

## 以分子生物技術分析不同產業廢水之缺氧—好氧程序系統 中氮氧化微生物分佈

葉詩薇，成功大學環境工程研究所碩士班研究生

邵勇先，成功大學環境工程研究所博士班研究生

吳哲宏，成功大學環境工程研究所副教授

計畫編號：108-2221-E-006 -160 -MY3

### 一、 前言

由於國內水體受氮氮污染嚴重與對環境永續要求日漸提升，環保署近年來加嚴法規，對工業、農業、民生用水等各產業部門分別增訂放流水氮氮與總氮管制標準，使綠色生物除氮技術受到極大重視。氮氧化反應是生物除氮程序不可或缺的一環，乃由特殊的氮氧化微生物(AOM)，包括氮氧化細菌(AOB)與氮氧化古菌(AOA)在有氧條件下氧化氮氮產生亞硝酸氮。最近發現的完全氮氧化(Comammox)菌同時擁有氮氮氧化至硝酸氮全套的基因，亦普遍存在環境中，對於氮氧化反應的貢獻不可小覷(Daims et al. 2015; VanKessel et al. 2015)。這三類 AOM 的生長與氮氧化動力學特性不同，對於環境條件，例如 pH、溫度、溶氧、氮濃度等的適應範圍差異亦大。但三種 AOM 都是固定二氧化碳生長的自營菌，由於生長緩慢，需要較長細胞停留時間或固定生物膜才能累積較高菌群密度，使反應槽發揮穩定的氮氧化效率。

國內常採用缺氧(Anoxic)—好氧(Oxic)(簡稱 AO)程序處理氮氮廢水，缺氧槽負責脫氮，利用廢水的 COD 提供脫硝所需電子還原硝酸氮成氮氣；好氧槽負責氧化氮氮成硝酸氮，並迴流至缺氧槽。在溶氧變動下，穩定的氮氧化是 AO 系統除氮效率的關鍵，當 AO 系統啟動或當機，植種高濃度硝化菌汙泥可快速(恢復)發揮 AO 系統效能。由於 AOM 種類與數量可能隨廢水水質、系統操作參數與環境條件而不同，尤其 Comammox 菌因發現時間短、多樣性高，相關報導仍不多(Beach and Noguera 2019; Roots et al. 2019)，而且 Comammox 菌在台灣廢水處理廠分布情形尚無研究報導。因應 AO 系統氮氧化效率經常不穩定以及啟動新廢水廠，需要系統性掌握汙泥中 AOM 種類與數量以及操作/環境條件之關聯性，了解這些資訊將有助於發展精準生物除氮技術。基於 AO 系統於生物脫氮程序上的廣泛應用與其特殊的溶氧變化，本研究蒐集不同廢水來源的 AO 槽活性汙泥進行氮氧化微生物的分析，探討廢水形式、操作條件、水質參數對於 AOM 菌群分佈之關聯。

### 二、 材料與方法

本研究採集處理農業養殖廢水(Agriculture)(2 廠 4 樣本)、工業廢水(Industry)(3 廠 7 樣本)、垃圾滲出水(Landfill)(2 廠 4 個樣本)及生活汙水廠(Sewage)(3 廠 15 樣本)的 AO 系統中缺氧與好氧槽內混合汙泥，於 24 小時內低溫運送回實驗室進行水質與菌相檢測，並收集現廠操作參數與功能表現數據(表

1)。以 Dneasy PowerSoil kit (Qiagen)回收汙泥 DNA，然後以 Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system 進行定量 PCR，以引子對 arch-amoA F/R 偵測 AOA、amoA 1F/2R 偵測 AOB、comamoAF\_mod/AR\_mod 與 comomoAF/AR 偵測 Comammox *Nitrospira*。本研究收集的數據在 R V4.1.1 版本下以 Vegan 包 V2.3-5 將數據依布雷-柯蒂斯(Bray-Curtis)相異度轉換後進行主座標分析。為探討變數間之關聯性，將數據標準化後(檢查決策曲線分析法<3，使變異數膨脹係數<10、模型  $p < 0.05$ )進行冗餘分析。

表 1 各類別廢水之操作參數與水質指標

廢水樣本	操作參數 (平均±標準差)						水質指標 (平均±標準差)						
	SRT (day)	HRT (hr)	回流比	DO (mg/L)	pH	MLSS (mg/L)	IC (mg/L)	TOC (mg/L)	TN (mgN/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	
農業	4	N.A.	84.4 ±61.4	N.A.	N.A.	7.7 ±0.2	30,919 ±25,391	24.3 ±4.2	61.2 ±15.6	665 ±356.1	325.3 ±396.7	104.4 ±199.4	26.6 ±33.5
工業	7	30.3 ±13.5	10.1 ±10.4	1.8 ±0.6	2.3 ±2.2	7.1 ±0.6	8,626 ±1,193	5.3 ±5.1	9.2 ±6.9	37.7 ±54.3	31.6 ±50.6	1.1 ±3	2.4 ±2.1
垃圾滲出	8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	6.8 ±1.1	9,682 ±8,940	10.7 ±8.5	59.3 ±44.2	135.4 ±44.9	49.9 ±22.8	0.1 ±0.1	60.9 ±54.6
都市	15	16.2 ±1.6	11.8 ±13.6	1.8 ±1	0.9 ±0.8	6.9 ±0.2	3,164 ±2,219	11.2 ±8.1	18.7 ±17.3	30.7 ±10.5	15.8 ±12.7	0.1 ±0.1	6.5 ±5.6

SRT, 汙泥停留時間、HRT, 水力停留時間、DO, 溶氧、MLSS, 混和懸浮固體物

工業廢水：科學園區、鋼鐵業、光電業；農業廢水：畜牧業；垃圾滲出水：垃圾滲出水、洗垃圾車水與化肥。

### 三、 結果與討論

如表 1 所示，工業廢水 AO 系統有較長的 SRT、較高的 DO 與較低的 TC、TN、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，農業廢水廠有較高的 HRT、MLSS、TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>與 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>；垃圾滲出水廠有硝酸累積；都市汙水廠濃度大多較低。圖 1 呈現水質參數(a)與操作數據(b)主座標分析結果。圖 1(a)表示依廢水類別分群，廠內樣本差異小，缺氧槽與好氧槽幾無區別，廢水性質與相對應操作間的差異大，僅個別廠(SW, IZ)混入其他類別中。如圖 1(b)顯示同一處理廠群聚在一起，其中前兩維座標解釋高達 97% 的變異。

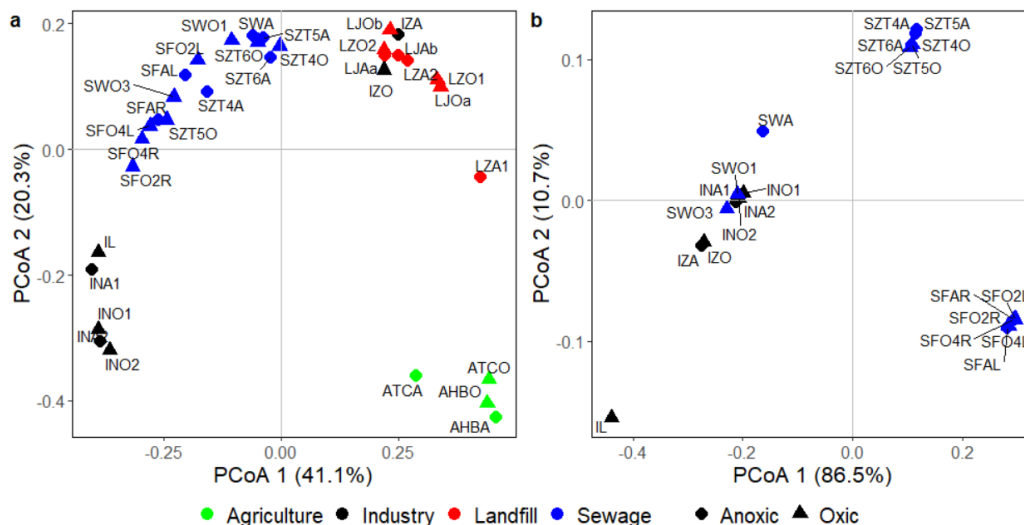


圖 1 (a)水質參數主座標分析；(b)操作參數主座標分析(A, 缺氧槽；O, 好氧槽)(農業:ATC,AHB；工業:IN, IZ, IL；垃圾滲出水：LJ, LZ；生活污水：SF, SZ, SW)

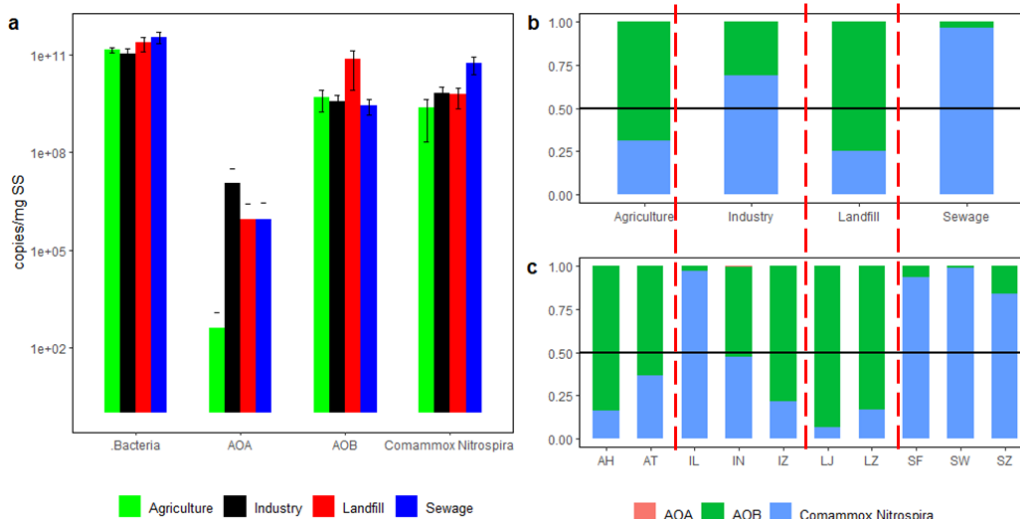


圖 2 各廢水處理廠中氮氧化微生物數量與佔比。a 不同廢水中氮氧化微生物的數量；b 各廢水中氮氧化微生物的平均比例；c 各廠中氮氧化微生物的比例。

圖 2(a)顯示無論是哪種廢水廠 AOA 比 AOB 或 Comammox 菌都低於 3 個數量級以上。研究指出 AOA 主要活躍在低氮濃度或是極端環境(低 pH、抗生素及毒性物質等(Kayee *et al.*, 2011)，與本研究的廢水廠環境大相逕庭，因此數量極低。有趣的是在不同廢水類別，AOA 在相對毒性較高的工業廢水廠反而較多，值得未來深入探討。在 AO 系統，AOB 及 Comammox 菌才是主要氮氧化微生物，其中 AOB 在垃圾滲出水與農業廢水處理廠較多豐富；Comammox 菌則在都市污水廠中有主導優勢(圖 2(b))。單從不同類別菌群分布來看(圖 2(b))，農業畜牧廢水與垃圾滲出水是以 AOB 為主，而生活污水則是以 Comammox 菌為主，工業廢水處理廠有不同的 AOB 與 Comammox 菌分佈，細看圖 3(c)發現工業污水中光電廢水(IL)的 Comammox 菌豐富度高達 97%，從而拉高工業廢水的 Comammox 菌比例，且不同於其他三種產業部門相似的佔比，工業廢水部門的 Comammox 菌群比例從 22%到 97%都有，代表處理工業廢水氮氮的 AOM 受廢水特性影響相當大。

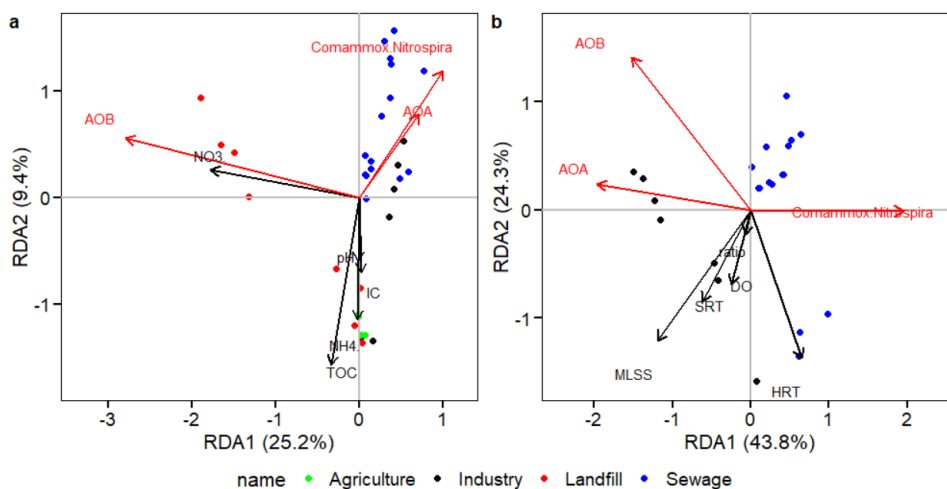


圖 3 三種 AOM 濃度(qPCR 結果)與(a)水質參數冗餘分析；(b)操作參數冗餘分析。圓圈:樣本；黑色箭頭:水質/操作參數；紅色箭頭:AOM 濃度

接下來，以冗餘分析探討 AOM 分佈與操作參數或水質濃度間的關係，如圖 3(a)所示，其結果與表 1 及圖 1(a)所展示的趨勢相似。本研究的樣本可分為三群，一群主要由滲出水廠樣本組成，有高硝酸氮累積並與 AOB 濃度呈正相關；一群由複雜樣本組成(垃圾滲出水(+化肥樣本)、農業樣本與鋼鐵、光電業樣本)，這些樣本都具高 TOC 與氨氮特性；一群是有低氨氮與 TOC 屬性，主要由生活污水廠樣本與科學園區樣本群聚。冗餘分析結果顯示 AOA 與 Comammox 菌與 TOC 及氨氮呈負相關，符合過去研究指出兩者有較高的對氨親和力，在低氨氮濃度下具競爭力。其中 IC、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、pH 彼此高度相關，可能因為 AOM 會使用無機碳，並在氨氧化成硝酸的過程中釋放 H<sup>+</sup>消耗鹼度。圖 3(b)是 AOM 分佈與操作條件之冗餘分析結果，結果顯示工業部門各廠的 AOM 分佈差異很大，工業廢水(科學園區)樣本中與高 AOB 與 AOA 濃度有正相關。生活污水廠都與 Comammox 菌群濃度有正相關，但有一廠(3 個樣本)操作在高 HRT(38 小時)與其他廠樣本分開。其中 Comammox 菌濃度分佈與 DO 與 SRT 呈現負相關；AOB 與 AOA 和 HRT 呈強烈負相關，因此在短 HRT 時呈現較高關聯性。

#### 四、 結論

本研究分析不同廢水廠 AO 系統中 Comammox 菌群、AOB 以及 AOA 濃度，並展現三群 AOM 豐富度差異與分佈特性，結果顯示同一廢水處理廠之缺氧槽與好氧槽中 AOM 種類與數量並無明顯的差異，但不同廢水水質與操作條件明顯影響氨氧化菌群分布，其中 Comammox 菌群普遍分布在 10 個廢水處理廠，尤其主導生活污水廠中氨氧化反應；AOB 則在農業、部分工業與垃圾滲出水廠中為主要氨氧化菌；AOA 在各廢水廠中濃度都很低，貢獻微薄。本研究建立 AO 系統中 AOM 組成、操作參數、廢水水質之關聯性，並強調 Comammox 菌群在 AO 系統的重要性，此新發現有助於改善廢水廠操作管理策略，以提升硝化功能之穩定性。

#### 五、 文獻回顧

1. Daims, H. *et al.* (2015) 'Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria', *Nature*, 528(7583), pp. 504–509.
2. VanKessel, M. A. H. J. *et al.* (2015) 'Complete nitrification by a single microorganism', *Nature*, 528(7583), pp. 555–559.
3. Roots, P. *et al.* (2019) 'Comammox *Nitrospira* are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor', *Water research*, 157, pp. 396–405.
4. Beach, N. K. and Noguera, D. R. (2019) 'Design and Assessment of Species-Level qPCR Primers Targeting Comammox', *Frontiers in Microbiology*, p. 36.
5. Kayee, P. *et al.* (2011) 'RETRACTED ARTICLE: Archaeal amoA Genes Outnumber Bacterial amoA Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Bangkok', *Microbial Ecology*, 62(4), pp. 776–788.