

# 豆腐废水 UASB 反应器中的原核生物多样性 及主要功能菌群

张春杨 刘晓黎 东秀珠\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 通过构建 16S rRNA 基因文库,对豆腐废水 UASB 反应器中颗粒污泥的原核生物多样性进行了分析,并用 MPN 法对颗粒污泥中的互养产乙酸细菌和产甲烷菌进行了活菌数量测定。结果表明 33% 的 16S rRNA 基因序列属于产甲烷菌,氢和乙酸盐营养型的产甲烷菌在颗粒污泥中数量最多,分别为  $1.1 \times 10^9$  个/mL 和  $4.5 \times 10^8$  个/mL。低 GC 革兰氏阳性菌和  $\delta$ -变形菌纲分支的细菌也是颗粒污泥中的主要菌群,它们的 16S rRNA 序列分别占 22% 和 9%,其中互养产乙酸细菌在颗粒污泥中的数量可达  $4.5 \times 10^7$  个/mL。绿色非硫细菌是另一类丰度很高的细菌,其 16S rRNA 序列占文库的 12%。对各类微生物在颗粒污泥中可能的作用进行了讨论。通过研究不仅了解了特定环境中的微生物组成,还为从中分离特异类群的微生物提供了指导。

**关键词** UASB 颗粒污泥,系统发育多样性,互养产乙酸细菌,产甲烷菌

**中图分类号** Q939 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)02-0141-07

在无光、无氧、无  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等电子受体的环境中,复杂的有机物被彻底分解为甲烷和二氧化碳主要由水解发酵菌(Hydrolyzing and fermenting bacteria),互养产乙酸细菌(Syntrophic acetogens),和产甲烷菌(Methanogens)协同完成<sup>[1]</sup>。其中 76% 的有机物先被降解为中间产物(如短链脂肪酸、一元醇等),由于这些物质的降解是热力学上的吸能反应,因而必须由其降解菌(互养产乙酸细菌)在耗氢菌(如产甲烷菌)的协助下才能完成。研究互养产乙酸细菌和产甲烷菌的资源以及它们的生理代谢特征,对了解有机物的厌氧降解、清除环境污染以及能源再生有重要意义。

研究发现,海洋、湖泊、河流的水底沉积物,稻田污泥,反刍动物的消化系统及各类工业和农业废水的 UASB(Up-flow Anaerobic Sludge Blanket)反应器是互养细菌及产甲烷菌的主要生境,其中 UASB 反应器的颗粒污泥(Granular sludge)中相关菌群最丰富,因为这些功能菌群形成了聚集体,有利于细胞间物质的传递<sup>[2]</sup>。

豆腐废水是一类 COD 含量较高、蛋白质丰富的有机废水<sup>[3]</sup>。北京“王致和豆制品厂”废水 UASB 反应器是运行了十几年的产甲烷反应器,它可将豆腐

废水 COD 从进水的  $11.5\text{kg/m}^3$  降到出水的  $0.3\text{kg/m}^3$ ,去除率达 97.4%,并且产生大量的甲烷气体常年供给附近居民作燃气。本研究采用非培养手段构建了此 UASB 反应器颗粒污泥的 16S rRNA 基因文库,普查其原核生物多样性,并采用培养手段对其中的互养产乙酸细菌和产甲烷菌进行了计数,为下一步分离此类菌群打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 采样

从“王致和豆制品厂”废水 UASB 反应器中采集活性颗粒污泥,分装于厌氧管以用于之后的 DNA 提取和分离培养。

### 1.2 试剂和培养基

**1.2.1 试剂** *Taq* DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;T4 DNA 连接酶、pUCm-T 载体来自 MBI-Fermentas。

**1.2.2 培养基** 在预还原的基础培养基<sup>[4]</sup>中分别加入 20mmol/L 丙酸钠,20mmol/L 丁酸钠或 10mmol/L 苯甲酸钠分别培养降解丙酸、丁酸或苯甲酸的互养细菌,加入 20mmol/L 乙酸钠或  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ (80:20)混合气体( $1.3 \times 10^5$  Pa)分别培养乙酸型或氢营养型的产

基金项目:国家杰出青年基金(30025001);国家“863 计划”(2001AA227131)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

作者简介:张春杨(1975-),女,山东安丘人,博士研究生,主要从事微生物资源和系统发育研究。E-mail: zcy530336@sina.com

收稿日期:2003-06-17,修回日期:2003-09-29

甲烷菌。预还原的培养基分装于 25mL 厌氧螺口管(每管装 5mL)中,加盖丁酰基橡胶塞和螺盖。除氢营养型甲烷菌外,其他菌的培养均用  $1.01 \times 10^5$  Pa 的  $N_2/CO_2$ (80:20)作为气相。

1.3 颗粒污泥 16S rRNA 基因文库的构建和分析

1.3.1 DNA 提取:颗粒污泥中总 DNA 的提取采用传统的酚/氯仿抽提法<sup>[5]</sup>并稍做改进,即在 DNA 提取前,将冷冻的颗粒先在室温下缓慢融化,然后用磷酸盐缓冲液(10mmol/L, pH7.2)轻轻漂洗。取 30 到 50 个直径为 0.3mm~0.5mm 的颗粒,在抽提缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 50mmol/L EDTA, 0.5mol/L NaCl)中混合均匀,再用超声波破碎(Cycle 0.5, Amplitude 90, 220V, 2A)1.5min。

1.3.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和文库构建:以提取的总 DNA 为模板,以原核生物通用引物 530F 和 1490R 为上下游引物扩增 16S rRNA 基因。530F (5'-GTGCCAGCA/GGCCGCGG-3')和 1490R (5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3')分别靶向大肠杆菌(*Escherichia coli*) 16S rDNA 的 514~529 位和 1491~1509 位核苷酸<sup>[5]</sup>。PCR 热循环条件为:95℃ 5min;94℃ 1min,50℃ 1min,72℃ 1.5min,30 个循环,72℃10min。PCR 扩增用平行的 6 管反应体系(每管 25μL),用 1%(w/v)的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,用 EB 染色后在紫外光下观察扩出的条带。将 1.0 kb 的条带用 PCR 产物纯化试剂盒回收和纯化。用 T4 DNA 连接酶将纯化的片段与 pUCm-T 载体连接,然后热激转化 *E. coli* DH 5α 感受态细胞。以氨苄青霉素(100μg/mL)抗性和蓝白斑筛选选择阳性转化子<sup>[6]</sup>,并用碱裂解法提取质粒,通过电泳进一步验证 16S rDNA 的插入片段。

1.3.3 序列分析:将插入 16S rRNA 基因片段的阳性质粒转化子送样测序,测序在上海博亚生物技术有限公司完成。用 CHECK\_CHEMERA 程序检测人工嵌合序列并剔除。将序列相同的 16S rDNA 克隆子定义为同一个操作分类单位(Operational taxonomic units, OTU)。不同的 OTU 序列用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索相似序列<sup>[7]</sup>。将相关序列用 DNA-MAN(version 4.0)进行比对,并构建系统发育树,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

1.4 微生物计数

颗粒污泥中不同营养群的微生物通过三管法进行 MPN 测定<sup>[8]</sup>。接种前,先在  $N_2$  保护下用注射器将颗粒污泥反复吹吸以获得均匀的混悬液,将混悬液用预还原基础培养基进行 10 倍系列稀释,然后每

个稀释度接种三管含相应底物的培养基。于 37℃ 培养至 3 个月。有机酸互养降解菌的阳性管以同时降解有机酸和产甲烷为标准;甲烷菌则以产生甲烷为标准。MPN 的测定结果用计算机程序来计算<sup>[9]</sup>。

1.5 分析方法

甲烷和挥发性脂肪酸用 GC 检测<sup>[10]</sup>,载气  $N_2$  的流量为 30cm<sup>3</sup>/min。测定甲烷和挥发酸的柱温分别为 50℃ 和 220℃。苯甲酸用 HPLC 进行检测<sup>[11]</sup>,60% 乙腈和 40% 超纯水作为流动相,流速为 0.5mL/min。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因文库的构建和基于序列相似性的系统发育学分析

从颗粒污泥中扩增出长约 1.0kb 的 16S rRNA 基因部分片段并进行了克隆和测序。本研究共获得代表 25 个 OTUs 的 58 个克隆子(表 1)。我们对这些 OTUs 和迄今已描述的原核生物在 16S rRNA 序列相似性基础上进行了系统发育学分析(图 1~图 4),结果显示这 58 个克隆子中的 19 个(33%)属于古菌域,并且都与广古菌中的产甲烷菌关系密切。其他的 39 个克隆子(67%)属于细菌域,其中大部分属于低 GC 革兰氏阳性细菌(22%的克隆子),δ-变形菌(9%的克隆子)和绿色非硫细菌(12%的克隆子),各类群的详细描述如下。

表 1 颗粒污泥中 16S rRNA 基因克隆子的分布情况  
Table 1 Distribution of 16S rRNA gene clones obtained in the granular sludge

Group	No. of OTUs	No. of clones	Percentage of total clones
Archaea			
Euryarchaeota	5	19	33
Bacteria			
Gram-positive bacteria			
High G + C subdivision	1	1	2
Low G + C subdivision	6	13	22
Bacteroides/ Cytophaga	2	3	5
Spirochaetales	2	3	5
Proteobacteria			
Delta subdivision	4	5	9
Green non-sulfur bacteria	3	7	12
Candidate division OP8	1	5	9
Candidate division OP11	1	2	3

2.1.1 古菌域(Archaea):从颗粒污泥中克隆到了

19 个古菌的 16S rRNA 序列 ,它们代表的 5 个 OTUs 均与广古菌域( *Euryarchaeota* )中的产甲烷菌关系密切(图 1)。其中丰度最高的克隆子 G4-13( 13/58 克隆子 )代表了与布氏甲烷杆菌( *Methanobacterium bryantii* )相近的一个 OTU ,序列相似性为 95% ~ 97%。

其他 4 个 OTUs 分别与甲酸甲烷杆菌( *Methanobacterium formicicum* ) ,理事会甲烷鬃菌( *Methanosaeta concilii* ) ,梅氏甲烷八叠球菌( *Methanosarcina mazei* )和小甲烷粒菌( *Methanocorpusculum parvum* )相近 ,16S rRNA 序列相似性均大于 97%。

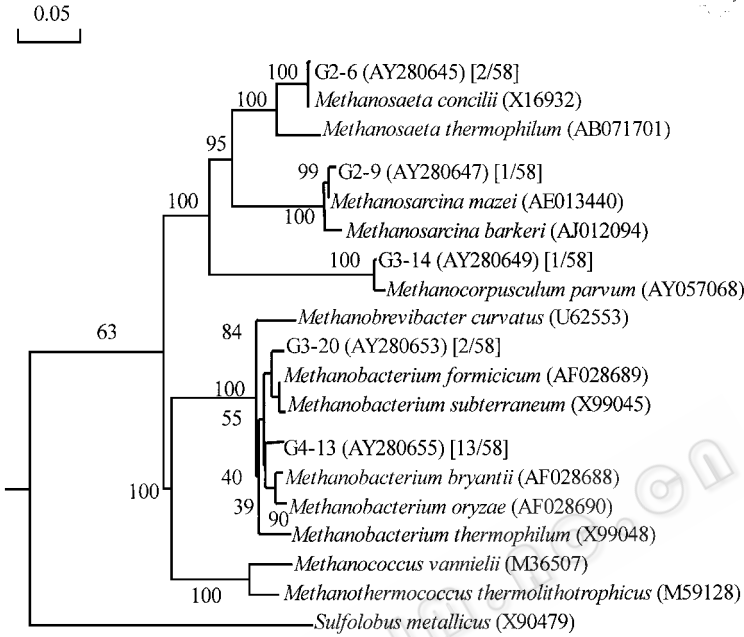


图 1 广古菌域中 OTUs 及相关菌株的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives in Euryarchaeota of the domain Archaea  
“ G ” refers to the granular clones representing different OTUs. Numbers in parentheses represent the sequences’ accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones.  
The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 5% sequence divergence.

**2.1.2 革兰氏阳性细菌( Gram-positive bacteria ):**从颗粒污泥中克隆到了 14 个 16S rRNA 序列属于革兰氏阳性细菌 ,它们代表 7 个 OTUs。除 G4-17 与高 GC 含量的白色嗜热栖油菌( *Thermoleophilum album* )和微小嗜热栖油菌( *Thermoleophilum minutum* )相对较近外 ,其他 6 个 OTUs( 13 个克隆子 )都与低 GC 含量的革兰氏阳性细菌较近。在后者中 ,一个 OTU( 克隆子 G2-14 )与一非培养的细菌相近 ,2 个 OTU( 7 个克隆子 )与脂肪酸互养降解菌聚为一群 ,其中与互养嗜热菌属( *Syntrophothermus* ) ,互养单胞菌属( *Syntrophomonas* ) ,互养生孢菌属( *Syntrophospora* )和暗生孢菌属( *Pelospora* )这几个互养产乙酸菌的 16S rRNA 序列相似性为 93% ~ 95%。其他 3 个 OTUs 与氨基酸单胞菌属( *Aminomonas* ) ,脱硫肠状菌属( *Desulfotomaculum* )和芽孢杆菌属( *Bacillus* )分别相近 ,序列相似性在 88% ~ 93% 之间(图 2)。

**2.1.3 δ-变形菌( δ-Proteobacteria ):**5 个克隆子属于 δ-变形菌 ,代表 4 个 OTUs ,均与有机酸互养降解菌

相近。其中一个 OTU( 克隆子 G4-8 )与降解丙酸的互养杆菌属( *Syntrophobacter* )的序列相似性为 96% ~ 99%。另一个 OTU 与氧化脂肪酸及芳香酸的史密斯氏菌属( *Smithella* )和互养菌属( *Syntrophus* )聚成一群 ,与丙酸氧化史密斯氏菌( *S. propionica* )最近 ,序列相似性为 99%。其余的 2 个 OTU( G3-7 和 G3-19 )与该群也相关 ,但关系不是很近(序列相似性为 88% ~ 90% ) ,相反 ,与转化四氯苯的厌氧微生物体系中的非培养细菌 SJA-162 更近些(图 3)。

**2.1.4 绿色非硫细菌( Green non-sulfur bacteria ):**与绿色非硫细菌关系较密切的有 7 个克隆子 ,代表 3 个 OTUs。其中一个 OTU 与一脱氯球菌( *Dehalococcoides* sp. FL2 )具有 90% 的序列相似性。另一个 OTU 与降解苯产甲烷混合培养物中的细菌 Eub4 比较近 ,序列相似性 95%。还有一个 OTU 与一非培养的细菌 SHA-31 具有 97% 序列相似性 ,该菌存在于 1 ,2-二氯丙醇脱氯反应器中(图 4)。

**2.1.5 其他细菌 :**有 2 个 OTUs 分别以 93% 和 95%

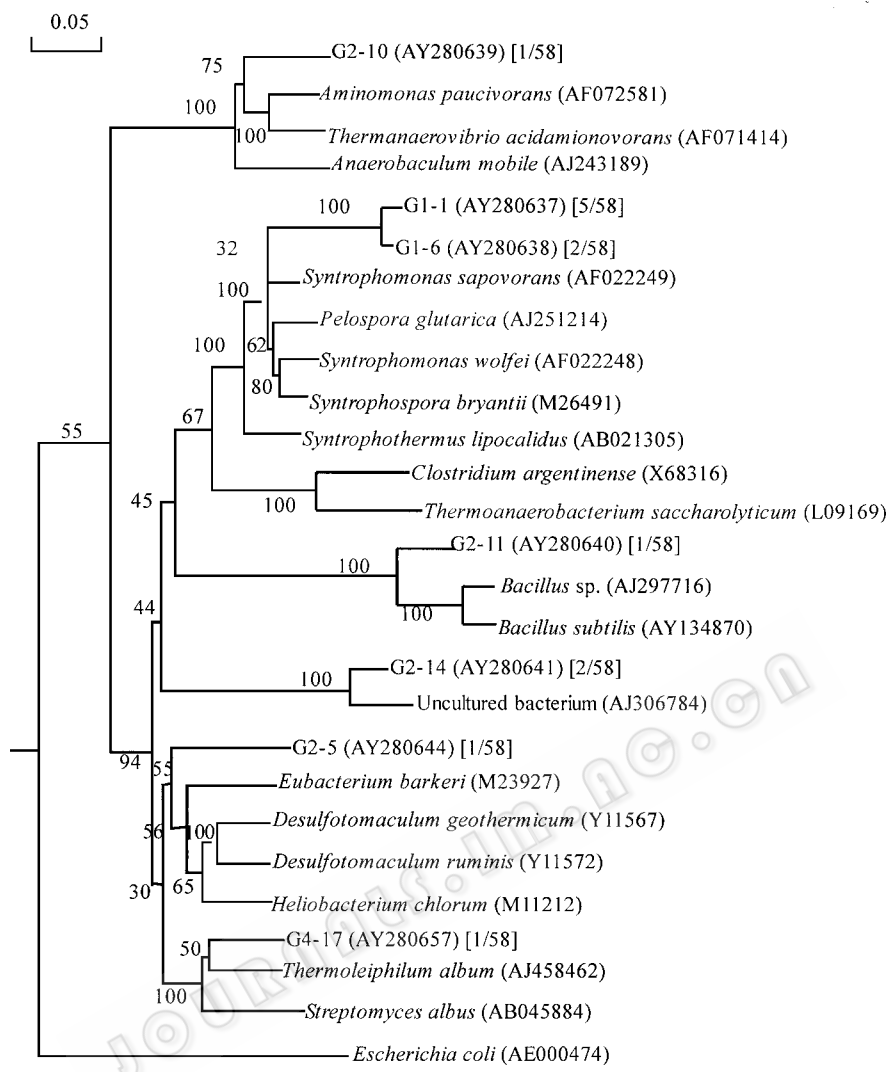


图 2 革兰氏阳性细菌门的 OTUs 及相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among Gram-positive bacteria

The annotation was the same as in Fig. 1.

的序列相似性与拟杆菌-噬纤维菌( *Bacteroides/ Cytophaga* )分支聚成一簇。2 个 OTUs 与螺旋体( *Spirochaetales* )以 88% 序列相似性松散地聚成一簇,它们与存在于污染了石油的地下水中的非培养螺旋体 KB43 关系更近些。2 个 OTUs( G2-7 和 G4-2 )分别以 90% 和 95% 的相似水平与非培养的分支 OP8 和 OP11 中的细菌相近。

2.2 颗粒污泥中不同营养菌群的数量测定

降解脂肪酸和苯甲酸的互养产乙酸细菌以及产甲烷菌的数量通过 MPN 法进行检测,结果(表 2)表明,在此 UASB 的颗粒污泥中,产甲烷菌数量最多,其中又以氢营养型产甲烷菌为多;降解有机酸的互养产乙酸细菌数量居中,其中降解丁酸的互养细菌数量较多。

表 2 颗粒污泥中不同营养群的数量测定

Table 2 Numeration of different trophic groups in the granules using MPN method		
Trophic groups		Counts( Cells/mL )
I Syntrophic acetogens degrading organic acids		
Syntrophic propionate-degrading bacteria		7.0 × 10 <sup>6</sup>
Syntrophic benzoate-degrading bacteria		9.0 × 10 <sup>6</sup>
Syntrophic butyrate-degrading bacteria		4.5 × 10 <sup>7</sup>
II Methanogens		
Acetoclastic methanogens		4.5 × 10 <sup>8</sup>
Hydrogenotrophic methanogens		1.1 × 10 <sup>9</sup>

3 讨论

本研究通过培养法对功能菌群的活菌计数和非

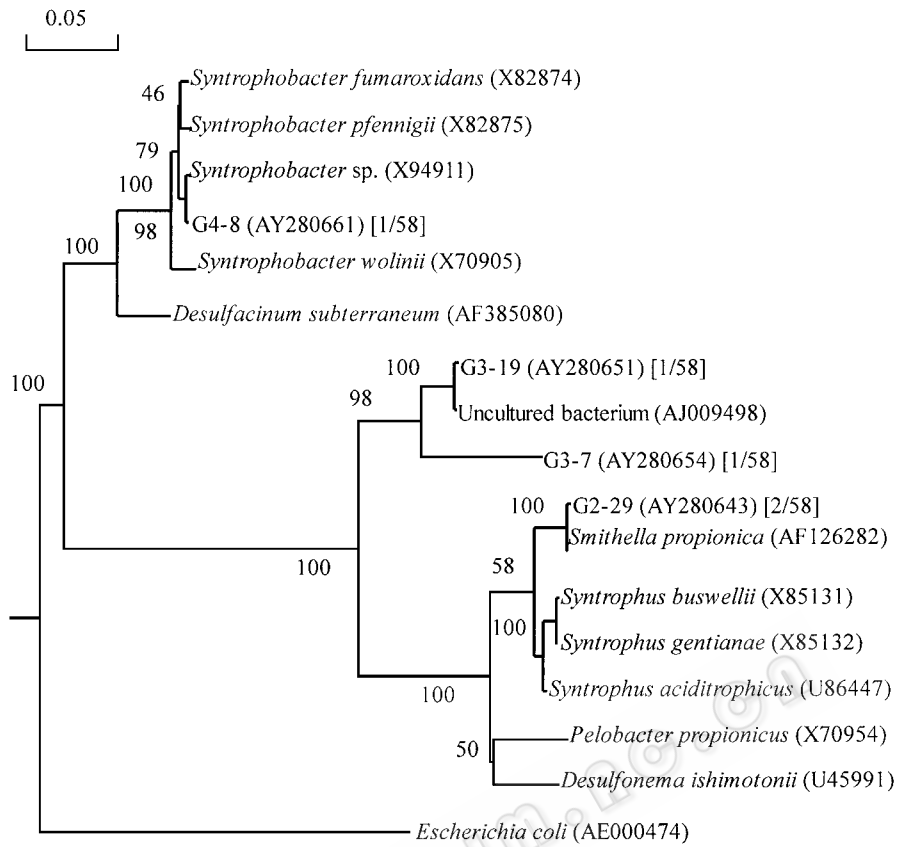


图 3 δ-变形菌纲的 OTUs 及其相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among δ-Proteobacteria  
The annotation was the same as in Fig. 1.

培养法分析 16S rRNA 基因序列同源性都表明 ,产甲烷菌( 氢营养型和乙酸盐营养型 )是豆腐废水 UASB 反应器颗粒污泥中的主要菌群 ,这与反应器高产量的甲烷相一致。分析表明 ,该反应器中的产甲烷菌比其他类型的反应器有更多的多样性。它不仅含有土豆废水反应器<sup>[12]</sup>、啤酒废水反应器<sup>[13]</sup>和降土纶反应器<sup>[14]</sup>中的甲烷鬃菌、甲烷八叠球菌和甲烷杆菌属的成员 ,还含有小甲烷粒菌。并且 ,数量最多的 16S rRNA 基因克隆子( 13/58 )可能代表了和已知产甲烷菌均不同的一个种 ,它与最近的布氏甲烷杆菌相似性也只有 95% ~ 97%。

互养产乙酸细菌是颗粒污泥中的另一重要代谢群。目前已描述的降解脂肪酸和苯甲酸的互养细菌位于系统发育学的两个分支 ,即低 GC 革兰氏阳性菌的互养单胞菌科和 δ-变形菌的互养杆菌-史密斯氏菌-互养菌群<sup>[13,15,16]</sup>。本研究获得了 2 个 OTUs( 7/58 的克隆子 )属于互养单胞菌科 ,但 16S rRNA 与已知种的相似性只有 95% ,说明可能代表了一个新的细菌。另有 4 个 OTUs 与互养杆菌-史密斯氏菌-互养菌群关系密切。分子系统发育学研究不仅揭示了

生境中的微生物组成 ,而且对分离难培养生物( 如互养产乙酸细菌和产甲烷菌 )具有指导意义。

我们从颗粒污泥中还获得了较高比例的绿色非硫细菌的 16S rRNA 序列 ,说明它们也是其中的一个优势菌群。据报道该群菌也普遍存在于其他反应器的颗粒污泥中<sup>[14,17]</sup> ,推测这群丝状的细菌在颗粒污泥中可能对形成和维系微生物聚集体的结构起作用 ,当然它们也具有降解大分子有机物的能力<sup>[18]</sup>。

另外还发现一些 16S rRNA 序列与拟杆菌-噬纤维菌-螺旋体分支相关 ,推测这些细菌可能水解发酵大分子有机物。而与未培养分支 OP8 及 OP11 相关的序列则无法推测其生理功能 ,因为这些序列与已描述的细菌的序列相似性都在 95% 以下。

值得提醒的是 ,采用构建基因文库的方法对一个环境中的微生物群体进行调查时应考虑如下因素造成的结果偏差 :不同微生物的细胞壁结构差异引起的 DNA 获得的不均一性 ;编码 16S rRNA 的操纵子拷贝数的差异及不同 DNA 和 PCR 引物亲和力不同所引起的扩增产物浓度的差异等<sup>[19,20]</sup>。因此对生境中微生物的组成和丰度的测定应结合基因文库构

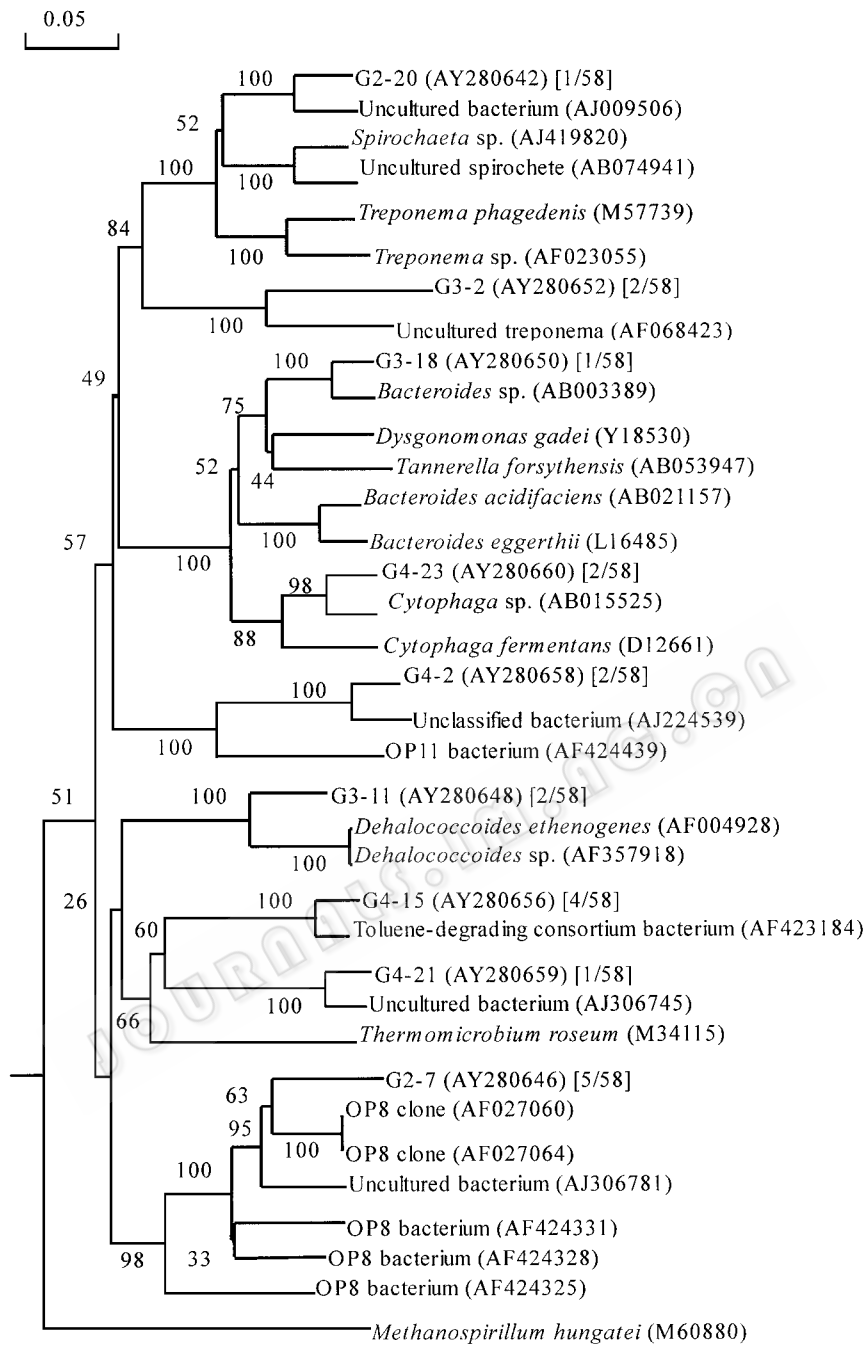


图 4 其他分支的 OTUs 及相关菌株的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among other bacteria branches  
The annotation was the same as in Fig. 1.

建和探针原位杂交等多种方法。本研究中,我们采用超声处理结合化学方法进行细胞壁裂解,并用多管反应体系进行 PCR 等措施来减少偏差。同时活菌计数实验所测得的一些功能菌群的数量与 16S rRNA 序列分析所揭示的结果基本一致。

参 考 文 献

[ 1 ] Thiele J H , Zeikus J G. Interactions between hydrogen-and formate-

producing bacteria and methanogens during anaerobic digestion. In : Erickson L E , et al , ed. Handbook on Anaerobic Fermentations. New York : Marcel Dekker , 1988 , 537 – 595.

[ 2 ] Hulshoff P L W , Zeeuw W J , Velzeboer C T M , et al . Granulation in UASB reactor. Water Sci Technol , 1983 , 15 : 291 – 304.

[ 3 ] Liu S , Hu J , Gu X. Anaerobic sludge granulation in a UASB reactor treating protein-containing wastewater. Water Treatment , 1992 , 7 : 297 – 306.

[ 4 ] Zehnder A J B , Wuhmann K. Physiology of a Methanobacterium strain A7. Arch Microbiol . 1977 . 111 : 199 – 205  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [ 5 ] Weisburg W G , Barns S M , Pelletier D A , *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* , 1991 , **173** : 697 – 703.
- [ 6 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* , 2<sup>nd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , 1.85 – 1.86.
- [ 7 ] Altschul S F , Gish W , Miller W , *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* , 1990 , **215** : 403 – 410.
- [ 8 ] Wu W , Jain M K , de Macario E C , *et al.* Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1992 , **38** : 282 – 290.
- [ 9 ] Hurley M A , Roscoe M E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J Appl Bacteriol* , 1983 , **55** : 159 – 164.
- [ 10 ] Touzel J P , Albagnac G. Isolation and partial characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol Lett* , 1983 , **16** : 241 – 245.
- [ 11 ] Jackson B E , Bhupathiraju V K , Tanner R S , *et al.* *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov. , a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch Microbiol* , 1999 , **171** : 107 – 114.
- [ 12 ] Visser F A , van Lier J B , Macario A J L , *et al.* Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. *Appl Environ Microbiol* , 1991 , **57** : 1728 – 1734.
- [ 13 ] Liu W T , Chan O C , Fang H H. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Res* , 2002 , **36** : 1767 – 1775.
- [ 14 ] Wu J H , Liu W T , Tseng I C , *et al.* Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* , 2001 , **147** : 373 – 382.
- [ 15 ] Schink B. Syntrophism among prokaryotes. In : Balows A , Trüper H G , Dworkin M , *et al.* eds. *The Prokaryotes*. New York : Springer Verlag , 1992 , 276 – 299.
- [ 16 ] Zhao H , Yang D , Woese C R , *et al.* Assignment of fatty acid- $\beta$ -oxidizing syntrophic bacteria to *Syntrophomonadaceae* fam. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* , 1993 , **43** : 278 – 286.
- [ 17 ] Björnsson L , Hugenholtz P , Tyson G W , *et al.* Filamentous *Chloroflexi* ( green non-sulfur bacteria ) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* , 2002 , **148** : 2309 – 2318.
- [ 18 ] Reichenbach H. The genus *Herpetosiphon*. In : Balows A , Trüper H G , Dworkin M , *et al.* ( eds ). *The Prokaryotes , A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology , isolation , identification , applications*. New York : Springer Press , 1992 , 3785 – 3850.
- [ 19 ] Martin-Laurent F , Philippot L , Hallet S , *et al.* DNA extraction from soils : old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** : 2354 – 2359.
- [ 20 ] Young M , Cole S T. *Clostridium*. In : Sonenshein A L , Hoch J A , Losick R ( eds ). *Bacillus subtilis* and other gram-positive organisms. Washington D.C. : American Society for Microbiology , 1993 , 35 – 52.

## Phylogenetic Diversity of Prokaryotes and The Main Functional Groups in A UASB Reactor Treating Bean Curd-farm Wastewater

ZHANG Chun-Yang LIU Xiao-Li DONG Xiu-Zhu\*

( Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** : Phylogenetic diversity of microorganisms in the UASB granular sludge treating bean curd-farm wastewater was surveyed based on the homology analysis of 16S rRNA sequences obtained from the granules. Quantification of syntrophic acetogenic bacteria and methanogens for degradation of fatty acid in the granules was determined with MPN method. The results indicated that methanogens both of  $H_2$ -and acetate-trophors were the most abundant metabolic groups in the granules. 33% of 16S rRNA sequences retrieved from the granules were affiliated to methanogens , and  $1.1 \times 10^9$  cells/mL and  $4.5 \times 10^8$  cells/mL were counted for  $H_2$ -and acetate-trophic methanogens , respectively. Low GC Gram-positive bacteria and Delta-*proteobacteria* , the two phylogenetic phyla to which syntrophic acetogenic bacteria were affiliated , could also be predominant in the granules , and their 16S rRNA sequences accounted for 22% and 9% respectively , at the same time , their count was determined as high as  $4.5 \times 10^7$  cells/mL. Green non-sulfur bacteria were another group existing abundantly , 12% of 16S rRNA sequences of them were obtained. Hence phylogentic analysis of an ecosystem could provide a preview for the organism composition before attempting to purify some cultures.

**Key words** : UASB granules , Phylogenetic diversity , Syntrophic acetogens , Methanogens

Foundation item : National Outstanding Youth Fund ( 30025001 ) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2001AA227131 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62558320 ; E-mail : dongxz@sun.im.ac.cn

Received date : 06-17-2003

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>