

氮氮廢水處理技術開發

厭氧氨氧化微生物分子鑑定與資料庫建立

邱聖壹¹、張婷婷²、張冠甫¹、彭淑惠²、張盛欽²、游舒媛³

¹ 工業技術研究院 材化所 研究員

² 工業技術研究院 材化所 副研究員

³ 工業技術研究院 材化所 助理研究員

摘要

在一般傳統生物除氮方法主以硝化脫硝方式進行，然近年來發現一較新穎的氮氮處理技術為厭氧氨氧化（Anaerobic Ammonia Oxidation, Anammox）程序，此反應可將氨氮及亞硝酸氮直接反應生成氮氣，此操作程序具有不需額外添加碳源與相對少量曝氣、污泥產量低等諸多優點。許多文獻指出，厭氧氨氧化族群能於無氧環境中將氨氮與亞硝酸鹽直接反應生成氮氣，不需硝化菌群與脫硝菌群的參與，具有維持氮循環平衡的重要功能，且亦是厭氧氨氧化反應之系統中主要優勢族群。為了能更明確地了解系統中負責進行厭氧氨氧化反應的菌群結構，除藉由水質分析來判斷這些菌群在系統中對除氮上貢獻的多寡，本研究也根據寡核酸探針資料庫中針對厭氧氨氧化菌群的專一性探針(PLA46及Amx368與hzsA functional gene marker)，改良設計成聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)引子組來進行PCR分析各處理系統污泥之厭氧氨氧化菌族群結構組成，以更明確瞭解各系統中所包含的Anammox菌屬種類與其他微生物族群間相互消長關係對於除氮效能之影響。並利用PCR、hzsA functional gene marker、Real-Time PCR、DGGE、FISH與TEM影像分析等相關技術建立厭氧氨氧化微生物分子生物鑑定技術與資料庫分析。於本次試驗中同時利用初始植種並未存在厭氧氨氧化菌之污泥，經由馴養後於操作後期，發現系統中厭氧氨氧化菌的數量提升為80%左右，此時氨氮、亞硝酸鹽與總氮的去除率高達90%以上，推測厭氧氨氧化微生物Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*與Candidatus *Brocadia anammoxidans*，可有效將水中氨氮與亞硝酸氮完全去除，使整體總氮去除率維持在90%以上。

關鍵詞：厭氧氨氧化菌、厭氧氨氧化、生物脫氮、菌

實驗結果與討論

本實驗利用植種顆粒污泥與系統操作後期馴養完成的厭氧氨氧化汙泥進行分子生物分析鑑定，污泥外觀有明顯變化，污泥顆粒經馴養後變為紅色(如圖1所示)，與植種污泥顏色差異極大，藉由分子生物技術分析污泥菌群組成，建立相關資料庫與技術鑑定。

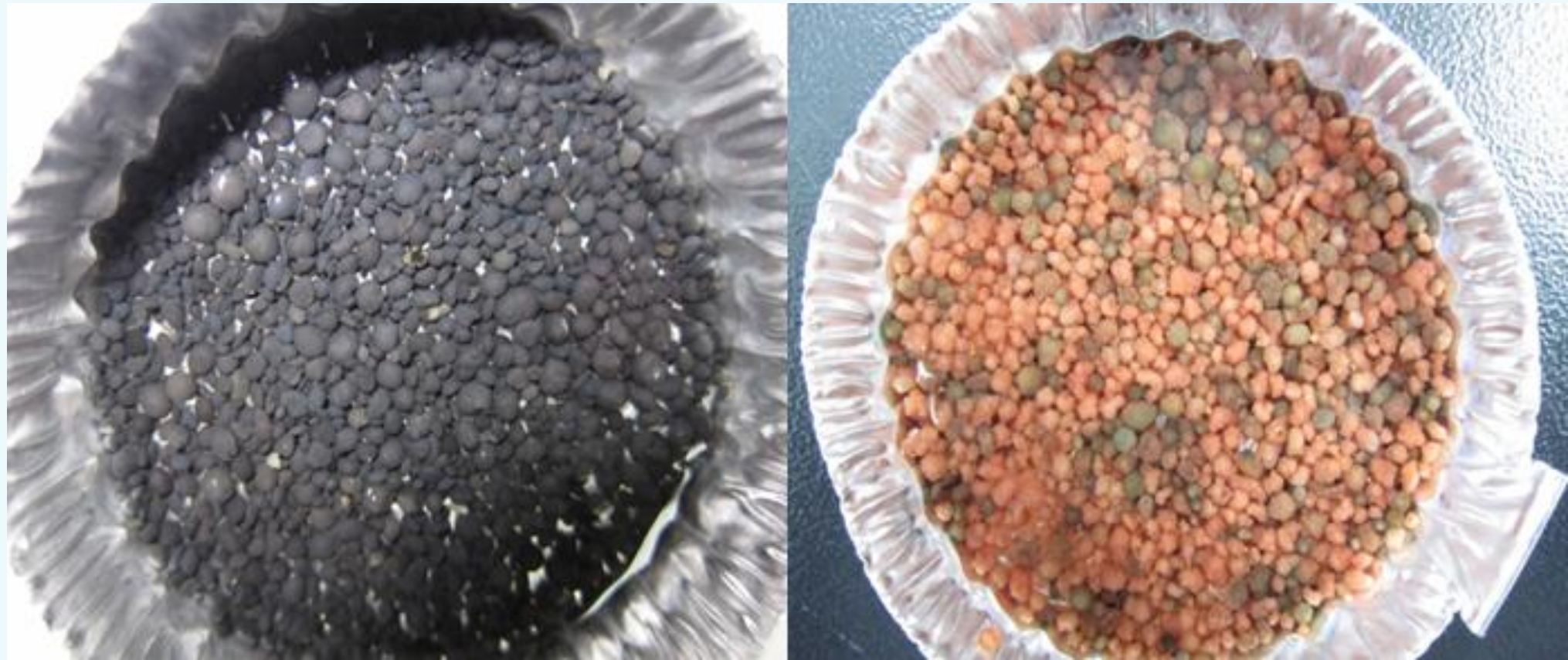


圖1 污泥外觀變化圖 左圖:初始污泥；右圖:操作後期

首先，將採集到的污泥進行前處理後，萃取樣本中菌群的DNA，藉由厭氧氨氧化專一性引子對分析微生物的組成與變化。由厭氧氨氧化專一性引子對(pla46-Amx368)分析的PCR結果得知，原始污泥中並無存在厭氧氨氧化微生物，或是極少量的厭氧氨氧化菌(低於偵測極限)，而經過最佳的操作條件馴養後，方可使厭氧氨氧化菌成為系統中的主要優勢菌種。同時，亦使用厭氧氨氧化功能性基因引子對(hzsA 526f - hzsA1857R)進行PCR分析，結果與專一性引子對(pla46-Amx368)相同，經馴養過後的厭氧氨氧化菌可大量表現Hydrazine hydrolase(hzsA)。

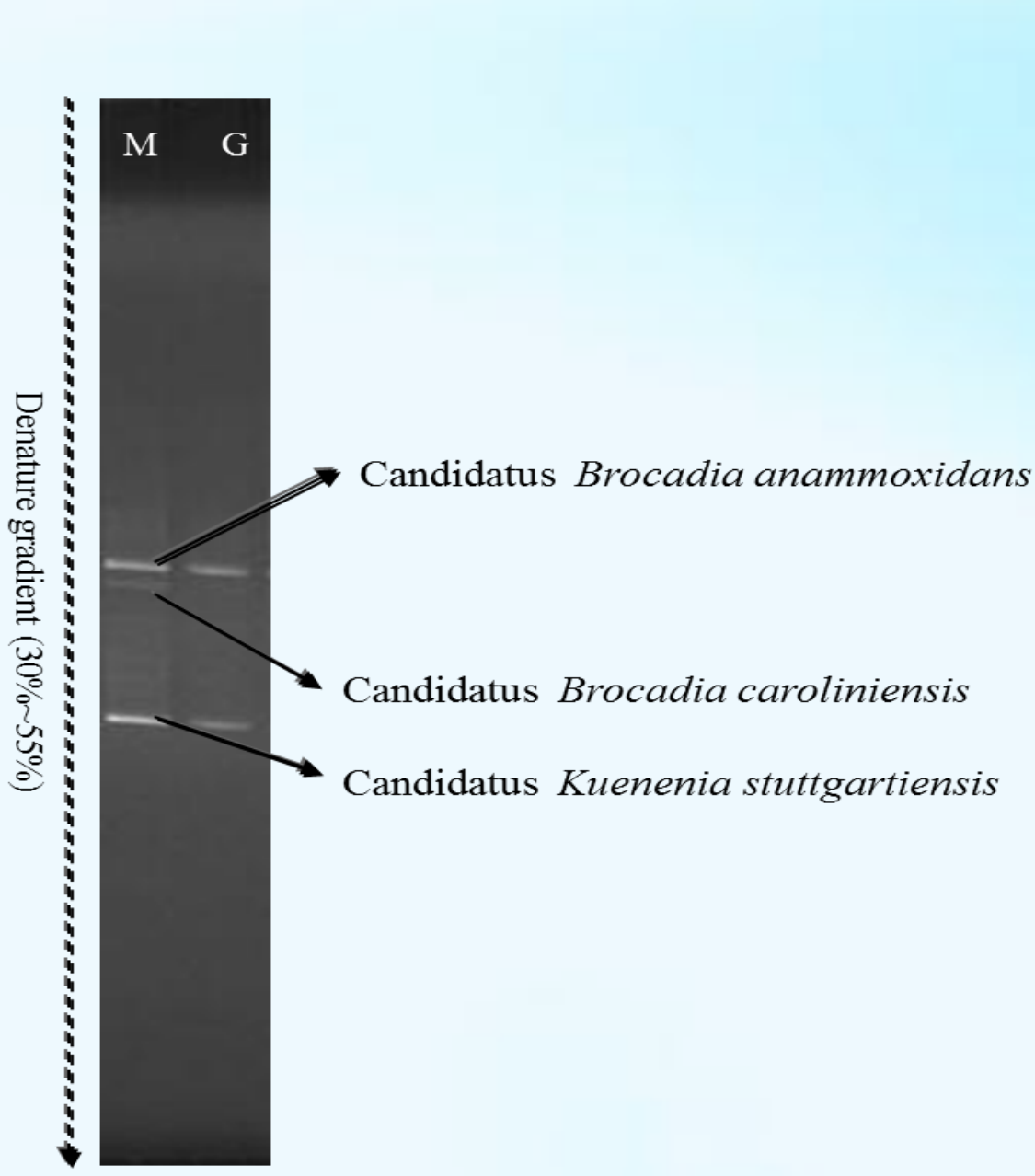


圖2厭氧氨氧化菌群分析之DGGE圖
註：M：Marker；G：馴養後厭氧氨氧化污泥

由針對厭氧氨氧化菌群之DGGE分析結果得知(圖2)，顆粒污泥馴化後存在厭氧氨氧化菌Candidatus *Brocadia anammoxidans*與Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*。過去有學者針對Candidatus *Brocadia anammoxidans*與Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*進行探討，Egli等學者指出Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*在pH=8且溫度為37℃之下，其最高活性為25 nmol N₂/mg protein · min，且也指出Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*對磷酸及亞硝酸鹽的容忍度較Candidatus *Brocadia anammoxidans*高(分別為13 mM與7mM)。

結論

本研究針對厭氧氨氧化族群進行微生物分子鑑定技術與資料庫分析之建立，包含PCR、functional gene marker、Real-Time PCR、DGGE、FISH與TEM影像分析等相關技術。此分析平台的建立將有助於未來水質分析中對於判斷菌群於系統中對於除氮的貢獻多寡將成為其佐證且較準確之依據。並針對其各處理系統污泥之厭氧氨氧化菌族群結構組成，以更明確瞭解各系統中所包含的Anammox菌屬種類與其他微生物族群間相互消長關係對於除氮效能之影響。

此外，本實驗同時利用厭氧氨氧化菌功能性基因(HzsA1597f and HzsA1857r)結合Real-Time PCR分析馴化後的厭氧氨氧化微生物數量，由標準曲線得知系統中厭氧氨氧化菌的數量高達 1.74×10^9 cells/mL，可作為後續資料庫建構使用。

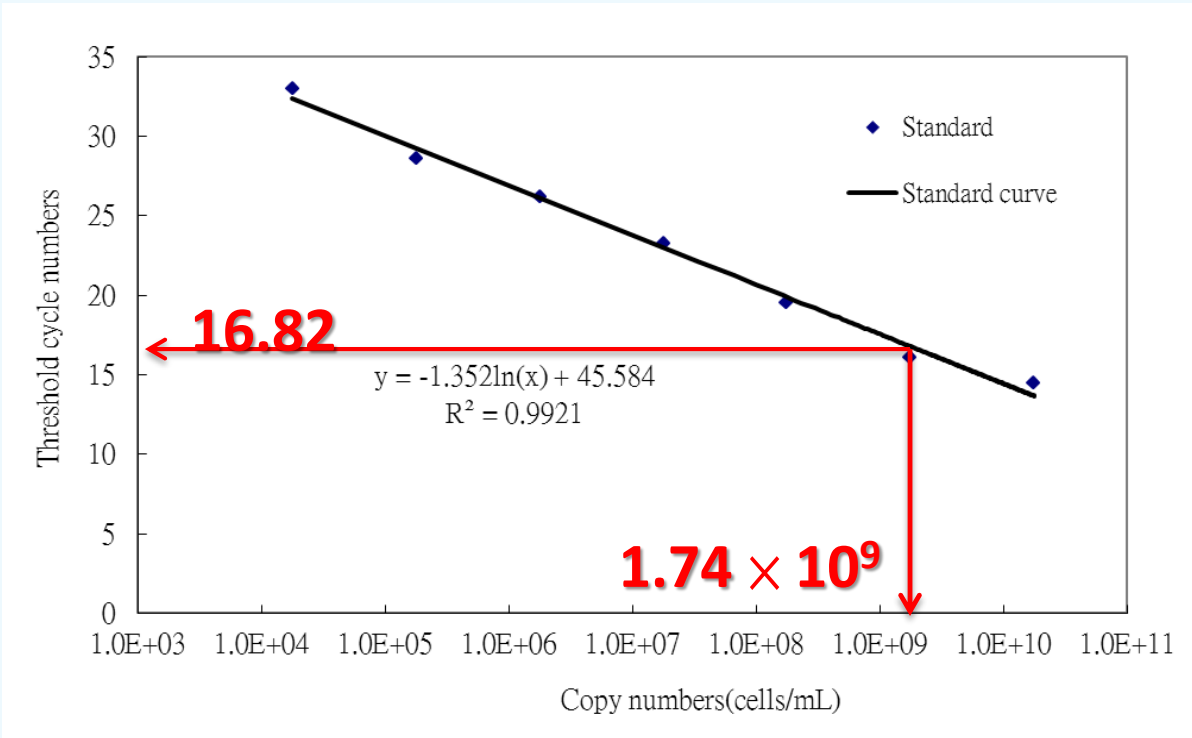


圖3 Real-Time PCR標準曲線

為了更深入的了解厭氧氨氧化菌群數量的變化，本研究利用螢光原位雜合技術(FISH)進行分析，如圖4所示。初始植種污泥並未存在厭氧氨氧化菌，經由馴養後，於操作後期，發現系統中厭氧氨氧化菌的數量提升為80%左右，此時氨氮、亞硝酸鹽與總氮的去除率高達90%以上，推測厭氧氨氧化微生物Candidatus *K. stuttgartiensis*與Candidatus *B. anammoxidans*，可有效將水中氨氮與亞硝酸氮完全去除，使整體總氮去除率維持在90%以上。



圖4厭氧氨氧化菌FISH分析結果
註：(A)植種污泥：左圖藍色區域為DAPI表示圖、紅色區域為Amx368探針(針對Anammox bacteria)
(B)操作後期：右圖藍色區域為DAPI表示圖、紅色區域為Amx368探針(針對Anammox bacteria)

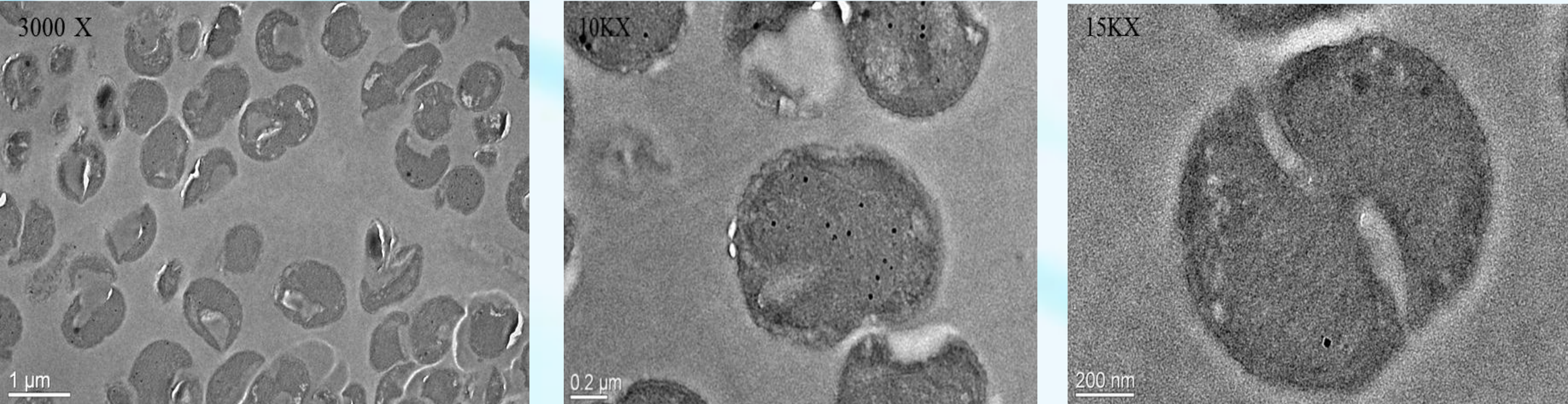


圖5 穿透式電子顯微鏡影像分析

本實驗將馴養後的厭氧氨氧化污泥，利用穿透式電子顯微鏡(TEM)進行分析，由TEM結果發現(如圖5所示)，本實驗所使用的厭氧氨氧化菌存在有雙層膜anammoxosome，過去文獻指出，厭氧氨氧化菌能在細胞中直接進行厭氧氨氧化作用，在細胞質間有一特殊雙層膜構成之隔間構造稱為anammoxosome，因其中含有ladderane 脂質分子而造成極難滲透，使厭氧氨氧化反應中所產生具毒性之中間產物羥胺(NH₂OH, hydroxylamine)及聯胺(N₂H₄, hydrazine)能保持於膜中，進而阻止具毒性之中間產物外洩造成細胞之毒害。