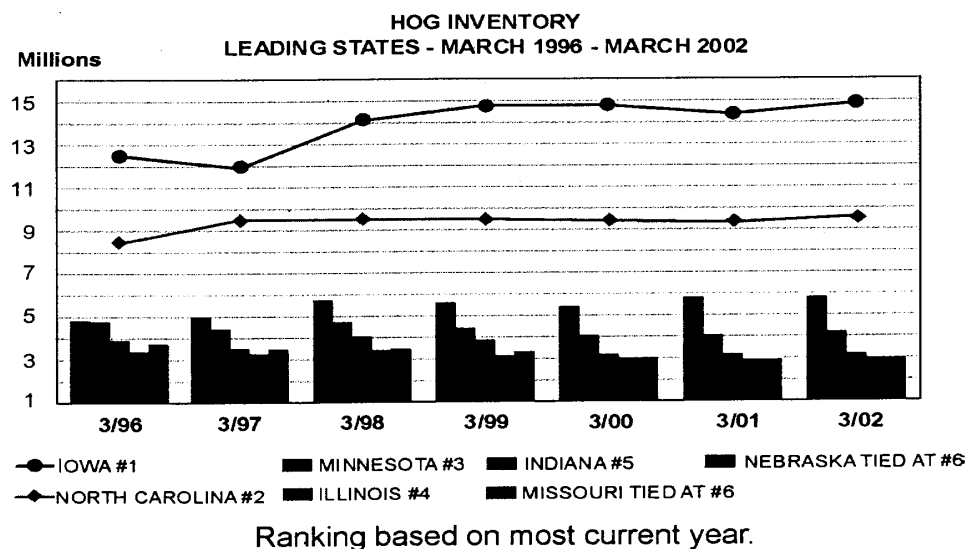
貳、過程

於 91 年 12 月 17 日前往美國北卡羅來納州立大學，期間於生物與農業工程系、微生物系與家禽系進行研究工作。主要的實驗工作是在微生物系 Dr. James M. Brown 實驗室與家禽系 Dr. Jason Shih 實驗室完成，而畜牧場廢水處理的現場工作與實習，是由生物與農業工程系 Dr. Jay Cheng 負責安排。研究期間於 92 年 5 月 18 日至 22 日前往 Washington DC 參加美國微生物學會第 103 次年會(103rd General Meeting, American Society for Microbiology)；於 92 年 6 月 2 日至 4 日參加北卡州舉行之化廢物為能源-厭氣消化高峰會(Turning waste into watts: The anaerobic digester summit)。最後，於 92 年 6 月 16 日結束研究返抵國門。

參、心得

一、美國養豬業現況與水污染問題

美國養豬頭數自 1998 年至 2003 年維持穩定，養豬最多為愛荷華州，次為北卡羅萊納州。養豬生產以大規模農場為主，以北卡羅萊納州為例，2002 年 76.5% 豬生產於 5000 頭以上規模之大養豬場。1984 年北卡州養豬頭數約為 2 百萬頭，1994 年快速增加至 7 百萬頭，目前則約 9 百萬頭，年產值近 20 億美元。養豬產業直接提供 16200 個就業機會，間接提供 39800 個工作機會，為北卡州，尤其鄉村地區帶來財富，也造成一些污染問題。



Hogs and Pigs: Number of Operations & Percent of Inventory by Size Group, North Carolina 2001-2002

	1-99 Head		100-499 Head		500-999 Head		1,000-1,999 Head		2,000-4,999 Head		+ 5,000 Head	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002
Number of Operations	1,600	1,450	140	120	100	90	200	190	720	700	640	640
Percent of Inventory	0.2	0.2	0.3	0.2	0.7	0.6	2.9	2.5	20.9	20.0	75.0	76.5

<http://www.agr.state.nc.us>

養豬廢水處理多採用厭氣塘(anaerobic lagoon)儲存，然後灌溉農地，依據含氮量來計算養豬頭數所需之農地。厭氣塘一般設計為 90 至 180 天廢水儲存量大小，具有儲存與灌溉具彈性、流出液可回流沖洗糞溝、容易用於施灌農地及低勞力、低技術、低操作成本的優點，因此廣為採用。但是，長期使用產生臭味、地下水污染等問題，在暴風雨後有厭氣塘污水溢流，甚至厭氣塘崩潰，造成河川污染，魚蝦大量死亡的事件。

二、對策

1. 環保法規修正

美國聯邦環保法令自 1972 年訂定，其中有關於畜牧業廢棄物處理的規定為任何污染物直接進入地表水必須取得許可，即 National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES) permit。至於細部的環保法令各州有不同的規定，以北卡州為例，法規自 1950 年起一直修正，以因應實際的產業與污染平衡的需求。1989 年 Water Supply Watershed Protection Act (House Bill 156)規定 100 頭以上的動物生產或位於水源保護區的農場，在 1994 年 7 月前必須採用最佳管理程序，來進行水質保護。1992 年 Wilful Discharge Act(Senate Bill 386)規定牧場放流污染物至地表水必須立即罰款 5,000 美元，1996 年提高至\$10,000。1992 年 Water Quality Nondischarge Rules 規定一定規模以上(豬 250 頭)牧場 必須向環保單位註冊，且在 1997 年底前必須提出廢棄物管理計畫，所有新或增養的牧場在操作前必須提出廢棄物管理計畫，此計畫須由專業技師簽證，並符合美國農部的技術手冊。1995 年 Livestock Farm Setback and Buffer Rules (Senate Bill 1080)規定牧場必須與其他居民離 1,500 呎以上，與學校教堂 2,500 呎以上，牧場設施需離周界 100 呎以上，土壤施灌與廢水需離周界或河川 50 呎以上。Swine waste Treatment Operator Training and Certification (Senate Bill 974) 規定註冊牧場廢棄物處理系統操作者必須接受 6 小時訓練，取得 5 年認證。1996 年 Act to Implement Recommendations of the Blue Ribbon Study Commission on Agricultural Waste (Senate Bill 1217) 對於廢棄物管理計畫書、專業技師

簽證、環保單位對農場進行檢查的頻率與收費，操作訓練與認證有更詳細的規定(Barker,2003)。

1997 年 Clean Water Responsibility and Environmentally Sound Policy Act (House Bill 515) 1997 年起禁止新建或擴大豬場或厭氣塘，但部分地區可延展至 1999 年 3 月，全州境內使用比厭氣塘先進的廢棄物管理系統者也可延展至 1999 年 3 月。1998 年 Swine Integrator Registration and Moratorium Extension Act (House Bill 1480)規定豬場整合者須在環保與天然資源局註冊，並延展禁建至 1999 年 9 月。禁建並未包括非使用厭氣塘為主、非使用土壤施灌的廢棄物處理系統，但環保單位要發出興建前項處理系統許可前，須符合特殊規定並徵詢北卡州立大學動物與家禽廢棄物管理中心。1999 年 The Clean Water Act (House Bill 1160) 延展禁建至 2001 年 7 月，增加違反水質保護法之罰責至每日 25000 美元以下，連續處罰至終止污染行為(Barker,2003)。

2001 美國環境保護署(EPA) 提出減少大型牧場水污染量的法規，修訂已實行超過 20 年的現行環保淨水 Clean Water Act 法規，並規範放流標準。約 39000 個集約牧場會受到此全國性法規限制而減少污染。

北卡州自 1997 年起至 2001 年因環保法令限制，養豬頭數不再增加。因為厭氣塘發生溢流及污染地下水的問題，要新建豬場不能以厭氣塘為主要處理方式，替代厭氣塘的更先進處理方式為產業所迫切需要的。

2. 研發替代處理方式

1994 年動物與家禽廢棄物管理中心(A&PVMC)成立於北卡州立大學，負責整合管理相關研究計畫，提供資源服務與人員訓練。1997 年於 Lake Wheeler Road Field Laboratory 成立試驗場所，佔地 5 公畝，提供研究人員進行替代處理方式之試驗。該中心目前正評估 18 種處理方式，包含 11 種已存在之技術，包括：

- BioSystems Technology Inc. And RemTec Inc. Procedure
- Bion Technologies Animal Waste Treatment System
- Polymer-Enhanced Swine-Solid Separation

- National Environmental Technologies Inc. Procedure
- Newman Environmental Solutions Inc. Aerobic Treatment
- Mobil Tangential Flow Separator
- Swine Wastewater Dewatering/Composting Facility
- Vermicompost System
- Ekokan Inc. Animal Waste Management Treatment System
- Partial Lagoon Aeration of Swine Waste
- Rondali Inc. Animal Waste Management System

2000 年產業界 Smithfield Foods, Inc. 與 North Carolina Attorney General 訂定協議，同意提供北卡州立大學 1 千 5 百萬美元開發替代現行開放式厭氣塘與噴灌系統之新技術。一旦新技術研發完成，Smithfield 將提供契約農戶資金來採行此技術。初期 5 個實場示範計畫為：

- 好氣上流式生物濾床(Aerobic Upflow Biofilter)
- 人造溼地(Constructed Wetland)
- 覆蓋式厭氣消化槽(Covered Earthen Anaerobic Digester)
- 連續批式反應槽(Sequencing Batch Reactor)
- 高溫厭氣消化槽(Thermophilic Anaerobic Digester)

資料來源 <http://www.bae.ncsu.edu/programs/extension/manure/awm.html>

3. 政府補助

於 2002 年 12 月 USEPA 簽署改版的 National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES) 與 Effluent Limitation Guidelines (ELG)，對多數的畜牧業者會產生影響，新的規則要求畜牧業者提出營養物管理計畫。EPA 認為美國農部提出的 comprehensive nutrient management plans (CNMP) 符合環保署的要求。因此，美國農部正大力推廣 CNMP，給予業者這項技術與財政的支援。

改版的法規主要包括：所有大畜牧場必須申請 NPDES 許可，或提出無排放證明；大型養雞場使用乾的糞尿處理方式者也納入管理；新建畜牧場必須符合無排放的標準；申請 NPDES 許可需具營養物管理計畫。

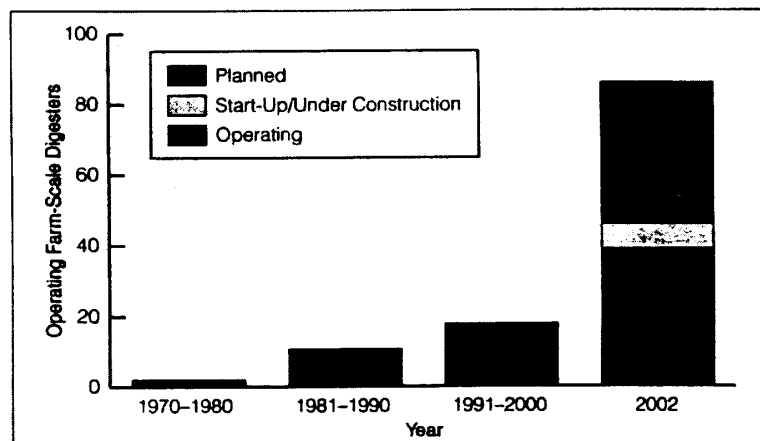
2002 Farm Bill 提供畜牧業者幾個補助方案，如 Environmental Quality

Incentives Program (EQIP)提供最高 75%財政補助，以協助業者達到環保需求。其他可申請的補助 Conservation Reserve Program、Conservation Reserve Enhancement Program、Wetlands Reserve Program、Wildlife Habitat Incentives Program。

資料來源：www.nrcs.usda.gov/programs/afo/CAFO_AsstAvail.html

三、厭氣處理高峰會

由於厭氣處理可產生沼氣(biogas)，其中甲烷可作為能源，因此在眾多評估中的廢棄物處理系統中，受到較多的重視，被認為具化廢棄物為能源的潛力，2000-2002 年間，美國養豬業實場應用厭氣消化槽者增加 30%，在 40 個用厭氣消化處理系統中有 35 個場應用沼氣發電或產熱，該 40 個系統資料整理於 AgSTAR Digest, EPA-430-F-02-028 技術報告 (www.epa.gov/agstar)。2003 年 6 月 2 至 4 日於北卡州舉行化廢物為能源-厭氣消化高峰會(Turning waste into watts: The anaerobic digester summit)，該會議由農部(USDA)、能源部(US. Dept. of Energy)、環保署(USEPA)與水環境聯盟(Water environment federation)主辦，參加者為來自美國全國的動物廢棄物處理研究人員、處理設備廠商與政府單位業務承辦人員，共四百多人。會議內容包含政策方向，技術報告與經濟評估，並參觀 Bahram Farm 的覆蓋厭氣消化槽與能源利用。



資料來源: AgSTAR Digest, EPA-430-F-02-028

技術報告中總結厭氣消化槽除覆蓋式厭氣塘外，尚有混合式(mixing)、塞流式(plug flow)、接觸生長式(contact growth) 設計，而應用的消化槽溫度則分為常溫(ambient)、中溫(mesophilic, 35°C)與高溫(Thermophilic, 50°C)。由學術界研究人員或廠商開發各式厭氣消化槽，或為試驗規模(pilot scale)或為實場規模各具優劣，但是經濟評估佔非常重要的地位，此點與台灣不同。台灣的觀點是要求最大處理效率，使放流水盡量不含有機物，能達到放流水標準為研究目標。美國在評估處理方式時則考慮經濟效益，即轉化為能源或其他副產品效率最高，能由廢棄物處理賺錢或至少能不花費在廢棄物處理上為目標。而由經濟學家 Carl Nelson 評估結果，在初期政府補助下，使用厭氣處理沼氣發電能有盈餘，但是長期下來，若電價未能提高，使用該系統並無利潤。

在台灣豬糞尿厭氣處理因有紅泥膠皮加以覆蓋，產生的沼氣能輕易收集，但大部份未加以利用。早期農政單位曾補助推廣沼氣發電機，但易腐蝕故障，且電價低，農戶產生的多餘電力又未能賣給電力公司，故目前少有繼續使用沼氣發電之農戶。電力價格低的問題台灣與美國相似，但美國沼氣發電機故障率是否較低，是否值得引進應用，則有待深入了解。

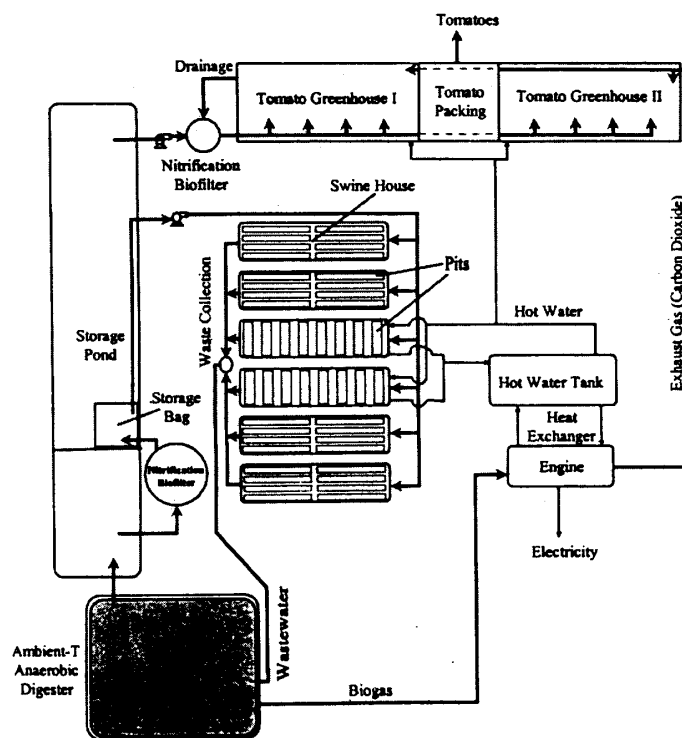
以下介紹北卡州內自 1997 年操作至今的覆蓋式厭氣消化與計畫中將於 2003 年興建之高溫厭氣消化兩個系統，此二系統皆利用厭氣發酵產生的沼氣能源與處理水進行整合性農業，或稱農漁牧綜合經營。

1. 覆蓋式厭氣消化槽

位於北卡州內一處種豬場，飼養 4000 頭母豬，自 1997 年開始操作覆蓋式厭氣消化槽系統(如下頁圖)，興建成本大約為 29 萬美元，該農場有六棟高床式豬舍，每棟床下有八條糞尿溝，每日以循環水利用重力方式沖洗其中一條溝，八條溝輪流沖洗。沖洗後廢水流入厭氣消化槽，然後進入硝化生物濾床減低氨氮，最後進入儲存塘，儲存之廢水循環沖洗豬舍，與供應溫室番茄所需水分與養分。厭氣消化槽體積 24500 m³，深度 6 米，底部土壤夯實，表面以高密度聚乙烯覆蓋，水力停留時間約 150 天。產生之沼

氣含甲烷 71%，二氧化碳 29%，用以發電每日產生電力 560-990 kW-hr，發電之餘熱，用以產生熱水，熱水用於豬舍保溫。產生之二氧化碳，用於溫室。該系統原廢水 COD 為 17247 mg/L、厭氣消化流出液為 1102 mg/L、儲存塘為 637 mg/L (Cheng *et al.*, 2001)。

該系統處理效率雖高，但最後之處理水 COD 並未能符合台灣之放流水標準，且總水力停留時間約 450-500 天，即需要大土地面積，以廢水處理觀點而言，並不能適用於台灣。但是，其有效利用沼氣能源(甲烷與二氧化碳)、發電餘熱與處理水再利用之落實值得學習。



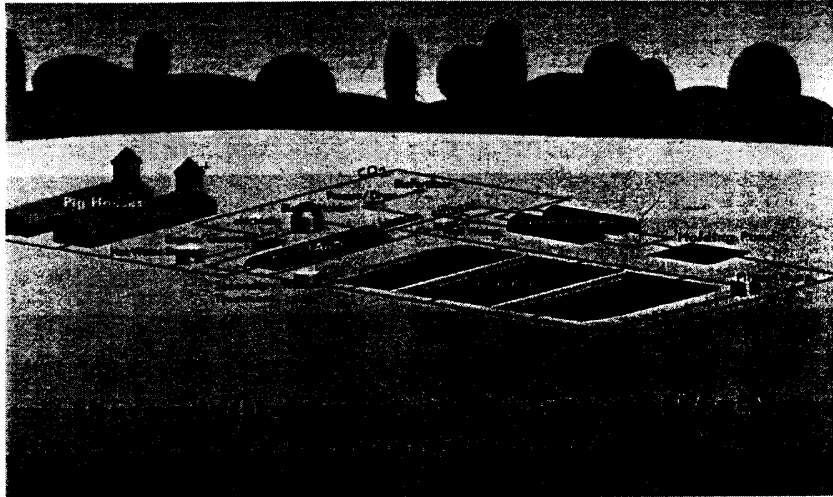
覆蓋式厭氣消化系統示意圖(Cheng *et al.*, 2001)

2. 高溫厭氣消化槽

高溫厭氣消化槽(Thermophilic Anaerobic Digester)指 50°C 以上之消化槽，反應速率較中溫或常溫者快，因此所需消化槽較小為其主要優勢；但是所需之能量較高，能否由產生之多餘沼氣能源供給，是常被質疑之處，

一旦溫度不能保持高溫，系統需要較長時間恢復運作。高溫厭氣消化槽適合較高濃度之廢水，揮發性固體(VS)在 2% 為最佳，因此沖洗式(flush)豬舍必須蓋建為刮糞式豬舍，才適宜用此系統。高溫與中溫系統皆須保持一定溫度，保溫之設備相當重要，高溫消化槽因濃度高體積小，保溫較易。

在 Smith field 示範計畫中，原訂 2000 年開始高溫厭氣消化示範場，但因農戶配合問題拖延至今，2003 年下半年預計以一百萬美元在北卡州 Rocky mount 地區 USDA 試驗站，新建豬舍與高溫厭氣消化設備。至於整合農場(integrated farm)構想(如下圖)，魚池與溫室等將待進一步之經費支援。

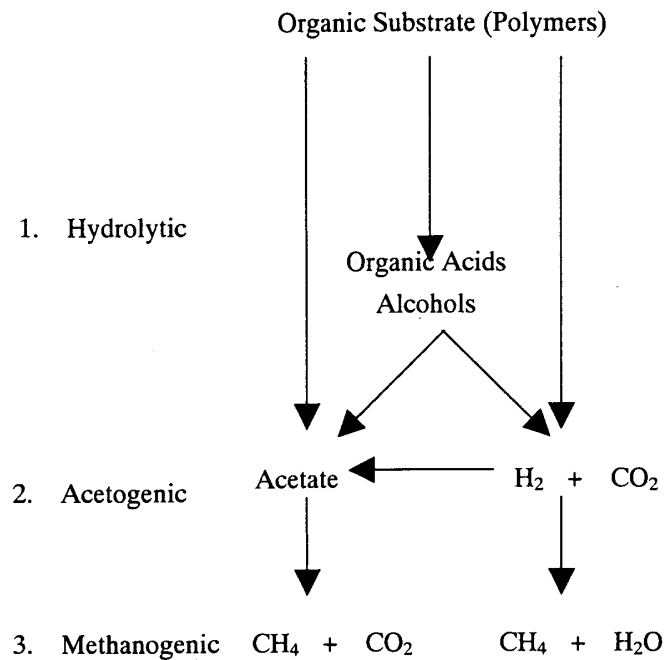


(Shih *et al.*,1999)

四、 厭氣處理之微生物

1. 總體反應

厭氣生物處理利用厭氣微生物，經由一連串酵素代謝作用將複雜之有機物轉化為甲烷、二氧化碳等產物。通常分為三階段，即水解(hydrolysis)、酸化(acidogenesis)及甲烷化(methanogenesis)。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化成溶解性、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。



2. 微生物多樣性與分類

微生物演化速度快，具有型態、構造、代謝、生態、行為與演化上的多樣性，是自然界豐富的基因資源。例如：微生物能生長的环境溫度可由 -5°C 至 118°C ，pH 值 0 至 11 的环境都有微生物可存活，這些特殊環境微生物必定有特殊基因使其能存活在不良的環境條件下，這些特殊的基因及衍生物可以應用於工業、農業等之生產。

傳統微生物的分類是採用外表型態、生殖方式及生化特徵等來分類，然而進來分子生物學的進步，使 DNA 與 RNA 序列分析成為簡易的分類工具。微生物的分類上已發展出使用分析核糖體的小單元 (small subunit，約兩千個核鹼基對)，根據各種生物的 RNA 序列相似程度，以演化法計算，繪製成的演化樹的分類方式。以此種演化分析方式，生物分為 Archaea、Bacteria 及 Eucarya 三域，與傳統分為原核生物界、原生生物界、植物界、動物界、真菌界的五界說明顯不同。

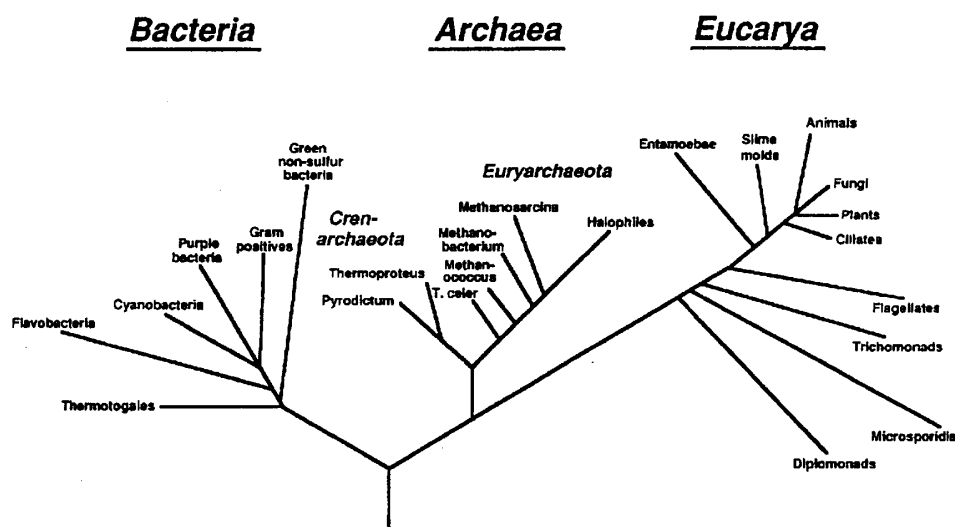


FIGURE 1 A phylogenetic tree based on evaluation of 16S rRNA sequences. The three major lineages of life (Archaea, Bacteria, and Eucarya) are shown. T. celer, *Thermococcus celer*. Reprinted from *The FASEB Journal* (56) with permission.

3. 甲烷菌

在三域系統的分類上甲烷菌、嗜鹼菌及嗜熱菌同屬 Archaea，其細胞壁不含太聚糖（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。在自然界中存在於瘤胃動物之腸胃道、水稻田、湖和海底泥與溫泉等厭氣環境中。在廢水處理厭氣反應器中，也可分離出甲烷菌。演化分類上甲烷菌分為 Mrthanbacteriales、Methanococcales、Methanosarcinales、Methanopyrales 及 Methanomicrobiales。甲烷菌又依營養來源分為 hydrogenotroph(氧化氫氣還原二氧化碳以生成甲烷)、formatotroph(氧化 formate)、methyloctroph(利用 methyl compound)及 acetotroph(利用醋酸產生甲烷)。由於，由氫氣與二氧化碳轉換為甲烷自由能最低，由醋酸轉換為甲烷自由能最高，hydrogenotroph 種類多於 acetotroph。(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。一般認為廢水處理系統中，以 Methanosarcina 屬為主要甲烷菌，在製酒廢水厭氣消化系統中，95% 的 Archaea 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)。

五、參加美國微生物學會第 103 屆年會報告

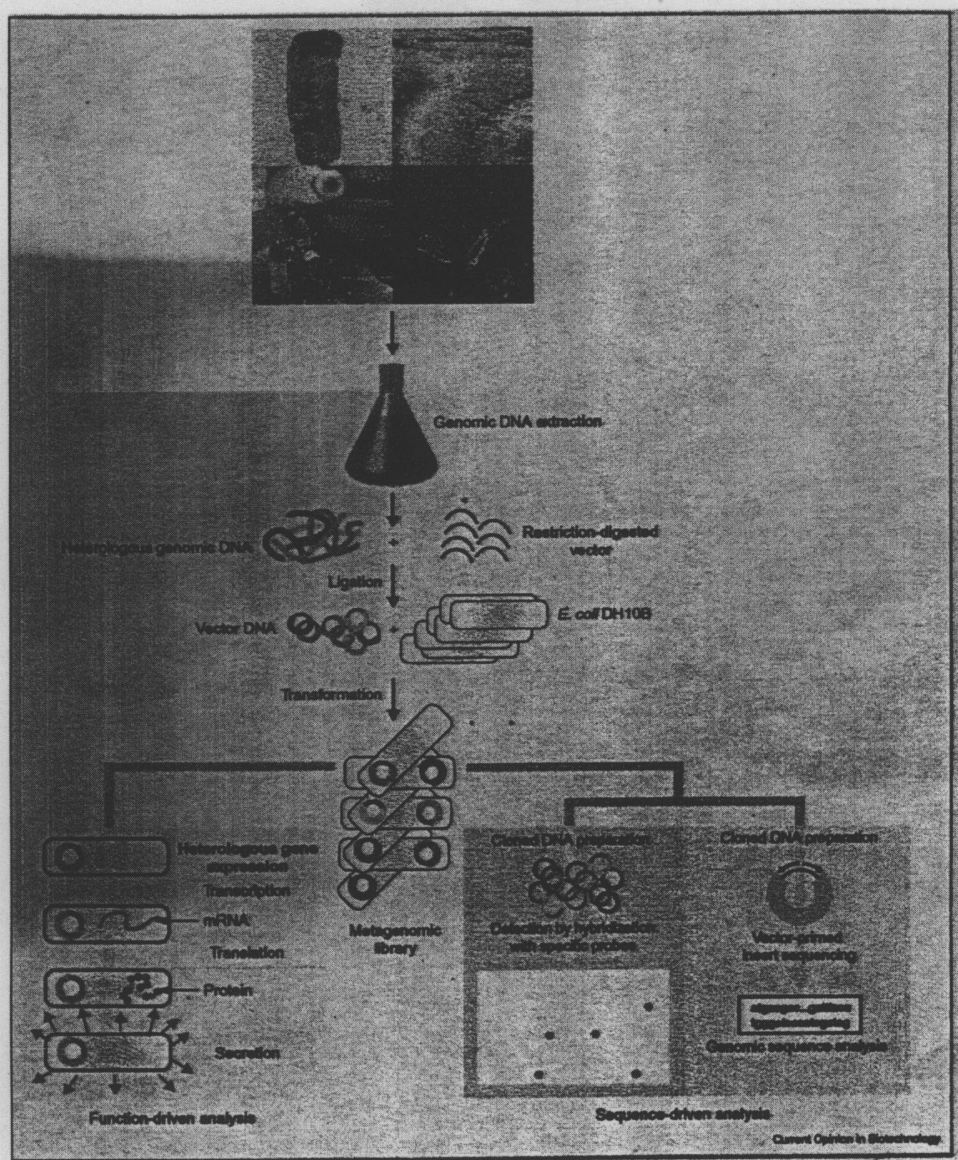
美國微生物學會第 103 屆年會有萬人參加，分為診斷微生物學、病原菌與寄主反應機制、普通微生物學、分子微生物學與生理病毒學三大組。每大組又分數組，共 26 組。會議由 2003 年 5 月 18 日至 22 日共舉行五天，各組有多場研討會與壁報展示。與本研習相關之環境微生物研究新方向，整理如下：

1. 多源基因體學(Metagenomics)

討論會由 metagenomics 緣起到最近的應用，研究方法上探討環境樣品大分子 DNA 萃取、選殖策略及多源基因庫(metagenomic library)的篩選；應用上探討開發新抗生素與酵素。

相對於單一生物的基因體研究，多源基因體學研究環境樣品多樣生物之基因體。研究方法是將環境樣本(如土壤、深海底泥、珊瑚表面)的 DNA 萃取出來，將這些來自多源微生物的 DNA 接合至載體(vector)上，然後轉型入 *E. coli*。由這樣構成的多源基因庫篩選目標基因的方法有兩類，即功能導向分析與序列導向分析。功能導向分析是將基因接合至可表現的載體，使其進行表現產生蛋白質，再篩選表現目標蛋白質的選殖株。序列導向分析是以特定核酸探針雜合目標基因或直接進行嵌入基因的序列分析 (Schloss and Handelsman, 2003)。以此方法一些不能培養的微生物基因也可以被選殖、定序、表現甚至應用，為其優點。但是，所建立之多源基因庫龐大，可能為數萬至數十萬個轉殖株，其中只有極少部份為含目標基因，而能完整表現的更是少數。

目前應用多源基因體篩選出的酵素有 chitinase、4-hydroxy butyrate sehydrogenase、lipase/esterase、protease、amylase、oxygenase、DNase、xylanase 及 polyketide synthase (Lorenz *et al.*, 2003)；新抗生素有 turbomycin A 與 B(Gillespie *et al.*, 2002)。



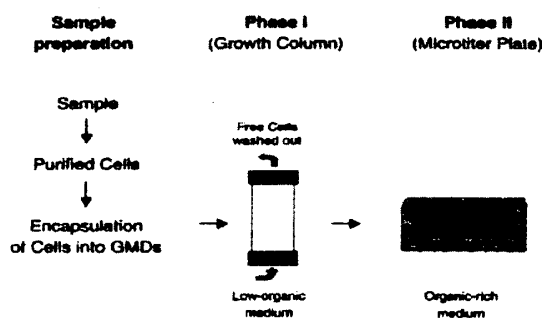
(Schloss and Handelsman, 2003)

總之，多源基因體學是一項可應用於生技產業的新技術，目前的技術已可以用來開發新產品以迎合實際上的需要，包含新抗生素與酵素開發。而目前許多的研究者針對多源基因表現、多源基因庫建立、載體設計與篩選方式進行改進，將可使該項技術更為便利，效益更佳。尤其，針對目標物增殖(enrich)環境樣本中某些微生物，可以提高選殖到目標基因的機率，應該是將來可行的有力研究工具。

2. 培養未培養(uncultured)微生物之策略與技術

環境中可培養的微生物只佔 1%，不能培養的微生物在特殊環境中佔重要的地位，也極具開發的潛能。除了用 metagenomics 的方法將不能培養微生物的基因選殖來應用外，以新技術來分離培養傳統上不能培養的微生物也是一種突破的方法。

使用包覆法 (encapsulation) 為其中之一種新技術，將水樣或土壤抽出之微生物樣品稀釋至一定濃度後與洋菜膠(agarose, 40°C)混合，用機械製成極小的顆粒，稱 GMD (gel microdroplet)，大約有 10% 的 GMD 中只有單一個細胞。第一階段將其培養於管柱，讓懸浮生長的細胞排出管柱，培養基乃取自樣品來源處，如海水微生物以滅過菌的海水培養。第二階段則使用微滴盤與人工海水培養基培養。如此分離培養出的菌株，經演化分析 (phylogenetic analysis) 發現一些之前未能培養之新菌株 (Zengler *et al.*, 2002)。在此次年會報告中，新的研究將 GMD 表面覆上多孔塑膠類物質，使其孔徑可容許營養物質通過供應生長需求，而不容許細胞通過，如此可解決單一 GMD 中細胞生長過度，而污染到其他 GMD 的問題，更能得到含純菌株的 GMD。



(Zengler *et al.*, 2002)

3. 環境中的抗生素與抗藥性

畜產業使用抗生素被認為是微生物產生抗藥性之重要因素之一。隨微生物抗藥性之增加，先進國家已經加強相關之研究，並禁止部分畜產業使用抗生素來提高生產效率。以美國為例，目前已禁止養雞飼料添加抗生

素，並且正在加強評估養豬業使用抗生素之影響，本次年會多篇報告初步指出養豬場使用抗生素造成施灌豬糞尿廢水之土壤中與承受之水體中微生物抗藥性增加。

超過 88% 美國養豬場使用抗生素來促進豬隻生長、減少下痢、治療呼吸道與腸道疾病。養豬場含抗生素、抗生素殘基及抗藥性腸道菌之排放水，常用於灌溉土地。經試驗結果施用養豬場排放水之農地土壤中抗藥性(抗 bacitracin、chlortetracycline、tetracycline、tylosin)好氣異營菌數，都較未施用排放水之土壤高。抗藥性基因測試也得到相同結果。只施用一次養豬場排放水的土壤，經 90 天後並未使土壤微生物抗藥性增加，而一年內重複施灌養豬場排水的農地微生物抗藥性基因量與種類皆有增加(Maxwell *et al.*, 2003)。另一篇報告測試抗四環黴素(tetracycline)基因的結果指出只有在最近施用過養豬排放水的土壤才測出抗藥性基因，而推測抗藥性基因在農地會逐漸衰退(Rodriguez-Minguella *et al.*, 2003)。以 real-time PCR 測試抗四環黴素基因結果養豬場不論是否使用抗生素，其飼料、糞、尿及土壤樣品皆有抗四環黴素基因，顯示此基因之廣佈，但未使用抗生素之有機農場 (organic farm) 樣品中，抗四環黴素基因量為使用氯四環黴素的農場樣品之十分之一至千分之一(Mehboob, *et al.*, 2003)。由這些結果看來，養豬場使用抗生素，經由放流水施灌對環境微生物抗藥性的增加有所影響。

然而，我國養豬場廢棄物處理方式與美國廣泛採用之厭氣塘不同，抗生素在廢水處理系統中與承受水體或土壤中是否存在，在土壤中移動如何，是否進入地下水中，是否造成環境中微生物族群改變或增加抗藥性基因分布，都是尚未探討之重要課題。

肆、 建議

目前，豬糞尿厭氣處理技術台灣並未落後，而美國使用之厭氣塘與噴灌系統需要土地面積大，並不適用於台灣；且美國也發生臭味與地下水污染的問題，為此已積極研發替代處理方式。2006 年美國聯邦政府的新排放標準將開始執行，這此期間已有大量人力物力投入替代處理方式的研發，以符合環保的需求。因此，這段期間將有若干新技術的產生，建議持續注意美國豬糞尿處理新技術的研發並加強交流。

對於厭氣處理微生物的研究將是提高厭氣處理效率的關鍵，本研究在接觸生長上流式厭氣槽發現一群未能培養的甲烷菌，在甲烷化過程中的角色應繼續研究，如能分離培養，或也研究其是否具有高甲烷化能力，提高沼氣中甲烷比例。

在環境微生物的研究上，多源基因體學可應用於新酵素等的開發，且目前為國外熱門的研究題材，能篩選出有用基因的機率隨研究方法的改進將逐步提高，雖然部分國內學者也已開始這方面的研究，仍建議多支持這個極具開發潛力的研究新領域。

伍、 相關附錄

附錄1. 參考文獻

- Cheng, J., and B. Liu. 2002. Swine wastewater treatment in anaerobic digesters with floating medium. *Trans ASAE*.45(3): 799-805.
- Cheng, J., M. M. Peet, D. H. Willits, and J. Pace. 2001. Integrated farming for sustainable agriculture. *Proceedings of the international conference for agricultural science and technology*, Nov. 7-9,2001, Beijing, China.
- Ficker, M., K. Krastel, S. Orlicky, and E. Edwards. 1999. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5576-5585.
- Garcia, J., B. K. C. Patel, and B. Ollivier. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6: 205-226.
- Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, and J. Handlesman.2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4301-4306.
- Godon, J., E. Zumstein, P. Dabert, F., Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2802-2813.
- Harris, J. K., E. S. Haas, D. Williams, D. N. Frank, and J. W. Brown. 2001. New insight into RNase P RNA structure from comparative analysis of the archaeal RNA. *RNA* 7: 220-232.
- James C. Barker.2003. *Water Quality and Waste Management Rules for Livestock Farms in North Carolina*. North Carolina State University.
- Lorenz, P. K. Liebeton, F. Niehaus, and J. Eck. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:572-577.
- Maxwell, S., J. C. Chee-Sanford, and G.K..Sims. 2003. A comparison of antibiotics resistance patterns in swine effluent manured and non-manured soils. Abstract A-041, 103th ASM general meeting, Washington DC, USA.
- McHugh, S., M. Carton, T. Mahony, and V. O'flahery. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters* 219: 297-304.
- Mehboob, A., S. A. Kocherginskaya, R. I. Aminov, and R. I. Mackie. 2003.

- Quantification of tetracycline resistance genes using real-time PCR on pig farms with and without antibiotic use. Abstract A-043, 103th ASM general meeting, Washington DC, USA.
- Nercessian, D., M. Upton, D. Lloyd, and C. Edwards. 1999. Phylogenetic analysis of peat bog methanogen populations. *FEMS Microbiology Letters* 173: 425-429.
- Parker, J. 2002. Turning manure into gold-The potential of methane-producing bacteria to meet future energy needs. *EMBO reports* 3(12):1114-1116.
- Plumb, J. J., J. Bell, and D. C. Stuckey. 2001. Microbial populations associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3226-3235.
- Rodon, M. R., S. J. Raffel, R. M. Goodman, and J. Handelsman. 1999. Toward functional genomics in bacteria; Analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6451-6455.
- Rodriguez-Minguela, C. M., J. M. Tiedje, and L. M. Jacobs. 2003. Detection of novel tetracycline resistance gene sequences in soil treated with swine manure. Abstract A-042, 103th ASM general meeting, Washington DC, USA.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2541-2547.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology.* 14: 1-8.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada, and K. Nakamura. 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144: 2655-2665.
- Solera, R., L. I. Romero, and D. Sales. Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe* 7: 79-86.
- USEPA. 2003. AgSTAR digest. EPA-430-F-02-028.
- Williams, D., E. S. Hass and J. W. Brown. 2001. Surprising archaeal diversity in a municipal wastewater sludge. (unpublished manuscript)
- 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.

- Wu, J., W. Liu, I. Tseng, and S. Cheng. 2001. Characterization of the microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology*, 147: 373-382.
- Zengler, K., G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, and M. Keller. 2002. Cultivating the uncultured. *PNAS* 99: 15681-15686.

Methanogenic Population Associated With Treatment of Swine Wastewater in Anaerobic Digesters

M. P. Cheng¹, J. M. Brown², J. J. Shih²

1. Material and Methods

1.1. Source of anaerobic sludge

Anaerobic sludges from swine wastewater plant of Taiwan Livestock Research Institute (T) and North Carolina State University(A) was collected for DNA extraction. The former was a plug flow- red mud plastic covered plant operated under ambient temperature; the latter was an pilot scale mesophilic (35°C) upflow anaerobic bioreactor(UASB) with filters for contact growth. The COD removal efficiencies were similar in these two reactors.

	A*	T
HRT (day)	10	10
Influent COD(mg/L)	1925	1389
Effluent COD(mg/L)	661	480

* data from Cheng and Liu, 2002.

1.2. Sludge DNA extraction and purification

Sludge DNA was extracted by using a modified protocol developed by Harris *et al.* (2001). Sludge samples were initially crushed using pestle and mortar grinding with dry ice, treating them with lysozyme (10mg/ml) for 5 min at 37°C, aliquots were added to sterile centrifuge tubes along with 3 ml of extraction buffer (30% 4-aminosalicylate, 5% SDS, and incubating for 10 min at 70°C. Following repeated extraction with STE saturated phenol, phenol-chloroform, and chloroform, DNA was precipitated using 0.1 volumes of 3M sodium acetate and equal volume of isopropanol. The crudely extracted nucleic acids were pelleted by centrifugation at 10000×g for 10 min. Extracted DNA was dissolved in STE (pH=8) buffer, and purified by CsCl gradient centrifugation.

1.3. Generation of 16S rDNA clone library

Archaeal-specific 16S rDNA was amplified by performing polymerase chain reaction (PCR) in a thermocycler (Perkin-Elmer) with forward primer 8FAPL (5'-GGCTGCAGTCTAGATCCGGTTGATCCTGCCGG-3') and reverse primer 1492RPL (5'-GGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGTTACCTGTTACGACTT-3'), and reaction mixtures (50 μ l) contained reaction buffer, 200 μ M dNTP, 100 ng of each primer, 10ng template DNA and 0.5 U Taq DNA polymerase. Reactions were incubated for an initial 2min at 94°C and amplified for 30 cycles at 92°C for 1.5 min, 55°C for 1.5 min and 72°C for 0.5 min, followed by 7 min of extension at 72°C. PCR products were ligated into the TA cloning vector (pST-Blue) and by using a TA cloning kit (Novagen) and then transformed to the competent *Escherichia coli* cells provided by following the manufacturer's instructions.

1.4. Amplified rDNA Restriction Analysis

Clones from each library were screened to determine whether they contained the insert of appropriate size by colony PCR with T7 and SP6 primers. PCR products obtained from the insert-containing clones from each sludge sample were digested with the restriction endonuclease *Hae*III and *Rsa*I. The resulting DNA fragments were resolved by electrophoresis on 2% agarose. Banding patterns were compared by visualization and grouped into operational taxonomic units (OTUs).

1.5. Sequence analysis

Representative from different OTUs were sequenced. Plasmid DNA was prepared from overnight cultures of positive transformants using an alkaline miniprep kit (Qiagen). Automate DNA sequencing was performed with an ABI model 377 sequencer (Applied Biosystems) with T7 and Sp6 primers. Each sequence was used to search NCBI/GeneBank database for most similar sequence; these sequence were aligned by pileup program of GCG server. Phylogenetic analysis was performed using Phylip.

2. Results and Discussion

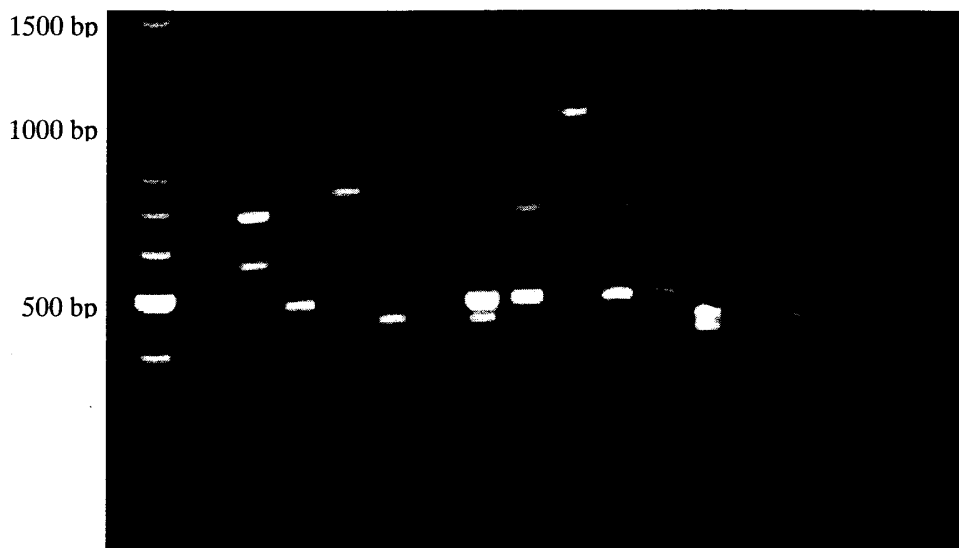


Fig. 1. Amplified rDNA Restriction Analysis

Of 51 and 64 clones were obtained from sludge A and T, 15 and 14 different OTUs were identified by ARDRA. The initial 500 bases of 16S rRNA gene of OTU A2 (5/51) were identical to those of *Methanococcus vannielii*; those of OTU A3 (5/51) was similar to those of *Methanobacterium formicicum* (98% identity); those of OTU A4 (10/51) was similar to *Methanococcus vannielii* (96%). The 16S rRNA gene of other OTUs from sludge A were related to those from a wastewater sludge of Cary South Municipal Treatment Plant (Williams *et al.*, 2001) with 98-99% of identity. OTU A8 (1/51), A9 (6/51) and A14 (1/51); A6 (1/51) and A13 (1/51); A7 (8/51), A10 (1/51), A12 (2/51) and A15 (2/51); A11 (2/51); A1 (5/51) and A2 (1/51) were similar to uncultured archaeon 39-2, 44A-1, 69-1, 62-2, and 72-1, respectively. Uncultured archaeon 39-2, 44A-1 and 69-1 were related to a large group of euryarchaea for which no cultivated species have been identified, and no phenotypic data are available; it was as methanogenic microbes with phylogenetic analysis (Williams *et al.*, 2001).

Table 1. Operational Taxonomy Units (OUTs) from anaerobic sludges and their most closed sequences aligned from Genbank database

OTU	Frequency	Most closed sequence		Most closed strain	
		Name and Source	Identities	Name	Identities
T01	16/64	Uncultured archaeon TA02 /terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system	545/556 (98%)	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	433/484 (89%)
		Uncultured archaeon ASDS8 / anaerobic bioreactors	436/439 (99%)		
T02	16/64	Uncultured archaeon clone LH-02 /northern peatland	525/558 (94%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	508/555 (91%)
T03	13/64	Uncultured archaeon 61-2 /municipal wastewater sludge	539/550 (98%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	525/545 (96%)
T04	4/64	Uncultured archaeon 39-2 /municipal wastewater sludge	527/543 (97%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	183/206 (88%) 32/33 (96%) 30/33 (90%)
T05	4/64	Uncultured archaeon 57-1 /municipal wastewater sludge Uncultured euryarchaeote VAL47/ surface water of freshwater Finnish forest lake	527/552 (95%) 527/552 (95%)		
T06	3/64	Uncultured	430/439	<i>Methanospirillum</i>	540/554

		archaeon isolate MUAHR / methanogenic upflow anaerobic hybrid reactor	(97%)	<i>hungatei</i>	(97%)
T07	1/64	Uncultured archaeon isolate MUAHR 12 / methanogenic upflow anaerobic hybrid reactor	421/433 (97%)	<i>Methanospirillum hungatei</i>	522/545 (95%)
T08	1/64	Uncultured archaeon TA03 /terephthalate-deg rading anaerobic granular sludge system	535/555 (96%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	349/351 (99%) 53/57 (92%)
T09	1/64	Uncultured archaeon clone LH-02 /northern peatland	444/475 (93%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	431/472 (91%)
T10	1/64	Uncultured archaeon 57-1 /municipal wastewater sludge	528/555 (95%)	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	337/370 (91%) 119/136 (87%)
T11	1/64	Uncultured archaeon clone LK2 / landfill site	472/489 (96%)	<i>Methanocorpus- culum labreanum</i>	534/559 (95%)
T12	1/64	Uncultured archaeon 57-1 /municipal wastewater sludge	545/576 (94%)		
T13	1/64	Uncultured archaeon TA03 /terephthalate-deg rading anaerobic granular sludge	534/551 (96%)	<i>Methanosaeta concilii</i>	373/382 (97%) 54/57 (94%)

		system			
T14	1/64			<i>Acholeplasma vituli</i>	520/552 (94%)
A1	5/51	Uncultured archaeon 72-1 16S ribosomal RNA gene	491/491 (100%)		
A2	5/51			<i>Methanococcus vannielii</i>	887/895 (99%)
A3	5/51	Uncultured archaeon Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) reactors treating oleic acid	391/403 (97%)	<i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanobacterium subterraneum</i>	478/485 (98%), 456/472 (96%),
A4	10/51			<i>Methanococcus vannielii</i>	
A5	1/51	Uncultured archaeon 72-1 16S ribosomal RNA gene	490/491 (99%)		
A6	1/51	Uncultured archaeon 44A-1	488/491 (99%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	244/279 (87%)
A7	8/51	Uncultured archaeon 69-1	490/491 (99%)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	242/279 (86%)
A8	1/51	Uncultured archaeon 39-2	483/491 (98%)		
A9	6/51	AF424769 Uncultured archaeon 39-2	488/493 (98%)		
A10	1/51	Uncultured archaeon 69-1	490/491 (99%)		
A11	2/51	Uncultured archaeon 62-2	483/492 (98%)		
A12	2/51	Uncultured archaeon 69-1	489/491 (99%)		
A13	1/51	Uncultured	489/491		

		archaeon 44A-1	(99%)		
A14	1/51	Uncultured archaeon 39-2	488/490 (99%)		
A15	2/51	Uncultured archaeon 69-1	487/491 (99%)		

The major OTUs of sludge T were OTU T01 (16/64), T02 (16/64) and T03 (13/64). OTU T01 was 98% identical to an uncultured archaeon TA02 from a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system and 89% identical to *Methanoculleus chikugoensis*. OTU T02 was 94% identical to an uncultured archaeon LH-02 from a northern peatland with and 91% identical to *Methanosaeta concilii*. OTU T03 was 98% identical to an uncultured archaeon 61-2 from municipal wastewater sludge with and 96% identical to *Methanosaeta concilii* (Table 1).

The methanogenic population structures of two sludges from different anaerobic digesters were different. In sludge A, 45% of clones were closed to a group of uncultured methanogenic microbes, 29% of clones were closed to *Methanococcus vannielii* which uses both hydrogen and formate as electron donors (Garcia *et al.*, 2000), 10% of clones were related to *Methanobacterium formicicum* which can use formate, 16% of clones were related to a little-known group of environmental crenarchaeal sequences. In sludge T, 45% of clones were closed to *Methanosaeta concilii* which is obligate acetotrophic, and 25% of clones were related to *Methanoculleus chikugoensis*, which uses formate as electron donors.

The results of phylogenetic analysis showed clones from sludge T were belong to the orders methanobacteriales, methanomicrobiales and methanosarcinales, except for OUT T04; while those from sludge A belong to order methanococcales (Fig.2).

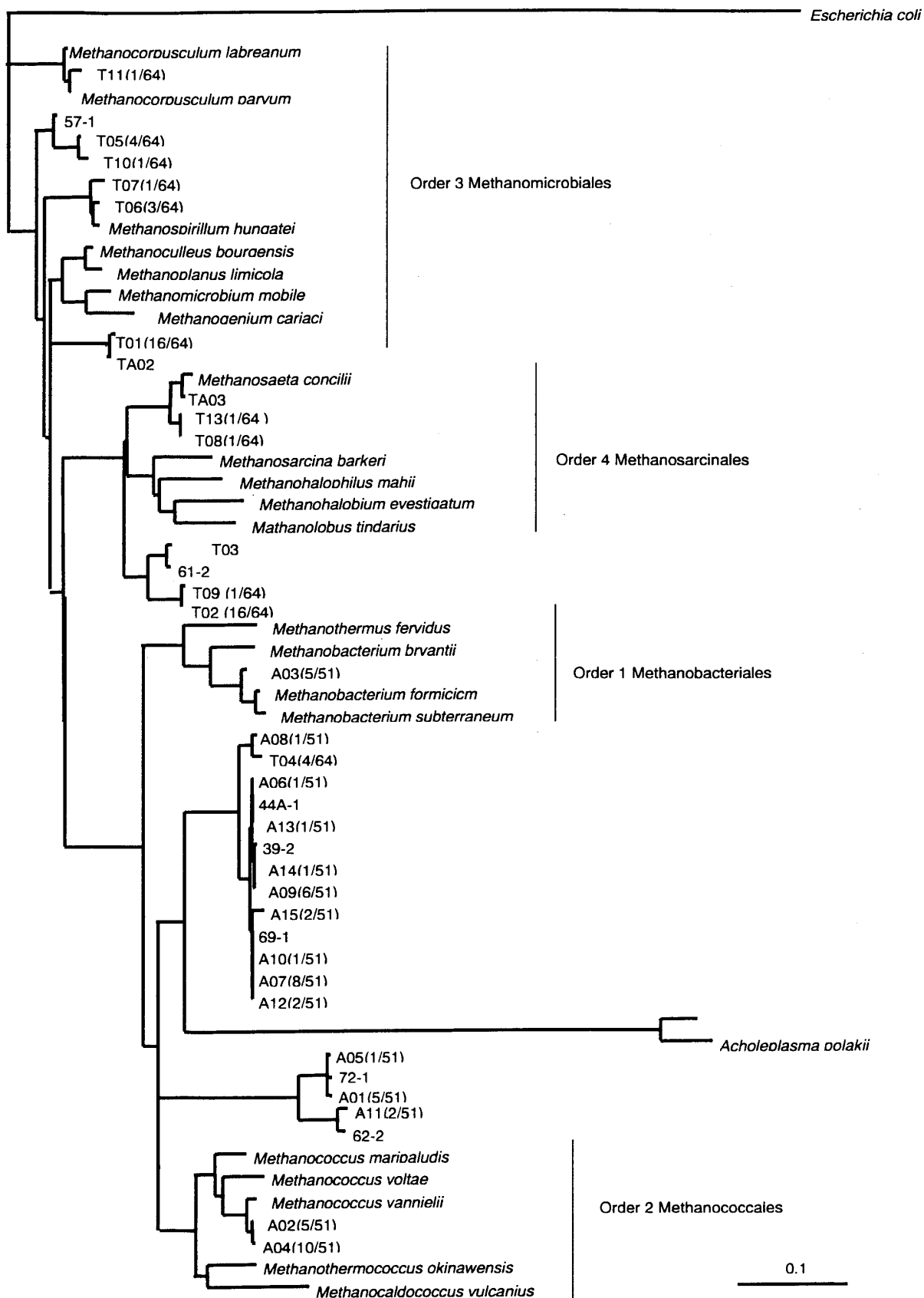


Fig. 2. Phylogenetic tree of partial SSU rDNA sequences from OTUs studied and sequences from identified archaea in the databases.