

國立臺灣大學工學院環境工程學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

三個垃圾滲出水處理廠的微生物氮循環交互作用

Interactions of microbial nitrogen cycling in three landfill
leachate treatment plants

廖婉婷

Wan-Ting Liao

指導教授：于昌平 教授

Advisor: Professor Chang-Ping Yu

中華民國 112 年 7 月

July, 2023

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

三個垃圾滲出水處理廠的微生物氮循環交互作用

Interactions of microbial nitrogen cycling in three landfill
leachate treatment plants

本論文係廖婉婷君(學號 R10541114)在國立臺灣大學環境工程學研究所完成之碩士學位論文，於民國 112 年 7 月 14 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

論文審查委員：

丁昌輝

于昌平博士

臺灣大學環境工程學研究所教授

童心啟

童心啟博士

臺灣大學環境工程學研究所教授

廖健森

廖健森博士

義守大學生物科學系教授兼系主任

指導教授：

丁昌輝

所長：

陳衍己

誌謝



兩年的碩士生涯過得很快，很感謝于昌平老師當初願意讓我進入于 lab 這個大家庭，在碩士兩年的時間裡，很感謝于老師給予我許多對於研究題目的想法，跟我共同討論，對於實驗上的需求也都給予我們極大的支持，給予我極大的空間。還要感謝吳佩勳學姊以及張朝欽學長，傳授給我許多實驗的技巧，分享其自身的經驗，給予不同的想法，有了你們的協助讓我在研究路途上走得更加順利。接著要非常感謝來參與我碩士論文口試的口試委員—于昌平老師、童心欣老師以及廖健森老師，給予我碩論文許多意見以及想法，讓我的研究論文更加完整。另外，要特別感謝已經畢業的學長姐—文暉、俊歲、鈺玟、丞均，在我對實驗室的事項都還懵懵懂懂的時候，細心的教導我們實驗室的大小事項以及儀器的使用與維護，有時也提供我們對於實驗的想法。而最不能忘記的就是我的實驗室夥伴—采儒、仕依、良鋐，雖然我比較常待在舊館做實驗，但每當我們遇到實驗不順的時候，總是會想到和對方討論、抒發心情，互相扶持至今，而實驗室的學弟妹—尚言、智傑、育綺、育瑄、科呈、凱婷、臻宜、晉偉，協助實驗室的大小事，有你們在的實驗室總是特別的歡樂，還要感謝童 lab 的各位，協助我開實驗室的門，一起討論實驗上遇到的問題，能夠認識你們真的很開心，最後也要感謝一直陪著我的家人們，有你們的支持，讓我無後顧之憂地完成我的碩士學位，真的非常感謝你們！

廖婉婷 謹誌於

中華民國 112 年 7 月



摘要

厭氧氨氧化反應是一種低成本、無需碳源和氧氣供應的脫氮技術，在垃圾滲濾液處理中已有應用。本研究所探討之 TWT、BL 以及 XF 三個廠區在過去皆有成果培養出或是植種了厭氧氨氧化菌。然而，經過多年的水質操作變化，本研究藉由數位化核酸定量儀 (Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR) 以及次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS)，定量氮相關基因並探討微生物組成的關係，以瞭解過去和現在水質以及微生物組成之間的差異。

根據水質參數分析、功能性基因定量以及菌種分析結果得知三個廠區反應槽性質差異大，TWT、BL 以及 XF 分別以硝化脫硝、部分硝化以及脫硝作用為各廠區反應槽主要之氮循環途徑。在過去三個廠區中皆有檢測到 *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 和 *Ca. Anammoxoglobus* 三種厭氧氨氧化菌屬，但目前 TWT 廠區僅剩下 *Ca. Brocadia* 以及 *Ca. Anammoxoglobus* 兩種菌屬；BL 廠區在相對占比上則佔有一定比例的 *Ca. Kuenenia* 屬；而 XF 廠區則無檢測至厭氧氨氧化菌之存在，與過去相比，各廠區的厭氧氨氧化基因多樣性以及豐富度皆下降。

在水質條件上，以碳氮比和額外添加碳源對於廠區厭氧氨氧化菌的存在最具影響性。在碳氮比條件上，由於 BL 廠區具有較佳的碳氮比 1.4，符合厭氧氨氧化菌生長所需；而現階段由於 BL 廠區的額外添加碳源—甲醇濃度的提高，以及 XF 跟 TWT 廠區的水肥處理量提升，增加了廠內 COD 之含量，一方面改變廠區優勢基因的組成，另一方面更不利於厭氧氨氧化菌的生存，導致厭氧氨氧化基因豐富度降低。

關鍵字：垃圾滲出水處理廠、氮循環、基因定量、菌種分析、厭氧氨氧化菌



Abstract

Anaerobic ammonia oxidation (Anammox) is a cost-effective nitrogen removal technology that does not require carbon sources or oxygen supply. It has been utilized in the treatment of landfill leachate. This study focuses on three treatment plants: TWT, BL and XF, which had achieved successful cultivation or inoculation of anaerobic ammonia-oxidizing bacteria. However, due to long-term changes in water quality, this research employs digital polymerase chain reaction (dPCR) and next-generation sequencing (NGS) techniques to quantify nitrogen-related genes and investigate the relationship with microbial composition. The aim is to understand the differences in water quality and microbial composition between the past and current.

Analysis of water quality parameters, quantification of functional genes, and microbial analysis revealed significant differences among the three plants: TWT, BL, and XF. TWT primarily operates with nitrification-denitrification, BL exhibits partial nitrification, and XF relies on denitrification as the main nitrogen cycling pathway. In the past, all three plants harbored three types of Anammox bacteria, namely *Ca. Brocadia*, *Ca. Kuenenia*, and *Ca. Anammoxoglobus*. However, presently, only *Ca. Brocadia* and *Ca. Anammoxoglobus* are found in the TWT plant, with BL showing a certain proportion of *Ca. Kuenenia*. Also, no Anammox bacteria were detected in the XF plant. The diversity and abundance of Anammox genes have decreased in three plants compared to the past.

According to water quality conditions, carbon-to-nitrogen ratio and the addition of supplemental carbon sources, greatly influence the presence of Anammox bacteria in the plants. BL plant demonstrates a favorable carbon-to-nitrogen ratio of 1.4, which is conducive to the growth of Anammox bacteria. However, the increase in concentration of additional carbon source-methanol in the BL plant and the elevated septic tank effluent

concentration in XF and TWT plants, leading to higher COD levels, have altered the composition of dominant genes in each plant and created an unfavorable environment for Anammox bacteria, resulting in decreased abundance of Anammox genes.

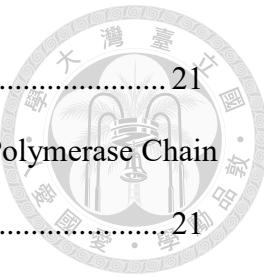


Keywords: Landfill leachate treatment plant, Nitrogen cycle, Gene quantification, Microbial analysis, Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria

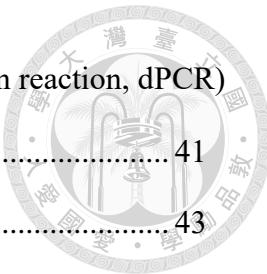
目錄



論文口試委員審定書	I
誌謝	II
摘要	III
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	XI
第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究動機	2
1.3 研究目的	4
第二章 文獻回顧	5
2.1 垃圾滲出水廢水處理廠之廢水特性及危害	5
2.2 氮循環	6
2.2.1 硝化反應	7
2.2.2 脫硝反應	8
2.2.3 固氮反應	9
2.3 厭氧氨氧化作用	11
2.3.1 厭氧氨氧化作用及應用	11
2.3.2 厭氧氨氧化微生物之生長特性	12
2.3.3 厭氧氨氧化微生物代謝機制	14
2.3.4 厭氧氨氧化微生物的細胞構造	16
2.3.5 影響厭氧氨氧化生長之因素	17



2.4 分子生物技術	21
2.4.1 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)	21
2.4.2 數位化核酸定量儀 (Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR) ..	22
第三章 材料與方法	24
3.1 實驗藥品與設備	24
3.1.1 實驗用藥品	24
3.1.2 實驗室儀器與設備	26
3.2 實驗架構	28
3.3 污水處理流程	29
3.3.1 採樣流程	29
3.3.2 採樣完實驗室前處理	29
3.4 水質分析方法	30
3.4.1 混合液懸浮固體 (Mixed liquor suspended solids, MLSS) 及揮發性懸浮固體(Mixed Liquor Volatile Suspended Solids, MLVSS) 分析	30
3.4.2 氮氣分析-納氏比色法	31
3.4.3 化學需氧量 (Chemical oxygen demand, COD) 分析	32
3.4.4 硝酸根及亞硝酸根分析	32
3.4.5 溶解性有機碳 (Dissolved organic carbon, DOC) 及總氮 (Total nitrogen, TN) 分析	33
3.4.6 凱氏氮分析	35
3.5 分子生物技術	36
3.5.1 去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 萃取	36
3.5.2 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)	39



3.5.3 數位化核酸定量儀 (Droplet digital polymerase chain reaction, dPCR)	41
3.5.4 基因選殖 (Gene cloning)	43
3.6 比厭氧氨氧化活性測試	44
3.7 次世代定序分析 (Next Generation Sequencing, NGS)	45
第四章 結果與討論	46
4.1 厭氧氨氧化菌基因選殖結果	46
4.2 廠區污水處理性能及背景	48
4.2.1 廠區處理背景	48
4.2.2 廠區採樣及基本水質分析 (溫度/pH值/溶氧/導電度/ORP)	51
4.2.3 總懸浮固體以及揮發性懸浮固體	54
4.2.4 化學需氧量	55
4.2.5 氨氮以及離子層析 (硝酸根、亞硝酸根)	57
4.2.6 凱氏氮以及總氮分析	59
4.3 污水處理廠相關基因定量	61
4.3.1 基因濃度絕對定量	63
4.3.2 基因濃度相對定量	69
4.4 厭氧氨氧化活性測試 (Specific Anammox Activity, SAA)	74
4.5 菌相分析	77
第五章 結論與建議	86
5.1 結論	86
5.2 建議	88
參考文獻	89
附錄	100

圖目錄



圖 2-1 XF 垃圾掩埋場 (圖片來源：新竹縣政府)	5
圖 2-2 氮循環 (Bernhard, 2010)	7
圖 2-3 厥氧氮氧化的代謝機制 (van Niftrik et al., 2004).....	15
圖 2-4 厥氧氮氧化的代謝機制 (Kartal et al., 2012; Kuenen, 2020).....	16
圖 2-5 厥氧氮氧化菌細胞結構圖 (Jetten et al., 2009)	17
圖 2-6 qPCR 反應程序 (圖片來源：NCBI)	21
圖 2-7 dPCR 反應流程圖 (Quan et al., 2018)	22
圖 3-1 (a)採樣方式 (b)採樣現場.....	29
圖 3-2 Eco IC 離子層析套組.....	33
圖 3-3 總有機碳分析儀.....	34
圖 3-4 凱氏氮儀器(a)蒸餾 (b)消化.....	36
圖 3-5 (a) StepOnePlus Real-Time PCR System (b)八連排反應位置	41
圖 3-6 (a)QIAcuity digital PCR system (b)8.5k, 24 well Nanoplate	42
圖 3-7 次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 流程	45
圖 4-1 NCBI 基因序列比對結果 (a)序列比對結果 (b)基因比對結果	47
圖 4-2 (a)TWT (b)BL (c)XF 廢區處理流程圖	50
圖 4-3 (a)溫度/pH 值 (b)導電度/氧化還原電位 (c)溶氧水質參數	53
圖 4-4 各反應槽之 MLSS 及 MLVSS	54
圖 4-5 XF 廢厥氧槽情形	55
圖 4-6 各採樣點之進出流 (a)TCOD 以及 (b)SCOD	56
圖 4-7 各採樣點氨氮濃度及去除率	58
圖 4-8 各採樣點亞硝酸根濃度	58
圖 4-9 各採樣點硝酸根濃度	58



圖 4-10 各採樣點之凱氏氮以及氨氮濃度	60
圖 4-11 各採樣點總氮濃度及去除效率	60
圖 4-12 各廠區基因之絕對定量	65
圖 4-13 <i>amoA</i> 基因與氨氮去除率之相關性	65
圖 4-14 (a)厭氧氨氧化基質濃度與 <i>hzo</i> 基因定量相關性 (本研究) (b)過去成功植 種完厭氧氨氧化污泥之定量結果 (Meng et al., 2021)	68
圖 4-15 TWT、BL、XF 相對濃度結果	71
圖 4-16 TWT、BL、XF 相對濃度結果 (疊加)	71
圖 4-17 BL 廠區兩次採樣之功能性基因相對定量	73
圖 4-18 BL 廠區缺氧槽—SAA 活性測試	76
圖 4-19 BL 廠區好氧槽—SAA 活性測試	76
圖 4-20 不同廠區之菌相相對豐富度 (門)	77
圖 4-21 不同廠區之菌相相對豐富度 (屬)	80
圖 4-22 三廠區 Beta diversity 分析圖(a)PCA (b)Weighted Unifrac 分析	83
圖 4-23 環境因子 (紫色箭頭) 與硝化脫硝菌和厭氧氨氧化菌相對豐度 (黃色箭 頭) 之間的 CCA 分析 (Canonical Correspondence Analysis, CCA)	84
圖 4-24 (a)過去(Yang et al., 2020)以及(b)現在厭氧氨氧化菌相對豐度	85
附圖 1 dPCR 基因螢光強度分布圖	100
附圖 2 dPCR 基因螢光強度分布圖	101
附圖 3 dPCR 反應結束示意圖	102
附圖 4 SAA 活性測試 (a)TWT-A (b)TWT-O (c)XF-A (d)XF-O	102

表目錄



表 2-1 目前已知厭氧氨氧化菌	12
表 2-2 qPCR v.s. dPCR	23
表 3-1 實驗用藥品清單	24
表 3-2 實驗儀器與設備清單	26
表 3-3 qPCR 及 dPCR primer 序列及 annealing temperature	39
表 3-4 qPCR 試劑比例	40
表 3-5 qPCR 反應設定	40
表 3-6 dPCR 試劑比例	42
表 3-7 dPCR 反應設定	43
表 3-8 比厭氧氨氧化活性測試培養基	44
表 4-1 垃圾滲出水處理之相關文獻	62
表 4-2 檢測厭氧氨氧化活性之文獻	75
表 4-3 各廠區 Alpha diversity 指數	83
表 4-4 硝化脫硝菌及厭氧氨氧化菌對環境因子的皮爾森統計分析 ($p > 0.1$)	83



第一章 緒論

1.1 研究背景

隨著工商業的發展，城市垃圾量快速增加，而掩埋又為最常見的垃圾處置方式，因此也造成大量的垃圾滲濾液產生，由於垃圾滲濾液中含有高濃度的氨氮以及有機物，抑或是重金屬離子等有害物質，皆對環境造成毒性及危害，更進一步產生人體健康的疑慮，加上垃圾滲濾液與一般的民生污水在水質條件上仍有差異，因此目前垃圾滲濾液的處理越來越受到重視。

目前的垃圾滲出水處理廠所產生的廢水處理方式主要區分為：生物處理法、物理化學處理法抑或是先統一收集污水後，再集中輸送至其他處理設備進行處置，由於物化法雖然可以去除滲出水中多數的有害物質，但因其成本較高且可能會產生二次污染，而生物處理法為最具永續性且經濟效益較高的處理方式，故本研究將以生物處理之觀點進行探討。

由於在不同階段所排放之垃圾滲出水性質不同，對於早中期的滲濾液，由於其碳氮比高，較適合利用硝化及脫硝反應處理，以去除氮和有機物；然而，中晚期的垃圾滲濾液碳氮比較低，較難以傳統方式除氮，加上厭氧氨氧化反應所需碳源濃度較低，適用於處理低碳氮 (C/N) 比的成熟垃圾滲濾液，且其反應物為氨氮以及亞硝酸根，與垃圾滲出水之性質類似，故厭氧氨氧化於垃圾滲濾液的處理更趨受重視。

在過去已有許多學者針對不同環境的氮循環代謝進行討論，在目前的處理流程中多數是藉由 AO 或是 A₂O 程序來進行廢污水之處理，從研究中可以得知不同廠區可能有多種不同的反應同時進行，但如何針對不同廠區的水質特性去調整其處理方式，針對不同垃圾滲出水處理廠進行微生物組成之研究，並建立水質與群落之間的關係，因此藉由分子生物技術進行氮相關功能性基因之定量能夠使我們更了解污水處理廠中複雜的微生物氮循環網絡。



1.2 研究動機

由於垃圾掩埋場在近幾年日仍為垃圾處理方式的選擇之一，垃圾滲濾液的組成複雜，當中包括重金屬、腐植酸、氨氮等混合物，故滲濾液在排放前的處理極為重要。起初，垃圾滲濾液的處理方式不外乎就是藉由傳統的硝化以及脫硝反應去除水中之污染物，但於 1990 年代首次在荷蘭流體化床處理廢水中發現新的除氮途徑—厭氧氨氧化作用，厭氧氨氧化作用跳過傳統的脫硝程序，以最短的途徑直接在無氧環境下以銨根以及亞硝酸根轉化成氮氣，去除水中的總氮，為除氮技術的新突破。

根據文獻研究，在過去幾十年裡，由於 Anammox 的生長極為緩慢且耗時，故許多研究皆將重點放在實驗室規模的反應槽體，探討如何最佳化條件以利於厭氧氨氧化的富集，並將其應用至實廠當中。然而，我們對於這些存在厭氧氨氧化作用的污水處理廠中微生物的氮循環網絡了解甚少。而台灣約於 2006 年在北部 TWT 垃圾滲出水處理廠中發現 Anammox 的存在，因此有學者針對 TWT 廠區進行 Anammox 的豐富度進行定量、觀察其群落組成的多樣性 (Meng et al., 2021; Yang et al., 2020)，由於為了要將此除氮技術應用得更廣泛，過去有將於 TWT 廠區發現的厭氧氨氧化顆粒污泥植種至不同的處理廠中，增加此技術之發展，同時也藉由分子生物技術探討群落的交互關係，藉由厭氧氨氧化菌顆粒污泥的植種，被植種廠區皆成功培養出肉眼可見的厭氧氨氧化菌，形成硝化—脫硝—厭氧氨氧化三者同步運作的反應體系。

在垃圾滲出水中，由於氨氮為垃圾填埋場的長期污染之問題，氨氮為垃圾滲濾液中的重要污染物，其決定了垃圾填埋場何時可以被視為是穩定的。因此，本研究將著重探討在三個垃圾滲出水處理廠中，所有氮相關分子的代謝變化。加上由於近幾年政府政策的改變，有些垃圾滲出水處理廠所處理之污水已經不再局限於垃圾滲濾液，少數廠區污水來源增加了水肥或是清洗砂石車廢水等，增加待處理水的有

機質含量，造成污水性質大幅改變。因此本研究希望在過去皆有植種過 Anammox 或發現存在 Anammox 的三個廠區當中進行微生物群落分析，利用分子生物技術進行氮功能性基因之定量，探討各廠區運行情況，以及過去跟現在的變化差異。





1.3 研究目的

本研究著重於探討現在的垃圾滲出水處理廠處理的效率以及與過去剛植種完
厭氧氨氧化顆粒污泥後的微生物群落差異，主要研究之細項如下：

1. 利用次世代定序 (Next generation sequencing, NGS) 分析三個垃圾滲出水廠廢水系統中的微生物群落組成以及占比。
2. 利用分子生物技術 (Quantitative Polymerase Chain Reaction & Digital polymerase chain reaction, dPCR) 檢測氮相關之功能性基因，建立不同功能的微生物族群進行之氮循環關係，確認基因定量與水質關係是否有相關性。
3. 比較各廠區在過去以及現今的微生物組成差異，探討兩者間是否有何參數的改變，導致此變化。
4. 綜合探討三個垃圾滲出水處理廠的水質差異及微生物之組成差異。



第二章 文獻回顧

2.1 垃圾滲出水廢水處理廠之廢水特性及危害

隨著工商業發展越來越進步，世界人口持續增加，隨之而來所產生的城市固體廢棄物 (Municipal Solid Waste, MSW) 也越來越多，雖然有許多方法可以進一步處理人類產生的廢棄物，但就開發或是成本而言，掩埋的成本是最低的 (Renou et al., 2008)，因此也成為目前垃圾主要處理流程之一，所以掩埋所產生的滲濾液的特性及危害也成為我們關注的重點之一。垃圾滲濾液主要影響著環境中的地下水以及地表水甚至是滲入土壤或底土中，對水域造成嚴重污染，其主要是由滲濾後之雨水以及垃圾降解產生的水或垃圾中固有的水混合物所組成，其中包含了大量的溶解性有機物、鹽類、重金屬、高濃度的氯氮以及其他有機物等等 (Wiszniewski et al., 2006)，因此對環境會產生不小的危害。圖 2-1 為 XF 垃圾掩埋場示意圖。



圖 2-1 XF 垃圾掩埋場（圖片來源：新竹縣政府）

固體廢棄物所產生的滲濾液成分差異很大，年輕滲濾液 (1~2 年) 的特點為揮發性有機酸 (Volatile fatty acid, VFA)、化學需氧量 (Chemical oxygen demand, COD)、總有機碳 (Dissolved organic carbon, DOC)、生物需氧量 (Biochemical



Oxygen Demand, BOD) 皆較高 (Umar et al., 2010)；而較成熟之滲濾液特點為 COD 相對較低 (<4,000 mg/L)、呈現弱鹼性 (pH>7.5) 以及生物降解性低 (Li et al. 2010)。不僅僅會隨著時間改變，在不同垃圾成分或是季節及溫度等季節性因素，垃圾滲濾液的成分會有相當大的差異 (Costa et al., 2019)。在夏季溫度高，生物降解速率較快，滲濾液中的 COD 以及 DOC 濃度較低；而冬季的 pH 值、總氮以及導電率則通常高於夏季；氧化還原電位、重金屬濃度、總懸浮固體等參數則沒有顯著的季節性變化 (Zhao et al., 2013)。

目前已有各種先進技術可以處理垃圾滲濾液，包括生物處理、化學處理以及物化處理等，但由於垃圾滲濾液的成分較複雜，故時常無法單以一種方式處理。由於生物處理的成本低、對於廢水中氮氮的去除成效較高 (Jokela et al., 2002)，故在此研究中將針對生物處理進行更深入之探討。

2.2 氮循環

氮 (Nitrogen, N) 是所有生物體不可或缺的主要元素之一，其為許多組成生物分子的主要成分，包括蛋白質、核酸以及葉綠素等 (Fowler et al., 2013)。氮分子 (N_2) 為生物質中第四豐富的元素，雖然大氣當中存在大量的氮分子，但多數皆無法直接被生物體利用，導致氮成為一種缺乏之資源。因此，只有當 N_2 轉化為 NH_4^+ 時才能被生物體利用；除此之外，氮同時也以許多不同形式存在，例如：氨氮、硝酸鹽以及亞硝酸鹽以無機氮之形式存在；而胺基酸以及核酸則以有機形式存在，隨著不同氮形式間的變化進行氮循環，提升生物的生長及利用效率，而氮循環又為所有循環中最為複雜的，圖 2-2 為氮循環示意圖。由於目前人類活動的廢污水或產生的垃圾中，皆含有大量的 NH_4^+-N 及其他氮相關之化合物，皆導致承受水體的優養化，也影響著廢水再利用的適宜性，故在後續章節中將詳細介紹不同氮反應之程序，更進一步了解氮相關的反應，將依序介紹硝化反應、脫硝反應、固氮反應以及厭氧氨氧化。

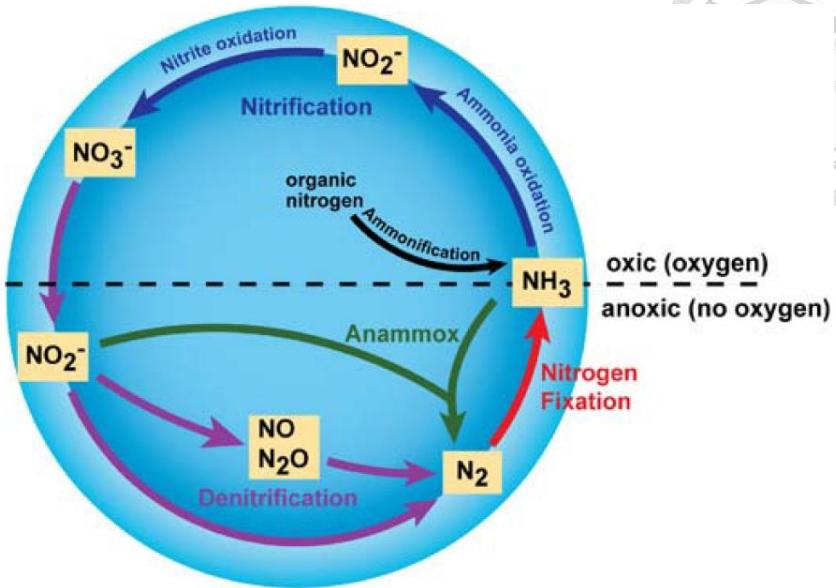


圖 2-2 氮循環 (Bernhard, 2010)

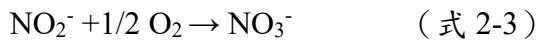
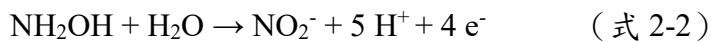
2.2.1 硝化反應

硝化作用多數是由好氧自營菌所進行，其主要包含兩個反應。首先，氨氮會經由氨氧化菌 (Ammonium oxidizing bacteria, AOB) 轉變為亞硝酸鹽，接著再經由亞硝酸鹽氧化菌 (Nitrite oxidizing bacteria, NOB) 將亞硝酸鹽轉化為硝酸鹽，在硝化反應的第一步驟中，主要有兩個關鍵酵素控制著反應之進行，分別為氨單加氧酶 (Ammonia monooxygenase, AMO) (式 2-1) 以及羥胺氧化還原酶 (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) (式 2-2)，透過這兩種不同的酵素將氨氮轉換成亞硝酸鹽；而氧化亞硝酸鹽之關鍵酵素則為亞硝酸氧化酶 (Nitrite oxidoreductase, NXR) (式 2-3)。硝化反應的基因 *amoA* 已被廣泛使用為鑑定 AOB 的功能性基因，其可以催化氨氮的氧化，提供微生物細胞之生長。而 *nxrB* 為 NOB 的功能性基因，*nxrB* 基因的功能為將來自亞硝酸鹽的電子通道連接至細胞膜上的呼吸鏈，調節著氧化作用的進行 (Pester et al., 2014)。

根據 16s rRNA 的系統發育關係圖可以得知，AOB 主要分成三個屬，分別為



Nitrosomonas、*Nitrosospira* 以及 *Nitrosococcus* (Head et al., 1993)，而 NOB 則分為四個屬，分別為 *Nitrobacter*、*Nitrospina*、*Nitrococcus* 以及 *Nitrospira* (Teske et al., 1994)，不同菌屬之微生物依照生理特性之差異其所適合的生存環境各不相同，例如：在定期添加大量氮肥農業土壤中發現 *Nitrosomonas* 屬的數量較多，表示氮肥的添加刺激了 *Nitrosomonas* 的生長 (Hastings et al., 1997)；而 *Nitrospira* 通常在廢水處理廠以及海洋中被發現 (Hayatsu et al., 2008)。



2.2.2 脫硝反應

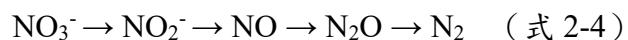
脫硝反應為將硝酸鹽轉化為氮氣的過程，氮氣為脫硝作用的最終產物，與硝化作用最大的不同在於脫硝反應主要為厭氧反應，但並非所有脫硝菌皆為絕對厭氧菌，有些為兼性厭氧菌 (Facultative anaerobe) 或是耐氧厭氧菌 (Aerotolerant anaerobe)，可利用硝酸鹽做為電子接受者。因此脫硝反應主要在深層土壤沉積物或海洋的缺氧區中發現脫硝反應的進行 (Bernhard, 2010)。除此之外，由於脫硝菌為化學有機營之微生物，生長速度較快，但若要進行脫硝反應時，有機碳的存在對反應的進行非常重要，故在實廠應用中常使用額外添加甲醇確保反應的進行。

常見的脫硝菌包括 *Bacillus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Halobacterium*, *Methanomonas*, *Spirillum* (Gayle et al., 1989)。脫硝的代謝途徑如式 2-4，總反應式如式 2-5，在每個不同的反應途徑中皆有著不同的基因控制其反應，分別為硝酸鹽還原基因 (Nitrate reductase, *narG*)、亞硝酸鹽還原基因 (copper-containing nitrite reductase, *nirK*)、一氧化氮還原基因 (Nitric oxide reductase, *norB*)



以及一氧化二氮還原基因 (Nitrous oxide reductase, *nosZ*)，控制著脫硝反應的第一個基因为 *narG*，此種基因存在於脫硝性微生物以及其它硝酸鹽還原菌中，其整個反應過程皆會被氧氣所抑制；第二個酵素為 NIR，NIR 包含兩種，分別為含銅亞硝酸鹽還原基因 (*nirK*) 以及細胞色素 cd1 亞硝酸鹽還原基因 (*nirS*)，其僅能在脫硝性微生物中發現，此酵素分布在細菌內膜及外膜之間的周質空間中；第三種酵素為 NOR，其為一種膜上蛋白；第四種酵素則為 NOS，其屬於周質間的含銅蛋白，此兩者皆會被環境中氧氣影響反應之進行。其中，又以 *norB* 為最易受到氧氣所影響之基因，當氧氣濃度低於 0.2 mg/L 時，其反應會被抑制 (Kumar & Lin, 2010)。

然而，並非所有脫硝菌皆具有進行脫硝反應的關鍵基因，有些物種可能缺乏上述所說的其中幾個基因，故使中間產物（如：亞硝酸鹽或是一氧化二氮）的累積，因此更深入的探討族群中脫硝菌的組成關係才能夠進一步分析脫硝反應之進行，將脫硝反應更有效率的應用到廢水處理中。



2.2.3 固氮反應

在大氣組成成分中有 80%為氮氣，由於此形式的氮無法直接提供植物以及微生物使用，因此須先將 N_2 進行生物性轉換，而此過程即稱為固氮作用，反應式如式 2-6。固氮作用在氮循環中具有相當重要之作用，為土壤提供大量的可利用氮。固氮作用除了藉由閃電或特定的工業過程進行外，在生物反應上僅能由原核生物進行反應，在具有固氮能力的微生物中有些可獨自生存，有些則須仰賴其他共生體進行固氮作用 (Burris & Roberts, 1993)，其中，又以根瘤菌最具代表性。在所有固氮菌中皆具有固氮酵素 (Nitrogenase)，固氮酵素對於氧氣非常敏感，因此許多固氮

菌會演化出多種生理策略來避免酵素接觸到氧氣，例如透過簡單的厭氧生長方式避免氧氣接觸，或是透過呼吸作用消耗過量的氧氣，以及在空間上演化出分隔避免氧氣的擴散，最經典的例子則是藍綠菌具有異型細胞 (Heterocyst) 可創造出微厭氧的環境，避免固氮酵素接觸到氧氣而失去活性 (Bernhard, 2010)；以及其他光合固氮菌則僅在夜間進行固氮作用 (Bernhard, 2010)。

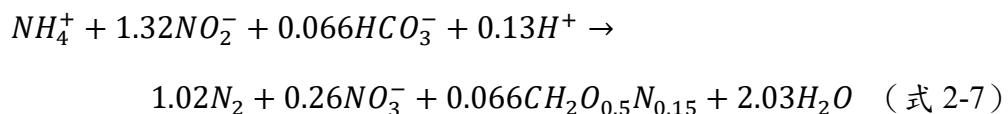




2.3 厥氧氮氧化作用

2.3.1 厥氧氮氧化作用及應用

在過去，氨的氧化通常被認為受限於有氧環境，但於 1995 年厭氧氮氧化 (Anaerobic Anammox Oxidation, Anammox) 由 A. Mulder 等荷蘭學者 (Mulder et al., 1995) 於脫硝性流體化床中發現。厭氧氮氧化菌具有獨特的代謝能力。在厭氧條件下，其藉由 NH_4^+ 做為電子供給者， NO_2^- 做為電子接受者，進行反應直接形成氮氣，此反應特別適用於處理高濃度的含氮廢水以去除廢水中過盛的含氮化合物，反應式如式 2-7。相較於以傳統方法—硝化以及脫硝反應去處理含氮廢水，厭氧氮氧化反應所需之氧氣需求量較低，不需要額外的有機碳源，加上反應產生之污泥量少 (Fux et al., 2002)，故操作成本較低，因此成為近年來厭氧氮氧化反應已經被廣泛應用於不管是實驗室規模還是實廠規模的含氮氮廢水之處理，例如：垃圾滲出水 (Egli et al., 2001; Shalini & Joseph, 2012)、養豬廢水 (Yamamoto et al., 2008) 以及其他各類廢水 (Tang et al., 2011; Tokutomi et al., 2011) 等。此外，由於厭氧氮氧化菌的生長時間長，在富集培養上較困難，因此現在已發展出許多結合固定化以延長厭氧氮氧化菌的停留時間 (Fujii et al., 2002; Strous et al., 1997)，提高厭氧氮氧化菌的應用性。





2.3.2 厭氧氨氧化微生物之生長特性

厭氧氨氧化微生物在生物學的分類上屬於細菌域，皆屬於浮徽菌門(Planctomycete)，目前總共有 7 個屬，包含 *Ca. Brocadia*, *Ca. Kuenenia*, *Ca. Jettenia*, *Ca. Scalindua*, *Ca. Brasilis*, *Ca. Anammoxoglobus* 與 *Ca. Anammoximicrobium* 以及 22 種主要微生物 (Miao et al., 2019) (如表 2-1 所示)，由於目前尚未培養出純菌株 (pure culture)，故無法取得微生物完整的基因序列，因此目前的暫時以 *Candidatus* (縮寫 *Ca.*) 來命名。厭氧氨氧化菌屬於專性厭氧自營菌，其對環境中的溶氧量非常敏感，當氧氣濃度高於 2 μM 時，代謝作用即會被抑制 (Van De Graaf et al., 1997)。厭氧氨氧化菌半生期可長達 11~20 天，相較於其它微生物是生長很緩慢的。此外，在一般厭氧氨氧化處理流程中，厭氧氨氧化菌的最適生存溫度約為 30°C，除了前述提到的溶氧以及溫度對其影響甚大之外，不同厭氧氨氧化微生物容易受到不同的環境因子去影響其代謝活性，其也包含含氮化合物 (氨及亞硝酸鹽) 之濃度、有機物濃度、pH 值以及重金屬等 (Jin et al., 2012)，上述因素於 2.3.5 小節詳細說明。

表 2-1 目前已知厭氧氨氧化菌 (Miao et al., 2019)

Genus	Species
Brocadia	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>
	<i>Ca. Brocadia sinica</i>
	<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>
Kuenenia	<i>Ca. Brocadia carolinensis</i>
	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>
	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>
Jettenia	<i>Ca. Jettenia moscovienalis</i>



	<i>Ca. Jettenia caeni</i>
	<i>Ca. Scalindua brodae</i>
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>
	<i>Ca. Scalindua marina</i>
	<i>Ca. Scalindua arabica</i>
Scalindua	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>
	<i>Ca. Scalindua zhenghei</i>
	<i>Ca. Scalindua sinooifield</i>
	<i>Ca. Scalindua wagneri</i>
Brasilis	<i>Ca. Brasilis concordiensis</i>
Anammoxoglobus	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>
	<i>Ca. Anammoxoglobus sulfate</i>
Anammoximicrobium	<i>Ca. Anammoximicrobium moscowii</i>

由於厭氧氮氧化菌的電子接受者不是氧氣，因此菌種較適合在不同的特殊環境下被發現，因此藉由了解菌種在不同生態區位的分布，可更確切了解不同厭氧氮氧化菌的獨特性。*Ca. Scalindua* 屬的厭氧氮氧化菌僅會存在於海洋環境中，且其豐富度會隨著河口地區的鹽度增加而變多 (Dale et al., 2009; Schmid et al., 2007)，而其它屬—*Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 則主要分布於鹽度較低的環境中，也較常於污水處理廠中被發現 (Egli et al., 2001)。故藉由不同厭氧氮氧化菌的分布也可以進一步擴展我們對不同環境之間的了解。

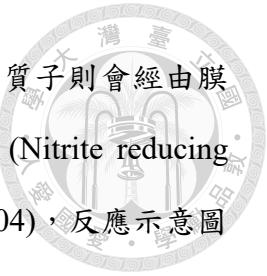


2.3.3 厥氧氮氧化微生物代謝機制

式 2-7 為厥氧氮氧化的總反應式，從反應式中可以看出雖然在反應物氨氮以及亞硝酸根的反應下可以反應成氮氣，但在此反應中同時也會產生硝酸根的累積，故在 Van De Graaf 等學者的研究下，利用同位素 ^{15}N 標記進行厥氧氮氧化反應途徑之分析，在其研究中發現在反應過程中會產生羥胺 (Hydroxylamine, NH_2OH) 以及聯氮 (Hydrazine, N_2H_4) 這兩個中間產物，且在額外添加這兩種物質後發現 NH_4^+ 的轉化率上升，以及 NO_3^- 的生成速率有下降趨勢 (Van De Graaf et al., 1997)，因此也促使之後的學者更進一步的探討厥氧氮氧化的完整代謝途徑。

厥氧氮氧化細菌的代謝途徑涉及到很多關鍵的酶，例如：HAO (Hydroxylamine oxidoreductase)、HZO (Hydrazine oxidoreductase) 以及 HZS (Hydrazine synthase)。HZS 是一種合成酶，它能夠合成 N_2H_4 ；而 HZO 酶又稱作 HDH，其主要功能為將 N_2H_4 氧化為 N_2 以及 H_2O ；HAO 酶則是可以協同 HZO 一起完成亞硝酸鹽的氧化過程，在厥氧氮氧化菌中，亞硝酸鹽的氧化分為兩步驟，第一步驟 NO_2^- 先被氧化成 NO 這個中間體，然後 NO 再進一步被氧化成 N_2 。在這兩個反應中，HAO 主要負責第一步反應的催化，而第二步驟則是由 HZO 催化。除此之外，這三種酶最大不同之處在於 HZO 和 HZS 是在 Anammox 中發現的，它們的基因結構相對簡單，只存在單個基因；但 HAO 酶則在不同細菌中存在著多個同源基因，基因結構和分布都比較複雜，在不同類型的氮氧化菌中也可能存在著多種不同的 HAO 基因 (Jetten et al., 2009; Strous et al., 2006)，故 *hzo* 以及 *hzs* 為測定厥氧氮氧化菌的標的基因。

在一開始，Laura A. van Niftrik 等學者認為在厥氧氮氧化菌的胞器 Anammoxosome (厥氧氮氧化體) 中具有肼水解酶 (Hydrazine hydrolase, HH) 可將 NH_4^+ 和 NH_2OH 結合成 N_2H_4 ，在這步驟中所產生的 N_2H_4 中間產物會再經由



HZO 酶的氧化形成 N_2 ，而最後在上述步驟中所產生的電子以及質子則會經由膜上的酵素一部分產生 ATP，另一部分則會被亞硝酸鹽還原酶 (Nitrite reducing enzyme, NIR) 用來還原 NO_2^- 並產生 NH_2OH (van Niftrik et al., 2004)，反應示意圖如圖 2-3。

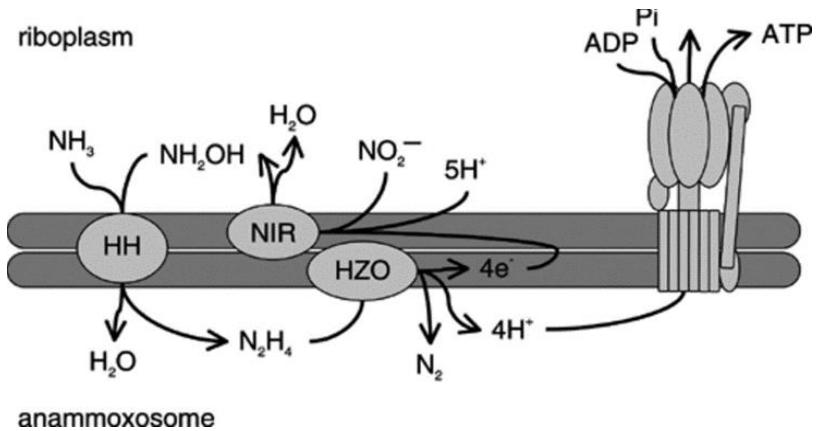


圖 2-3 厳氧氮氧化的代謝機制 (van Niftrik et al., 2004)

然而，J. Gijs Kuenen 等學者則發現了與上述所介紹的以 NH_2OH 作為中間產物的不同途徑，故在後續幾年又提出了另一種嚴氧氮氧化可能途徑，代謝機制如圖 2-4 以及式 2-8~2-10。首先，嚴氧氮氧化菌中的酵素 NIR 將 NO_2^- 還原成 NO，並在 HZS 酶的催化下，將 NO 以及 NH_4^+ 轉化成 N_2H_4 ，最後再經由 HZO 酶的反應下將 N_2H_4 氧化成 N_2 (Kartal et al., 2012; Kuenen, 2020)。

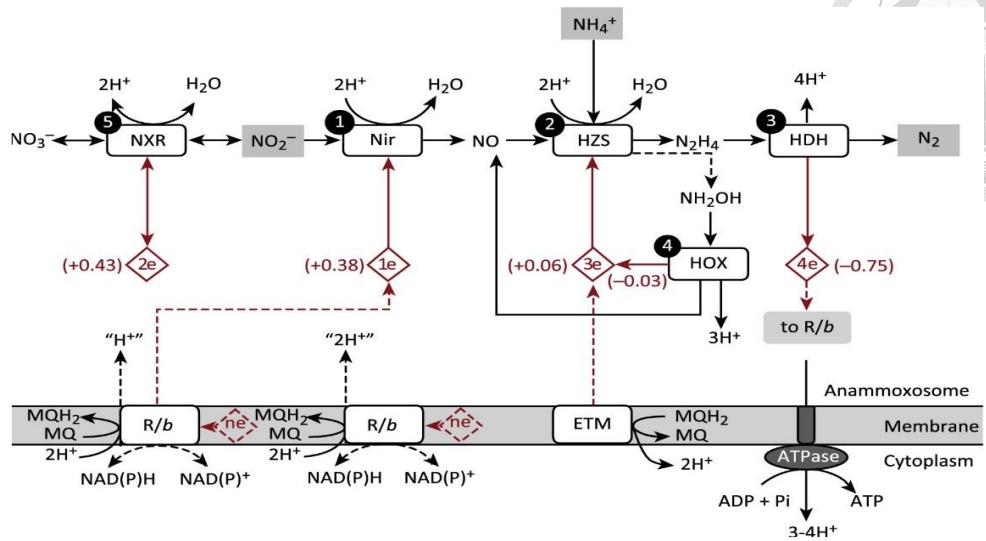
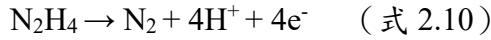
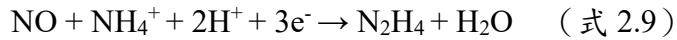


圖 2-4 厥氧氮氧化的代謝機制 (Kartal et al., 2012; Kuenen, 2020)



2.3.4 厥氧氮氧化微生物的細胞構造

厥氧氮氧化菌屬於自營性的格蘭氏陰性菌，為一種小型的紅棕色球狀細胞，直徑大約 $0.8 \mu\text{m}$ ，菌種本身較特殊之處在於其缺乏其它細菌細胞壁的聚合物—肽聚醣 (peptidoglycan) (Fuerst, 1995; Stackebrandt et al., 1986)，主要由蛋白質所組成，其細胞主要由三個腔室組成，每個腔室都是由雙層膜所包圍，第一層膜包圍著整體細胞以及最外部的腔室，稱之為 paryphoplasm；第二層膜包圍著由細胞核以及核糖體 (van Niftrik et al., 2008)，所有轉錄、轉譯反應皆在此發生；而最內層的膜是一個完全封閉且高度彎曲的膜，當中包含著一個胞器，稱之為厥氧氮氧化體，主要作為能量轉換的區域，而在文獻中學者認為高度彎曲的膜提供膜的體表面積，提供給在膜上進行反應的代謝途徑更多空間 (McMahon & Gallop, 2005)。圖 2-5 為厥氧氮氧化菌細胞結構圖。

除此之外，我們時常看到厭氧氨氧化菌呈現紅色的型態，其原因在於厭氧氨氧化菌體中具有細胞色素 c，細胞色素 c (cytochromes c proteins) 是一個關鍵的電子載體分子，也稱為血紅素蛋白，其扮演著將電子從胺化合物轉移到其他分子的角色。厭氧氨氧化細胞中大約 20% 的細胞蛋白是血紅素蛋白 (Jetten et al., 2009)，大多數細胞色素 c 作為電子載體並且在還原亞鐵和氧化鐵氧化態之間循環來進行電子的轉移。這些電子傳遞過程是整個代謝過程中的關鍵步驟之一。同時，氨氮、亞硝氮以及中間反應物也都藉由細胞色素 c 的催化和電子轉移功能進行代謝 (Kartal & Keltjens, 2016)。因此紅色外觀為厭氧氨氧化過程中的一個特徵。

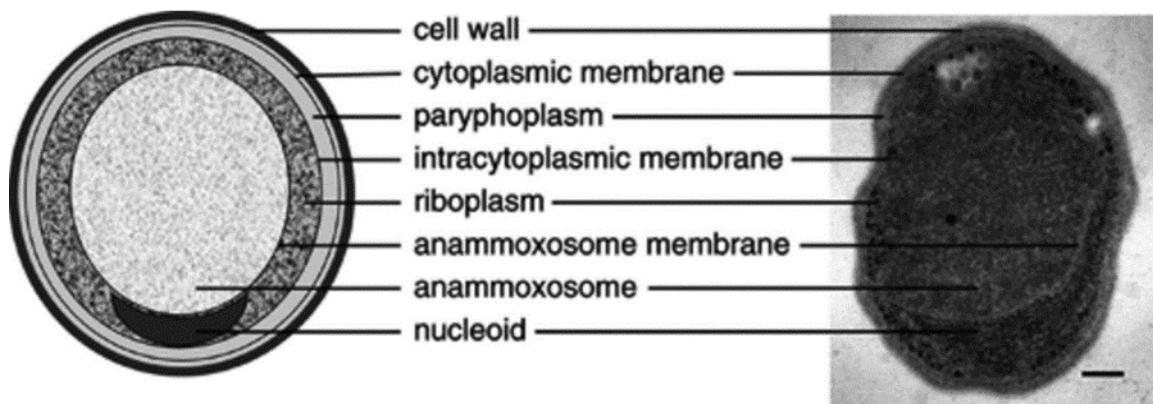


圖 2-5 厌氧氨氧化菌細胞結構圖 (Jetten et al., 2009)

2.3.5 影響厭氧氨氧化生長之因素

由於厭氧氨氧化菌體內的 Anammoxosome 膜上的特殊脂質排列緊密且滲透性低的特性，故菌株的代謝運輸較緩慢，導致 Anammox 的生長速率受到限制 (van Niftrik et al., 2004)，也因此其半生期可長達 11~20 天 (Strous et al., 1997)。除此之外，在過去許多研究發現厭氧氨氧化菌會隨著不同環境條件而有所差異，例如：溫度、pH 值、溶氧、氮化合物的濃度以及有機物等 (Ma et al., 2016)，藉由了解在不同操作條件下的厭氧氨氧化性能差異，提供最有效率的操作條件，故後續將針對 Anammox 生長環境因素進行說明。



I. 溫度

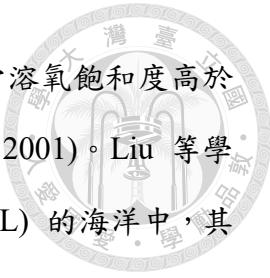
溫度是影響厭氧氨氧化反應的重要參數之一，溫度波動影響著厭氧氨氧化酵素的活性，進而影響脫硝效率。過去研究發現，厭氧氨氧化菌的最適生長溫度為30~40°C，但根據 Guibing Zhu 等學者研究指出當溫度低於 15°C 或高於 40°C 時，厭氧氨氧化菌之活性降低，反應速率下降 (Zhu et al., 2011)，但此抑制作用是可逆的；此外，由於在溫度大於 40°C 的情況下，生物的細胞可能會裂解，因此可能造成厭氧氨氧化的抑制作用 (Dosta et al., 2008)。然而也有少數菌種可以適應極端溫度環境，例如：在 60~80°C 的溫泉環境 (Jaeschke et al., 2009) 以及在-5~4°C 的環境水體中仍皆能發現厭氧氨氧化菌的存在 (Kouba et al., 2022)。這表示厭氧氨氧化菌具有較大的生理溫度範圍，不同厭氧氨氧化菌依照其自身的生理差異其所能適應的生長條件不同。

II. pH 值

pH 值為另一項對厭氧氨氧化菌生長有相關性的重要因子，pH 值會成為生物反應的重要因素之原因在於主要功能酵素以及質子的梯度維持皆需要特定的 pH 值 (Bae et al., 2016)。在 Limei Wang 等學者的研究指出厭氧氨氧化菌在 pH 值 6.0~9.0 具有活性，而在 pH 8.0 時脫硝效率最佳 (Wang et al., 2021)；此外，在其他研究中也發現厭氧氨氧化菌株在酸性以及鹼性環境下活性並未受到抑制，其原因在於厭氧氨氧化菌株具有特殊由梯烷脂質所構成的低滲透性膜，可以限制質子的擴散 (Zhu et al., 2015)，提高了厭氧氨氧化菌在酸性或鹼性的環境中生存。

III. 溶氧

由於厭氧氨氧化菌為專性或兼性厭氧菌，因此系統中的溶氧濃度也影響著 Anammox 的生長，高濃度的溶氧會促進亞硝酸鹽氧化菌 (Nitrite oxidation bacteria, NOB) 的生長，進而與厭氧氨氧化菌 (Anaerobic Ammonia-Oxidation Bacteria, AnAOB) 以及氨氧化菌 (Ammonia oxidation bacteria, AOB) 競爭水體中的亞硝酸鹽，導致氮化合物之累積 (Wen et al., 2020)。除此之外，當厭氧氨氧化菌在 0.5~2%



的溶氧飽和度時，厭氧氨氧化反應具有可逆性的抑制作用，但當溶氧飽和度高於 18%時，則會對厭氧氨氧化菌產生不可逆的抑制作用 (Egli et al., 2001)。Liu 等學者發現有些厭氧氨氧化細菌廣泛存在於高濃度 DO (DO > 3.22 mg/L) 的海洋中，其推測主要原因為少數特殊的厭氧氨氧化細菌可以利用宿主細胞產生的能量來維持生長，並且進行有氧呼吸 (Cui et al., 2020)。

IV. 氮化合物濃度

$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 以及 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 為厭氧氨氧化的反應物，在過去許多研究證明厭氧氨氧化菌易受氮化合物濃度的影響，若 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 以及 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的濃度過高，過多的反應物會刺激胞外聚合物快速分泌，導致厭氧氨氧化顆粒污泥通道堵塞，造成污泥解體，抑制 Anammox 的活性 (Wan et al., 2022)；根據 Martins, T.H. 等學者的研究指出，當亞硝酸鹽以及氨氮的莫爾比為 1.32 時，在其 SBR 反應系統具有最大的比厭氧氨氧化活性 (Specific Anammox Activity, SAA)。而在 2007 年，在學者 Depena-Mora 等人的研究中發現，在添加不同初始濃度的氨氮、硝酸鹽以及亞硝酸鹽的測試中，亞硝酸鹽的抑制作用最強，25 mM 的亞硝酸鹽在 SAA 測試中會被抑制 50%，而氨氮以及硝酸鹽在相同標準下的濃度則為 55 和 45 mM，表示亞硝酸鹽的毒性閾值較低，影響較大 (Dapena-Mora et al., 2007)。

V. 碳源

厭氧氨氧化菌株為化學自營性微生物，以 CO_2 作為其主要碳源，適量的無機碳存在可以促進厭氧氨氧化菌的生長，同時也可以增加其活性 (Kimura et al., 2011)，但有機物的存在則會抑制厭氧氨氧化菌之活性，同時促進異營性微生物的生長，因此在厭氧氨氧化系統中，有機物濃度的控制是相當重要的一項因素。然而，在 2021 年，Limei Wang 等學者的研究發現並非所有的有機物皆會對厭氧氨氧化菌造成影響，添加葡萄糖會抑制反應的進行，但醋酸鹽、甲酸鈉或是丙酮酸的添加則是促進了厭氧氨氧化的反應進行 (Liu et al., 2021)。除此之外，有些厭氧氨氧化菌種，例如：*Ca. Anammoxoglobus propionicus*、*Ca. Brocadia fulgida* 以及 *Ca. Jettenia asiatica*

具有將 VFA 氧化成 CO_2 的能力，並且透過乙酰輔酶 A 途徑將其同化代謝 (Feng et al., 2018)，使其提高在群體中的競爭優勢，由上述研究可以發現，厭氣氯氧化菌的代謝多樣性讓其更利於生存在環境中，也可能是其廣泛存在自然環境中的原因之一 (Kartal et al., 2013)。





2.4 分子生物技術

2.4.1 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

即時定量聚合酶連鎖反應為第二代的 PCR 系統，其是利用 PCR 擴增的原理，利用光學偵測系統即時偵測螢光染劑與 DNA 結合釋放出的螢光量，達到即時定量的目的，qPCR 反應示意圖如圖 2-6。qPCR 在染劑的選擇上主要分為兩種，第一種是非專一性的染劑 SYBR Green，SYBR Green 會與 PCR 過程中形成的雙股 DNA 結合 (Wang et al., 2022)，並藉由在每一個 PCR 循環結束時，測量其螢光強度即可知道每個 PCR 循環中產生的產物量，進而回推目標基因之含量得出 Ct 值。第二種則為化學物質 TaqMan probe，TaqMan probe 為具特異性的檢測方法，其特點在於其反應中除了需要專一性的引子對外，在引子對之間的 DNA 序列中需找到具有專一性的片段作為探針，探針在 5' 端會以螢光進行 Reporter gene 之標記，並在 3' 端做淬滅劑之標記，在 PCR 反應過程中，Reporter gene 會與淬滅劑分離，並產生與樣品中擴增的產物量成正比之螢光信號 (Li et al., 2012)，故 TaqMan probe 的專一性相較於 SYBR Green 會更高一些。

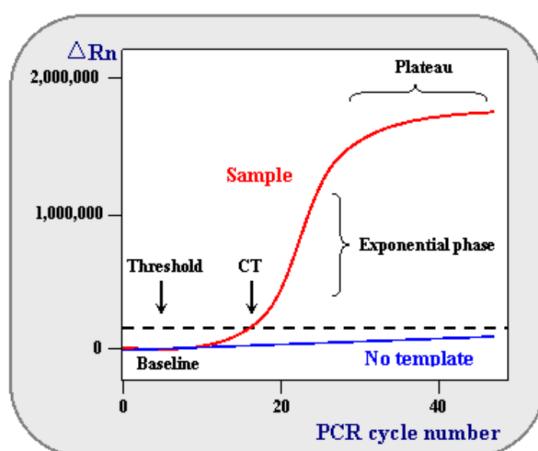


圖 2-6 qPCR 反應程序 (圖片來源：NCBI)

qPCR 分子生物技術的應用非常廣泛，在 Guimarães 等學者 2017 年的研究中，利用 qPCR 去分析各個氮相關功能性基因之定量，建立民生污水廠中好氧槽的微生物脫氮途徑 (Guimarães et al., 2017)，與本研究之概念類似。除此之外，此技術除了應用在環境樣品的檢測外，在 Postollec 等學者的研究中也將此技術應用至食品微生物學的定量上 (Postollec et al., 2011)，故 qPCR 為一項應用性非常廣的分子生物技術。

2.4.2 數位化核酸定量儀 (Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR)

dPCR 為第三代的 PCR 系統，其藉由稀釋樣本數後將樣品分配至上千或上萬個微小反應孔中，進行個別 PCR 反應後，最後再進行螢光偵測 (Wang et al., 2022)，反應示意圖如圖 2-7 所示，並且採用 PCR 終點檢測 (endpoint) 之方式，若此微小反應孔在反應結束時具有螢光訊號即判讀為陽性，若否則為陰性，再根據卜瓦松分布 (Poisson distribution) 原理進行統計分析，即可得出待測基因的濃度，因此不需仰賴標準品即可進行基因絕對定量。除此之外，由於 dPCR 是將樣品分割至多個獨立反應系統中，因此降低了背景訊號以及 PCR 抑制物對反應的干擾，故對 PCR 抑制物的耐受性提高許多。

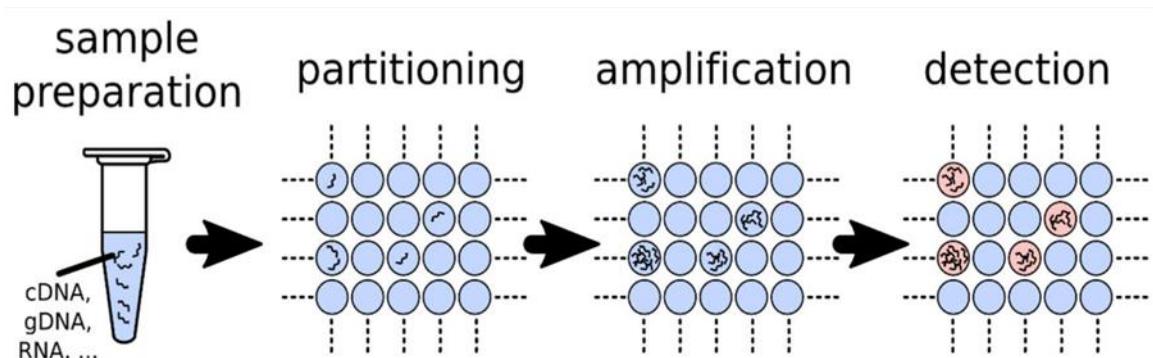


圖 2-7 dPCR 反應流程圖 (Quan et al., 2018)



由於 dPCR 為近幾年發展之分子生物技術，故相較於 qPCR，其目前的應用性尚未如此廣泛，在近幾年的研究中，由於 Coronavirus Disease (COVID) 的盛行，許多研究針對下水道系統或廢水處理廠進行 SARS-CoV-2 RNA 的檢驗 (Ahmed et al., 2022; Viveros et al., 2022)，確認其對人類生活的危害。而在 Kim 等學者在 2014 年的研究中，其同時利用 qPCR 以及 dPCR 進行土壤細菌的族群動態變化比較，研究顯示在可檢測的範圍內兩種方法皆有合適的表現，但當濃度較低時，dPCR 比 qPCR 高出 10 倍的靈敏度，表示 dPCR 在樣本濃度較低時較具應用性 (Kim et al., 2014)。最後，表 2-2 為 qPCR 以及 dPCR 的比較表格，由於 dPCR 克服了許多 qPCR 的侷限性，故在近幾年 dPCR 的使用愈來愈廣泛。

表 2-2 qPCR v.s. dPCR

(整理自 (Cao et al., 2020; Quan et al., 2018))

qPCR	dPCR
在每個 PCR 循環中測定複製效率	終端 PCR 在完全反應完成後偵測 PCR 結果
相對或絕對定量 需有標準品建立檢量線	絕對定量 不需建立檢量線 以統計分析測定絕對濃度
對 PCR 抑制物的耐受性較低	對 PCR 抑制物的耐受性較高
反應體積具彈性	需固定反應體積進行反應

第三章 材料與方法



3.1 實驗藥品與設備

3.1.1 實驗用藥品

表 3-1 實驗用藥品清單

藥品名稱 (中文)	藥品名稱 (英文)	廠牌	用途
酒精 (乙醇)	Alcohol, C ₂ H ₅ OH	友和	消毒用
氨氮指示劑	Mineral Stabilizer Polyvinyl Alcohol Dispersing Agent	HACH	氨氮分析
化學需氧量試劑	Nessler Reagent		COD 分析
陰離子儲備溶液	COD KIT	日澤	
丙酮	HPS IC-2-A 及 HPS IC-N-M	HPS	
碳酸鈉	Acetone, C ₃ H ₆ O	友和	
碳酸氫鈉	Na ₂ CO ₃	Nacalai Tesque	IC 分析
濃硫酸	NaHCO ₃	Nacalai Tesque	
鄰苯二甲酸氫鉀	H ₂ SO ₄	Honeywell	
硝酸鉀	Potassium hydrogen phthalate, KHP	Alfa aesar	
鹽酸	KNO ₃	友和	DOC/TN 分析
磷酸二氫鉀	Hydrochloric acid, HCl	J.T.Baker	
磷酸氫二鉀	KH ₂ PO ₄	Nacalai Tesque	SAA 活性測試
	K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	



凱氏氮分析

氯化胺	NH ₄ Cl	Merck	
硝酸鈉	NaNO ₂	Nacalai Tesque	
氫氧化鈉	Sodium hydroxide, NaOH	Nacalai Tesque	
麴胺酸	Glutamic acid	友和	
DNA 萃取套組	DNeasy PowerSoil Pro Kit	QIAGEN	萃取 DNA
SYBR® green 染劑	Fast SYBR® green master mix	Thermo Fisher	qPCR
EvaGreen 染劑	QIAcuity™ EG PCR Kit	QIAGEN	dPCR
DNA HS 測定試劑 套組	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher	定量 DNA 濃度

3.1.2 實驗室儀器與設備



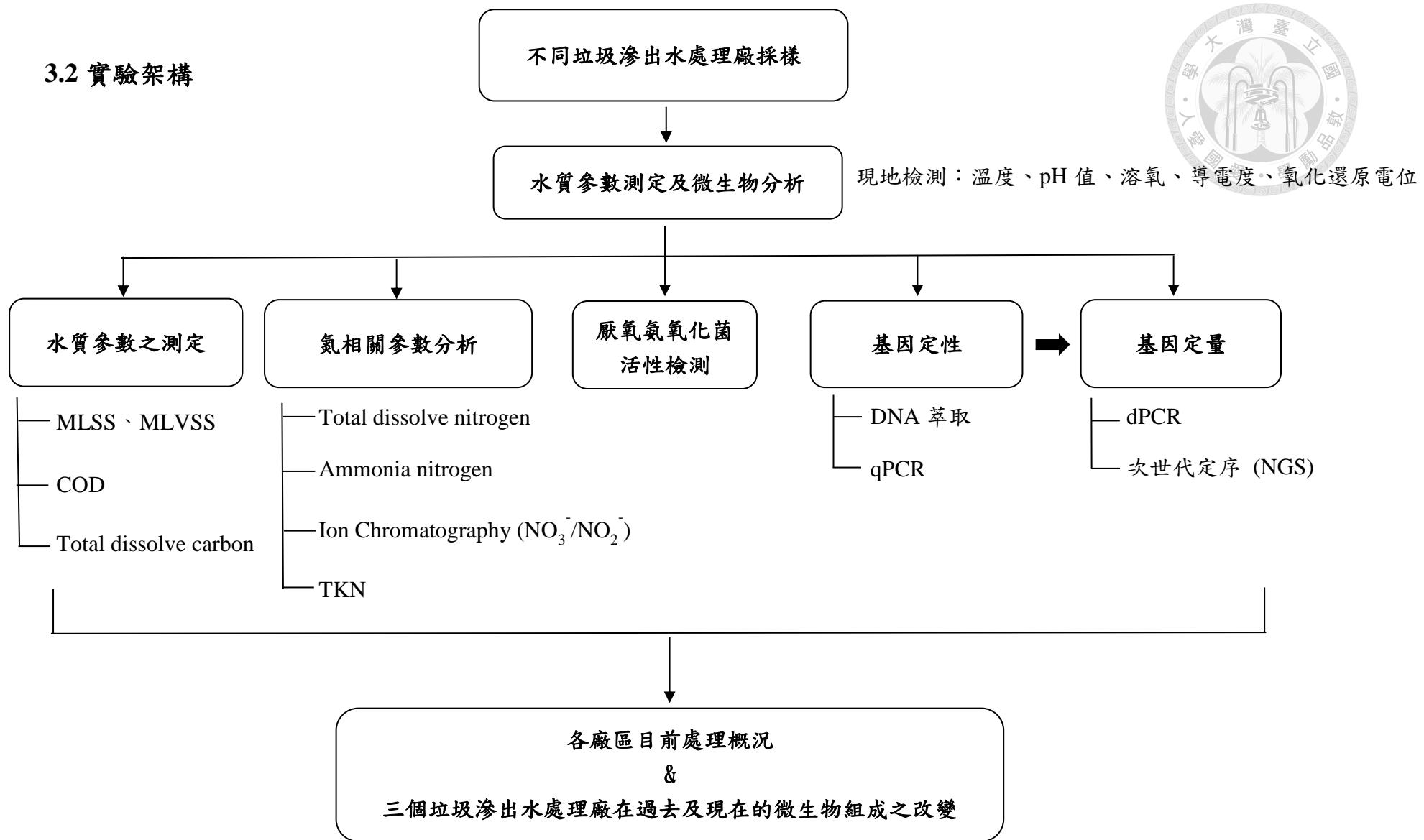
表 3-2 實驗儀器與設備清單

實驗設備	型號	製造商
電子天秤	ATX224	ATX224
電子天秤	Precisa	XS 225A-SCS
超音波振盪器	DC150H	Delta
抽氣櫃	訂製	章嘉
烘箱	6890N	AGILENT
高溫爐	JH-6	章嘉
分光光度計	DR3900	Hach
滅菌釜	FD50R	ZEALWAY
抽氣幫浦	300	Rocker
純水機	Milli-pore	Milli-Q
冷藏櫃	SC122	Azo
無菌操作台	JW-3N	LAIN-SHIN
電磁加熱攪拌器	CORNING	Stirrers/Hot Plate
超音波振盪器	Delta	DC150H
低溫冷凍櫃	LSC-20	Fridigaire
離心機	Universal320	Hettich
離心機	1236V	Centronix
qPCR	StepOnePlus™	Applied Biosystems

dPCR	QIAcuity One	QIAGEN
Qubit	2.0	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop	ND-1000	Thermo Fisher Scientific
陰離子層析儀	Eco IC	Metrohm
總有機碳分析儀	1080 TOC	O.I. Analytical
水質監測儀	HQ2200	HACH
掌上 ORP 計	MP103-3	EZDO
COD 加熱儀	CR25	ROCKER
凱氏氮消化爐	DT208	FOSS
凱氏氮蒸餾	Kjeltec 2100	FOSS



3.2 實驗架構





3.3 污水處理流程

3.3.1 採樣流程

本研究中所探討之 TWT 廠區是於民國 111 年 12 月初進行採樣；BL 廠區則於民國 111 年 12 月底以及民國 112 年 5 月初進行採樣；而 XF 廠區則是在民國 112 年 4 月初進行採樣。在採樣過程中使用廠區所提供之採樣器在樣品完全混合之情況下進行採樣（如圖 3-1 所示），並在採樣完成的當下以實驗室 HACH 水質檢測儀先測定溫度、pH 值、溶氧、導電度、氧化還原電位等水質參數，記錄採樣當下的水質狀態，利於後續的參數分析。採樣完成後先進行現場樣品的分裝，並於樣品分裝後，依照樣品瓶上之標籤說明，將需要的樣品先行進行加藥保存。最後再將樣品放置於有放置冰袋的冰桶中，維持運送途中的樣品保存方式，在採樣結束立即將樣品運送回實驗室進行後續分析。



圖 3-1 (a)採樣方式 (b)採樣現場

3.3.2 採樣完實驗室前處理

在將樣品運送回實驗室後，由於後續將進行多項的水質項目檢測，故須先將樣品進行下列之前處理事項，避免樣品後續測定之誤差。由於本實驗所採樣之水樣皆屬於 MLSS 濃度較高之樣品，故會先進行離心將污泥先去除，剩餘的上層液再分別以 $0.45 \mu\text{m}$ 以及 $0.22 \mu\text{m}$ 的親水性針筒過濾器進行過濾，分別將過完 $0.45 \mu\text{m}$ 以及 $0.22 \mu\text{m}$ 之水樣保存於 4°C 冷藏中，並在各項檢測水質項目規定之檢測時間內檢測完畢。



3.4 水質分析方法

3.4.1 混合液懸浮固體 (Mixed liquor suspended solids, MLSS) 及揮發性懸浮固體 (Mixed Liquor Volatile Suspended Solids, MLVSS) 分析

MLSS 和 MLVSS 是兩個重要的參數，其可用於評估污水處理系統的運行狀態和處理效果。MLSS 代表在污水處理廠的活性污泥中，以懸浮的形式存在的固體物質的含量，其包括有機物、生物顆粒、微生物和其他污染物等，可用來判定活性污泥系統運行的重要參數之一；而 MLVSS 代表在活性污泥中以懸浮的形式存在的可揮發性固體物質的含量，其中包括微生物量，可作為微生物含量的重要指標，MLVSS 的高低與污水處理廠的處理效果較相關，較高的 MLVSS 值表示有足夠的微生物量來處理污水中的有機物，從而提高有機物的去除效率。

本方法參考環檢所公告之標準方法-水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法—103~105°C 乾燥 (NIEA W210.58A) 以及污泥廢棄物中總固體、固定性及揮發性固體含量檢測方法 (NIEA R212.02C) 進行測定，由於水樣為垃圾滲出水廠之處理廢水，本方法使用 $1\mu\text{m}$ 的玻璃纖維濾紙測定，實驗步驟如下：

- (1) 將濾紙皺面朝上放置於過濾裝置上，以約 20 ml 試劑水沖洗 3 次後，持續抽氣至水分完全去除，並將濾紙放置於蒸發皿中。
- (2) 將蒸發皿移入 103~105°C 烘箱中烘乾一小時後，取出冷卻並秤重，重複此步驟待其恆重 (兩次重量差需小於 0.5 mg)。並記錄蒸發皿前重。
- (3) 將濾紙取出並以皺面朝上置於過濾裝置上，取適量之混合水樣倒入過濾，並以超純水沖洗濾杯壁邊，等待水分抽乾後將濾紙放回蒸發皿。
- (4) 重複步驟 2，並紀錄為蒸發皿後重。
- (5) 將蒸發皿後重減去前重，並除以溶液體積，即為 MLSS 濃度。
- (6) 將測定完 MLSS 之蒸發皿放置於 $550 \pm 25^\circ\text{C}$ 之高溫爐中，步驟如同步驟 2 所示，待其恆重。



- (7) 將 MLSS 測得之蒸發皿後重減去樣品經高溫爐燃燒後之重量，並除以溶液體積即可求得 MLVSS 濃度。

3.4.2 氨氮分析-納氏比色法

納氏比色法之原理為在強鹼性的環境中，碘化汞和碘化鉀會與氨反應生成淡棕色的產物，且溶液顏色與氨氮濃度呈正相關，其通常在波長 420~425 nm 範圍下測定其吸光度，進而推算出濃度範圍。本實驗是使用 HACH 之商用納氏試劑組合，組合包含納氏試劑、聚乙烯醇分散劑以及礦物穩定劑三種，並使用 Hach Method 8038 (380N, Ammonia, 濃度範圍：0.02~2.50 mg/L NH₃-N) 進行分光測試，實驗步驟如下：

- (1) 水樣須以 0.45 μm 的針筒過濾器進行過濾，確保污水中的雜質不影響分光測定。
- (2) 將水樣稀釋至檢測之濃度範圍內，並將體積定量為 25 ml。
- (3) 將稀釋完之樣品依序加入 3 滴聚乙烯醇分散劑、3 滴礦物穩定劑、1 mL 納氏試劑，搖晃均勻後反應呈色 1 min。
- (4) 點選分光光度計中 Hach Method 8038 (380 N, Ammonia) 測量 422 nm 下之吸光度值，儀器顯示之數值已自動換算成 NH₃-N 濃度 (mg/L)。



3.4.3 化學需氧量 (Chemical oxygen demand, COD) 分析

為了測定各廠區有機物濃度的變化，本研究以 HACH 市售之 COD Kit 進行測定，其原理為在重鉻酸鉀（氧化劑）、硫酸銀（催化劑）以及濃硫酸之混合液中加入水樣進行加熱，加熱至 150°C 的過程中，鉻離子會從 6 價鉻被還原成 3 價鉻而變色，其中顏色的改變與樣品中的有機物含量成對應關係，以分光光度計測定在 620 nm 的吸光值，進而可推算出樣品的化學需氧量。本研究所測定之 COD 分為 Total COD (TCOD) 以及 Soluble COD (SCOD)，TCOD 為原水樣的上澄液，其測量的是水體中的所有有機物的氧化需氧量，SCOD 為以 0.45 μm 的針筒過濾器進行過濾後之水樣，通常用於衡量水體中容易被氧化劑快速分解的有機物的含量，這些有機物容易受到生物處理的影響。實驗步驟如下：

- (1) 將水樣直接加入市售之套組中，並將最終體積定量為 2 ml。確保濃度落在檢測之濃度範圍內 (20~1500 mg/L)。
- (2) 放置於抽風櫃內的 COD 加熱爐上加熱，在加熱前務必先將底部的沉澱物搖晃均勻至消失。
- (3) 反應結束後放置室溫冷卻。
- (4) 點選分光光度計中 Hach Method 435 (COD HR) 測量吸光度值，儀器顯示之數值已自動換算成 COD 濃度 (mg/L)。

3.4.4 硝酸根及亞硝酸根分析

本研究使用 Metrohm 公司的 Eco IC 離子層析套組進行測定，儀器如圖 3-2，套組內包含自動進樣器以及陰離子層析管柱 Metrosep A Supp 17-100/4.0。離子層析儀的原理為在裝有離子交換樹脂的層析管柱，利用不同離子與管柱間的親和力差異導致有不同的停留時間 (retention time)。分離後之陰離子再經抑制裝置轉換成高導電度的酸，而移動相將不同離子進行分離。最後再藉由測定導電度偵測訊號，即可從圖譜中的停留時間與波峰面積進行離子的定量及定性分析。本實驗所測定的



亞硝酸根以及硝酸根停留時間分別約為 5.85 及 8.46 min。

本方法參考環檢所標準方法：水中陰離子檢測方法—離子層析法 (NIEA W415.54B)，標準液採用市售之儲備溶液 HPS IC-2-A 以及 HPS IC-N-M，儲備溶液之內容物分別包含氟離子、氯離子、溴離子、亞硝酸根、硫酸根、磷酸根離子以及硝酸根各 1000 mg/L，並檢量線配製 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L，分析時間 21 分鐘。以 5 M Na₂CO₃ 及 0.2 mM NaHCO₃ 作為流洗液以及 0.1 M H₂SO₄ 作為再生液。水樣採集後皆須經過 0.22 μm 的針筒過濾器進行過濾，以保護管柱。過濾之樣品若未能及時分析，須保存於 4°C，並於 2 日內分析完成。



圖 3-2 Eco IC 離子層析套組

3.4.5 溶解性有機碳 (Dissolved organic carbon, DOC) 及總氮 (Total nitrogen, TN) 分析

本研究參考環檢所標準方法—水中總有機碳檢測方法—燃燒/紅外線測定法 (NIEA W530.51C)，採用 O.I. Analytical 公司，型號 1088TOC 的總有機碳分析儀並以模式 1088TNB 進行分析，其實驗原理將樣品先經過 1 M 鹽酸酸化、混和以



及吹掃將水中之無機碳 (TIC) 去除，樣品中剩餘之有機碳再經過高溫燃燒後完全氧化成 CO_2 ，藉由固態非色散性紅外線偵測器 (SS-NDIR) 偵測 CO_2 訊號來定量水樣中的溶解性有機碳含量。而總溶解氮分析同樣以總有機碳分析儀，模式 1088TNB 進行分析，儀器如圖 3-3。藉由串聯的氮和碳選擇性偵測器能同時偵測 DOC 及 TN 濃度，在 720°C 的高溫燃燒下，將樣品中的碳化合物氧化成 CO_2 ，而含氮化合物則氧化成 NO，並以氧氣作為載流氣體，先以固態非色散紅外線偵測器 (SS-NDIR) 偵測總碳濃度，然後再進入電化學檢測器偵測 TN 濃度，達到同時檢測總溶解碳以及總氮之目的。

總溶解性有機碳以及總氮之標準品分別以鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium hydrogen phthalate, KHP) 以及硝酸鈉，經 105°C 烘乾至恆重後，配製成 1000 mg/L 儲備溶液，並放置 4°C 保存。為了確保每次上機時儀器之誤差，每次上機皆須配製檢量線進行校正，檢量線配製濃度為 0.5 mg/L 、 1 mg/L 、 2 mg/L 、 6 mg/L 、 10 mg/L 、 20 mg/L ，上機分析之樣品皆須經過 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的針筒過濾器進行過濾，以保護管柱，並於一週內完成實驗分析。



圖 3-3 總有機碳分析儀



3.4.6 凱氏氮分析

本方法依據環檢所標準方法一水中凱氏氮檢測方法 (NIEA W451.51A)，由於凱氏氮為水中氨氮以及有機氮之總和，本研究為了更進一步瞭解處理水中氮相關之含量，藉由測定凱氏氮以及前述測定之氨氮，可進一步得到有機氮之濃度，進而分析不同種類氮之組成。凱氏氮測定包含消化以及蒸餾兩部分，藉由將凱氏消化片、濃硫酸以及含氮之有機化合物共同加熱至 380°C , 3 小時，使處理廢水中的有機氮分解轉換成 NH_4^+ ，再經由添加氫氧化鈉進行加熱蒸餾後， NH_4^+ 遇到鹼液即會轉變成氨氣 (NH_3)，最後再經過冷凝將所有氨氣溶於硫酸吸收液中，即可進行凱氏氮之定量，儀器如圖 3-4。實驗步驟如下：

- (1) 消化管應先以試劑水潤洗過，並放置晾乾。
- (2) 將水樣稀釋至適當倍率後，定量至 30 ml。
- (3) 依序加入 FOSS 催化片 1 片、10 顆沸石以及 10 ml 濃硫酸，並小心搖晃均勻，即可將消化管置於消化裝置上進行 380°C 加熱消化。
- (4) 消化過程中，須每小時確認水樣沒有被燒乾。
- (5) 消化至水樣清澈即為消化完成。
- (6) 將消化完之樣品定量至 50 ml 後，接收瓶放置 0.02 M, 50 ml 的硫酸吸收液，以儀器自動添加之模式加入 40 ml 氫氧化鈉，並進行蒸餾 6 min。
- (7) 將蒸餾後之蒸餾液稀釋定量至 250 ml，即可依照前述氮氮測定方法進行凱氏氮濃度的測定。

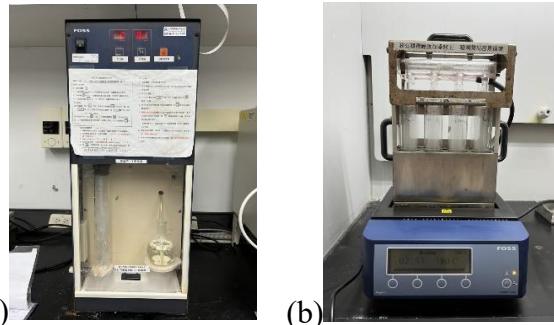


圖 3-4 凱氏氮儀器(a)蒸餾 (b)消化

3.5 分子生物技術

3.5.1 去氧核醣核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 萃取

本研究萃取反應槽中之污泥以了解各相關氮功能基因之組成，此外，也將利用次世代定序更進一步了解廢水中的群落組成。本方法使用 QIAGEN 的市售套組 DNeasy PowerSoil Pro Kit，並依照手冊提供之步驟進行萃取，此方法利用一系列的離心、過濾以去除雜質且純化，最後再將 DNA 洗脫即可完成萃取，過程中所使用之容器皆為套組內附贈。實驗步驟如下：

- (1) 將 Power Bead Tubes 稍微離心，確認顆粒位於底部。取 0.25 g 污泥置於 Power Bead Tubes 中，並添加 800 μ L Solution CD1 後水平固定於震盪器上，以最大震盪速度震盪 10 分鐘。
- (2) 以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (3) 將 600 μ L 上澄液移至 2 mL 離心管中，並添加 200 μ L Solution CD2，震盪 5 秒鐘。
- (4) 以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (5) 將上澄液 700 μ L 移至新的 2 mL 離心管中，並添加 600 μ L Solution CD3，震盪 5 秒鐘。
- (6) 吸 650 μ L 溶液至 MB Spin Column，並以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (7) 廢棄過濾液並重複步驟 6，確保全數溶液都通過 MB Spin Column。



- (8) 小心將 MB Spin Column 放置於 2 mL Collection Tube 中，並避免任何過濾液回濺至 MB Spin Column。
- (9) 添加 500 μ L Solution EA 至 MB Spin Column，並以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (10) 廢棄過濾液並將 MB Spin Column 放置於原本的 2 mL Collection Tube 中。
- (11) 添加 500 μ L Solution C5 至 MB Spin Column，並以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (12) 廢棄過濾液並將 MB Spin Column 放置於新的 2 mL Collection Tube 中。
- (13) 以高轉速 (16000 g) 離心 2 分鐘，將 MB Spin Column 放在 1.5 mL Elution Tube。
- (14) 添加 50 μ L Solution C6 至白色濾膜的中心點，以高轉速 (15000g) 離心 1 分鐘。
- (15) 廢棄 MB Spin Column，下方濾液即為 DNA 的萃取樣本，DNA 萃取樣本須保存在-20°C以利後續檢測。

分別將萃取完成之萃取液進行 Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific) 以及 Qubit 2.0 Fluorometer 定量濃度，Nanodrop 測量是利用核酸的紫外吸收特性，檢驗項目包含 A260、A230、A280 以及 DNA 的紫外外吸收光譜，其數值分別為雙股 DNA、鹽類及碳水化合物、蛋白質之吸光波長，故藉由 Nanodrop 可以進一步確認萃取液之品質及濃度；而 Qubit 則是採用螢光染料法進行測定。這些螢光染料可以特異地與不同種類的核酸相結合，並且在特定波長光源的激發下發出螢光。由於 Nanodrop 無法區分 DNA 以及 RNA，且在濃度過高或過低時，數值可能會有些許偏差，因此與 Qubit 相比，Qubit 所測得的濃度會相較準確，因此後續會主要以 Qubit 測得的濃度數據做為主要參考依據。

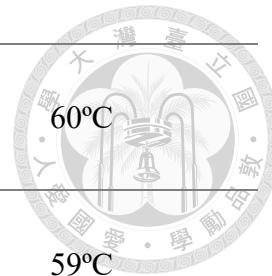


3.5.2 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

本研究採用 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) (圖 3-5) 即時定量聚合酶連鎖反應先進行功能性基因之定性及初步定量分析，利用 qPCR 所得之 Ct 值推估後續微滴式數字聚合酶連鎖反應 (dPCR) 的上機稀釋倍率，此外，也將藉由 qPCR 的 melting curve 確認引子的專一性以及建立不同引子適合的升降溫參數，以利於後續檢測微滴式數字聚合酶連鎖反應。本研究所使用之引子序列如表 3-3，反應總體積為 10 μ L，引子最終濃度為 0.2 μ M，配製試劑體積如表 3-4，並將其配在 0.1 ml qPCR 八連排霧管（光學蓋）中上機分析，反應參數如表 3-5 所示。

表 3-3 qPCR 及 dPCR primer 序列及 annealing temperature

引子名稱 (明欣生物科技)	序列 (5'端到 3'端)	annealing temperature (Ta)
amoA_F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	59°C
amoA_R	CCCTCBGSAAAVCCTCTTC	
nxrB_F	TGTGGTGGAACAAACGTGGAA	56°C
nxrB_R	CCCGGCATCGAAAATGGTCA	
narG_F	TAYGTSGGGCAGGARAACTG	61°C
narG_R	CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT	
nirK_F	ATYGGCGGVCAYGCGA	60°C
nirK_R	GCCTCGATCAGRTTRTGGTT	
nosZ_F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	60°C
nosZ_R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	



Bac_F	ATGGYTGTCGTCAGCT
Bac_R	ACGGGGCGGTGTGTAC
Hzo_F	TGYAAGACYTGYCAYTGG
Hzo_R	ACTCCAGATRGCTGACC
comamoA_F	GGATTCTGGNTSGATTGGA
comamoA_R	WAGTTNGACCACCASTACCA

表 3-4 qPCR 試劑比例

添加項目	添加量 (uL)
5 mM Forward Primer	0.4 (Final conc.= 0.2 uM)
5 mM Reverse Primer	0.4 (Final conc.= 0.2 uM)
2X FAST SYBR MASTER MIX	5
ddH₂O	3.2
DNA	1
total volume = 10uL	

表 3-5 qPCR 反應設定

qPCR 反應階段	溫度，時間
Initial	95°C , 10 min
denaturation	
Denaturation	95°C , 15 s
Annealing	Ta , 15 s
	40 cycles
Extention	72°C , 15 s
Melt curve	60°C to 95°C increment 0.3°C



圖 3-5 (a) StepOnePlus Real-Time PCR System (b)八連排反應位置

3.5.3 數位化核酸定量儀 (Droplet digital polymerase chain reaction, dPCR)

當確認完引子的專一性以及升降溫模式後，以 qPCR 求得的 Ct 值可作為 dPCR 上機稀釋倍率參考，本研究使用 QIAcuity digital PCR system (QIAcuity One, QIAGEN, Germany) 進行分析，儀器如圖 3-6(a)，採用 dPCR 進行功能性基因的定量分析。本研究利用 8.5k, 24 孔之 Nanoplate 透過將樣品分割 (partition) 的方式形成大約 8500 個獨立的反應個體，加入螢光染劑 QIAcuity EG PCR Kit 與 DNA 進行反應，在反應結束時對每個獨立個體進行螢光反應之監測，若有螢光訊號表示該檢測基因有被擴增成功，附圖 2 為反應最終進行拍照估算陽性反應點的示意圖，將亮點數量進行卜瓦松分布 (Poisson distribution)，進而計算出目標基因的絕對濃度，而附圖 3 則為反應後 partition 分布圖，可透過此分布圖調整至適當之閾值。

本研究將針對各種與氮相關之基因進行定量，包含硝化基因 - *amoA*、*nxrB*，脫硝基因 - *narG*、*nirK*、*nosZ*，以及厭氧氨氧化菌功能性基因 *hzo* 與總細菌 16S rRNA 基因，以上基因序列如表 3-3 所示。在 0.1 mL 的 qPCR 八連排反應管中配製實驗總體積 12 uL，引子最終濃度為 0.4 uM，DNA 萃取液則依照 qPCR 的 Ct 值適當稀釋後添加 3 uL 進行反應，配製完後須先將內部氣泡去除並離心，最後再

將總體積 12 uL 的反應試劑吸至 8.5k, 24 well 的 nanoplate 中（圖 3-6(b)），並以封膜封上，上機進行分析。試劑個別添加量如表 3-6 所示。除此之外，各基因之反應參數則依照其 Annealing temperature 的不同進行設定，反應參數如表 3-7 所示。

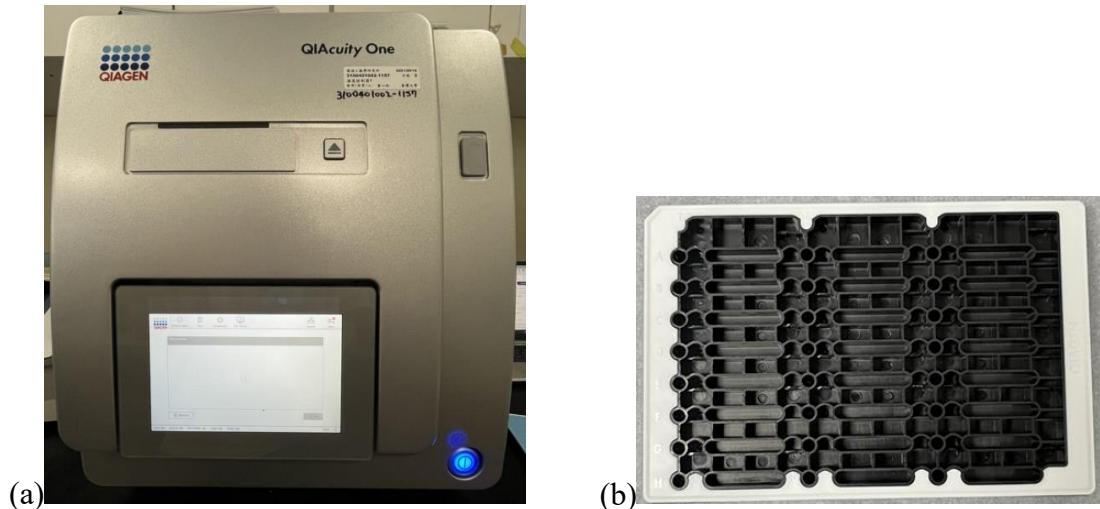


圖 3-6 (a)QIAcuity digital PCR system (b)8.5k, 24 well Nanoplate

表 3-6 dPCR 試劑比例

添加項目	添加量 (uL)
10 mM Forward Primer	0.48 (Final conc.= 0.4 uM)
10 mM Reverse Primer	0.48 (Final conc.= 0.4 uM)
3x Eva Green	4
DNA	3
ddH₂O	4.04
total volume = 12uL	



表 3-7 dPCR 反應設定

dPCR 反應階段	溫度，時間
Initial denaturation	95°C，2 min
Denaturation	95°C，15 s
Annealing	Ta，30 s
	40 cycles
Extention	72°C，15 s
Cooling down	40°C，5 min

3.5.4 基因選殖 (Gene cloning)

本研究委託明欣生物科技進行基因選殖 (Gene cloning)，由於基因選殖的目的是為了更方便進行基因表現之研究以及更利於後續實驗之保存，故將從生物體的 DNA 中擴增出目標基因之片段，選殖至合適之載體，並進一步轉殖至合適的宿主。本研究中所使用的 *hzo* 引子對會針對樣品進行基因選殖，一方面進行厭氧氨氧化菌基因之專一性確認，另一方面也可作為後續研究人員的標準品進行保存。實驗步驟如下：首先利用 5-1 節萃取好的 genomic DNA 進行目標基因片段的擴增，利用跑膠確認擴增之片段是否正確 (*hzo* amplicon:471bp)，接著再進行標的基因選殖，此部分選殖之載體為明欣生物科技所提供的 yT&A，將目標 DNA 片段和載體 DNA 片段進行連接，形成重組 DNA 後，將重組 DNA 輽體導入宿主細胞，並利用 Sanger sequencing 確認選殖基因序列的正確性 (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer)，最後會取得廠商之提供的目標基因殖體 DNA 以及定序結果。



3.6 比厭氧氨氧化活性測試

本研究參考過去研究所發表之實驗方法 (Huynh et al., 2019; Ismai et al., 2021)，以批次實驗的方式進行比厭氧氨氧化活性測試 (Specific Anammox Activity tests, SAA tests)。由於污泥中具有厭氧氨氧化菌，在不具有有機物且厭氧環境下，厭氧氨氧化反應會消耗槽體中的氨氮以及亞硝酸根基質，且兩者會成一定比例的消耗，可推測厭氧氨氧化之活性。本實驗以總體積為 116 ml 的厭氧瓶進行試驗，污泥於實驗前須先以經過 95%Ar-5%CO₂ 混合氣體預曝氣 20 分鐘以上之磷酸鹽緩衝溶液去除水中溶氧，並將實驗用污泥以磷酸鹽緩衝溶液進行清洗、離心及再懸浮至總體積 116 ml 共三次，使原污泥中的含氮物質去除，最後再各別加入含氮化合物基質 NH₄Cl (2500 mg/L), 13 ml 以及 NaNO₂ (2500 mg/L), 16.67 ml，培養基成分如表 3-8 所示，使瓶內 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 濃度為 100 mg-N/L。最後在瓶口覆蓋橡皮上蓋，並以鋁環固定，再以氮氣混和氣體曝氣 10 分鐘，置換頂部之氣體，即完成實驗架設。將配製完成之厭氧瓶以轉速 150 rpm 下培養，並在固定時間內以滅菌之針筒進行採樣，測定氨氮、亞硝酸根、硝酸根以及總溶解氮等項目，實驗檢測方法如 3.4.2、3.4.4、3.4.6 小節。

表 3-8 比厭氧氨氧化活性測試培養基

活性測試培養基	
NH ₄ Cl	2500 mg/L
NaNO ₂	2500 mg/L
KH ₂ PO ₄	0.14 g/L
K ₂ HPO ₄	0.75 g/L
NaHCO ₃	0.5 g/L



3.7 次世代定序分析 (Next Generation Sequencing, NGS)

本實驗將各廠區的反應槽污泥以 3.5.1 小節中的方式進行 DNA 的萃取，並委託基龍米克斯生技公司進行微生物組的生物資訊分析以及次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS)，定序流程如圖 3-7，利用 Illumina 高通量定序技術針對 16S rRNA 基因的 V3–V4 片段進行定序，在取得複雜的族群樣本之後以 PCR 方式進行 16S 變異區域進行放大並且建庫定序，根據其序列變異和豐富度，以達到菌相分類之目的。在送樣分析前須先以 Nanodrop 或是 Qubit 確認樣品 DNA 量是否足夠，此外也可藉由 Nanodrop 的 A260、A280 數值進一步判斷 DNA 萃取的品質，若上述皆符合廠商規定之標準才可送樣。

次世代定序的原理為將 DNA 片段變成大量短片段後再拼回去，藉由大量而快速短序列片段 (Short Reads) 的定序方式，在短時間內能有效增加比對數減少錯誤率，這也是其優勢之一，本研究使用之 Illumina 高通量定序法主要是針對 16S V3–V4 區域，引子 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 以及 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')，先進行 PCR 聚合酶連鎖反應，並進行電泳的定性分析後，確認產物並且純化，利用 Illumina MiSeq 系統將待測核酸切成小片段，並於片段兩端接上 Adapter，透過橋式聚合酶連鎖反應進行 DNA 複製，放大訊號，在此過程中也同時加入不同已標記特定可移除螢光分子之鹼基 (dNTP) 及反應試劑後，藉由反覆進行螢光移除及偵測，達到高速且大量的 DNA 定序。最終之定序結果以 QIIME 軟體以及 SILVA2-5 之數據庫進行分析整理，以 OUT 之分類探討不同廠區的微生物群落組成關係。

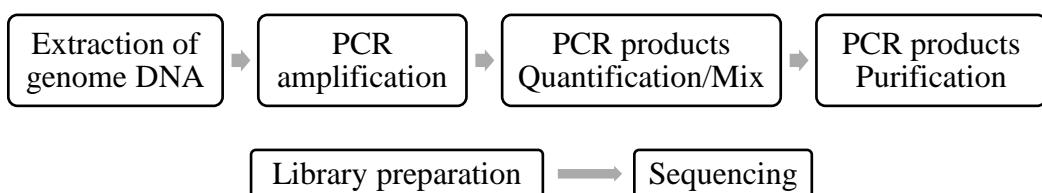


圖 3-7 次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 流程

第四章 結果與討論



4.1 厥氧氣氧化菌基因選殖結果

由於在厥氧氣氧化反應中的控制酵素主要為 *hzs* 以及 *hzo*，在 2.3.3 小節中有介紹過兩個基因之差異，由於 *hzo* 是第一個用於檢測厥氧氣氧化細菌的功能基因，且在過去也使用過許多不同引物組去檢測不同環境樣品，例如：沿海和深海沉積物 (Dang et al., 2010)、污水處理廠 (Quan et al., 2008) 以及紅樹林沉積物 (Li et al., 2011) 等。這些研究結果皆表明 *hzo* 基因為研究自然環境中厥氧氣氧化細菌可靠的生物標記，加上本研究所欲探討之三個廠區在過去皆有相同之植種來源，故在引子對的選擇上先確認適合應用於本研究後，並將之使用在三廠的厥氧氣氧化菌測定上。

本研究利用 BL 廠之污泥樣品進行目標基因的擴增以及基因克隆，將樣品委託明欣生物科技公司進行基因選殖，並將明欣生物科技克隆測序完之序列以美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 進行基因序列之比對，以 Total score、identity 以及 Query coverage 皆為最高分數做為比對結果，比對結果如圖 4-1(a)。除此之外，為了更進一步比對其相對基因，將定序完的基因位置對應至 whole genome 可以確認該基因為 *hdh* (如圖 4-1(b))，如 2.3.3 節介紹，*hdh* 與 *hzo* 相同，因此確定此引子對正確且專一性足夠。在比對結果中可以得知該基因在此條件下比對出對應的菌種為 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*，根據 Egli 等學者在 2001 年的研究也指出 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 多在鹽度較低抑或是污水處理廠中被發現 (Egli et al., 2001)，因此在本研究中所測得的厥氧氣氧化菌可以初步先確認與過去文獻所述相呼應。

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis strain CSTR1 chromosome, complete genome	Candidatus Ku...	865	1714	100%	0.0	99.79%	4334932	CP049055.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis isolate kuenenia_mbr1_ru-nijmegen genome assembly, chromosome 1	Candidatus Ku...	865	1719	100%	0.0	99.79%	4406153	LT934425.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Planctomycetota bacterium clone CMC-H2-C1 hydrazine oxidase (hzo) gene, partial cds	uncultured Plan...	865	865	100%	0.0	99.79%	471	KT895601.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured planctomycete clone WW_ANA_02 hydrazine oxidase (hzo) gene, partial cds	uncultured Plan...	865	865	100%	0.0	99.79%	682	JQ822938.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured planctomycete clone WW_H4F_06 hydrazine oxidase (hzo) gene, partial cds	uncultured Plan...	865	865	100%	0.0	99.79%	555	JQ822934.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured planctomycete clone WW_H4F_01 hydrazine oxidase (hzo) gene, partial cds	uncultured Plan...	865	865	100%	0.0	99.79%	591	JQ822929.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Kuenenia stuttgartiensis genome fragment KUST_D (4 of 5)	Candidatus Ku...	865	865	100%	0.0	99.79%	896449	CT573072.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured planctomycete clone WW_ANA_10 hydrazine oxidase (hzo) gene, partial cds	uncultured Plan...	854	854	100%	0.0	99.36%	597	JQ822946.1
(a)	Kuenenia stuttgartiensis genome fragment KUST_C (3 of 5)	Candidatus Ku...	854	854	100%	0.0	99.36%	893329	CT573073.1

(b)

```

gene complement(1072768..1074501)
/gene="hdh"
/locus_tag="KsCSTR_11820"
complement(1072768..1074501)
/CDS
/gene="hdh"
/locus_tag="KsCSTR_11820"
/EC_number="1.7.2.8"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hydrazine dehydrogenase"
/protein_id="QII10561.1"
/translation="MRKFLKVTLASALIGCGVIGTVSSLMVKEAKAVEIITHWVPHEV
YGMPGEPDNGKVFFSGLKAKYMGYPKDAQRSPYPGKYSKFWKTLPAYRYYIPDYM
RDEVRPSNPIKGTFKLEQCVACHSVMTPGIVRDYNKSAHSKAEPAPTGC
DTCHGNHQ
KLTMPSSKACGTAECHETQYNEQQGGIGSHASCSSFAQVECAWSIERPPGDTAG
CTF
CHTSPEERCSTCHQRHQFDPAVARRSEQCKTCHWGKDHRDWEAYDIGLHGT
VYQVN
DTEQFDFSKLSDADYVGPTCQYCHMRGGHHNVQRASIVYTS
MGMSMADRGAPLWKEK
RDRWVSICDDCHSPRFARENQAMDESVKDASLKYRETFKVAEDLLIDGVLDPM
PKDL
CPDWSGQHIWSLKIGAYHDGEAYGGKTGESGEFRMSNVTDVERLCFESVG
YFQTYIYK
GMAHGSWNDATYSDGSFGMDRWLNVKQN
ASRARRLALEKKVGISWQPEQFWKTGEW
LDQLTGPYIVKNHPGKTIFDLC
PDPGWLDTHHAPAAEVEYIERKLKELGMEAGTHDVK
QDSESKSVREH"

```

圖 4-1 NCBI 基因序列比對結果 (a)序列比對結果 (b)基因比對結果



4.2 廢區污水處理性能及背景

4.2.1 廢區處理背景

在本研究中，選定了三個目標垃圾滲出水處理廠進行探討，此三廠後續將以 TWT、BL 以及 XF 作為代稱，在各廠區中，若有採集不同污水處理位點的樣品，例如：好氧槽以及缺氧槽，則會在廠區名稱後方分別再以 O 跟 A 作為代稱，廠區處理流程及採樣位置如圖 4-2 所示。選定的三個廠區中，其中 TWT 為首個被發現具有厭氧氨氧化菌的垃圾滲出水處理廠 (Wang et al., 2010)，也因為厭氧氨氧化反應具備許多優點，為了使其更廣泛應用，在 2010 年時，將 TWT 廢區的部分厭氧氨氧化顆粒污泥植種至 BL 以及 XF 廢，並且在植種後六個月內成功形成肉眼可見的厭氧氨氧化顆粒 (Wang et al., 2010; Yang et al., 2020)。由於這三個廠區在過去約 10 年前皆有發現或額外植種過厭氧氨氧化菌的經歷，故在本研究中，希望更進一步的了解在經過約 10 年的時間中，各廠區的水質參數是否有變動，將過去以及現在的狀況進行比較，同時也將更進一步探討目前處理廠中的水質與氮循環之間的關係。

➤ TWT

TWT 垃圾滲出水處理廠於民國 83 年特別設立來處置 TWT 垃圾掩埋場之滲出水，避免環境水體的污染，提升人民生活品質。除此之外，TWT 廢最著名的則是該廠為第一個被發現具有厭氧氨氧化菌株之廠區 (Wang et al., 2010)，廠區污水處理方式採用 A/O 處理流程，利用在 A 段進行脫氮除磷，O 段則主要去除水中的有機物含量，進而達到同時去氮又去除有機物。此廠區初期僅處理經垃圾掩埋所產生之滲濾液 (Meng et al., 2021)，但於民國 110 年 4 月起配合政府政策增加水肥之投入 (資料來源：廠區資料)，故在此後垃圾掩埋之滲出水、垃圾洗車廢水、水肥以及廚餘桶清洗廢水皆以會集中收集後再進行生物處理反應，最後納管至和平島污水廠進行處理。

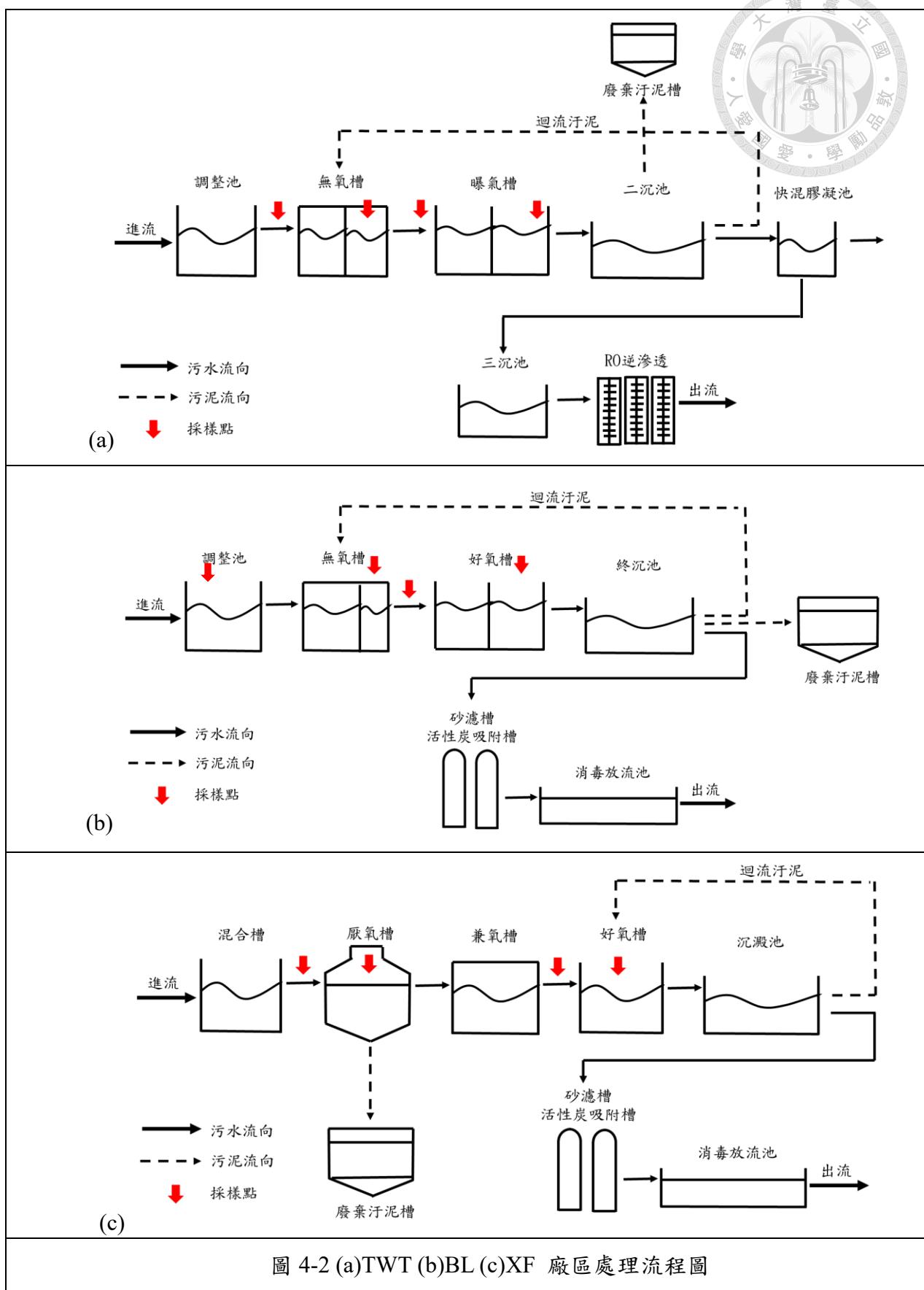


➤ BL

BL 垃圾滲出水處理廠之處理流程與 TWT 廠區相同，同樣利用 A/O 處理流程進行垃圾滲出水處置，採用間歇式曝氣，但 BL 廠的待處理水體與 TWT 廠區不同，水體組成不包含水肥，主要以垃圾掩埋場的滲出水為主，包含少量由腐植土場產生之滲出水，且在近幾年由於排放水體管制標準加嚴，廠區有額外添加甲醇作為額外碳源促進反應槽之運作，故在待處理廢水的組成上具有較大的差異。利於後續的探討。

➤ XF

XF 廠區於民國 99 年底開始運作，廠區處理流程採用 A₂O 方式，在 AO 的基礎上增加了無氧階段，無氧環境更利於脫硝反應，從廢水中去除氮氣污染物，提升效益。此廠區在建廠至今處理水體的組成皆包含水肥的投入，但在初期廢水組成仍以垃圾滲出水為大宗，水肥占少數，但於近幾年水肥處理需求量的提升，水肥占比逐漸提高，單日投入最大量達到 56 號（資料來源：廠區資料），大量的水肥投入是否造成水質組成或特性改變，本研究希望藉此探討三廠反應槽之差異。





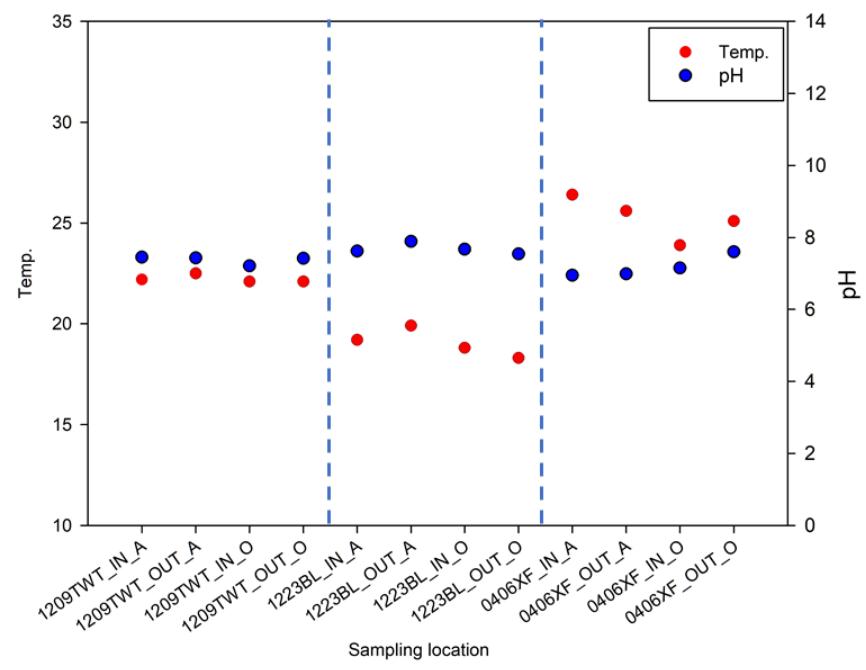
4.2.2 廠區採樣及基本水質分析（溫度/pH 值/溶氧/導電度/ORP）

本研究將針對 4.1.1 節所述之三個垃圾滲出水處理廠的水質以及氮相關功能性基因的定量進行探討，選定控制硝化作用之基因 *amoA*、*nxrB*，脫硝基因 *narG*、*nirK*、*nosZ*，以及 16S rRNA 基因進行定量，本研究採樣點包含三個廠區的缺氧槽及好氧槽進行探討，採樣點參考圖 4-2。在現場採樣後即會馬上以實驗室水質分析儀測定樣品的溫度、pH 值、溶氧、導電度以及氧化還原電位，測定結果參考圖 4-3。

在溫度的測定上，由於 TWT 以及 BL 廠區採樣時間皆為冬季，故溫度相對較低，溫度範圍在 20°C 左右，而 XF 廠由於採樣時間接近春末夏初，故溫度約為 25°C。一般而言，廢水中的微生物在中溫環境下 (30±2°C) 的反應最佳，隨著溫度些微升高會促進酵素之反應 (Lin et al., 2020)。除此之外，在 pH 值的部分，三個廠區不管採樣點位於好氧槽抑或是缺氧槽，pH 值範圍皆落在 7.0~7.9 的中性或中偏鹼性範圍內，根據文獻指出 pH 8.0 時脫硝效率最佳 (Wang et al., 2021)，故也可以初步了解目前廠區基礎脫硝情形。

在溶氧的部分，好氧槽的溶氧通常會設定在 2 mg/L 以上以維持好氧微生物之反應，缺氧需控制在 0.2~0.5 mg/L，厭氧則必須控制在 0.2 mg/L 以下，在檢測的三個廠區中可以得知個別採樣點幾乎皆符合反應槽原始設定範圍，多數皆落在缺氧的區間內，但在 BL 廠區的溶氧可以發現不管在好氧抑或是厭氧槽，溶氧值高達 6 mg/L 以上，BL 廠區溶氧偏高部分原因為廠區運行方式為間歇曝氣，而本研究是在曝氣階段進行採樣，另一部分則因廠區需求，提高曝氣強度，故溶氧值高於其他兩個廠區。此外，對比過去剛植種 TWT 廠區之污泥時，曝氣量有穩定控制在較低的水平 (<1.0 mg/L)，避免厭氧氨氧化菌受到抑制 (Yang et al., 2020)，此情形在經過詢問廠區方後得知，廠方認為目前的微生物反應效率不如預期，故為了提高微生物的反應暫時先將曝氣量提升，溶氧的改變也將做為 BL 廠區後續探討微生物基因組成以及反應效率之參考。

一般而言，由於微生物不同或處理條件之差異，其表現的氧化還原電位也不同。在好氧環境中，大多數好氧微生物可以在 ORP 高於 +100 mV 的情況下生長；而對兼氧微生物而言，當 ORP 高於 +100 mV 時，它們會進行好氧呼吸；而當低於 +100 mV 時，它們會轉而進行無氧呼吸。然而，在檢測結果中可看出在 XF 及 TWT 廠區的 ORP 數值可以推論廠內微生物應是和厭氧或兼氧微生物生存，較特別的是 BL 廠的 ORP 數值皆偏高，這也與在現地檢測到溶氧值偏高相呼應。而在導電度的部分，導電度的高低可以判定水體中離子成分的多寡，導電度過高可能導致承受水體的危害，故導電度的高低也可作為水質變化的參考項目之一。



(a)

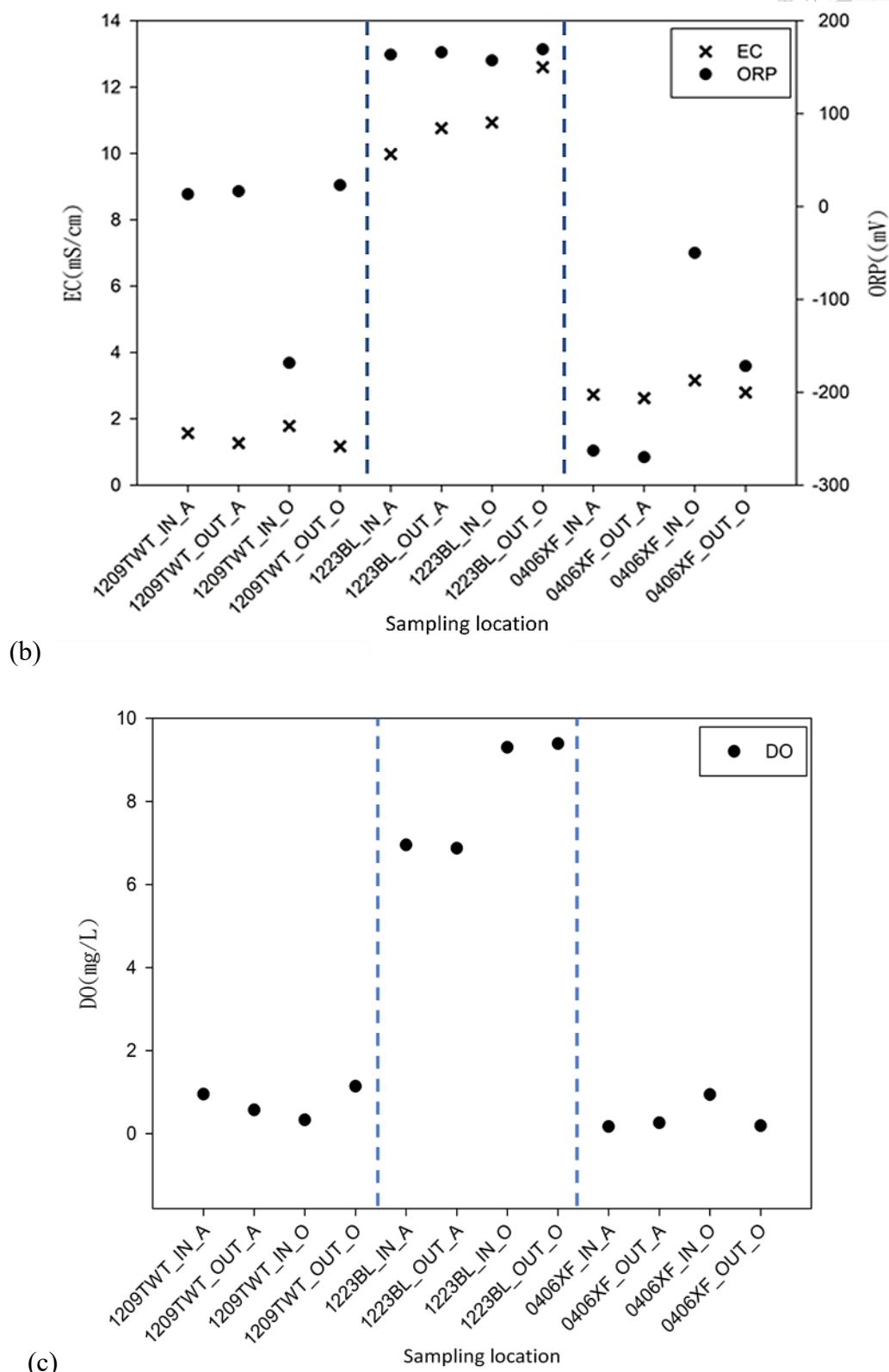


圖 4-3 (a)溫度/pH 值 (b)導電度/氧化還原電位 (c)溶氧水質參數

備註：IN 採樣點為進入槽體前之位點，OUT 則為反應槽後端位點



4.2.3 總懸浮固體以及揮發性懸浮固體

在一般的污水處理廠中，MLSS 和 MLVSS 分別用來表示污水處理系統的運行狀況和處理效果以及微生物含量的重要指標。在圖 4-4 中可以很明顯地得知，在 BL 廠的 MLSS 以及 MLVSS 濃度很低，且在採樣過程中也可以發現廠區水質之懸浮物極少，相較其他兩個廠區數值可以相差至 10~100 倍，從其 MLVSS 濃度可以初步推測該廠區反應槽的生物反應效率偏低，XF 廠厭氧槽的數值則遠比其它廠區甚至是一般污水廠的數值來的更高，在現場採樣時觀察到厭氧槽上方浮著一層厚厚的浮渣，目前推測可能原因為由於水肥中的浮渣佔比極高，加上待處理水樣中水肥佔比也偏高，故導致 XF 廠數值巨大的差異，此現象也造成處理效能的下降，現場採樣狀況如圖 4-5，過高數值容易導致許多負面問題，例如：在反應槽內無法達到有效的氧氣傳遞，微生物無法進行反應，也可能造成產氣量的增加，導致惡臭或是流程操作上的困難等，皆可能導致槽體運作效能的下降，故建議廠區可加強曝氣量，提高溶氧濃度，改善廠區狀況。因此，在三個廠區中，僅 TWT 廠區之反應槽的活性污泥反應狀態較好，不管是 MLSS 或是 MLVSS 的數值皆較符合一般活性污泥的狀態。

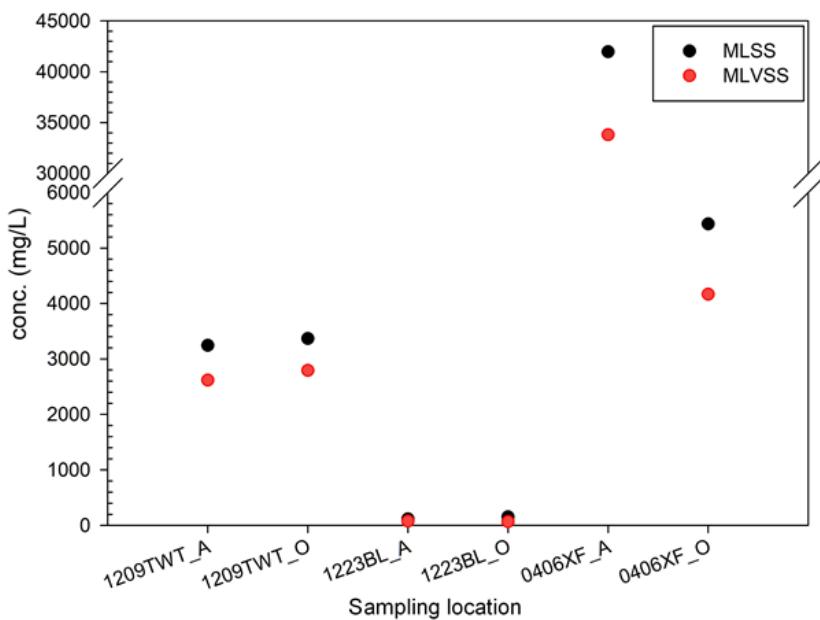


圖 4-4 各反應槽之 MLSS 及 MLVSS

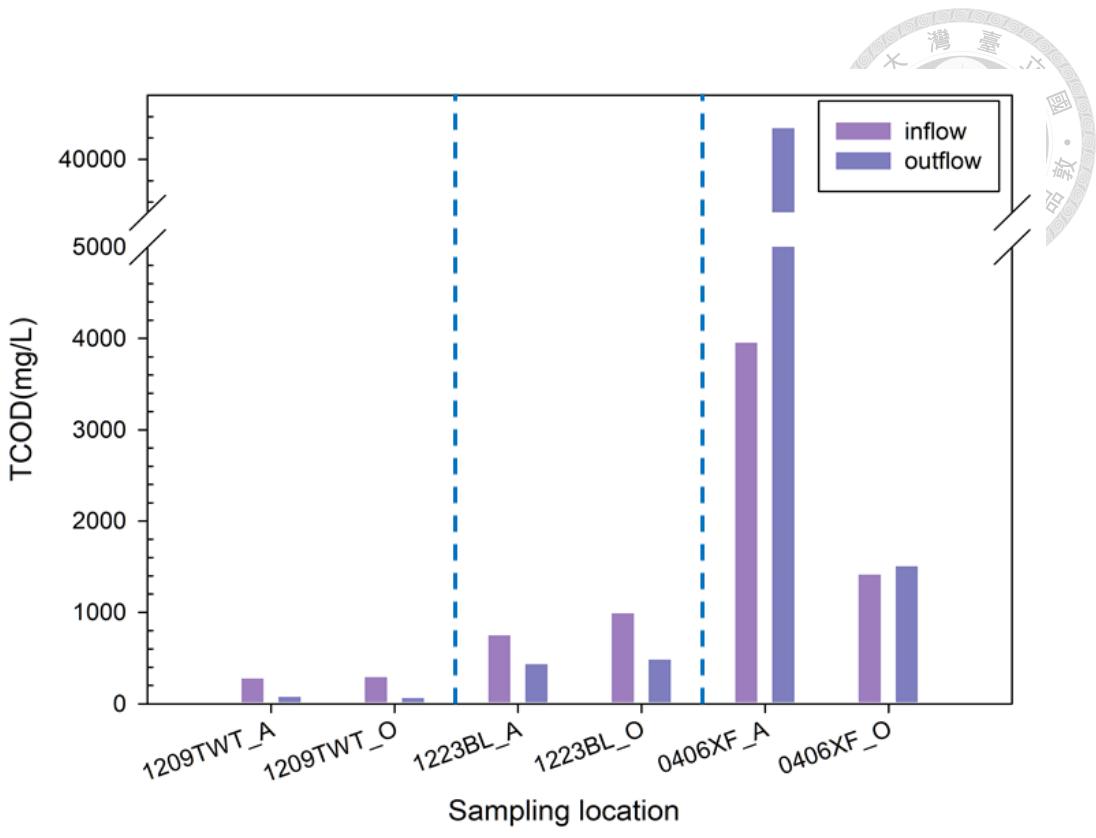


圖 4-5 XF 廠厭氧槽情形

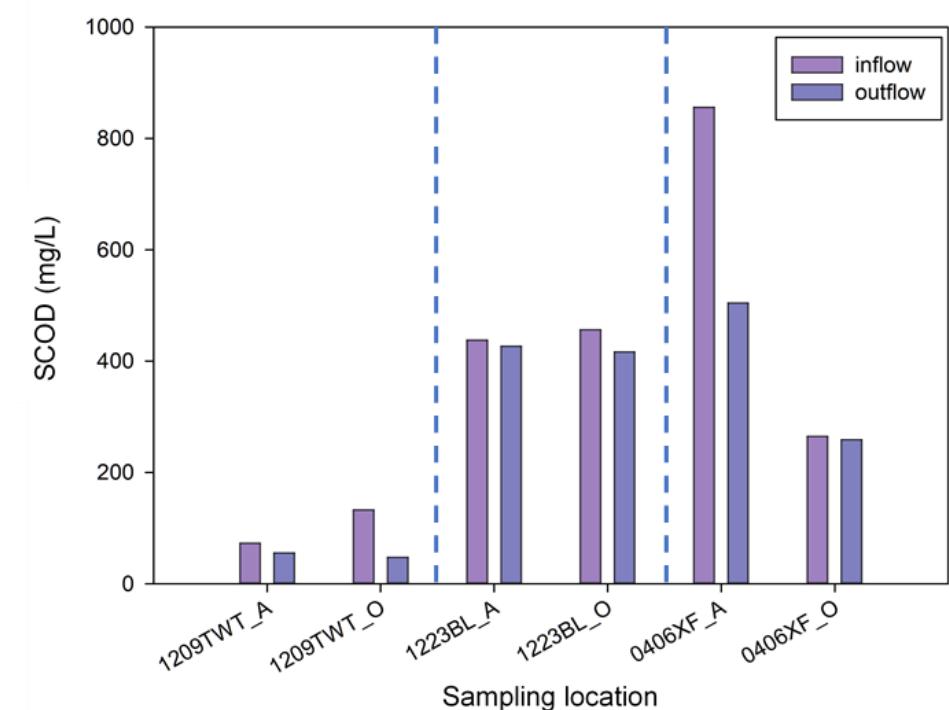
4.2.4 化學需氧量

廢水中的 COD 提供反應槽內部微生物生長所需，供其生長進行代謝反應， COD 區分為總固體化學需氧量 (Total Solid Chemical oxygen demand, TCOD) 跟總溶解固體化學需氧量 (Soluble Chemical oxygen demand, SCOD)，TCOD 是水體中的所有有機物的氧化需氧量，包括了可溶性和不可溶性有機物，由於 SCOD 較容易被微生物使用，故 SCOD 在本研究中用來評估污水處理的去除效率。

本研究 TCOD 的測定方式為將水樣靜置後取上澄液直接測定，因此若污泥沉降性較差，在測定過程中污泥也將貢獻一部分的 TCOD，從圖 4-6(a)可以看出 XF 廠的 TCOD 數值遠大於另外兩個廠區，此 TCOD 有很大一部分是源自於 4.4.3 小節所測得之 MLSS，而在另外兩個廠區中，由於 TWT 廠區污泥沉降性較佳，故在測定 TCOD 時污泥所造成的偏差較少；而 BL 廠的 MLSS 極低，故 TCOD 數值也偏低。然而，在 SCOD 的數值結果如圖 4-6(b)，以 BL 跟 XF 廠數值較高，但就去除效率而言，TWT、BL、XF 三廠的缺氧以及好氧槽的去除率依序為 23.6%、2.5%、41.1% (缺氧槽) 以及 64.3%、8.7%、2.27% (好氧槽)，具有較高 COD 去除率的缺氧槽 COD 之消耗可能是以異營脫硝反應為主，而好氧槽高 COD 去除率則表示可能為提供好氧微生物生長較具優勢。



(a)



(b)

圖 4-6 各採樣點之進出流 (a)TCOD 以及 (b)SCOD



4.2.5 氨氮以及離子層析（硝酸根、亞硝酸根）

本研究以 HACH 市售 kit 測定廢水中氨氮濃度，並以離子層析儀分析廢水中硝酸根以及亞硝酸根離子濃度，由於在垃圾滲出水處理廠區處理完之廢水並非進行直接排放，分別納管至各污水廠更進一步處置，故在各縣市政府所規範之納管標準中雖無明定氮相關物質排放標準。然而，氮化合物的濃度高低跟廢水的性質關係緊密，也直接影響著槽體內部微生物之組成，故本研究希望藉由探討水質狀態建立與微生物組成之關係。

氨氮為多數微生物首選之氮源，但氨氮濃度過高 ($>800 \text{ ppm}$) 容易產生細胞毒性 (Dapena-Mora et al., 2007)，破壞酵素活性、改變細胞內 pH 值，造成抑制作用，而亞硝酸鹽也不例外。從圖 4-7~4-9 的結果可以看出各廠區的氨氮、硝酸鹽氮以及亞硝酸鹽氮的數值皆屬於正常範圍，並無濃度過高造成毒性抑制的問題。此外，氨氮去除通常是藉由硝化作用進行氮化合物之轉換，但由去除率可以發現 BL 廢區的去除率偏低，與 4.2.3 小節推測的廠區微生物反應效率不佳相符；而在硝酸鹽及亞硝酸鹽的部分，如圖 4-8、4-9，TWT 以及 XF 廢之濃度遠低於 BL 廢，對比過去剛植種完厭氧氨氧化污泥之水質測定結果發現在現階段 BL 廢區的 NO_3^- -N 濃度提高許多，但在 XF 廢區的 NO_2^- 以及 NO_3^- 數值皆大幅下降 (Meng et al., 2021)，這將與後續基因定量作為輔助參考。

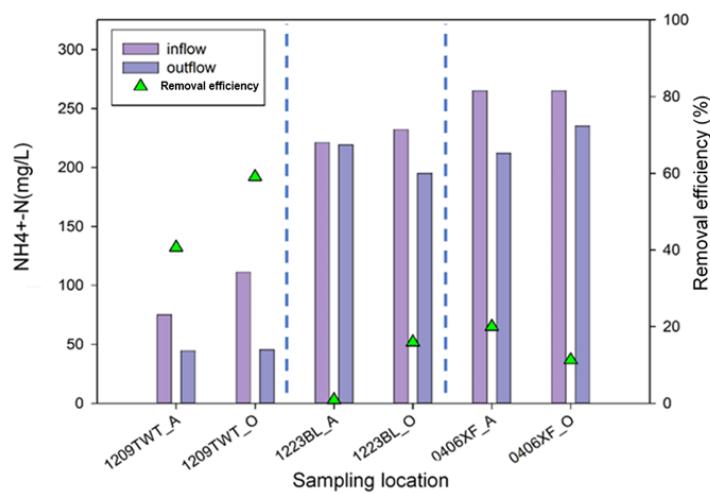


圖 4-7 各採樣點氨氮濃度及去除率

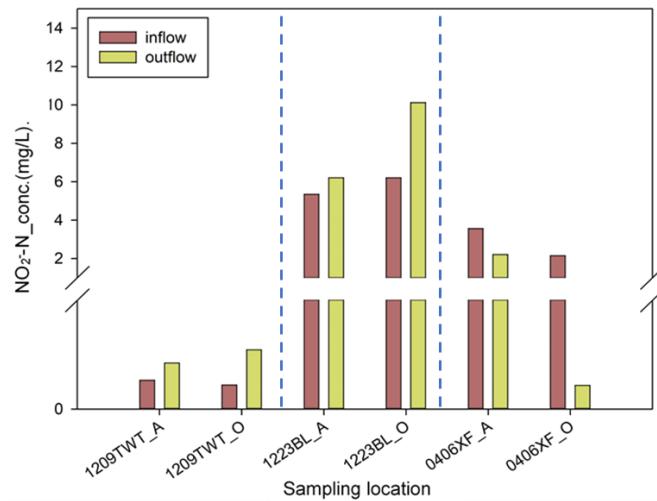


圖 4-8 各採樣點亞硝酸根濃度

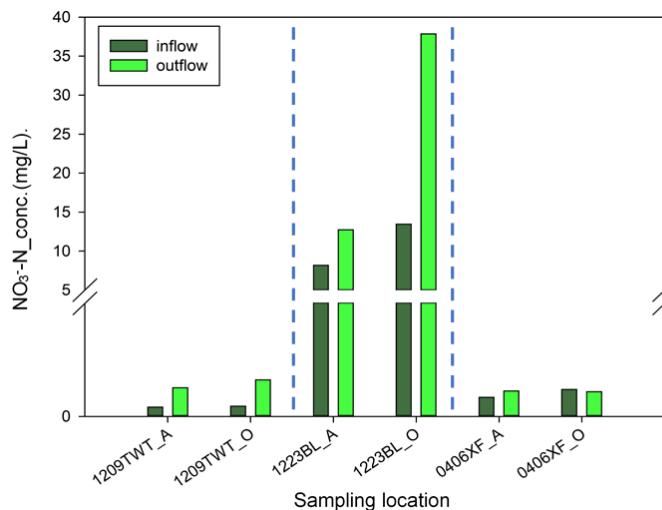


圖 4-9 各採樣點硝酸根濃度



4.2.6 凱氏氮以及總氮分析

凱氏氮為氨氮以及有機氮之總和，高含量的有機氮在垃圾滲出水中可能對水體環境造成一些潛在的問題。例如：當垃圾滲出水進入水體或地下水系統時，有機氮的存在可能導致水體富營養化，故在已知氮氮濃度的情況下，我們可得知廢水中有機氮的含量，高有機氮含量通常表示水體受到有機廢污染物的嚴重污染；而有機氮含量過低則表示水體中氮源的不足，可能會限制生物生長和生態系統的功能，結果如圖 4-10 所示，在三廠中，以 XF 廠的有機氮含量最高。除此之外，有機氮之含量也可作為垃圾掩埋場年齡的指標，在新設立的垃圾掩埋場中，垃圾滲濾液的有機氮的含量較高，隨著掩埋場年齡的增加，有機氮逐步被分解並轉化為氨氮，並進行後續氨氮之轉換 (Wang et al., 2021)。由於 TWT 以及 XF 兩廠在近幾年皆有水肥的投入，故僅從 BL 廠做對比，其在過去剛植種完厭氧氨氧化污泥之廠區凱氏氮濃度 737 mg/L (Meng et al., 2021)，與現階段廠區濃度約為 200~300 mg/L 高出許多，與其它文獻所述相符。

而在總氮的部分，本研究中所表示的總氮為溶解氮，故當中應包含氨氮、硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮以及有機氮，數據如圖 4-11 所示，三廠中僅 TWT 廠區的總氮去除率較高，表示廠內的除氮效率相對較佳；然而，在 BL 廠的總氮去除效率僅達百分之一，表示其氮化合物僅在硝化脫硝系統中循環，並未達到完全除氮的效果。而其餘廠區的去除率與過去數據相比皆有下降趨勢 (Meng et al., 2021)。

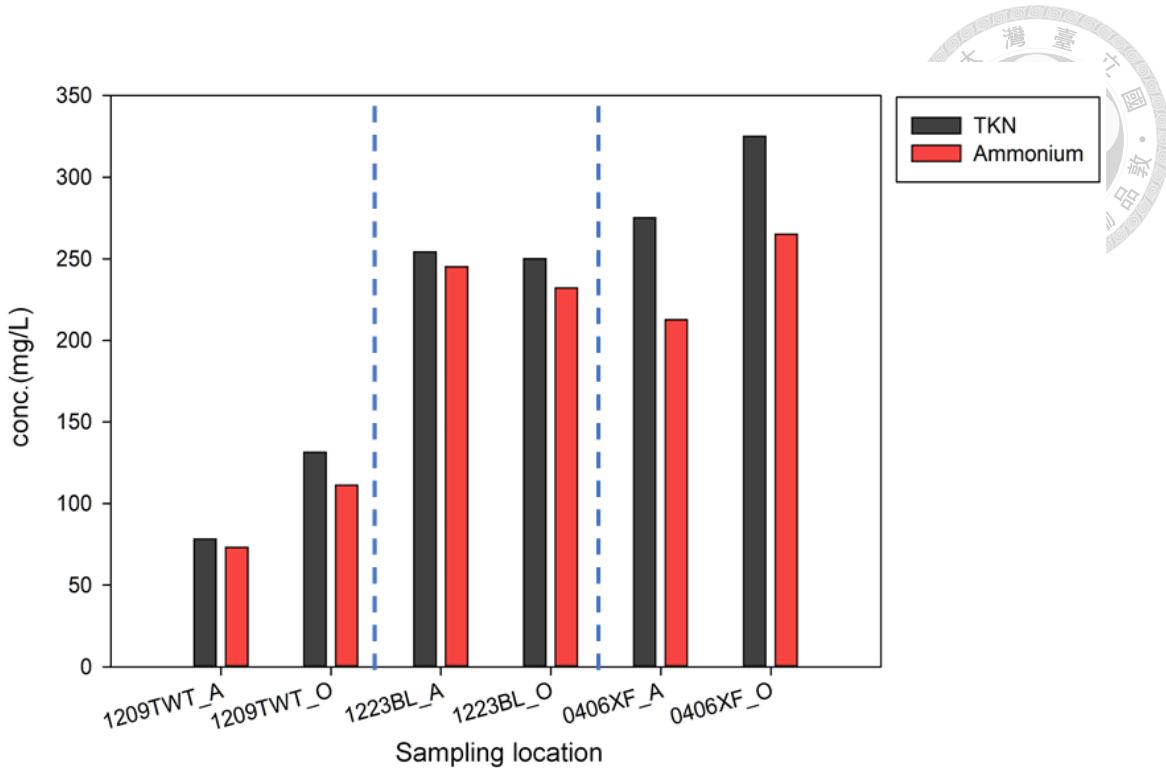


圖 4-10 各採樣點之凱氏氮以及氨氮濃度

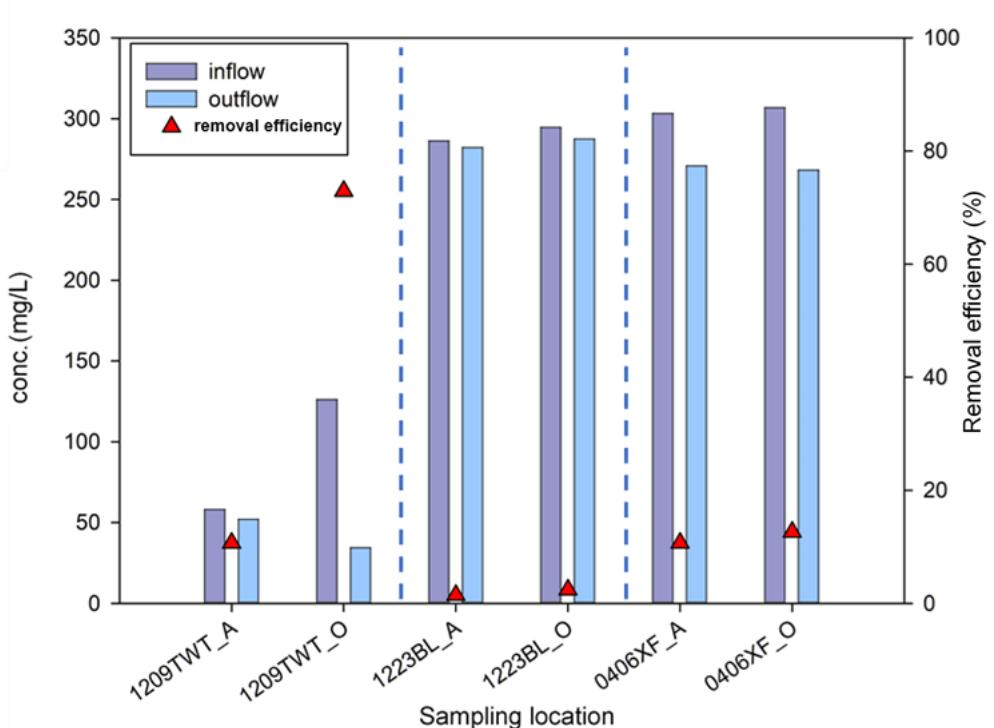


圖 4-11 各採樣點總氮濃度及去除效率



4.3 污水處理廠相關基因定量

在本研究中，將針對 TWT、BL 以及 XF 三個垃圾滲出水處理廠進行基因之定量。在過去，由於台灣首次發現厭氧氨氧化菌的存在，故於發展初期，許多文獻是以 High-throughput sequencing (又稱為 Next generation sequencing, NGS) 以及 Metagenomic 了解微生物群落之組成及基因功能，較少以絕對定量的方式探討氮相關功能性基因以及水質參數之變化，故藉由本研究建立之相對以及絕對定量，先以 qPCR 進行各個待測基因的相對定量 Ct 值，以取得後續上機 dPCR 分析的稀釋倍率進行絕對定量。由於廠區水質特性的差異，在三個廠區中，XF 以及 TWT 廠區是利用反應槽內部的 MLSS 以 8000 rpm, 10 mins 離心後之污泥按照 3.5.1 小節步驟進行 DNA 萃取；而由於 BL 廠區之反應槽內部 MLSS 量極低，考慮後續無法萃取得至相當濃度的 DNA，故 BL 廠在好氧槽以及缺氧槽的污泥取得方式分別為從好氧載體以及缺氧槽壁上刮取定量之污泥進行萃取。故在後續基因定量之分析中，三個廠區皆以每克乾污泥之 gene copies 數進行探討；而 BL 廠區則由於萃取污泥是由載體上抑或是反應槽壁上取得，故若以同樣為懸浮狀態之微生物進行比較的情況下，BL 廠區的基因定量可能會比原本檢測結果來的少量。

由於本研究所探討廠區之性質為垃圾滲出水污水處理廠，其在廢水組成上與一般民生污水處理廠差異較大，故在此研究中整理了垃圾滲出水處理之相關文獻，整理如表 4-1。以下將針對 Digital PCR 定量之結果進行數據的說明以及討論。



表 4-1 垃圾滲出水處理之相關文獻

廢水來源	目標基因	基因定量表示方法	參考文獻
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>nosZ</i> 、16S rRNA	copies/g dry sludge	(Gabarró et al., 2013)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nxrA</i> 、 <i>narG</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>nosZ</i>	copies/L	(Sun et al., 2020)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>narG</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>norB</i> 、 <i>nosZ</i> 、16S rRNA	copies/g dry sludge	(Zhang et al., 2021)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nxrB</i> 、 <i>narG</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i>	copies/g dry sludge	(Jiang et al., 2021)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>nosZ</i> 、16S rRNA、Anammox	copies/ng DNA	(Wang et al., 2017)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>nosZ</i> 、16S rRNA、Anammox	copies/ng DNA	(Wei et al., 2019)
Landfill leachate	<i>amoA</i> 、 <i>nirS</i> 、 <i>nirK</i> 、 <i>nosZ</i> 、16S rRNA、Anammox	copies/g wet sludge	(Shu et al., 2016)
Landfill leachate	16S rRNA、 <i>amoA</i> 、 <i>nxrA</i>	copies/g dry sludge	(Sun et al., 2014)
Landfill leachate	16S rRNA、 <i>amoA</i> 、Anammox	copies/g dry sludge	(Xie et al., 2013)
Landfill leachate	16S rRNA、 <i>amoA</i> 、 <i>nxrA</i> 、Anammox	copies/g dry sludge	(Zhang et al., 2017)
Landfill leachate	16S rRNA、Anammox	copies/g dry sludge	(Miao et al., 2014)



4.3.1 基因濃度絕對定量

➤ 16S rRNA/硝化/脫硝基因絕對定量

圖 4-12 為三個廠區基因的絕對定量 (gene copies/g dry sludge)，從基因的定量結果可以得知硝化、脫硝以及厭氧氨氧化細菌共存於各廠區的反應槽內部，其中各廠區之 16S rRNA 基因定量範圍落在 $1.28 \times 10^{11} \sim 1.21 \times 10^{12}$ (gene copies/g dry sludge)，與一般垃圾滲出水處理廠定量之結果相符 (Gabarró et al., 2013)。在反應槽中，最常見的氮相關反應為硝化、脫硝反應，*amoA* 以及 *nxrB* 分別為控制氨氮的轉換以及亞硝酸鹽進一步的代謝，*comammox* 基因則為可進行完全硝化的菌屬，在本研究中低於檢測極限，故無更進一步探討。在三個廠區中，TWT 以及 XF 廠區在兩個硝化基因之定量上差距不到一個數量級，但在 4.4.2 小節中有提到 BL 廠區污泥特性較特殊，故 BL 廠區為從載體上採集污泥進行萃取，然而，BL 廠的溶氧與其他兩個廠區相比相對較高 (6~8 mg/L)，一般而言，較高的溶氧會促進完全硝化反應 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) 之進行，但比對基因定量出來之結果發現廠區中 *amoA* 在每單位乾污泥下遠高於 *nxrB* 基因 2~3 個數量級，表示 BL 廠反應槽內可能進行著部分硝化之途徑，因此，根據過去文獻報導 (Jiang et al., 2020)，在相對高的溶氧下，在生物膜抑或是絮團中具有不同氧氣濃度之差異，可以形成一種另類的保護層面，提供不同微生物的生長，故由此推測載體上之污泥可能形成氧氣梯度之差異，在此生態區位下並無形成完全硝化反應之進行，故推測在 BL 廠區中的 AOB 的反應效率應該比 NOB 來的高。

此外，圖 4-13 為控制氨氮進行硝化作用之基因 *amoA* 以及氨氮去除率關係圖，由於氨氮為垃圾滲出水處理廠中重要污染物之一，氨氮的去除效率對水體意義重大，故希望藉由本研究中所定量出來的氨單加氧酶以及處理水中的氨氮去除率確認是否具有相關性，用以判定廢水系統中含氮廢水與基因之關係。在三個廠區中以 XF 廠的 *amoA* 基因拷貝數最低，相對的可能表示在硝化反應中 AOB 的活性或菌量較少，導致整體氨氮去除率偏低；而 TWT 的基因拷貝量比 XF 廠

多兩個數量級，而該廠區在氨氮去除率也遠比 XF 廠高兩倍以上；然而，較特別的是雖然 BL 廠區所定量出來的 *amoA* 基因量也比 XF 廠高 100 倍，但其在氨氮去除率上與 XF 廠相近甚至是更低，由於在 4.2.3 節中所提及 BL 廠區反應槽之 MLVSS 很低，生物反應效率差，故推測現有存在之微生物實際進行反應的比例少，導致整體的氨氮去除率相對較差。

在脫硝基因中，TWT、BL、XF 廠區的 *narG*、*nirK* 以及 *nosZ* 中以 *narG* 的基因拷貝量最低，其約落於 10^8 gene copies/g dry sludge，與過去文獻相比，其在 *narG* 濃度皆約為 $10^6\sim 10^7$ gene copies/g dry sludge (Jiang et al., 2021; Zhang et al., 2021)，雖然絕對定量結果與其他文獻相比較高，但由於各廠操作性質的差異，此基因在本研究之三個廠區中定量濃度皆偏低，結合水質條件的差異，可推測低濃度的 NO_3^- -N 可能為 *narG* 基因豐富度較低之原因 (Kim et al., 2011)。此外，在 *nirK* 以及 *nosZ* 這兩個脫硝基因的定量上，兩者基因拷貝數分別落在 $3.88\times 10^9\sim 4.97\times 10^{10}$ 以及 $9.6\times 10^9\sim 6.69\times 10^{10}$ ，對比過去文獻在相同單位下的基因拷貝數來的高出許多 (Jiang et al., 2021; Zhang et al., 2021)，由於反應系統條件之差異可能會導致整體基因絕對定量的不同，故此部分會在後續以個別基因占 16S rRNA 基因的相對占比去進一步探討。

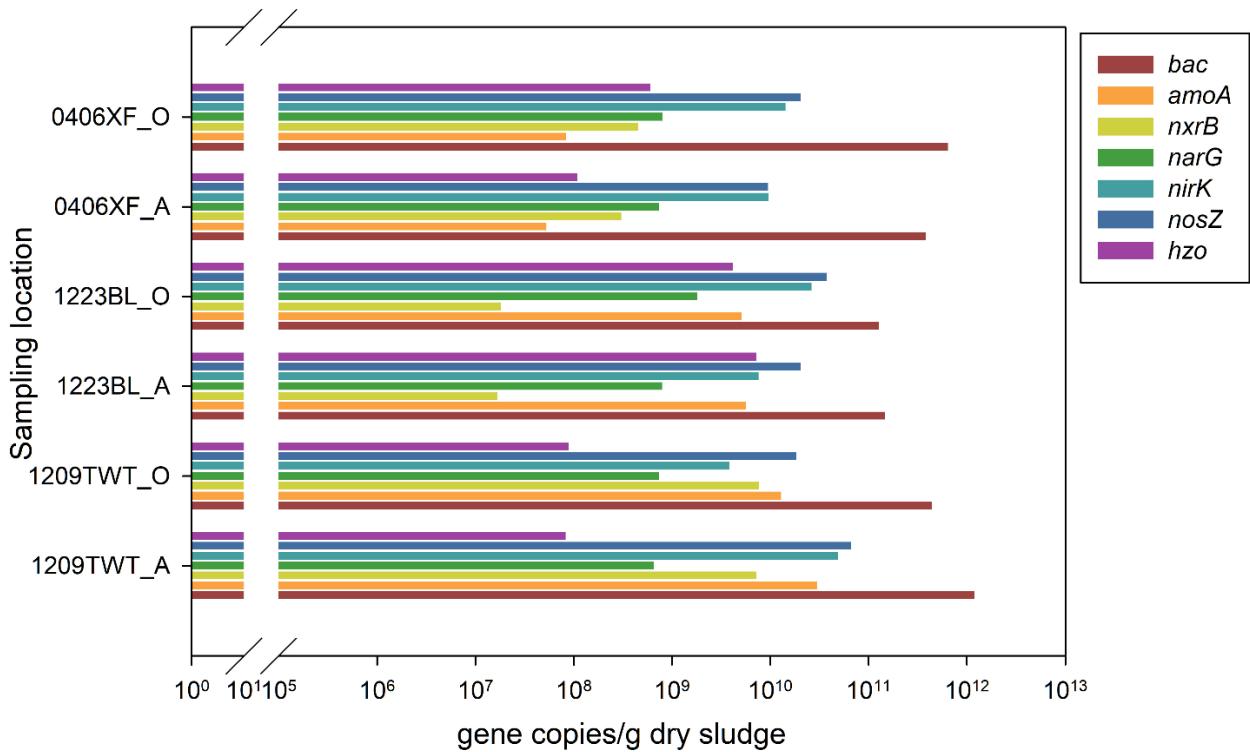


圖 4-12 各廠區基因之絕對定量

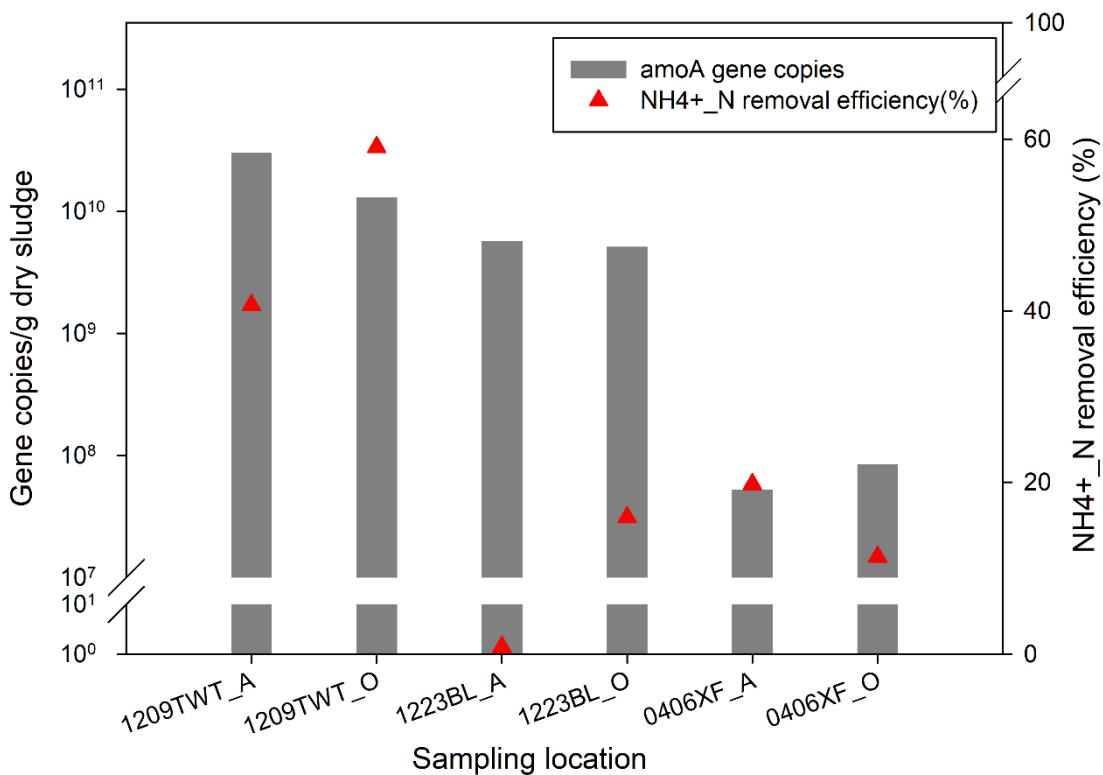


圖 4-13 amoA 基因與氨氮去除率之相關性



➤ 厥氧氨氧化基因絕對定量

在本研究中所欲探討的其中一個除氮作用—厥氧氨氧化反應是針對厥氧氨氧化反應中的其中一個酵素 hzo 作為引子對， hzo 為控制合成 N_2H_4 的酵素；而 hzo 主要功能為將 N_2H_4 氧化為 N_2 以及 H_2O 。由於厥氧氨氧化作用之反應物為氨氮以及亞硝酸根，根據圖 4-14 的結果可以發現在三個廠區中僅 TWT 廠區的氨氮濃度較低，BL 以及 XF 廠區的氨氮濃度皆有高達 200~250 ppm；且從圖中可以看出另一個反應基質— NO_2^- 的濃度皆非常低，根據文獻發現 NO_2^- -N 濃度在 50~70 ppm 長期運行系統下，最終可以將 NO_2^- -N 完全去除 (Chamchoi & Nitisoravut, 2007)，但在三廠中僅在 BL 廠區有測得 5~10 ppm 的 NO_2^- -N 濃度，且從式 2-7 可以知道 $NH_4^+ : NO_2^- = 1:1.32$ 為最佳，因此反應基質濃度的缺乏可能造成 Anammox 的活性不佳或是數量偏低，而從三廠定量結果可以發現在 BL 廠區會測得最高的厥氧氨氧化基因拷貝數之其中一個影響因素為基質濃度。

此外，由於厥氧氨氧化菌為自營菌，故過多的有機物質存在會影響其生存競爭，但當碳氮比過低時，系統中的脫硝反應無法順利進行，因此碳氮比的高低可以用來探討在具有厥氧氨氧化菌的環境中，並進一步確認其是否為影響因素。以下將以溶解性化學需氧量以及總溶解氮進行 C/N ratio 之計算。根據過去文獻研究，在碳氮比為 1.1~1.5 時，厥氧氨氧化菌的活性會呈現指數成長，當碳氮比達到 2~2.5 以上時，由於碳源相對量提高，促進脫硝反應之進行，脫硝菌與 NOB 兩者對亞硝酸鹽的競爭性提高，可能為造成厥氧氨氧化活性下降的原因，甚至生長受到抑制 (Miao et al., 2018)。根據碳氮比計算結果，TWT 廠區的好氧槽以及缺氧槽的碳氮比分別為 1.05、1.24；BL 則為 1.41 與 1.45；而 XF 則為 0.84 以及 3.16，從上述結果可得出 BL 廠區的碳氮比為三廠中最適合厥氧氨氧化菌的生長，XF 廠區則因為廠區近年來水肥投入量的增加，大幅提升進水 COD 含量，造成水體環境不適合厥氧氨氧化菌的生存。

與過去其他針對剛植種過厭氧氨氧化菌之廠區進行 Anammox 定量的研究團隊所測得的結果相比（如圖 4-15）(Meng et al., 2021)，在過去剛成功植種完厭氧氨氧化群落時，BL 和 XF 的污泥為肉眼可觀察到厭氧氨氧化顆粒的兩個廠區，當時針對三廠進行了厭氧氨氧化菌之定量，從定量結果中發現 BL 以及 XF 兩廠的厭氧氨氧化菌基因豐富度遠高於原始植種廠區 TWT。在 TWT 廠區中，過去於好氧槽污泥定量之結果約為 1.1×10^9 gene copies/g dry sludge，而本研究採樣定量結果為 8.32×10^7 gene copies/g dry sludge；BL 廠區則在過去進行了好氧槽以及好氧槽載體之定量，其定量結果分別為 2.59×10^{10} 以及 7.58×10^{12} gene copies/g dry sludge，而現階段載體污泥豐富度則降低至 4.378×10^9 以及 7.304×10^9 gene copies/g dry sludge；XF 廠過去缺氧槽以及好氧槽之定量結果分別為 1.33×10^9 以及 1.45×10^{10} gene copies/g dry sludge，現在基因量則下降至 $10^8 \sim 10^9$ ，從上述結果得知在過去及現在厭氧氨氧化菌的豐富度皆降低了 2~3 個數量級，由於在過去剛植種過厭氧氨氧化菌時水體溫度皆落在 28~30°C，與本研究在採樣時的水體溫度相比更高，更適合厭氧氨氧化菌之生長；此外，在溶氧的部分，由於 TWT 以及 XF 廠區在過去以及現在溶氧條件皆有控制在 <1 mg/L，然而，目前 BL 廠區的溶氧值與過去相比相對提高 (6~8 mg/L)，過高的溶氧可能會抑制厭氧氨氧化菌之活性 (Wang et al., 2021)，改變特定微生物之數量。最後，雖然三個廠區與過去相比在絕對定量上皆減少，現階段以 BL 廠為本研究絕對定量較高的廠區，此結果可能歸因於 BL 廠區載體的存在提供生長較緩慢的微生物（如：厭氧氨氧化菌）一個穩定的環境進行附著生長以及良好的生態區位，避免直接受到水質或水體擾動之影響，具有較合適的生存環境。

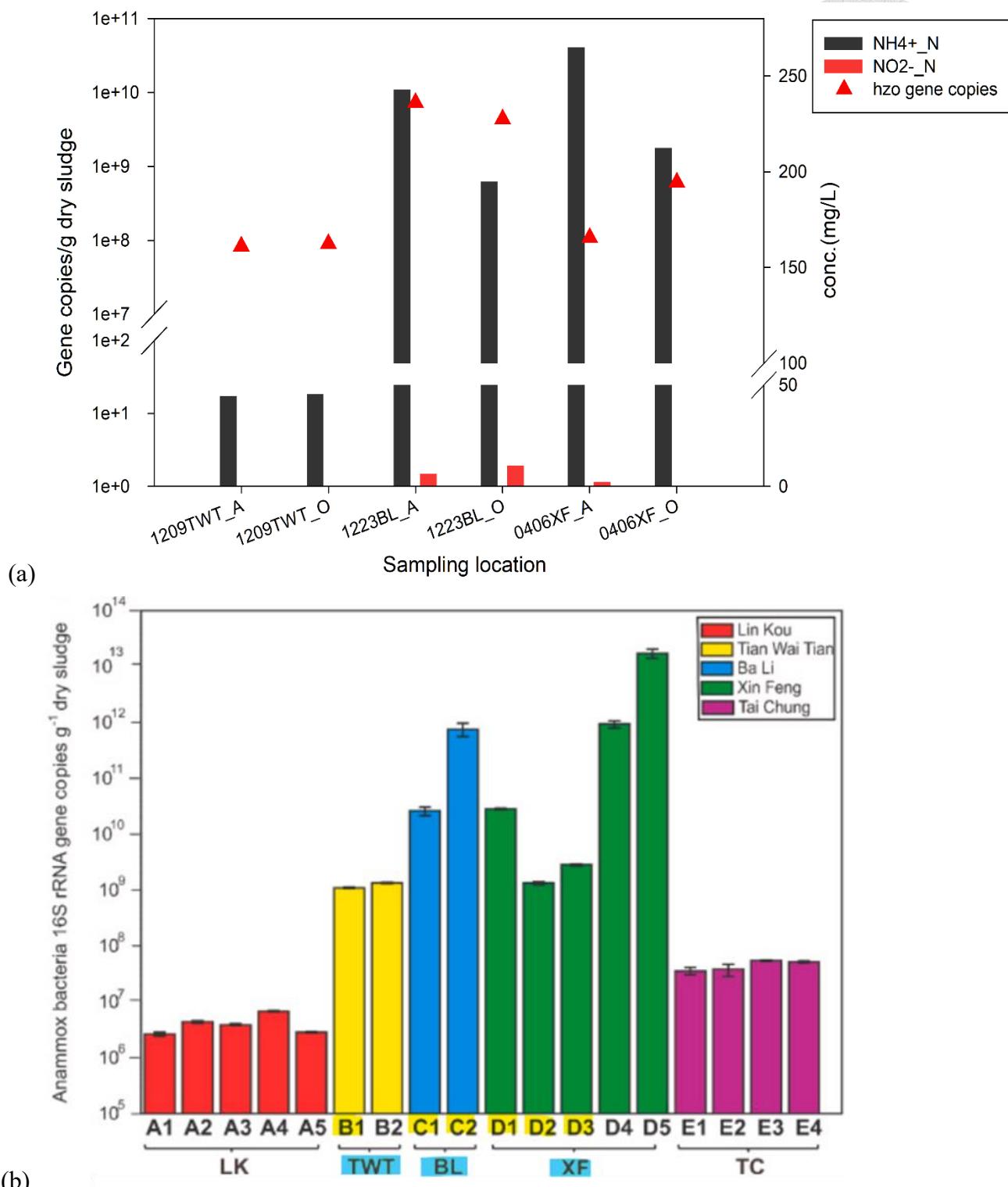


圖 4-14 (a)厭氧氮氧化基質濃度與 hzo 基因定量相關性 (本研究) (b)過去成功植種完厭氧氮氧化污泥之定量結果 (Meng et al., 2021)

備註：B1—好氧槽；C1/C2—好氧槽/好氧載體；D1/D2、D3—缺氧槽/好氧槽



4.3.2 基因濃度相對定量

前一小節是以絕對定量去作探討，由於各廠區微生物總量皆不同，為了避免不同廠區細菌族群大小之差異影響各功能性基因之判斷，以 16S rRNA 基因將定量的各功能性基因進行標準化，求得相對濃度，觀察不同氮相關基因在不同廠區之間之變化差異，相對結果如圖 4-15 所示。

➤ XF

在三個廠區中，可以很明顯的看出 *amoA* 基因在 XF 廠區的占比最低，BL 占比最高，充足的氧氣可以明顯提升 AOB 的數量以及活性，提高 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的去除率 (Pan et al., 2015)，但過低的溶氧 (<1.5 mg/L) 可能較不適合 AOB 或是 NOB 的生長 (Fan et al., 2013)。根據文獻，同樣為垃圾滲濾液處置的反應系統中，在 *amoA* 相對占比為 8.8% 下， $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 去除效率高達 90.5% (Wang et al., 2014)，但於研究之三廠區中，*amoA* 的相對占比皆小於文獻的 100 倍以上，且根據硝化反應的控制基因占比可以發現 XF 廠區的 *amoA* 跟 *nxrB* 基因相對占比皆僅有 0.01% 以及 0.07%，呼應圖 4-13 *amoA* 基因與氨氮去除率低的現象。此外，相對於脫硝基因 — *narG*、*nirK* 以及 *nosZ*，控制硝化反應基因之占比更低，加上 *hzo* 基因在 XF 廠區中的相對占比也僅有 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ，所有結果皆顯示在 XF 廠區目前的硝化或厭氧氨氧化作用比例較低，主要進行脫硝反應。

➤ BL

在 BL 廠區中，以圖 4-15 的相對占比可以看出 *amoA* 基因的相對占比遠高於 *nxrB* 基因 2~3 個數量級，且根據圖 4-9、4-10 發現亞硝酸根以及硝酸根濃度在槽內皆有累積之趨勢。除此之外，根據圖 4-16 可以看出 BL 廠的厭氧氨氧化菌占 16S rRNA 基因約 10^{-2} ，XF 及 TWT 廠則僅占總菌的 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ，為三個廠區中相對占比最高，加上其廠區與其他兩廠相比的溶氧濃度相對偏高，故根據 Jiang 等學者在 2020 年的研究指出厭氧氨氧化菌在好氧環境也可進行反應及生長，藉由



好氧生物膜提供之保護，讓厭氧氨氧化細菌能夠在高溶氧下表現出高活性 (Jiang et al., 2020)，本研究針對測得之水質參數與基因定量，推測 BL 廢區的氮循環機制主要是藉由部分硝化使多數 AOB 分布在載體污泥表面，利用外部氧氣進行有氧氨氧化；相對的，對氧敏感的厭氧氨氧化細菌或脫硝菌更偏好留在污泥下層或內部，讓外層的 AOB 先將氮氮氧化成亞硝酸鹽，同時消耗水中偏高的溶氧，提供污泥內部微生物之基質及環境，使污泥內部部分行脫硝反應，另一部分則提供厭氧氨氧化進行代謝生長，此外，載體也提供了厭氧氨氧化菌良好的生長區位，讓它們能夠累積形成顆粒，作為與懸浮和移動的活性污泥不同的生態區位 (Yang et al., 2020)。同時，也可從結果看出在 BL 廢的 *narG* 以及 *nirK* 相對占比較高，兩個基因的高豐富度分別利於厭氧氨氧化反應基質—NO₂⁻ 以及代謝中間產物 NO 的產生，促進厭氧氨氧化反應。故 BL 廢區主要藉由厭氧氨氧化菌與污泥外層的硝化菌或異營菌等好氧微生物配合進行脫氮反應，以調節環境中高濃度溶氧對厭氧氨氧化菌之危害。

➤ TWT

根據圖 4-15 可以看出 TWT 廢區以及 XF 廢區類似，在廠區中 Anammox 占 16S rRNA 之占比為 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ ，可以得知厭氧氨氧化之反應的貢獻性極低，故從其他硝化以及脫硝基因之占比來看，TWT 廢區以硝化菌和脫硝菌占主導地位，廠區的氮相關基因分布較平均，占比皆占 16S rRNA 基因的 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ，且在水質特性上氨氮以及 COD 濃度皆與另外兩廠相比更低，與一般垃圾滲出水的高氮氮特性較不同。因此，就定量結果來看此廠區較符合一般常規的硝化脫硝程序。此外，從圖 4-16 的相對占比結果可以發現三個廠區的 *nosZ* 基因拷貝數皆為最高，*nosZ* 為 N₂O 脫硝成 N₂ 的控制基因，但在三個廠區中，脫硝功能基因的拷貝數與總氮去除率不成正比，根據過去研究顯示，在同一個廠區中同時進行 16S rRNA 基因測序以及反轉錄 16S rRNA 定序，結果顯示在反應槽中僅有 29% 的微生物是具有活性的，表示在廠區中具有 *nosZ* 基因的脫硝菌並未實際進行反應或是活性較低。

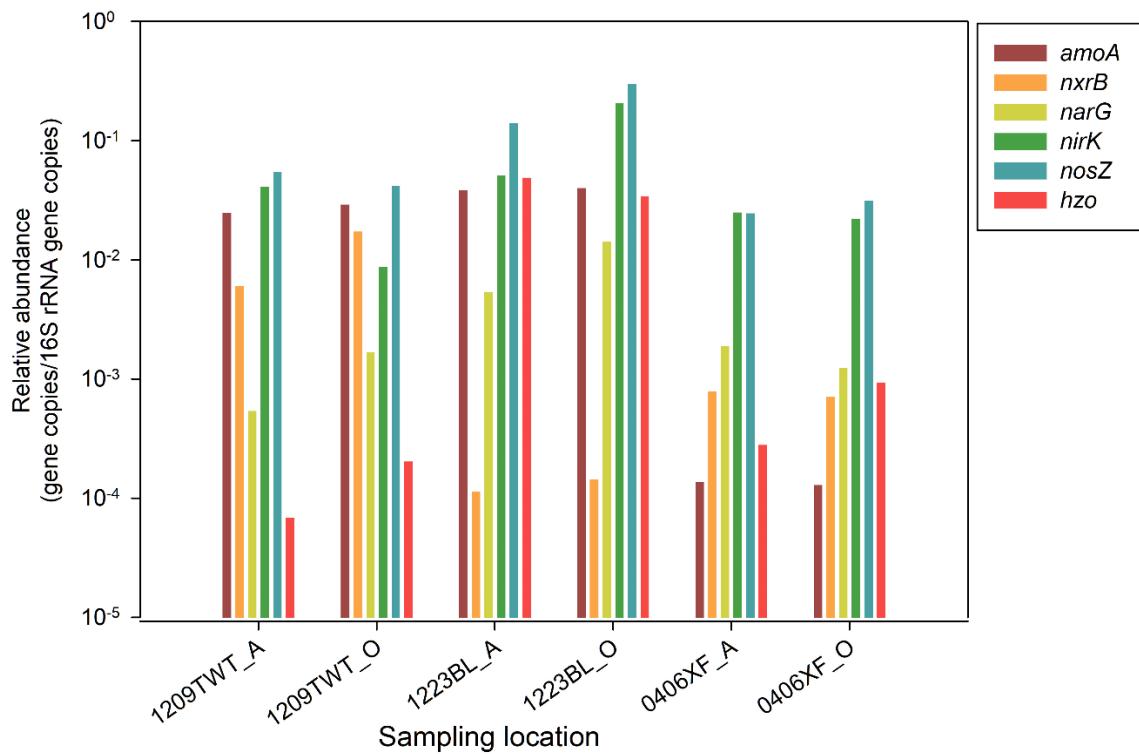


圖 4-15 TWT、BL、XF 相對濃度結果

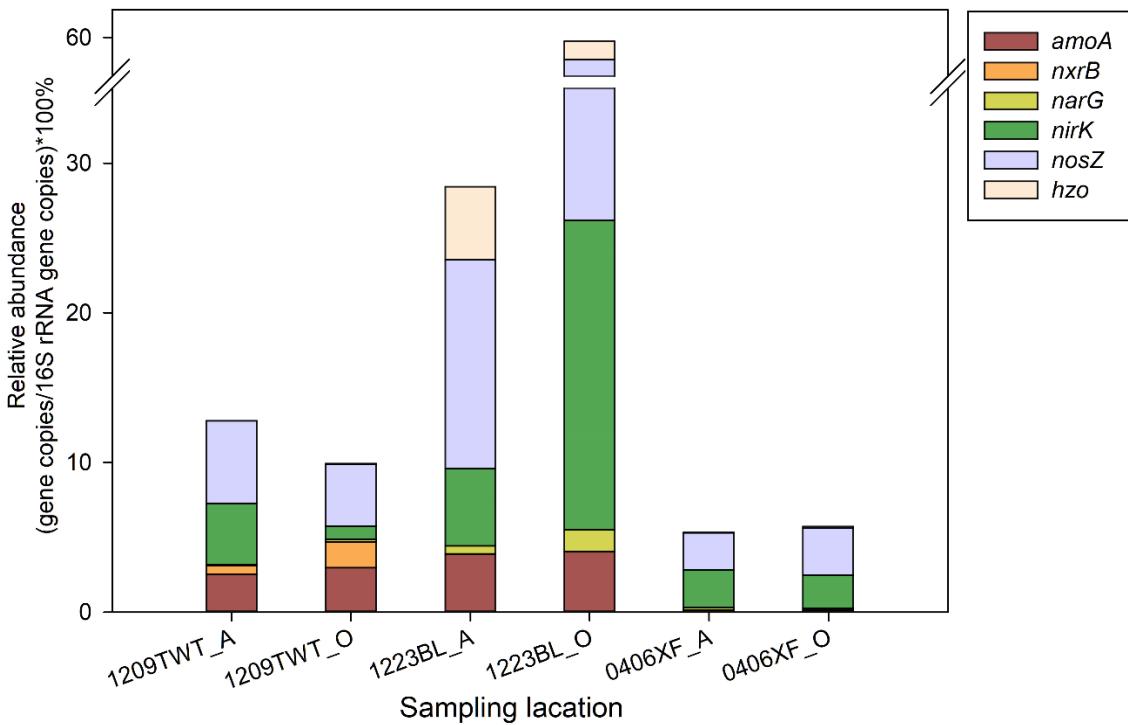


圖 4-16 TWT、BL、XF 相對濃度結果（疊加）



➤ BL—第一次採樣 v.s. 第二次採樣

前述所討論的皆為各廠區的第一次採樣結果，而由於 BL 廠區為了提升排放水去除效率，廠區在採樣期間有持續額外添加碳源—甲醇，額外碳源的添加主要目的為提升廠內異營菌之生長，改善廠區污泥狀態，第二次採樣時甲醇的添加濃度從 100 ppm 增加至 500 ppm，且廠內溶氧值與第一次差異不大，皆為 6~7 mg/L，在其它水質參數上差異不大，故碳源添加的濃度為兩次採樣的主要變因。圖 4-17 為廠區兩次基因相對定量之結果，可以看出 *nirK* 基因在缺氧槽中相對豐富度大幅提升，表示額外碳源的添加改變了脫硝基因的豐富度，促進了脫硝反應的進行；而 *amoA* 基因的相對占比也從第一次 4% 下降至第二次採樣 1% 左右，*amoA* 基因占比下降表示 BL 廠區反應槽的間歇曝氣法在未曝氣階段因溶氧值較低，且碳源的添加促進脫硝菌的優勢，故硝化基因 *amoA* 的相對豐富度降低；而 *nxrB* 的占比仍維持極小。最後，由於 *nosZ* 在實際活性表現上仍不理想，故在整體除氮效率上仍不如預期。

在厭氧氨氧化基因 *hzo* 的相對占比上，整體相對占比有些微下降的趨勢，根據過去文獻研究顯示，在厭氧氨氧化菌具有作用能力的情況下，甲醇的添加對厭氧氨氧化菌可能具有不可逆的抑制反應，其原因為甲醇可能代替銨被氧化，並且在細胞內轉化為甲醛 (Güven et al., 2005; Isaka et al., 2008)，也因為在過去研究中曾經指出甲醛會導致蛋白質和酶的不可逆的失去活性，故最終導致厭氧氨氧化菌的抑制反應，且此抑制為不可逆。因此，若要考量廠區內厭氧氨氧化菌的菌量或是活性的維持，甲醇的添加濃度須更進一步謹慎的思考，在實務面以及保存厭氧氨氧化菌之間進行更審慎的討論，避免甲醇的添加造成整體厭氧氨氧化菌基因量的下降。

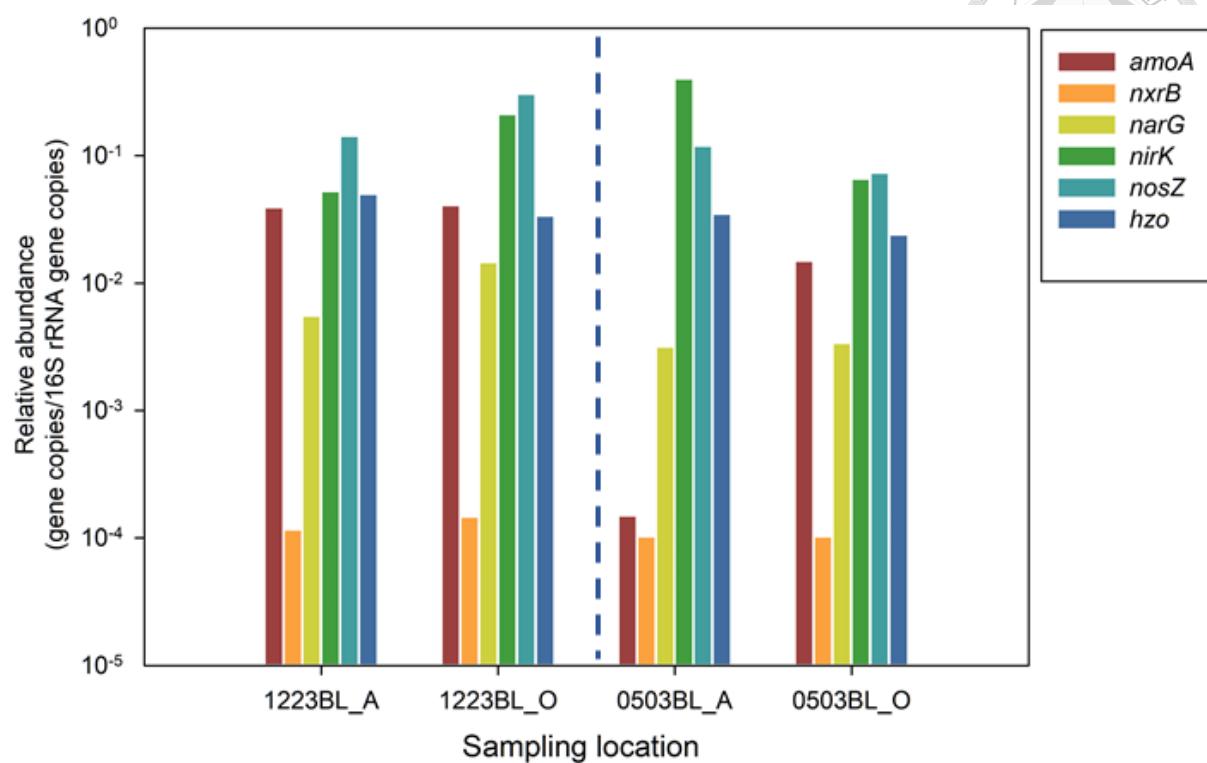


圖 4-17 BL 廠區兩次採樣之功能性基因相對定量

4.4 厥氧氮氧化活性測試 (Specific Anammox Activity, SAA)

在過去文獻中，有許多種不同測定實際厥氧氮氧化活性的測試，其中包含了藉由頂空壓力變化以氣體組成方程式換算其產生的 N_2 含量 (Chen et al., 2017; Dapena-Mora et al., 2007)，作為 Anammox 的活性表現，第二種方式則為藉由 ^{15}N 追蹤測定實際由厥氧氮氧化產生之氮氣濃度 (Ishimoto et al., 2021)，最後一種則為本研究希望通過計算 NH_4^+-N 和 NO_2^-N 濃度的線性下降斜率來測量厥氧氮氧化活性。透過 NH_4^+-N 和 NO_2^-N 的總氮去除率來評估 SAA (mg-N/mg-VSS-day) (Bae et al., 2016)，故依照 3.6 小節實驗方法架設之結果如圖 4-18、4-19，由於 BL 廠區在前述基因定量佔比較高，故結果呈現以 BL 廠區為主，TWT 以及 XF 廠之結果放置附錄。

從實驗結果可以看出批次實驗中 NO_2^-N 濃度持續在下降，但氨氮濃度持續維持在初始濃 100 ppm，在死菌組的架設也排除非生物降解之可能性。根據式 2-7，槽體內若有厥氧氮氧化反應在進行，氨氮以及亞硝酸根之消耗比應落在 1:1.32 左右，故配合測定在第 0 點時的 SCOD 濃度檢測，在經過三次清洗污泥後，槽體中仍有約 100 ppm 的有機質存在，故從氨氮、亞硝酸鹽的濃度下降趨勢以及槽體內 COD 測定試驗，可以推測槽體內部由於 COD 的存在，主要進行脫硝反應。然而，由於在本實驗中的基因檢測確實有定量到厥氧氮氧化菌的存在，但在 SAA 活性測試上由於實驗條件的不穩定，導致無法呈現厥氧氮氧化反應，故以下將針對本研究之結果與過去文獻進行比較及建議。

表 4-2 為利用上述三種方式檢測厥氧氮氧化活性之文獻，可以看出多數實廠研究皆利用 ^{15}N 同位素測定，而利用 NH_4^+-N 和 NO_2^-N 的總氮去除率來評估厥氧氮氧化活性的文獻多數是應用在實驗室規模的反應槽，由於在反應槽的運作上，為了良好的馴養出厥氧氮氧化菌，槽體內的 COD 濃度皆較低，然而，由於本研究是將實廠污泥直接進行活性測試，原始廠區的 COD 濃度皆偏高，可能導致在架設



SAA 實驗時無法達到預先設定之槽體狀態，導致無法呈現出厭氧氨氧化反應。此外，在 Okabe 等學者在 2023 年的文獻指出，其在測定 SAA 活性之污泥，厭氧氨氧化菌佔總菌之 98% (Okabe et al., 2023)，且許多文獻也指出植種污泥之狀態為肉眼可見的紅色，故厭氧氨氧化菌之菌量也是影響因素之一。

表 4-2 檢測厭氧氨氧化活性之文獻

Anammox 來源	檢測方法	分析類別	參考文獻
優養化湖泊之底泥	^{15}N -tracer	實驗	(Yoshinaga et al., 2011)
處理養豬廢水之 污水處理廠	^{15}N -tracer	實驗	(Ishimoto et al., 2021)
污水處理廠	^{15}N -tracer	實驗	(Yuan et al., 2021)
實驗室長期馴養污泥	^{15}N -tracer	實驗室反應槽	(Okabe et al., 2023)
污水處理廠	^{15}N -tracer	實驗	(Yang et al., 2021)
實驗室長期馴養污泥	$\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ 去除率	實驗室反應槽	(He et al., 2018)
實驗室長期馴養污泥	$\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ 去除率	實驗室反應槽	(Sun et al., 2018)
實驗室長期馴養污泥	$\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ 去除率	實驗室反應槽	(Martins et al., 2018)
實驗室長期馴養污泥	頂空壓力變化	實驗室反應槽	(Fernández et al., 2012)
垃圾滲濾液處理廠污泥	頂空壓力變化	實驗	(Daverey et al., 2015)

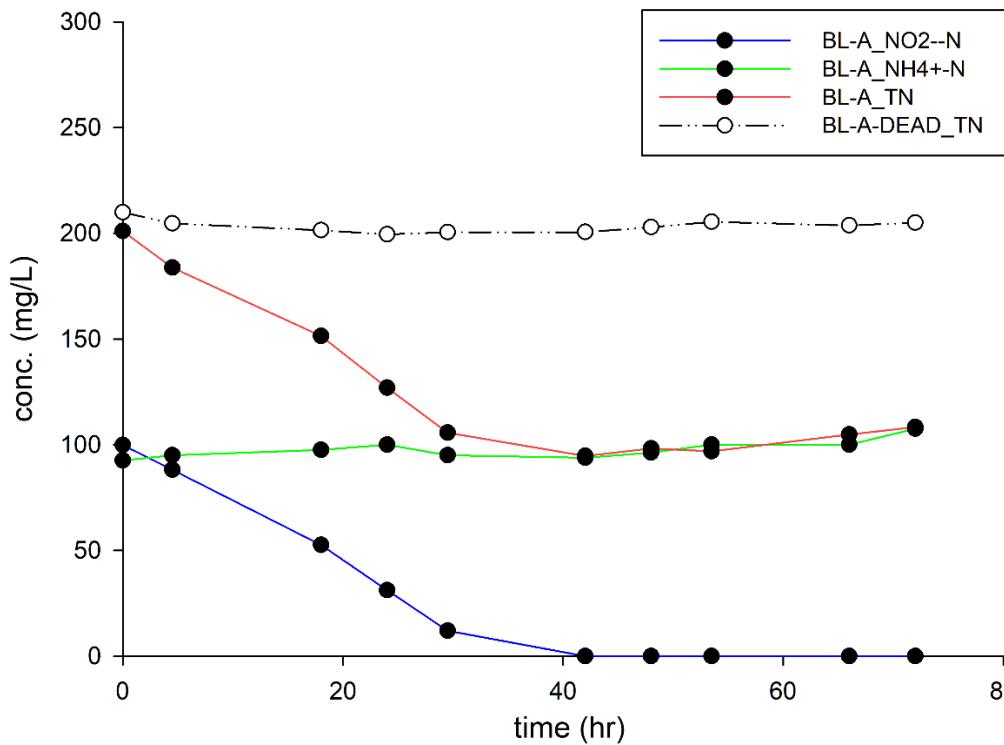


圖 4-18 BL 廠區缺氧槽-SAA 活性測試

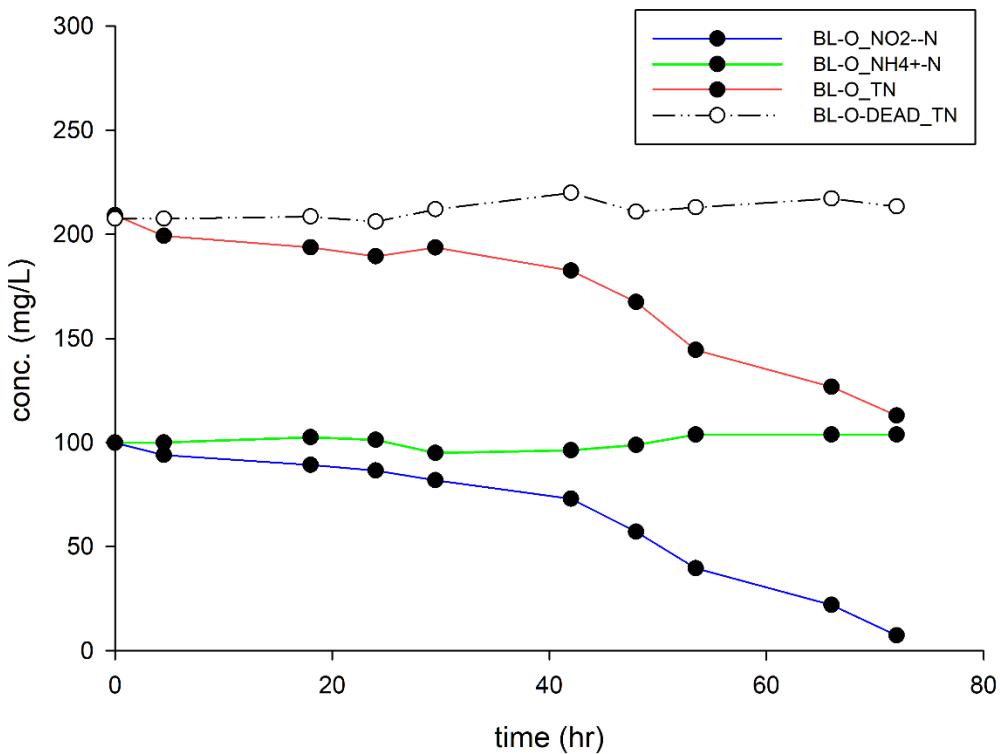


圖 4-19 BL 廠區好氧槽-SAA 活性測試



4.5 菌相分析

圖 4-20 為委託基龍米克斯生技公司進行 NGS 分析後之廠區在門的菌相相對豐度，在過去文獻中發現，厚壁菌門、擬桿菌門和變形菌門為垃圾填埋場中最豐富的三個門，可以佔總序列的 66-90 % (Xu et al., 2017)，而本研究在三個廠區中的優勢門—相對豐富度>10% 的廠區皆有擬桿菌門 (*Bacteroidota*)、變形菌門 (*Proteobacteria*)，其中的擬桿菌門以其出色的水解能力而著稱 (Song et al., 2015)。而 XF 廠區其他的優勢菌門為厚壁菌門，厚壁菌門主要負責垃圾填埋場的水解和發酵，其促進纖維素、蛋白質和脂質等的代謝 (Xu et al., 2017)；TWT 廠區則以綠彎菌門 (*Chloroflexi*) 以及放線菌門 (*Actinobacteriota*) 為優勢門；而 BL 廠的其他優勢門分別有厚壁菌門以及浮黴菌門，由於在浮黴菌門中已包含所有厭氣氨氧化菌，剛好與 4.3 小節中以 dPCR 之定量結果相呼應，故也可以進一步證實在 BL 廠區中目前仍具有厭氣氨氧化菌之存在。後續將以屬之範圍更進一步進行討論。

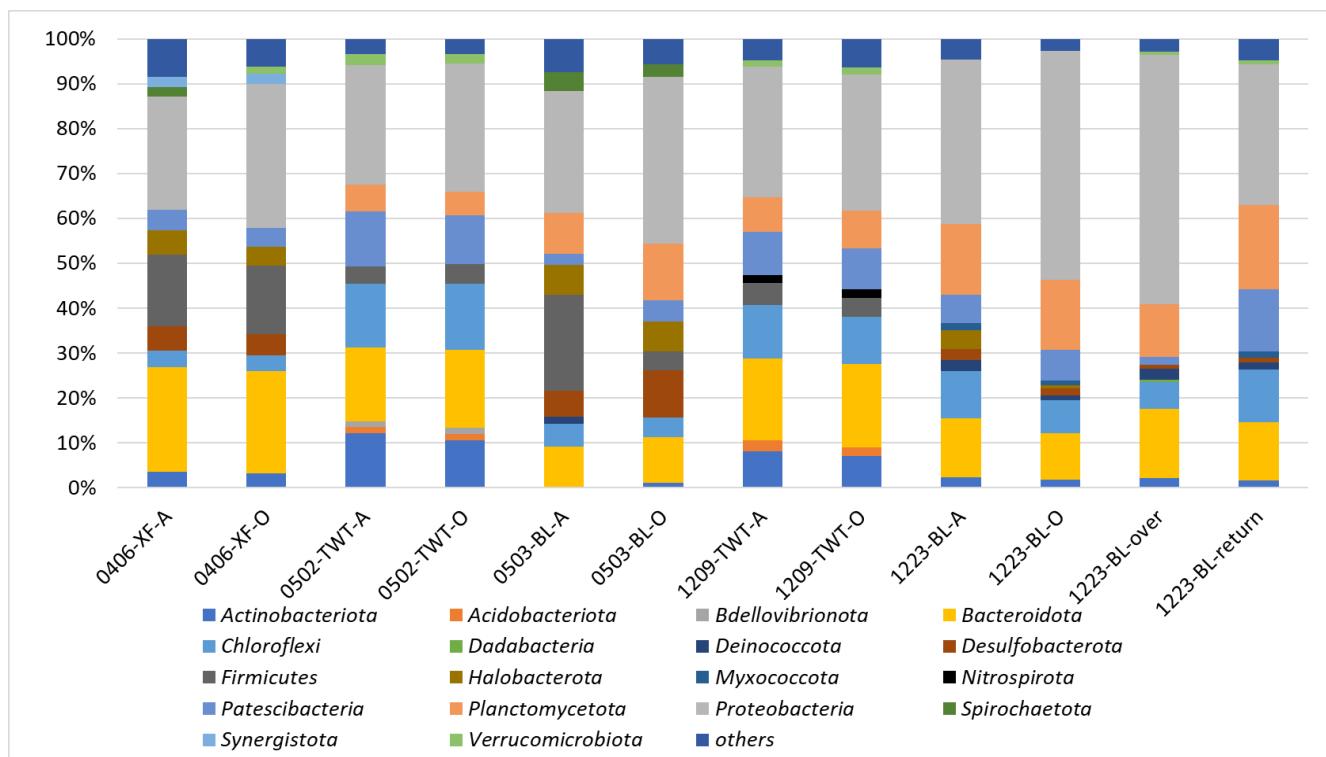
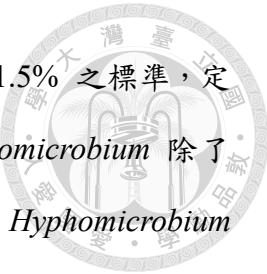


圖 4-20 不同廠區之菌相相對豐富度 (門)



接下來圖 4-21 為各廠的優勢屬，本研究優勢屬為相對豐度 $> 1.5\%$ 之標準，定序結果可得知三廠的優勢屬不完全相同，從圖中可以看出 *Hyphomicrobium* 除了在 XF 廠區無檢測到其存在外，在其他檢測點皆為優勢屬之一，*Hyphomicrobium* 為兼性甲基營養菌，其普遍存在於水和土壤中，但也存在於污水處理廠中，*Hyphomicrobium* 的存在與脫硝率有極大關係 (Baytshtok et al., 2008; Isaka et al., 2012)，也因為其生理功能，其通常被認為是補充甲醇的脫硝系統的主要參與者 (Timmermans & Van Haute, 1983)，而在 BL 廠區由於在平時也有添加甲醇作為額外碳源，故在相對豐度上也比其他廠區高，符合廠區狀況。在 XF 廠區的優勢屬包含 *Aquabacterium*、*Bacteroidetes*、*Delftia*、*Methanosaeta*、*Halomonas* 等，其中的 *Methanosaeta* 以及 *Halomonas* 為產甲烷菌，為垃圾掩埋場中常見之菌屬 (Song et al., 2015)；而 *Aquabacterium* 在系統中的代謝產物可作為脫硝菌的碳源，實現同時去除硝酸鹽和難降解之有機物 (Chen et al., 2021)。TWT 廠區則以 *Iamia*、*Nitrosomonas*、*Nitrospira* 為優勢屬，*Nitrosomonas* 與 *Nitrospira* 在過去以及現階段皆為優勢的 AOB 以及 NOB；而 *Iamia* 則為脫硝菌之一，高相對豐度可推測其在系統中主要的氮相關代謝為硝化-脫硝作用。最後在 BL 廠區中之優勢屬為 *Acetobacterium*、*Ca. Kuenenia*、*Nitrosomonas*、*Paracoccus* 等，在優勢屬中，*Ca. Kuenenia* 為厭氧氨氧化菌屬之一，相對豐度 5~7%，表示廠區目前確實仍有厭氧氨氧化菌之存在，且此菌屬與基因克隆比對結果相符，證實本研究之絕對定量結果；此外，優勢菌屬 *Nitrosomonas* 進行則負責進行部分硝化，為厭氧氨氧化反應提供亞硝酸鹽，加上在現今 BL 廠區內並無檢測到過去廠區中檢測到的 *Nitrospira* (NOB) 菌屬 (Yang et al., 2020)，表示雖然廠內的溶氧值在偏高的形況下，間歇曝氣的作法可以維持在部分硝化的階段，利於厭氧氨氧化菌的生長；而 *Paracoccus* 為著名的脫硝菌屬，且部分菌種具有在好氧環境下進行好氧脫硝反應 (Shi et al., 2013)，符合廠區目前高溶氧之狀態，在本研究中定序出的所有古菌皆為產甲烷菌，但其相對占比皆非常低，推測部分原因為垃圾掩埋場的歷史相對悠久 (Huang et al.,

2003)，滲濾液水質條件的改變不適合產甲烷菌的生存。

由以上 NGS data 可以得知在本研究中所調查的三個垃圾滲出水處理廠微生物組成具有差異，TWT 及 XF 主要以硝化—脫硝菌屬以及厭氧產甲烷菌屬組成，而 BL 廢區則同時具備硝化—脫硝—厭氧氨氧化菌三者合一。後續將繼續針對各廠區過去及現在微生物組成之差異進行探討。



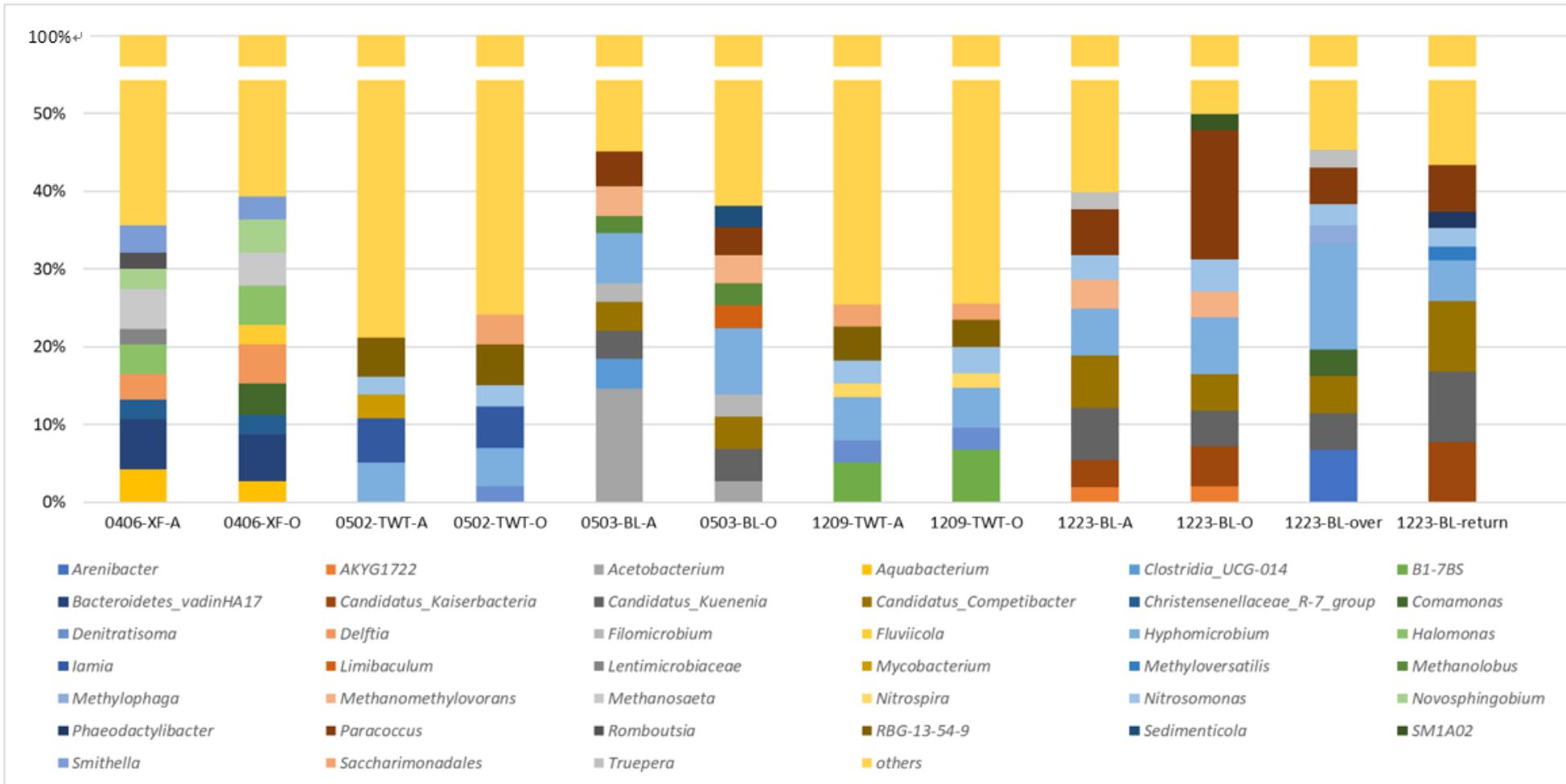


圖 4-21 不同廠區之菌相相對豐富度（屬）



首先，先藉由 Alpha diversity 來比較過去以及現在各個廠區樣本的 Alpha diversity (Chao1、Shannon) 指數，表4-3為檢測結果，Chao1 的數值越大，表示菌群的豐富度越高；而 Shannon 指數則包括豐富度以及均勻度兩個方面，Shannon 數值越大，表示群落多樣性越高。觀察表 4-3 之指數可顯示BL廠區在物種豐富度或多樣性上都比另外兩個廠區差。在過去，TWT、BL 以及 XF 廠區的 Chao1 以及 Shannon 分別落在 5000~6000 以及 7.12~9.87 (Yang et al., 2020)，對照表 4-3 過去剛植種完污泥之狀態可以發現兩個指數差異甚大，表示目前廠區中微生物之組成豐富度與多樣性可能因為廠區水質條件或參數的變化與過去相比皆降低。而 Beta diversity 則可以用來探討不同廠區樣本的差異關係，圖4-22為 Weighted Unifrac 以及 PCA 圖，從這兩張圖皆可得出本研究之三個廠區性質差異較大，廠區之間可能存在著不同微生物組成或環境條件，導致三者在 PCA 空間中呈現明顯的分離，加上 Weighted Unifrac 包含了物種的豐富度資訊，故從圖4-22中發現三個廠區中以 BL 跟 XF 的差異性最大。

表 4-4 為從各廠區優勢菌種中挑出的硝化脫硝菌屬以及厭氧氨氧化菌與水質參數做皮爾森相關性分析，在皮爾森相關分析中， NO_2^- 以及 NO_3^- 為脫硝菌均與脫硝菌屬成高度相關，而佔比較高的厭氧氨氧化菌與氨氮濃度、pH值為中度正相關，表示目前廠區的 pH 值條件為厭氧氨氧化菌最適生長條件—中偏鹼性，與文獻相符，而氨氮濃度則影響著厭氧氨氧化反應之進行。圖4-23為各廠區的環境因子與硝化脫硝菌屬以及厭氧氨氧化菌屬相對豐富度 CCA 分析 (Canonical Correspondence Analysis, CCA)，從各廠區中的優勢菌屬挑選出幾個相對具有代表性的硝化菌 (*Nitrospira*、*Nitrosomonas*)、脫硝菌 (*Denitratisoma*) 以及測序結果中相對豐富度最高的厭氧氨氧化菌菌屬 (*Kuenenia*) 進行探討，從圖 4-24 的 CCA 圖可以明顯看出氨氮對於物種的組成影響最大，亞硝酸根以及 pH 值則為次之。在 TWT 廠區中，皆以硝化脫硝菌為正相關；然而，BL 廠區則主要以氨氧化菌—*Nitrosomonas* 以及厭氧氨氧化菌菌屬—*Ca. Kuenenia* 相對豐富度更高，表示 AOB

在 BL 廠區所貢獻的亞硝酸根具有一定程度的貢獻，提供 BL 廠區的厭氧氨氧化菌生長基質，也同時驗證 BL 廠區的厭氧氨氧化菌最為豐富。此外，從菌種與環境因子的相關性可以看出 *Ca. Kuenenia* 的豐富度可能與廠區中氨氮呈現正相關，表示氨氮的存在對於厭氧氨氧化菌的累積具有一定的貢獻。



表 4-3各廠區 Alpha diversity 指數

	Chao1	shannon
0406-XF-A	421	7.726
0406-XF-O	408	7.578
1209-TWT-A	547	8.003
1209-TWT-O	534	7.935
1223-BL-A	409	7.335
1223-BL-O	321	6.744

表 4-4硝化脫硝菌及厭氧氨氧化菌對環境因子的皮爾森統計分析 ($p > 0.1$)

	pH	COD	ammonium	nitrite	nitrate
<i>Hyphomicrobium</i>	0.4655	0.2726	0.1051	0.2355	0.3921
<i>Paracoccus</i>	0.3806	0.4758	0.3281	0.7164	0.9650
<i>Nitrosomonas</i>	0.1817	-0.2454	-0.4785	0.5906	0.5915
<i>Nitrospira</i>	-0.0521	-0.5807	-0.5388	-0.3574	-0.2334
<i>Kuenenia</i>	0.6352	0.6932	0.5923	0.4442	0.5969

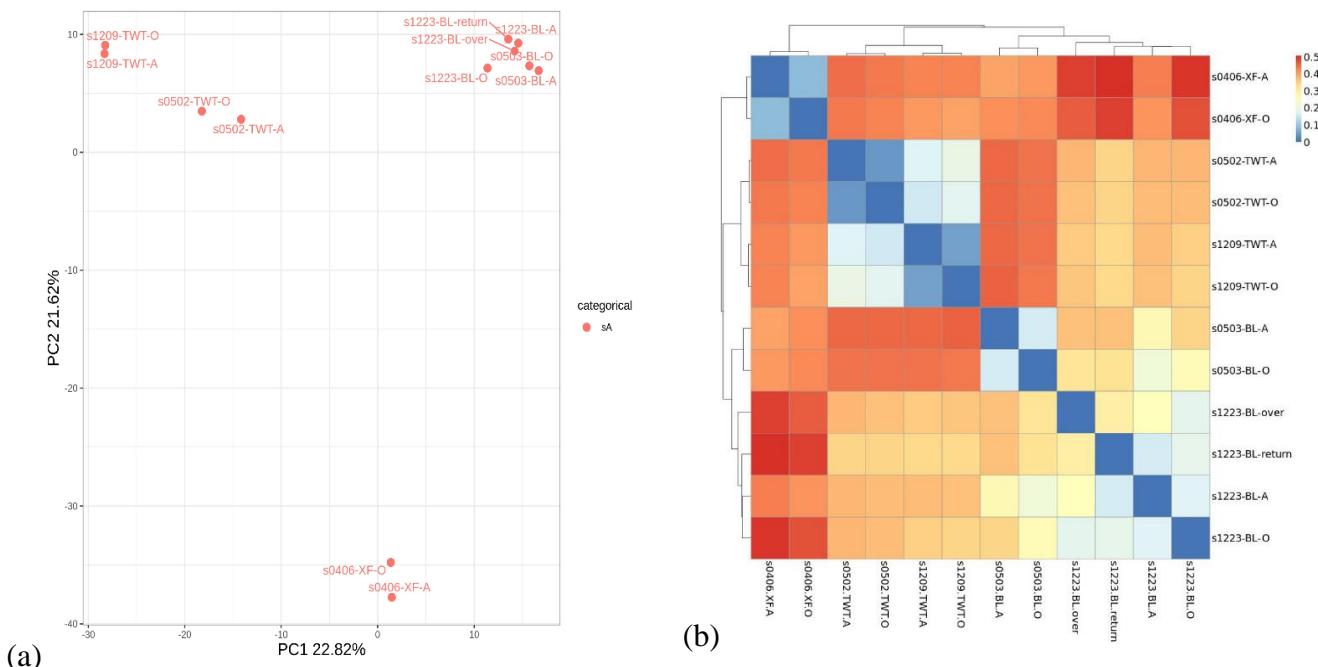


圖4-22三廠區Beta diversity分析圖(a)PCA (b)Weighted Unifrac 分析

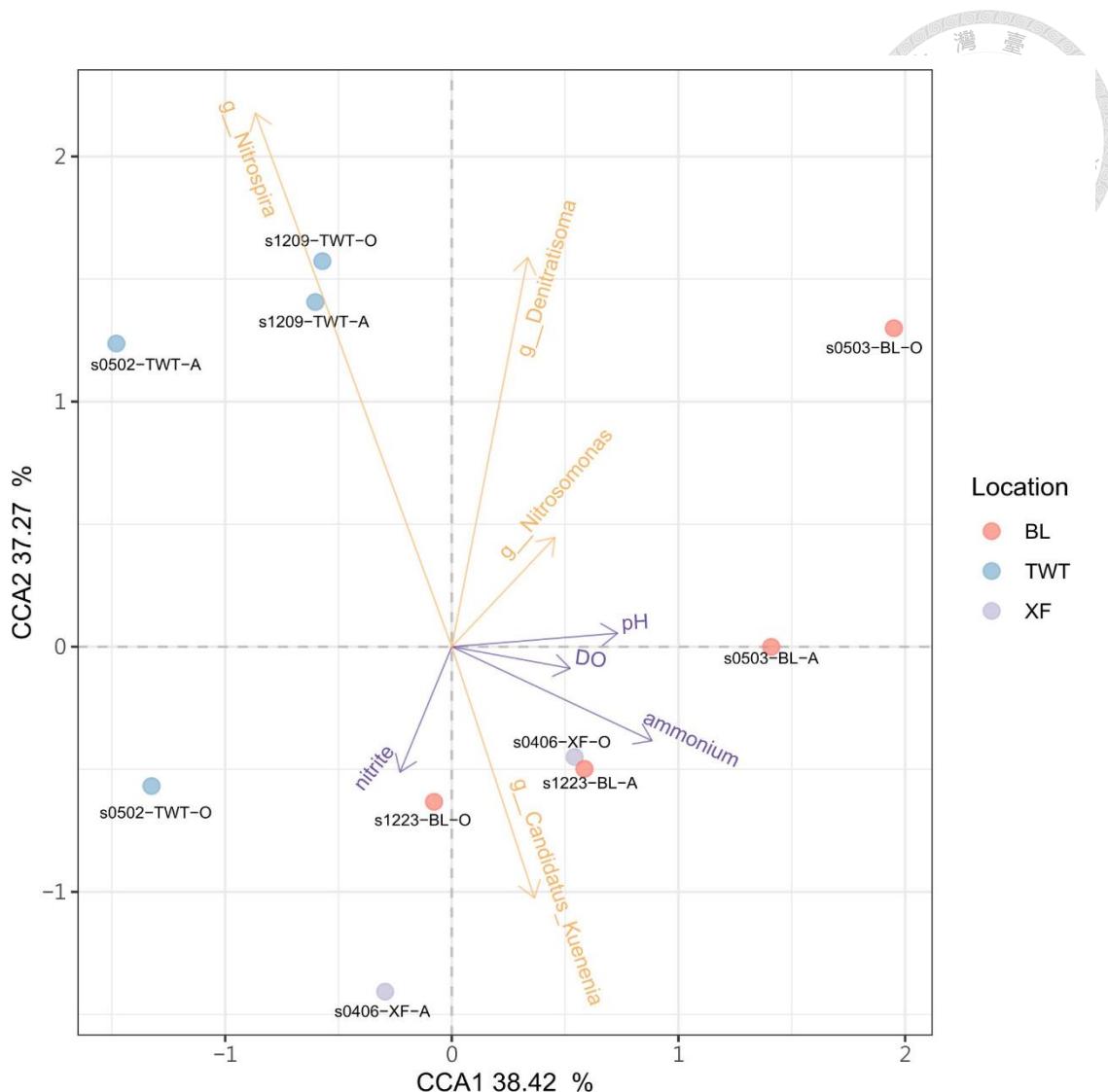


圖4-23環境因子（紫色箭頭）與硝化脫硝菌和厭氧氨氧化菌相對豐度（黃色箭頭）之間的 CCA 分析 (Canonical Correspondence Analysis, CCA)

由於本研究另一個探討的項目為比較過去及現在厭氧氨氧化菌的差異，圖 4-24 為過去及現在以 NGS 方法測定厭氧氨氧化菌之相對豐度結果，在過去接種完富含厭氧氨氧化菌污泥後，在廠區中皆有測得三種厭氧氨氧化細菌屬 *Ca. Brocadia*、*Ca. Kuenenia* 和 *Ca. Anammoxoglobus*，其中三個廠區皆為 *Ca. Brocadia* 為大宗，但從圖 4-24(b)可以看出 XF 廠區目前並無測序到厭氧氨氧化菌之存在，TWT 則僅 *Ca. Brocadia* 以及 *Ca. Anammoxoglobus*，且兩者的相對豐度與過去相比下降許多；BL廠區則僅測得 *Ca. Kuenenia* 屬的存在。根據文獻研究顯示，在一般污水處理廠中從未發現 *Ca. Scalindua* 的存在 (Hu et al., 2010)；而 *Ca. Kuenenia* 在具有選擇性的環境下競爭條件勝過 *Ca. Brocadia* (Kartal et al., 2006; Yang et al., 2018)，加上 *Ca. Kuenenia* 對基質的親和力高，更適合垃圾滲出液 (Miao et al., 2018)，故經過多年水質條件的變化，在 BL 廠區中僅剩 *Ca. Kuenenia* 屬的存在。

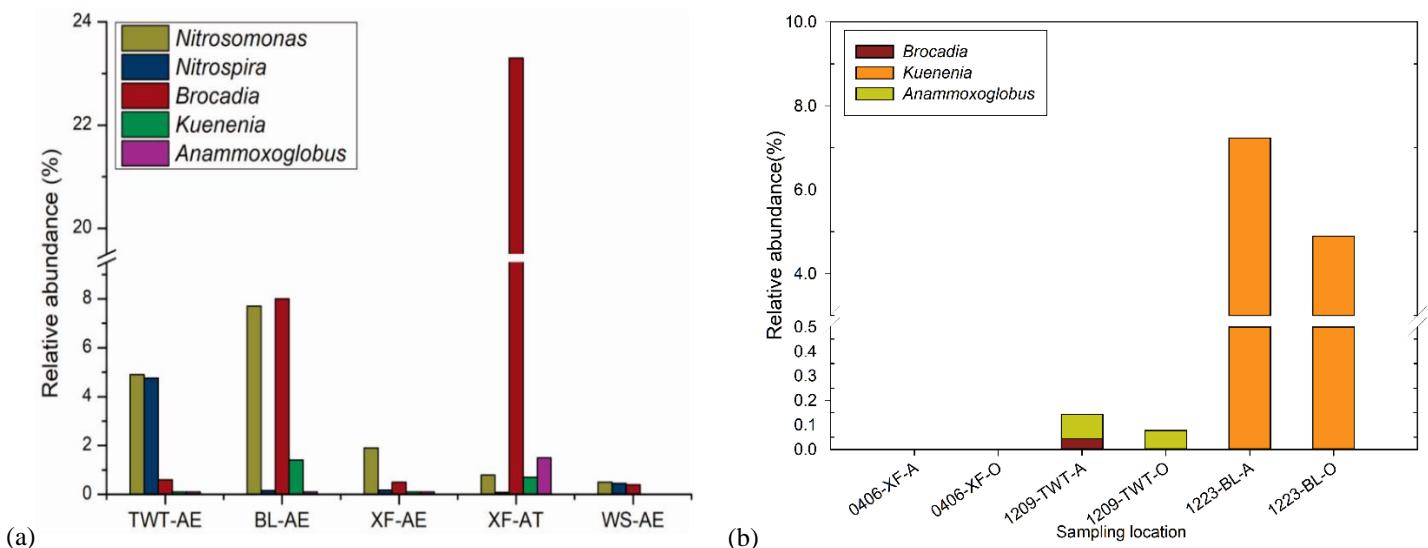


圖 4-24 (a)過去(Yang et al., 2020)以及(b)現在厭氧氨氧化菌相對豐度

第五章 結論與建議



5.1 結論

本研究探討了台灣在過去曾經額外植種具有厭氧氨氧化菌顆粒之污泥的垃圾滲出水處理廠區現今的廠區情形，藉由 dPCR 技術進行氮相關基因之絕對定量，以及次世代定序分析探討三廠區之氮循環主要機制，同時與其他研究團隊在過去的研究結果進行比較，本研究結果整理如下：

1. 由於三個廠區具有相同的植種來源，故在其中 BL 發現厭氧氨氧化菌後，由於可以推斷其他兩個廠區也可能存在相關基因序列。因此，以基因克隆確認了引子對的適用性，以及正確性。
2. 三廠區在基本的水質檢測上以 BL 廢區較特別，廠內反應槽採用間歇曝氣法，故在採樣時溶氧濃度相對較高，此外，其污泥濃度為其他廠區的 0.1~0.01 倍，故在整體反應槽之 COD、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 以及 TN 的去除效率上表現相對較差；而 TWT 廢區目前反應槽的水質狀態與一般垃圾滲出水處理廠具有差異，氨氮濃度較低，故在整體廠區的運作方式上與一般民生污水處理廠較相似，其在總氮去除效率上最佳。
3. 在三個廠區的氮相關基因絕對定量上，TWT 以及 XF 廢區之厭氧氨氧化基因占比極低，甚至是低於檢測極限，故推論目前廠區中厭氧氨氧化反應對整體氮循環反應貢獻很小，而就硝化脫硝基因的占比來看，XF 廢區主要以脫硝反應占優勢，而 TWT 廢區則同時在進行整體氮循環反應，BL 則為硝化—脫硝—厭氧氨氧化三者合一。
4. 本研究中僅在 BL、XF 廢區檢測到 *hzo* 基因，由於 BL 廢區的水質條件（基

質濃度以及碳氮比) 較適合 Anammox 進行反應，且載體提供穩定的生長環境及生態區位，故基因定量上以 BL 廠區基因濃度最高，且根據 CCA 分析結果，BL 廠區的厭氧氨氧化菌可歸功於氨氮以及 AOB 之貢獻。



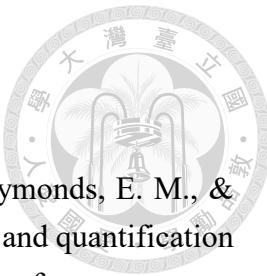
5. 在菌相分析上，三廠區的優勢菌門皆有擬桿菌門 (*Bacteroidota*)、變形菌門 (*Proteobacteria*)，相對豐富度皆>10%，與剛植種完之狀態相同。在優勢菌屬上，TWT 及 XF 廠區主要以硝化脫硝菌屬以及厭氧產甲烷菌屬組成，而 BL 廠區則同時具備硝化—脫硝—厭氧氨氧化菌三者合一。
6. 與過去相比，經過多年水質組成的改變(例如：溶氧、廠區水肥處理量提升)，三個廠區廠內的物種多樣性皆下降，且厭氧氨氧化菌屬相對占比皆有減少趨勢。現階段 BL 廠區以 *Kuenenia* 為優勢屬，TWT 則以 *Brocadia* 及 *Anammoxoglobus* 為主要組成，但占比很低。



5.2 建議

1. 在實廠的厭氧氨氧化活性檢測上，較不建議以氨氮、亞硝酸根的去除率來判斷 Anammox 活性，建議以 ^{15}N 同位素檢測法檢測，避免無法掌握變因較多的實廠樣品。
2. 本研究針對功能性基因的絕對定量與次世代定序了解菌種組成，由於檢測基因量有限，建議後續可同時進行總基因組分析，建立更完整的微生物群落組成、功能性反應及其在環境中與其他微生物的相互作用關係。
3. 由於 BL 廢區的水體性質特殊，故污泥分析是以載體以及壁上污泥進行討論，建議後續在分析相同概念之廠區時，可同時分析其他廠區在壁上或固體物上的污泥，進一步探討不同生態區位對微生物組成之影響。
4. 根據本研究目前之探討結果可知目前 BL 廢區的厭氧氨氧化菌具有相對的優勢，但由於實務面考量，廠區的反應效率較不理想，提高了曝氣量及額外碳源的添加，持續下去可能會影響厭氧氨氧化菌的生存，故建議後續研究團隊可持續探討在實廠污泥中影響 Anammox 的數量因子，改善目前實廠遇到的困境。
5. 根據 XF 廢區的水質條件以及基因定量結果，建議 XF 廢區提高廠區溶氧，提高硝化反應之進行。

參考文獻

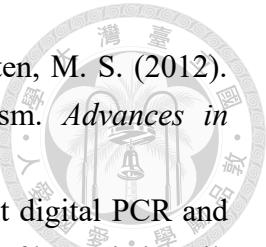


- Ahmed, W., Bivins, A., Metcalfe, S., Smith, W. J., Verbyla, M. E., Symonds, E. M., & Simpson, S. L. (2022). Evaluation of process limit of detection and quantification variation of SARS-CoV-2 RT-qPCR and RT-dPCR assays for wastewater surveillance. *Water Research*, 213, 118132.
- Bae, H., Paul, T., Kim, D., & Jung, J.-Y. (2016). Specific ANAMMOX activity (SAA) in a sequencing batch reactor: optimization test with statistical comparison. *Environmental Earth Sciences*, 75, 1-9.
- Baytshtok, V., Kim, S., Yu, R., Park, H., & Chandran, K. (2008). Molecular and biokinetic characterization of methylotrophic denitrification using nitrate and nitrite as terminal electron acceptors. *Water Science and Technology*, 58(2), 359-365.
- Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: processes. *Players, and Human*, 3, 10-25.
- Burris, R. H., & Roberts, G. P. (1993). Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition*, 13(1), 317-335.
- Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., & Zhang, B. (2020). Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. *Molecules*, 25(3), 706.
- Chamchoi, N., & Nitisoravut, S. (2007). Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 66(11), 2225-2232.
- Chen, F., Li, G., Li, X., Wang, H., Wu, H., Li, J., Li, C., Li, W., Zhang, L., & Xi, B. (2021). The cotreatment of old landfill leachate and domestic sewage in rural areas by deep subsurface wastewater infiltration system (SWIS): performance and bacterial community. *Environmental Pollution*, 274, 115800.
- Chen, W., Chiang, Y., Huang, Y., Chen, S., Sung, S., & Lin, J.-G. (2017). Tertiary nitrogen removal using simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in packed bed reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 36-42.
- Costa, A. M., Alfaia, R. G. d. S. M., & Campos, J. C. (2019). Landfill leachate treatment in Brazil—An overview. *Journal of Environmental Management*, 232, 110-116.
- Cui, B., Yang, Q., Liu, X., Wu, W., Liu, Z., & Gu, P. (2020). Achieving partial denitrification-anammox in biofilter for advanced wastewater treatment. *Environment International*, 138, 105612.
- Dale, O. R., Tobias, C. R., & Song, B. (2009). Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1194-1207.
- Dang, H., Li, J., Chen, R., Wang, L., Guo, L., Zhang, Z., & Klotz, M. G. (2010). Diversity,

- abundance, and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing Betaproteobacteria in response to environmental gradients and coastal eutrophication in Jiaozhou Bay, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4691-4702.
- Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J., Mosquera-Corral, A., Mendez, R., & Jetten, M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 859-865.
- Daverey, A., Chei, P. C., Dutta, K., & Lin, J.-G. (2015). Statistical analysis to evaluate the effects of temperature and pH on anammox activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 89-93.
- Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J., Mosquera-Corral, A., Campos, J., Mata-Alvarez, J., & Méndez, R. (2008). Short-and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 688-693.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J., Siegrist, H., van der Meer, J. R., & Zehnder, A. J. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 175, 198-207.
- Fan, J., Zhang, B., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Liu, F., Guo, Y., & Wu, H. (2013). Intermittent aeration strategy to enhance organics and nitrogen removal in subsurface flow constructed wetlands. *Bioresource Technology*, 141, 117-122.
- Feng, Y., Zhao, Y., Guo, Y., & Liu, S. (2018). Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia. *Water Research*, 128, 402-411.
- Fernández, I., Dosta, J., Fajardo, C., Campos, J., Mosquera-Corral, A., & Méndez, R. (2012). Short-and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. *Journal of Environmental Management*, 95, S170-S174.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., & Galloway, J. N. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164.
- Fuerst, J. A. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology*, 141(7), 1493-1506.
- Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J. D., & Furukawa, K. (2002). Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(5), 412-418.

- Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., & Siegrist, H. (2002). Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology*, 99(3), 295-306.
- Gabarró, J., Hernández-del Amo, E., Gich, F., Ruscalleda, M., Balaguer, M., & Colprim, J. (2013). Nitrous oxide reduction genetic potential from the microbial community of an intermittently aerated partial nitritation SBR treating mature landfill leachate. *Water Research*, 47(19), 7066-7077.
- Gayle, B., Boardman, G., Sherrard, J., & Benoit, R. (1989). Biological denitrification of water. *Journal of Environmental Engineering*, 115(5), 930-943.
- Guimarães, L. B., Mezzari, M. P., Daudt, G. C., & da Costa, R. H. (2017). Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(7), 1756-1765.
- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M. C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H. J., & Jetten, M. S. (2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1066-1071.
- Hastings, R. C., Ceccherini, M. T., Miclaus, N., Saunders, J. R., Bazzicalupo, M., & McCarthy, A. J. (1997). Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(1), 45-54.
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33-45.
- He, S., Chen, Y., Qin, M., Mao, Z., Yuan, L., Niu, Q., & Tan, X. (2018). Effects of temperature on anammox performance and community structure. *Bioresource Technology*, 260, 186-195.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., & Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Microbiology*, 139(6), 1147-1153.
- Hu, B.-l., Zheng, P., Tang, C.-j., Chen, J.-w., van der Biezen, E., Zhang, L., Ni, B.-j., Jetten, M. S., Yan, J., & Yu, H.-Q. (2010). Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. *Water Research*, 44(17), 5014-5020.
- Huang, L.-N., Chen, Y.-Q., Zhou, H., Luo, S., Lan, C.-Y., & Qu, L.-H. (2003). Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(2), 171-177.

- Isaka, K., Kimura, Y., Osaka, T., & Tsuneda, S. (2012). High-rate denitrification using polyethylene glycol gel carriers entrapping heterotrophic denitrifying bacteria. *Water Research*, 46(16), 4941-4948.
- Isaka, K., Suwa, Y., Kimura, Y., Yamagishi, T., Sumino, T., & Tsuneda, S. (2008). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 379-385.
- Ishimoto, C., Waki, M., & Soda, S. (2021). Adaptation of anammox granules in swine wastewater treatment to low temperatures at a full-scale simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification plant. *Chemosphere*, 282, 131027.
- Jaeschke, A., Op den Camp, H. J., Harhangi, H., Klimiuk, A., Hopmans, E. C., Jetten, M. S., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J. S. (2009). 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 343-350.
- Jetten, M. S., Niftrik, L. v., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., & Op den Camp, H. J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2-3), 65-84.
- Jiang, H., Peng, Y., Li, X., Zhang, F., Wang, Z., & Ren, S. (2020). Advanced nitrogen removal from mature landfill leachate via partial nitrification-Anammox biofilm reactor (PNABR) driven by high dissolved oxygen (DO): Protection mechanism of aerobic biofilm. *Bioresource Technology*, 306, 123119.
- Jiang, H., Wang, Z., Ren, S., Qiu, J., Li, X., & Peng, Y. (2021). Culturing sludge fermentation liquid-driven partial denitrification in two-stage Anammox process to realize advanced nitrogen removal from mature landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125568.
- Jin, R.-C., Yang, G.-F., Yu, J.-J., & Zheng, P. (2012). The inhibition of the Anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79.
- Jokela, J., Kettunen, R., Sormunen, K., & Rintala, J. (2002). Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate: low-cost nitrification in biofilters and laboratory scale in-situ denitrification. *Water Research*, 36(16), 4079-4087.
- Kartal, B., de Almeida, N. M., Maalcke, W. J., Op den Camp, H. J., Jetten, M. S., & Keltjens, J. T. (2013). How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 428-461.
- Kartal, B., & Keltjens, J. T. (2016). Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 998-1011.
- Kartal, B., Koleva, M., Arsov, R., van der Star, W., Jetten, M. S., & Strous, M. (2006). Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 546-553.

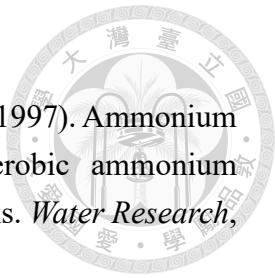


- Kartal, B., van Niftrik, L., Keltjens, J. T., den Camp, H. J. O., & Jetten, M. S. (2012). Anammox—growth physiology, cell biology, and metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, 60, 211-262.
- Kim, T. G., Jeong, S.-Y., & Cho, K.-S. (2014). Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6105-6113.
- Kim, Y. M., Cho, H. U., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2011). Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Research*, 45(17), 5785-5795.
- Kimura, Y., Isaka, K., & Kazama, F. (2011). Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource Technology*, 102(6), 4390-4394.
- Kouba, V., Bachmannová, C., Podzimek, T., Lipovova, P., & Van Loosdrecht, M. (2022). Physiology of anammox adaptation to low temperatures and promising biomarkers: a review. *Bioresource Technology*, 126847.
- Kuenen, J. G. (2020). Anammox and beyond. *Environmental microbiology*, 22(2), 525-536.
- Kumar, M., & Lin, J.-G. (2010). Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal—strategies and issues. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3), 1-9.
- Li, M., Hong, Y.-G., Cao, H.-L., & Gu, J.-D. (2011). Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl River Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. *Ecotoxicology*, 20, 1780-1790.
- Li, M., Wang, Y., Zhang, Y., Li, J., & Chen, X. (2012). Variance analysis between TaqMan probe and SYBR Green real-time quantitative PCR for determining the copy number of transgene in transformed plants. *Journal of Anhui Agricultural University*, 39(4), 568-570.
- Lin, Z., Huang, W., Zhou, J., He, X., Wang, J., Wang, X., & Zhou, J. (2020). The variation on nitrogen removal mechanisms and the succession of ammonia oxidizing archaea and ammonia oxidizing bacteria with temperature in biofilm reactors treating saline wastewater. *Bioresource Technology*, 314, 123760.
- Liu, X., Wu, J., Hong, Y., Li, Y., Hu, Y., Wang, L., Wang, Y., & Long, A. (2021). Wide distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in the water column of the South China Sea: Implications for their survival strategies. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1893-1903.
- Ma, B., Wang, S., Cao, S., Miao, Y., Jia, F., Du, R., & Peng, Y. (2016). Biological nitrogen

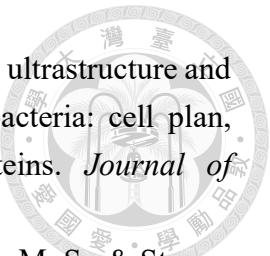
- removal from sewage via anammox: recent advances. *Bioresource Technology*, 200, 981-990.
- Martins, T. H., Souza, T. S., & Varesche, M. B. A. (2018). The Influence of stirring speed, temperature and initial nitrogen concentration on specific anammox activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590-596.
- Meng, H., Zhang, X., Zhou, Z., Luo, L., Lan, W., Lin, J.-G., Li, X.-Y., & Gu, J.-D. (2021). Simultaneous occurrence and analysis of both anammox and n-damo bacteria in five full-scale wastewater treatment plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 156, 105112.
- Miao, L., Wang, K., Wang, S., Zhu, R., Li, B., Peng, Y., & Weng, D. (2014). Advanced nitrogen removal from landfill leachate using real-time controlled three-stage sequence batch reactor (SBR) system. *Bioresource Technology*, 159, 258-265.
- Miao, L., Yang, G., Tao, T., & Peng, Y. (2019). Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments—A review. *Journal of Environmental Management*, 235, 178-185.
- Miao, L., Zhang, Q., Wang, S., Li, B., Wang, Z., Zhang, S., Zhang, M., & Peng, Y. (2018). Characterization of EPS compositions and microbial community in an Anammox SBBR system treating landfill leachate. *Bioresource Technology*, 249, 108-116.
- Miao, Y., Peng, Y., Zhang, L., Li, B., Li, X., Wu, L., & Wang, S. (2018). Partial nitrification-anammox (PNA) treating sewage with intermittent aeration mode: Effect of influent C/N ratios. *Chemical Engineering Journal*, 334, 664-672.
- Mulder, A., Van de Graaf, A. A., Robertson, L., & Kuenen, J. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), 177-183.
- Okabe, S., Ye, S., Lan, X., Nukada, K., Zhang, H., Kobayashi, K., & Oshiki, M. (2023). Oxygen tolerance and detoxification mechanisms of highly enriched planktonic anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *ISME Communications*, 3(1), 45.
- Pan, J., Fei, H., Song, S., Yuan, F., & Yu, L. (2015). Effects of intermittent aeration on pollutants removal in subsurface wastewater infiltration system. *Bioresource Technology*, 191, 327-331.
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lücker, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., & Lebedeva, E. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing N itrospira. *Environmental Microbiology*, 16(10), 3055-3071.



- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848-861.
- Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: a technology review. *Sensors*, 18(4), 1271.
- Quan, Z. X., Rhee, S. K., Zuo, J. E., Yang, Y., Bae, J. W., Park, J. R., Lee, S. T., & Park, Y. H. (2008). Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3130-3139.
- Renou, S., Givaudan, J., Poulain, S., Dirassouyan, F., & Moulin, P. (2008). Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3), 468-493.
- Schmid, M. C., Risgaard-Petersen, N., Van De Vossenberg, J., Kuypers, M. M., Lavik, G., Petersen, J., Hulth, S., Thamdrup, B., Canfield, D., & Dalsgaard, T. (2007). Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1476-1484.
- Shalini, S. S., & Joseph, K. (2012). Nitrogen management in landfill leachate: Application of SHARON, ANAMMOX and combined SHARON-ANAMMOX process. *Waste Management*, 32(12), 2385-2400.
- Shi, Z., Zhang, Y., Zhou, J., Chen, M., & Wang, X. (2013). Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM. *Bioresource Technology*, 148, 144-148.
- Shu, D., He, Y., Yue, H., & Wang, Q. (2016). Metagenomic and quantitative insights into microbial communities and functional genes of nitrogen and iron cycling in twelve wastewater treatment systems. *Chemical Engineering Journal*, 290, 21-30.
- Song, L., Wang, Y., Tang, W., & Lei, Y. (2015). Archaeal community diversity in municipal waste landfill sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6125-6137.
- Song, L., Wang, Y., Zhao, H., & Long, D. T. (2015). Composition of bacterial and archaeal communities during landfill refuse decomposition processes. *Microbiological Research*, 181, 105-111.
- Stackebrandt, E., Wehmeyer, U., & Liesack, W. (1986). 16S ribosomal RNA-and cell wall analysis of *Gemmata obscuriglobus*, a new member of the order Planctomycetales. *FEMS Microbiology Letters*, 37(3), 289-292.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., & Wincker, P. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*,



- 440(7085), 790-794.
- Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. (1997). Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, 31(8), 1955-1962.
- Sun, F., Sun, B., Li, Q., Deng, X., Hu, J., & Wu, W. (2014). Pilot-scale nitrogen removal from leachate by ex situ nitrification and in situ denitrification in a landfill bioreactor. *Chemosphere*, 101, 77-85.
- Sun, F., Zhang, W., Jiang, G., Liu, Y., Wu, S., Wu, D., Su, X., Chen, J., Lin, H., & Zhou, Y. (2020). Effective biological nitrogen process and nitrous oxide emission characteristics for the treatment of landfill leachate with low carbon-to-nitrogen ratio. *Journal of Cleaner Production*, 268, 122289.
- Sun, S., Song, Y., Yang, X. J., Hu, H., Wu, S., Qi, W.-k., & Li, Y.-Y. (2018). Strategies for improving nitrogen removal under high sludge loading rate in an anammox membrane bioreactor operated at 25 C. *Chemical Engineering Science*, 183, 106-114.
- Tang, C.-J., Zheng, P., Chen, T.-T., Zhang, J.-Q., Mahmood, Q., Ding, S., Chen, X.-G., Chen, J.-W., & Wu, D.-T. (2011). Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process. *Water Research*, 45(1), 201-210.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J., Toze, S., Rittmann, B., & Stahl, D. (1994). Evolutionary relationships among ammonia-and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176(21), 6623-6630.
- Timmermans, P., & Van Haute, A. (1983). Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Research*, 17(10), 1249-1255.
- Tokutomi, T., Yamauchi, H., Nishimura, S., Yoda, M., & Abma, W. (2011). Application of the nitritation and anammox process into inorganic nitrogenous wastewater from semiconductor factory. *Journal of Environmental Engineering*, 137(2), 146-154.
- Umar, M., Aziz, H. A., & Yusoff, M. S. (2010). Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton for the treatment of landfill leachate. *Waste Management*, 30(11), 2113-2121.
- Van De Graaf, A. A., De Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S., & Kuenen, J. G. (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143(7), 2415-2421.
- van Niftrik, L., Geerts, W. J., van Donselaar, E. G., Humbel, B. M., Webb, R. I., Fuerst,

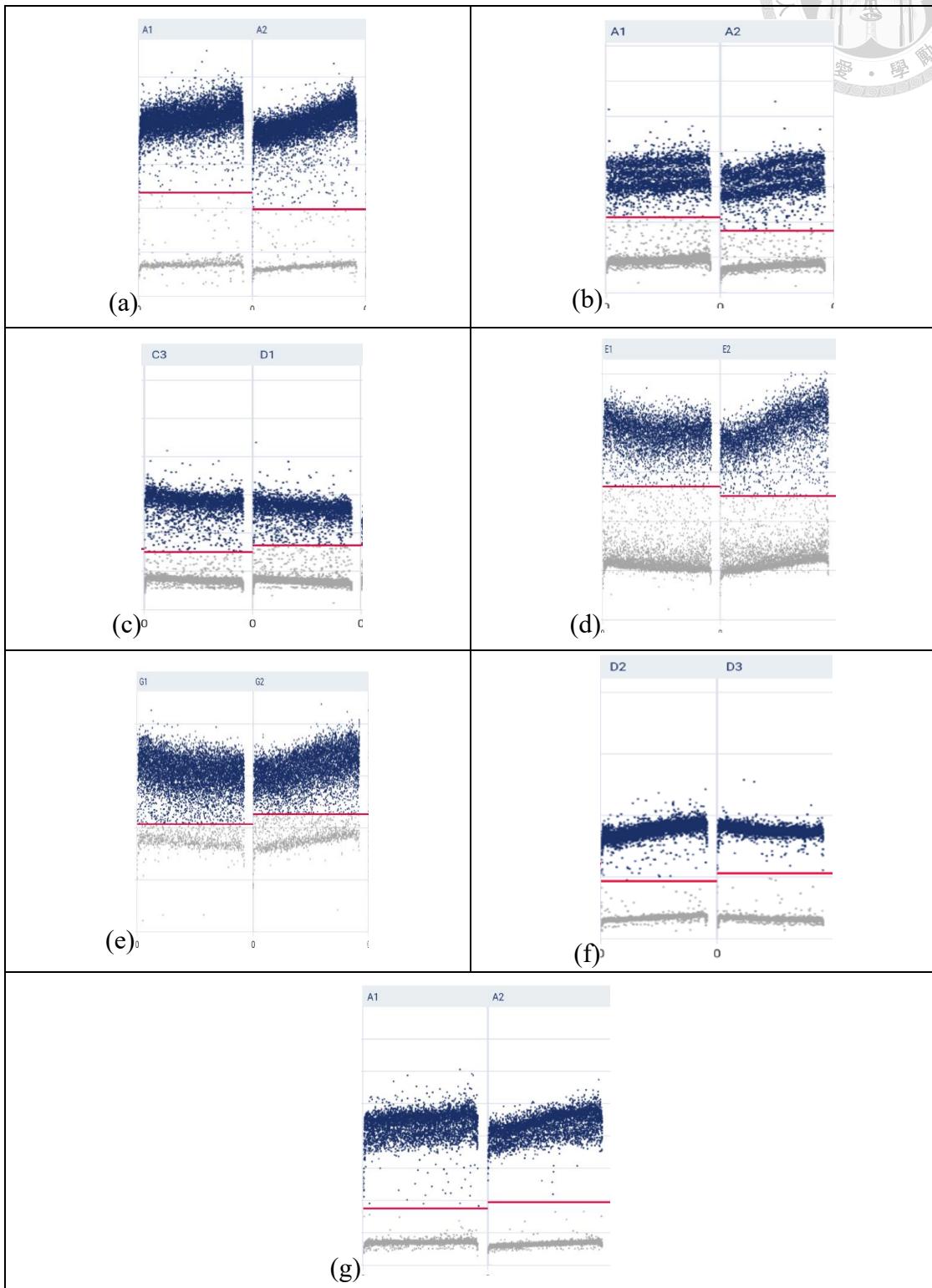


- J. A., Verkleij, A. J., Jetten, M. S., & Strous, M. (2008). Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome c proteins. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 708-717.
- van Niftrik, L. A., Fuerst, J. A., Damsté, J. S. S., Kuenen, J. G., Jetten, M. S., & Strous, M. (2004). The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), 7-13.
- Viveros, M. L., Azimi, S., Pichon, E., Roose-Amsaleg, C., Bize, A., Durandet, F., & Rocher, V. (2022). Wild type and variants of SARS-CoV-2 in Parisian sewage: presence in raw water and through processes in wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(44), 67442-67449.
- Wan, K., Yu, Y., Hu, J., Liu, X., Deng, X., Yu, J., Chi, R., & Xiao, C. (2022). Recovery of anammox process performance after substrate inhibition: Reactor performance, sludge morphology, and microbial community. *Bioresource Technology*, 357, 127351.
- Wang, C.-C., Lee, P.-H., Kumar, M., Huang, Y.-T., Sung, S., & Lin, J.-G. (2010). Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 622-628.
- Wang, C., Zhao, Y., Xie, B., Peng, Q., Hassan, M., & Wang, X. (2014). Nitrogen removal pathway of anaerobic ammonium oxidation in on-site aged refuse bioreactor. *Bioresource Technology*, 159, 266-271.
- Wang, D., Wang, S., Du, X., He, Q., Liu, Y., Wang, Z., Feng, K., Li, Y., & Deng, Y. (2022). ddPCR surpasses classical qPCR technology in quantitating bacteria and fungi in the environment. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2587-2598.
- Wang, L., Hong, Y., Gu, J.-D., Wu, J., Yan, J., & Lin, J.-G. (2021). Influence of critical factors on nitrogen removal contribution by anammox and denitrification in an anammox-inoculated wastewater treatment system. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101868.
- Wang, X., Xie, B., Zhang, C., Shen, Y., & Lu, J. (2017). Quantitative impact of influent characteristics on nitrogen removal via anammox and denitrification in a landfill bioreactor case. *Bioresource Technology*, 224, 130-139.
- Wang, Y.-n., Xu, R., Wang, H., Shi, H., Kai, Y., Sun, Y., Li, W., Bian, R., & Zhan, M. (2021). Insights into the stabilization of landfill by assessing the diversity and dynamic succession of bacterial community and its associated bio-metabolic process. *Science of the Total Environment*, 768, 145466.
- Wei, H., Wang, X., Hassan, M., Huang, H., & Xie, B. (2019). Strategy of rapid start-up

- and the mechanism of de-nitrogen in landfill bioreactor. *Journal of Environmental Management*, 240, 126-135.
- Wen, R., Jin, Y., & Zhang, W. (2020). Application of the anammox in China—A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1090.
- Wiszniewski, J., Robert, D., Surmacz-Gorska, J., Miksch, K., & Weber, J. (2006). Landfill leachate treatment methods: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 51-61.
- Xie, B., Lv, Z., Hu, C., Yang, X., & Li, X. (2013). Nitrogen removal through different pathways in an aged refuse bioreactor treating mature landfill leachate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9225-9234.
- Xu, S., Lu, W., Liu, Y., Ming, Z., Liu, Y., Meng, R., & Wang, H. (2017). Structure and diversity of bacterial communities in two large sanitary landfills in China as revealed by high-throughput sequencing (MiSeq). *Waste Management*, 63, 41-48.
- Yamamoto, T., Takaki, K., Koyama, T., & Furukawa, K. (2008). Long-term stability of partial nitritation of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. *Bioresource Technology*, 99(14), 6419-6425.
- Yang, X.-R., Li, H., Su, J.-Q., & Zhou, G.-W. (2021). Anammox bacteria are potentially involved in anaerobic ammonium oxidation coupled to iron (III) reduction in the wastewater treatment system. *Frontiers in Microbiology*, 12, 717249.
- Yang, Y., Li, M., Hu, Z., Shim, H., Lin, J.-G., Li, X.-Y., & Gu, J.-D. (2020). Deep insights into the green nitrogen removal by anammox in four full-scale WWTPs treating landfill leachate based on 16S rRNA gene and transcripts by 16S rRNA high-throughput sequencing. *Journal of Cleaner Production*, 276, 124176.
- Yang, Y., Pan, J., Zhou, Z., Wu, J., Liu, Y., Lin, J.-G., Hong, Y., Li, X., Li, M., & Gu, J.-D. (2020). Complex microbial nitrogen-cycling networks in three distinct anammox-inoculated wastewater treatment systems. *Water Research*, 168, 115142.
- Yang, Y., Zhang, L., Cheng, J., Zhang, S., Li, X., & Peng, Y. (2018). Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: From sidestream to mainstream. *Bioresource Technology*, 251, 327-333.
- Yoshinaga, I., Amano, T., Yamagishi, T., Okada, K., Ueda, S., Sako, Y., & Suwa, Y. (2011). Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes and Environments*, 26(3), 189-197.
- Yuan, Q., Wang, K., He, B., Liu, R., Qian, L., Wan, S., Zhou, Y., Cai, H., & Gong, H. (2021). Spontaneous mainstream anammox in a full-scale wastewater treatment plant with hybrid sludge retention time in a temperate zone of China. *Water Environment Research*, 93(6), 854-864.

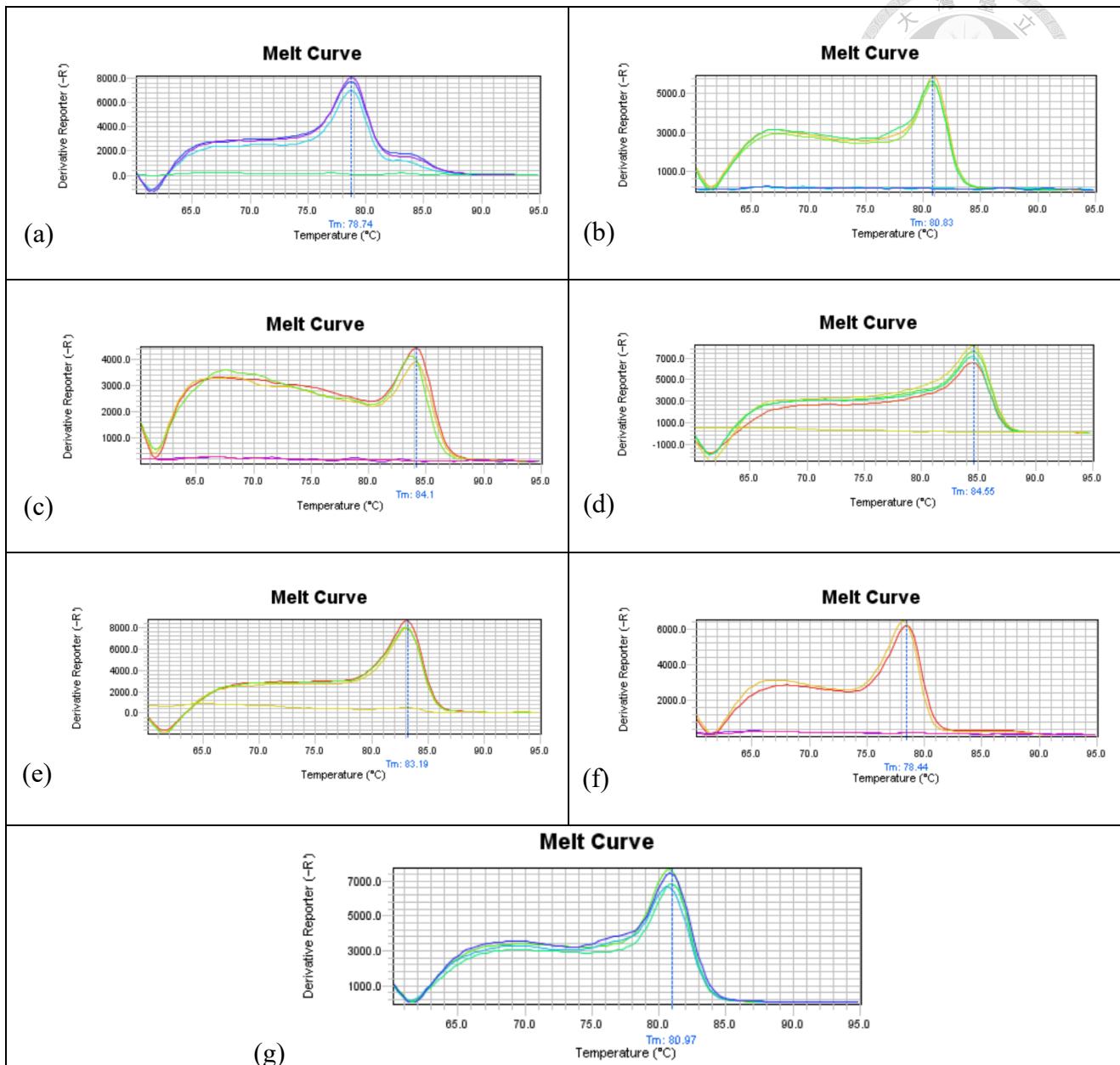
- Zhang, F., Peng, Y., Liu, Y., & Zhao, L. (2021). Improving stability of mainstream Anammox in an innovative two-stage process for advanced nitrogen removal from mature landfill leachate. *Bioresource Technology*, 340, 125617.
- Zhang, F., Peng, Y., Miao, L., Wang, Z., Wang, S., & Li, B. (2017). A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chemical Engineering Journal*, 313, 619-628.
- Zhao, J., Lu, X.-Q., Luo, J.-H., Liu, J.-Y., Xu, Y.-F., Zhao, A.-H., Liu, F., Tai, J., Qian, G.-R., & Peng, B. (2013). Characterization of fresh leachate from a refuse transfer station under different seasons. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 631-637.
- Zhu, G., Wang, S., Wang, Y., Wang, C., Risgaard-Petersen, N., Jetten, M. S., & Yin, C. (2011). Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME Journal*, 5(12), 1905-1912.
- Zhu, G., Xia, C., Shanyun, W., Zhou, L., Liu, L., & Zhao, S. (2015). Occurrence, activity and contribution of anammox in some freshwater extreme environments. *Environmental Microbiology Reports*, 7(6), 961-969.

附錄



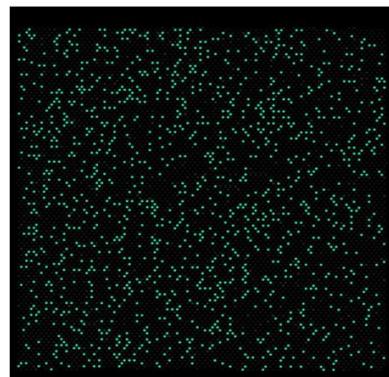
附圖 1 dPCR 基因螢光強度分布圖

(a) *amoA* (b) *nxrB* (c) *narG* (d) *nirK* (e) *nosZ* (f) *hzo* (g) *bac*
100

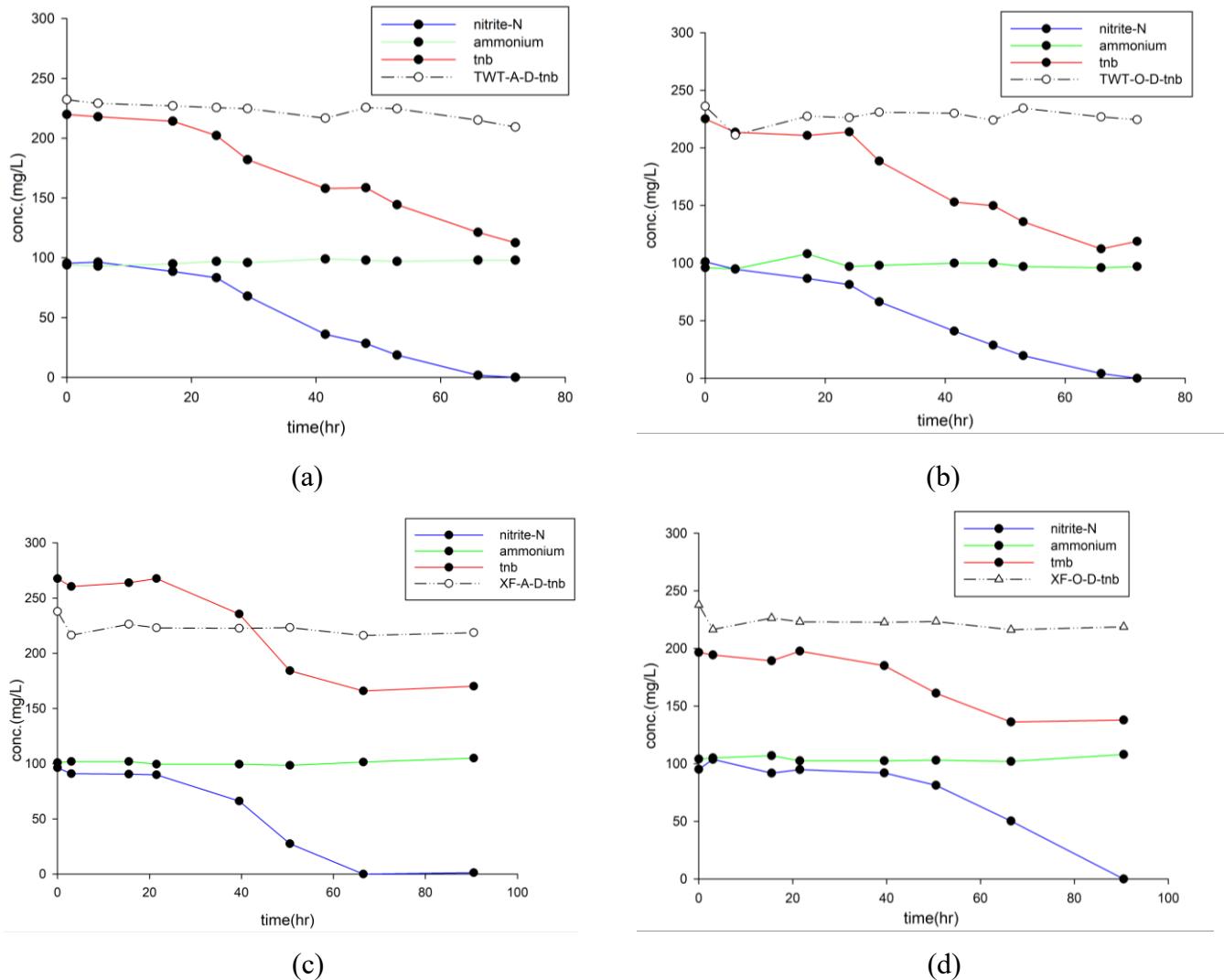


附圖 2 dPCR 基因螢光強度分布圖

(a) *amoA* (b) *nxrB* (c) *narG* (d) *nirK* (e) *nosZ* (f) *hzo* (g) *bac*



附圖 3 dPCR 反應結束示意圖



附圖 4 SAA 活性測試 (a)TWT-A (b)TWT-O (c)XF-A (d)XF-O