

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's Thesis

應用3D生物列印於ANAMMOX菌固定化材料
開發與效能評估之研究

Development and Functional Assessment of ANAMMOX
Immobilization Materials Using 3D Bioprinting

袁輔瑩

Fu-Ying Yuan

指導教授：于昌平 博士
Advisor: Chang-Ping Yu, PhD.

中華民國 114 年 7 月

July 2025

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY



應用 3D 生物列印於 ANAMMOX 菌固定化材料

開發與效能評估之研究

Development and Functional Assessment of ANAMMOX

Immobilization Materials Using 3D Bioprinting

本論文係袁輔瑩 君（學號 R12541109）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 114 年 6 月 26 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：

黃郁慈

黃郁慈博士
中原大學化學工程系教授

張怡塘

張怡塘博士
東吳大學微生物學系特聘教授

于昌平

于昌平博士
國立台灣大學環境工程學研究

指導教授：

于昌平

所長：

✓陳衍正



誌謝



行文至此，始於初秋，終於盛夏。我的碩士生涯至此落下帷幕。兩年的時光轉瞬即逝，生活雖忙碌，卻也充實而精彩。一路走來，有太多扶持著我的人，值得感謝。

「桃李不言，下自成蹊。」首先感謝我的指導教授——于昌平教授。于老師學識淵博、治學嚴謹，待學生親切溫和，在我整個碩士階段中，給予我無限的耐心與對研究自由探索的空間，是我前行路上的明燈。

也誠摯感謝我大學時期的指導教授——張怡塘教授。張老師在我早期研究上的啟蒙、鼓勵與訓練，為我後來的學習奠定了紮實的基礎。

感謝實驗室的博士與夥伴們。謝謝吳佩勳博士在實驗設計與操作上的協助，也感謝婕涵、昌鑫、昆泰、之暘與晉廷，與你們一同實驗、學習、聊天的日子，是我碩士生活中難得開心的時光。

「願歲並謝，與長友兮。」感謝我的摯友庭瑜，一路以來是我最堅實的依靠與良師益友。在生活與學業的每一次困惑中，妳總能陪我談出一片光亮。期待我們未來繼續結伴同行。

「樹高千尺，不忘根深洪土。」感謝我的父親，始終無聲地支持我追求學業的每一步。感謝我的妹妹，讓我在求學的路上無後顧之憂；也感謝我的貓，讓我重拾對這個世界的柔軟與期待。

我更想感謝我的母親。感謝她曾用力地托舉著我。如果她可以看見我的論文，我想她應該會為我驕傲。

最後，感謝一路顛簸卻從未放棄的自己。即使生活時常猝不及防地給我一記耳光，我仍咬牙堅持，學會獨自面對的勇氣。未來縱然難免再度跌倒，我依然會一次又一次地站起來。

袁輔瑩 謹誌於 2025/7/12



摘要



氮污染為水體環境中常見且具累積性之污染問題，傳統硝化-反硝化程序需外加碳源與高能耗，而厭氧氨氧化(ANAMMOX)為一種自營型脫氮機制，具有低碳源需求與低污泥產量等優勢，逐漸受到重視。然 ANAMMOX 菌生長速率緩慢，對操作條件敏感，故穩定富集與固定化應用成為研究重點。本研究以建立穩定之 ANAMMOX 反應系統為目標，並探討固定化材料與保存條件對其活性與應用可行性之影響。

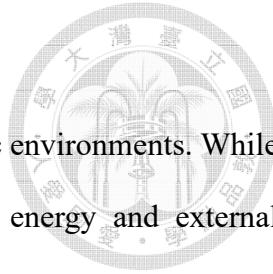
本研究以一垃圾掩埋場滲出水處理廠生物處理單元活性污泥與食品廠廢水處理廠之活性污泥為接種源，建立實驗室規模之 ANAMMOX 反應系統，並採漸升氮源濃度操作模式，最終進流總氮濃度為 120 mg-N/ L。第 94 天起觀察到氨氮與亞硝酸氮穩定消耗，顯示系統成功富集 ANAMMOX 菌群，後續以此建立四組反應槽進行馴養。反應系統最終去氮效率達 60–90%，菌相結果顯示菌群由有機物降解菌演替為以 *Candidatus Brocadia* 為主之 ANAMMOX 群落，AC3 反應槽 ANAMMOX 豐度最高達 8.2%。

懸浮態菌群之厭氧氨氧化菌比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)為 1.33 mg-N/ mg-VSS-day。固定化方面，以 PVA-PEGDA/ Light 材料列印所得載體，在總氮濃度為 200 mg-N/ L 下 SAA 可達 1.51 mg-N/ mg-VSS-day，優於懸浮態。保存測試顯示，室溫厭氧條件(S3)保存 10 天後 SAA 維持 1.55 mg-N/ mg-VSS-day，無需冷藏或添加保護劑，展現固定化技術之操作便利性與應用潛力。

關鍵字： ANAMMOX、厭氧氨氧化比活性、菌相分析、除氮、微生物固定化、3D 生物列印



Abstract



Nitrogen pollution is a common and cumulative issue in aquatic environments. While conventional nitrification–denitrification processes require high energy and external carbon, anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) provides an autotrophic alternative with low carbon demand and sludge yield. However, its application is limited by the slow growth and operational sensitivity of ANAMMOX bacteria.

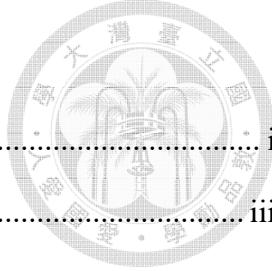
This study established a lab-scale ANAMMOX system using activated sludge from a landfill leachate treatment unit and a food-processing wastewater plant. Operated under gradually increasing nitrogen concentrations up to 120 mg-N/L, the system showed stable ammonium and nitrite removal from day 94. Four reactors were subsequently cultivated, achieving nitrogen removal efficiencies of 60–90%. Microbial analysis revealed a shift from heterotrophs to ANAMMOX-dominated communities, with *Candidatus Brocadia* reaching 8.2% in reactor AC3.

Suspended sludge showed a specific ANAMMOX activity (SAA) of 1.33 mg-N/ mg-VSS-day. Carriers printed with PVA-PEGDA/Light reached 1.51 (TN = 200 mg-N/ L), and after 10 days of anaerobic storage at room temperature, retained 1.55 without refrigeration or additives, demonstrating operational feasibility.

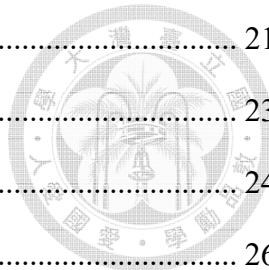
Keywords: ANAMMOX, Specific Anammox Activity, Microbial Community Analysis, Nitrogen Removal, Microbial Immobilization, 3D Bioprinting



目次



口試委員審定書	i
誌謝	iii
摘要	v
Abstract	vii
目次	ix
圖次	xiii
表次	xix
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	3
第二章 文獻回顧	5
2.1 氮循環與水體氮污染	5
2.1.1 氮型態與自然循環路徑	5
2.1.2 人為活動對氮循環的擾動	7
2.1.3 廢水中氮去除的技術需求-以生物程序為例	9
2.2 脫氮相關微生物及其功能	13
2.2.1 氨氧化菌(AOB)與硝酸鹽氧化菌(NOB)	13
2.2.2 異營與自營特性之脫硝菌	14
2.2.3 厭氧氨氧化菌(ANAMMOX)的潛能與限制	15
2.2.4 新興微生物路徑：n-DAMO 與硫脫氮等	17
2.3 ANAMMOX 反應機制與菌群特性	20
2.3.1 ANAMMOX 的生理與代謝路徑	20



2.3.2 常見 ANAMMOX 菌屬與其特徵.....	21
2.3.3 培養條件與富集限制因素	23
2.3.4 ANAMMOX 在不同系統中的應用案例.....	24
2.4 微生物固定化技術在廢水處理中的應用	26
2.4.1 微生物固定化技術類型、選擇與優缺點	26
2.4.2 微生物固定化對菌體活性與穩定性的影響	29
2.4.3 固定化 ANAMMOX 的應用現況與挑戰.....	29
2.5 3D 生物列印技術概述	31
2.5.1 3D 生物列印的基本原理與分類	31
2.5.2 微生物應用中材料特性與列印參數對微生物生存影響	34
2.5.3 3D 列印於固定化微生物的應用案例與研究進展	34
2.6 高通量基因定序技術在微生物研究中的應用	36
2.6.1 高通量基因定序技術簡介(NGS 與 TGS).....	36
2.6.2 高通量定序在脫氮系統微生物群落分析中的應用	37
第三章 材料與方法	41
3.1 研究流程	41
3.2 實驗藥品與設備	43
3.2.1 實驗用藥品	43
3.2.2 實驗用儀器設備	46
3.3 厭氧氨氧化菌(ANAMMOX bacteria)之培養條件與鑑定	47
3.3.1 污泥來源	47
3.3.2 厭氧氨氧化菌培養之合成廢水組成與反應條件設定	49
3.3.3 運行期間之定期監測與分析	52
3.3.4 微生物群落結構分析:PacBio 全長 16S rRNA 定序技術解析菌相變化	54

3.4 厥氧氨氧化菌比活性分析(Specific ANAMMOX Activity, SAA)	57
3.4.1 氨氮(NH ₃ -N)濃度測定方法	58
3.4.2 亞硝氮(NO ₂ ⁻ -N)與硝酸氮(NO ₃ ⁻ -N)濃度測定方法	60
3.4.3 厥氧氨氧化菌比活性(SAA)之計算與表示	61
3.5 微生物固定化與3D列印設計	63
3.5.1 3D生物列印機及列印參數	63
3.5.2 固定化材料生物墨水配方製備	64
3.5.3 生物墨水材料列印步驟	66
3.5.4 固定化後載體之處理與活化	68
3.6 最佳固定化載體與懸浮態ANAMMOX菌比活性(SAA)比較分析	69
3.6.1 氮源濃度漸增下之生物固定化載體反應適應性測試	69
3.6.2 生物固定化載體保存穩定性測試	70
3.7 固定化ANAMMOX載體之特性分析	72
3.7.1 載體微結構觀察與分析：了解固定化形貌與孔隙結構	72
3.7.2 不同階段菌體生長狀態觀察：以螢光染色評估菌體活性	73
第四章 結果與討論	77
4.1 厥氧氨氧化菌培養與反應系統運行分析	77
4.1.1 培養啟動過程與初期系統表現	77
4.1.2 培養過程之氮源濃度變化與系統穩定性分析	80
4.1.3 定期監測參數統整與趨勢探討	88
4.2 微生物群落結構變化分析	96
4.2.1 微生物多樣性變化(Alpha & Beta Diversity)	96
4.2.2 ANAMMOX系統運行期間菌相組成變化	100
4.2.3 ANAMMOX系統運行期間ANAMMOX群落相對豐度分析	113
4.3 懸浮態污泥中ANAMMOX菌群活性評估(SAA測試)	120

4.3.1 氨氮與亞硝氮去除效率分析	120
4.3.2 SAA 計算結果與活性趨勢評估	124
4.4 微生物固定化與 3D 列印之應用成果	125
4.4.1 列印參數設定與製程穩定性觀察	125
4.4.2 墨水與材料配方對列印成品的影響	129
4.4.3 固定化載體培養條件之適用性分析	131
4.5 固定化與懸浮態 ANAMMOX 菌之活性比較分析	138
4.5.1 氮源濃度漸增下之活性反應與耐受性分析	138
4.5.2 固定化載體之保存穩定性與活性維持效果探討	141
4.6 固定化載體之結構與菌體生長狀態分析	148
4.6.1 載體微結構觀察(SEM)結果與孔隙性探討	148
4.6.2 載體內部菌體生長狀態螢光染色結果分析	151
第五章 結論與建議	159
5.1 結論	159
5.2 建議	161
參考文獻	163
附錄	173

圖次

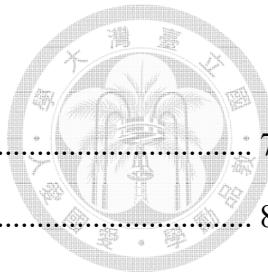


圖 2. 1、氮自然循環路徑(Ghaly et al., 2015)	7
圖 2. 2、氧垂曲線(Lawryshyn, 2024).....	8
圖 2. 3、ANAMMOX 細胞內構(Kartal et al., 2016)	21
圖 2. 4、Kuenenia stuttgartiensis 的生化途徑與酵素機制(Kartal et al., 2013)	21
圖 3. 1、研究流程圖	42
圖 3. 2、垃圾掩埋場滲出水處理廠活性污泥初期照片	48
圖 3. 3、食品廠廢水處理廠活性污泥種植後初期照片	48
圖 3. 4、DNeasy® Power Soil Pro Kit 之 DNA 萃取流程	56
圖 3. 5、厭氧氨氧化菌比活性分析(Specific ANAMMOX Activity, SAA)操作步驟	57
圖 3. 6、HACH 水中氨氮分析試劑-納式比色法之操作步驟.....	59
圖 3. 7、本研究建立之 IC 檢量線	61
圖 3. 8、3D 生物列印機	63
圖 3. 9、生物墨水配置步驟	66
圖 3. 10、場發射掃描式電子顯微鏡儀器照片	72
圖 3. 11、切片後載體以濃度梯度酒精脫水	73
圖 3. 12、Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System 共軛焦光譜 顯微鏡	74
圖 3. 13、載體切片染色顯微鏡操作與活死菌面積分析	75
圖 4. 1、(a)ANAMMOX 系統中污泥發黑跡象；(b)更換含硝酸氮機質後之污泥狀 況	79
圖 4. 2、ANAMMOX 反應系統建立第 0 天至第 113 天之系統初始與出流之氨氮 (NH ₃ -N)、亞硝氮(NO ₂ ⁻ -N)與硝酸氮(NO ₃ ⁻ -N)濃度變化	79
圖 4. 3、ANAMMOX 反應系統初期啟動過程中主要運行參數變化情形(a) DO ；(b)	

pH ; (c) 電導度 ; (d) ORP	80
圖 4. 4 、系統中 ANAMMOX 紅色顆粒污泥.....	83
圖 4. 5 、不同反應槽各運行階段之氮源濃度變化(a) AC1 ; (b) AC2 ; (c) AC3 ; (d) AC4.....	84
圖 4. 6 、各反應槽出流水氮源比例分佈、總氮去除能力與 ANAMMOX 活性反應效率(a) AC1 ; (b) AC2 ; (c) AC3 ; (d) AC4.....	85
圖 4. 7 、各反應槽副產物 NO_3^- -N 之產生量與理論值比較	86
(a) AC1 ; (b) AC2 ; (c) AC3 ; (d) AC4.....	86
圖 4. 8 、AC1 至 AC4 反應槽中塑膠載體 ANAMMOX 菌群附著與瓶壁紅色生物膜形成情形(a) AC1 ; (b) AC2 ; (c) AC3 ; (d) AC4.....	87
圖 4. 9 、AC1 之水質定期監測.....	91
(a) DO (mg/ L) ; (b) pH ; (c) 電導度(EC, $\mu\text{s}/ \text{cm}$) ; (d) ORP (mV)	91
圖 4. 10 、AC2 之水質定期監測.....	92
圖 4. 11 、AC3 之水質定期監測.....	93
圖 4. 12 、AC4 之水質定期監測.....	94
圖 4. 13 、各反應槽之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性懸浮固體濃度(VSS, mg/ L)定期監測(a) AC1 ; (b) AC2 ; (c) AC3 ; (d) AC4.....	95
圖 4. 14 、各階段槽體 α 多樣性指數(Observed OTUs 、Shannon 、Simpson 、Chao1) (a)前期樣本(b)後期樣本	98
圖 4. 15 、各階段槽體 β 多樣性主座標分析(Bray-Curtis PCoA) (a)前期樣本(b)後期樣本	99
圖 4.16 、各反應槽不同月份之門層級菌相堆疊長條圖(a)初始污泥 ; (b) AC1 ; (c) AC2 ; (d) AC3 ; (e) AC4 (續)	103
圖 4. 17 、不同階段初始污泥(未分瓶前)之(a)群落結構 ; (b) 菌群功能分類堆疊圖	106

圖 4.18、不同階段 AC1 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖	107
圖 4.19、不同階段 AC2 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖	108
圖 4.20、不同階段 AC3 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖	109
圖 4.21、不同階段 AC4 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖	110
圖 4.22、各菌屬在初始污泥以及不同反應槽隨啟動月數增加之變化(a)初始污泥； (b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4.....	115
圖 4.23、AC1 懸浮態 ANAMMOX 菌群於比活性(SAA)測試中之反應瓶狀態.	120
圖 4.24、(a)懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試空白對照組之氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度變化趨勢；(b) 氮源轉化過程總濃度堆疊圖	122
圖 4.25、(a)懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度變化趨勢；(b) 氮源轉化過程總濃度堆疊圖	122
圖 4.26、GCODE 檔案文字檔開啟後刪除之部分(石丞均，2022)	126
圖 4.27、SOLIDWORKS 建模之 $10 \times 10 \times 6$ mm 之方體載體型狀	126
圖 4.28、Ultimaker Cura 軟體切片後之網格設計	126
圖 4.29、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 墨水列印所得之	127
(a)空白載體與(b) ANAMMOX 載體.....	127
圖 4.30、根據網格設計列印之 PVA-PEGDA/ Light 載體	128
圖 4.31、添加 40 nm 二氧化矽導致無法固化之 PVA-PEGDA/ Light 載體	128
圖 4.32、SOLIDWORKS 建模之 $10 \times 10 \times 6$ mm 具 5×5 mm 之方形孔洞之方體載體型狀	128
圖 4.33、Ultimaker Cura 軟體切片後之方形孔洞設計	129
圖 4.34、PVA-PEGDA/ Light 墨水列印所得之(a)空白載體與(b) ANAMMOX 載體	129
圖 4.35、ANAMMOX 固定化載體批次反應瓶測試狀態(a) PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體；(b) PVA-PEGDA/ Light 載體	132

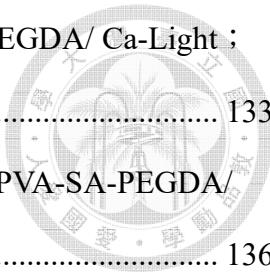


圖 4.36、初步空白載體($TN = 80 \text{ mg/L}$)測試結果(a) PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light ; (b) PVA-PEGDA/ Light.....	133
圖 4.37、初步 ANAMMOX 載體($TN = 80 \text{ mg/L}$)測試結果(a) PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light ; (b) PVA-PEGDA/ Light	136
圖 4.38、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之趨勢與 SAA 結果	140
(a)空白載體 ; (b) PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體.....	140
圖 4.39、保存性各測試組 10 天保存後載體狀態	143
(a) 4°C 保存(S1) ; (b) -20°C 冷凍保存(S2) ; (c) 室溫保存.....	143
圖 4.40、保存性測試各組氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之趨勢與 SAA 結果	
(a)空白載體 ; (b) 4°C 保存(S1) ; (c) -20°C 冷凍保存(S2) ; (d)室溫保存	144
圖 4.41、S2 組(-20°C 冷凍保存) (a)反應後厭氧瓶混濁情形 ; (b)載體破碎狀況	146
圖 4.42、PVA-PEGDA/ Light 空白載體 SEM 拍攝之內部結構	148
圖 4.43、PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體內外結構不同放大倍率拍攝之觀察 結果(a) 1000 X 載體表面 ; (b) 50 X 載體內部 ; (c) 1000 X 內部孔隙發達區域 ; (d)	
1000 X 內部孔隙稀疏區域	150
圖 4.44、共軛焦顯微鏡拍攝之 PVA-PEGDA/ Light 空白載體(a)白光拍攝 ; (b)雷射 光激發後拍攝	152
圖 4.45、直接使用之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度 漸增測試($TN 200 \text{ mg-N/L}$) 之白光與雷射光激發後結果	153
圖 4.46、 4°C 保存之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度 漸增測試($TN 200 \text{ mg-N/L}$)之白光與雷射光激發後結果	154
圖 4.47、 -20°C 保存之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度 漸增測試($TN 200 \text{ mg-N/L}$)之白光與雷射光激發後結果	155
圖 4.48、室溫保存之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度 漸增測試($TN 200 \text{ mg-N/L}$)之白光與雷射光激發後結果	156





表次

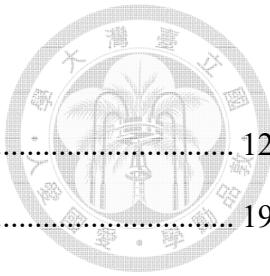


表 2.1、廢水處理中常見氮去除技術比較(以生物程序為主).....	12
表 2.2、脫氮相關微生物及其功能比較	19
表 2.3、固定化載體常用材料之優缺與應用建議	28
表 2.4、不同 3D 生物列印技術之比較(Herzog et al., 2024)	33
表 2.5、3D 生物列印材料於環境應用之案例	35
表 2.6、次世代定序(NGS)與第三代定序(TGS)技術比較	39
表 3.1、實驗用藥品清單	43
表 3.1、實驗用藥品清單(續)	44
表 3.1、實驗用藥品清單(續)	45
表 3.2、實驗用儀器與設備	46
表 3.3、ANAMMOX bacteria 培養基組成成分	50
表 3.4、微量元素成分表	50
表 3.5、本研究反應槽觀測之項目及其目的	54
表 3.6、Nessler 試劑套組三種試劑成分與目的	59
表 3.7、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 輽體配方	65
表 3.8、PVA-PEGDA/Light 輽體配方	65
表 3.9、本研究設計之三種保存條件與其對應處理步驟與文獻參考	71
表 4.1、初始污泥之不同功能群相對豐度變化(%)	111
表 4.2、不同階段 AC1 之不同功能群相對豐度變化(%).....	111
表 4.3、不同階段 AC2 之不同功能群相對豐度變化(%).....	112
表 4.4、不同階段 AC3 之不同功能群相對豐度變化(%).....	112
表 4.5、不同階段 AC4 之不同功能群相對豐度變化(%).....	113
表 4.6、初始污泥之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%).....	117

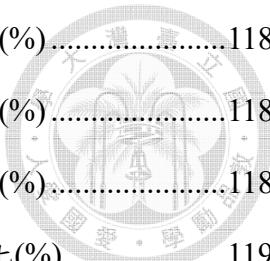
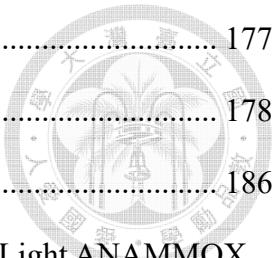


表 4. 7、AC1 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)	118
表 4. 8、AC2 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)	118
表 4. 9、AC3 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)	118
表 4. 10、AC4 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)	119
表 4. 11、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之空白對照組氮源濃度變化	123
表 4. 12、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之氮源濃度變化	123
表 4. 13、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試結果	124
表 4. 14、3D 生物列印機參數設定	125
表 4. 15、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light 載體列印比較	131
表 4. 16、初步空白載體($TN = 80 \text{ mg/ L}$)測試結果	134
(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light & PVA-PEGDA/ Light)	134
表 4. 17、ANAMMOX 載體($TN = 80 \text{ mg/ L}$)測試結果	137
(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light & PVA-PEGDA/ Light)	137
表 4. 18、不同氮源濃度下 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之 SAA	141
表 4. 19、不同保存條件下 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之比活性	147
表 4. 20、PVA-PEGDA/ Light 固定化載體於反應前後及不同保存條件下微生物活 菌與死菌面積比例分析結果	157
附表 1、初始污泥水質每月平均參數	173
附表 2、AC1 水質每月平均參數	173
附表 3、AC2 水質每月平均參數	174
附表 4、AC3 水質每月平均參數	175
附表 5、AC4 水質每月平均參數	176
附表 6、AC1 與 AC2 反應槽每 3 個月之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性懸 浮固體濃度(VSS, mg/ L)監測	177
附表 7、AC3 與 AC4 反應槽每四個月之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性懸 浮固體濃度(VSS, mg/ L)監測	178



浮固體濃度(VSS, mg/ L)監測.....	177
附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群.....	178
附表 9、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之空白載體結果	186
附表 10、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體	187
附表 11、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之保存性測試空白載體	189
附表 12、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 4°C 保存後 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體(S1).....	190
附表 13、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之- 20 °C 保存後 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體(S2).....	192
附表 14、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之室溫保存後 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體(S3).....	192





第一章 緒論

1.1 研究背景

氮作為生物體構成胺基酸與核酸的關鍵元素，其循環在自然界中透過固氮、硝化、脫硝與揮發等過程維持平衡。然而自工業革命以來，人類活動大量釋放反應性氮(Reactive Nitrogen)，如氨氮、硝酸鹽與氧化氮，導致自然氮循環失衡，進一步造成水體優養化、地下水硝酸鹽污染與生態退化。尤其在都市化加劇與工業發展下，廢水中高濃度氮氮與低C/N比的特性，使傳統硝化-脫硝系統在處理效率與穩定性上受限，需依賴高曝氣量與外加碳源，導致提升能耗與處理成本。

為解決上述問題，自營型脫氮技術如厭氧氨氧化(Anaerobic Ammonium Oxidation, ANAMMOX)逐漸受到重視。ANAMMOX菌群可在無氧條件下直接將 NH_4^+ 與 NO_2^- 轉化為 N_2 ，不需碳源與高曝氣量，具有節省能耗與低污泥產出的潛力。該技術已廣泛應用於側流(Sidestream)高氮廢水中，如污泥脫水液與滲濾液，並逐步拓展至主流市政污水處理。然而，ANAMMOX菌生長速率極慢、對操作條件(如溶氧、毒性中間產物)高度敏感，導致其在主流程應用中仍存在啟動期長、菌體流失與活性不穩定等瓶頸。

為強化 ANAMMOX 系統之穩定性與操作彈性，微生物固定化技術成為近年研究重點。透過將菌群固定於特定載體內部或表面，可有效提升存留率與反應穩定性並對抗環境擾動。然而傳統固定化方法如包埋、吸附或膠體聚集，常受限於質傳效率不佳與孔隙結構不可控，難以兼顧保護性與功能性設計。3D 生物列印(3D Bioprinting)技術的興起，則為固定化技術開創新契機。其透過 CAD 建模與逐層堆疊列印，可精準調控載體孔隙率、微結構與材料分布，具有設計化彈性之優勢，為 ANAMMOX 固定化提供新的研究方向。



1.2 研究動機

儘管 ANAMMOX 具備理論上高效脫氮潛力，實際應用仍受限於菌體流失與環境敏感性。近年研究指出，藉由固定化技術提升菌群附著能力、降低活性被影響可能，大幅推動 ANAMMOX 固定化應用的研究。而在多項固定化技術中，3D 列印具備孔隙設計靈活、材料組成彈性與高密度細胞分布等優勢，但是相關應用仍多停留於初步驗證階段，對列印條件、材料選擇與光固化影響菌體活性的機制理解尚不完整。

因此，本研究希望補足目前技術上的不足，透過結合材料設計、生物技術與微生物處理的相關知識，開發一套適合 ANAMMOX 菌群的 3D 列印固定化方式。目標是建立一個操作簡便、設計彈性高，且能穩定維持菌體活性的系統，讓這項技術未來更容易被應用在實際的污水處理工程中。

1.3 研究目的

本研究旨在評估 3D 生物列印固定化技術應用於 ANAMMOX 系統之可行性，並針對材料配方、列印參數與菌群活性進行系統化探討。具體目標如下：

1. 建立實驗室中可穩定馴養 ANAMMOX 菌群的方法。
2. 評估 ANAMMOX 菌對氨氮與亞硝氮的去除效率。
3. 透過分子生物工具分析 ANAMMOX 菌群的種類與分布情形。
4. 比較不同材料配方(如 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light)對菌群固定效率與活性影響。
5. 分析固定化載體在批次氮去除測試中的比活性(SAA)與操作穩定性並與懸浮態菌進行比較。

本研究期望建立一套具實務應用潛力的固定化策略，不僅能提升 ANAMMOX 系統的穩定性與效率，也有助於推廣其在低碳、節能污水處理領域的應用。



第二章 文獻回顧



2.1 氮循環與水體氮污染

氮(N)是生物賴以合成胺基酸、核酸與蛋白質的基本元素，更在全球物質循環中扮演核心角色。大氣中約 78 %為惰性氮氣(N_2)，但僅有少數微生物能夠將其轉化為可被植物或者其他生物利用的固定態氮(NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^-) (Ghaly et al., 2015)。下述小節將分別說明氮在自然環境中的主要轉化途徑、人為活動如何干擾平衡，以及廢水處理中對氮去除的技術需求。

2.1.1 氮型態與自然循環路徑

圖 2.1 為 Ghaly 等人說明之氮自然循環路徑，以下為氮於自然循環之型態說明：

1. 固氮(Nitrogen Fixation):

❖ 生物固氮(Biological fixation):

由根瘤菌(*Rhizobium* spp.)或藍綠菌(*Cyanobacteria*)等，以氮化酶複合體(Nitrogenase)將大氣中 N_2 還原為 NH_4^+ ，供給植物吸收與合成蛋白質(Ghaly et al., 2015)。

❖ 工業固氮/非生物固氮(Industrial fixation):

Haber – Bosch 合成法以高壓高溫狀態下利用催化劑將 N_2 與 H_2 合成 NH_3 ，雖然耗能巨大，但仍是目前農業上使用肥料中主要的氮源。

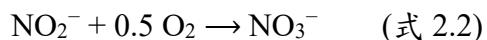
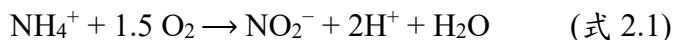
2. 矿化/氮化(Mineralization/ Ammonification):

在土壤與水體中，動植物殘體、糞便、有機沉積物等有機氮(Organic nitrogen)，經過異營性微生物(Heterotrophic bacteria)利用分解

後，會先行化為 NH_4^+ ，為後續硝化作用提供原料。

3. 硝化(Nitrification):

好氧環境中，*Nitrosomonas* spp. 會 NH_4^+ 將氧化成 NO_2^- ，再由 *Nitrobacter* spp. 氧化為 NO_3^- ，整個過程共消耗 2 mol O_2 ，並伴隨 H^+ 升成，對水體之 pH 具緩慢影響(Sri Shalini et al., 2012)。



4. 脫硝(Denitrification)

溶氧降低至微氧或無氧時，脫硝菌會以 NO_3^- 為電子受體，依序還原為 NO_2^- 、 NO 、 N_2O ，最終釋放 N_2 回歸大氣，完成氮循環閉環。

5. 揮發與溶出(Volatilization & Leaching)

- ❖ NH_3 揚發(Volatilization): 於高 pH 或高溫條件下， NH_4^+ 與 OH^- 結合生成 NH_3 ，逸散到大氣。
- ❖ NO_3^- 溶出(Leaching): NO_3^- 高度溶於水，且不容易被土壤吸附，容易隨降水滲透至地下水，最終流入河川與湖泊，導致水體氮負荷轉移與污染，誘發飲用水硝酸鹽污染以及優氧化(Eutrophication) (Ghaly et al., 2015)。

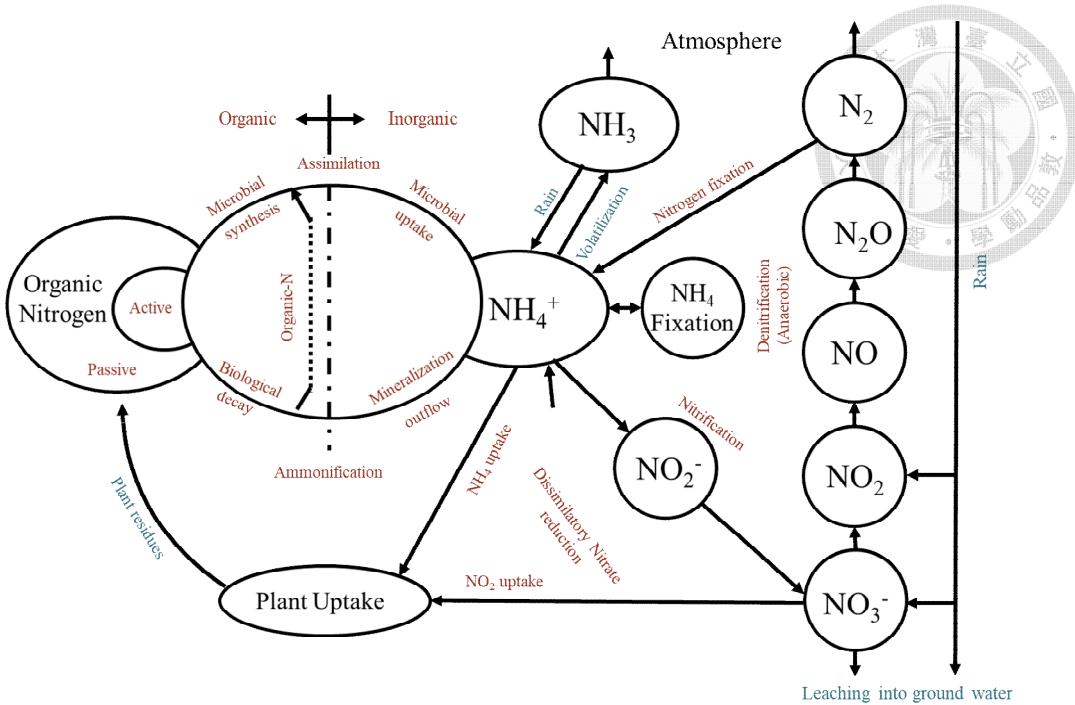


圖 2.1、氮自然循環路徑(Ghaly et al., 2015)

2.1.2 人為活動對氮循環的擾動

自工業革命以來，人類透過化肥施用、化石燃料燃燒與城鎮排放等行為，將「反應性氮(Reactive nitrogen)」，例如 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_x 等形式輸入環境的速度提升數倍，劇烈改變自然氮循環的平衡。下列是對氮循環影響甚遠的主要人為活動，包括農業非點源污染、城市與工業廢水以及土地利用變遷：

- ❖ 農業非點源污染(Agriculture non-point sources):

合成氮肥與畜禽糞便尿液大量於土地面上施灑後，過剩的 NH_4^+ 與 NO_3^- 會隨著降雨流入河川與地下水；同時在田間高 pH 或高溫條件下， NH_4^+ 轉為 NH_3 ，可能進而氧化成 NO_x ，又或者經由脫硝作用產生出 N_2O ，導致水質硝酸鹽超標引起水質優養化(Eutrophication)與溫室氣體排放(Sri Shalini et al., 2012)。

❖ 城市與工業廢水(Municipal and industrial wastewater):

生活污水與工業排放常含高濃度氨氮與有機物，通常需要預先處理才能排入水中，如未經過預處理便排入水中，會促進消化並釋放 H^+ 造成水體酸化，除此之外，也會驅動脫硝產生 N_2O ；另外，進而形成沿河流下游氧氣濃度降低後再逐漸回升的「氧凹陷區(oxygen sag curve)」現象(圖 2.2)。該現象常見於排放口下游，水體分層與底層缺氧會進一步影響魚類與底棲生物生存，破壞水生生態系的穩定性(Miao et al., 2019)。

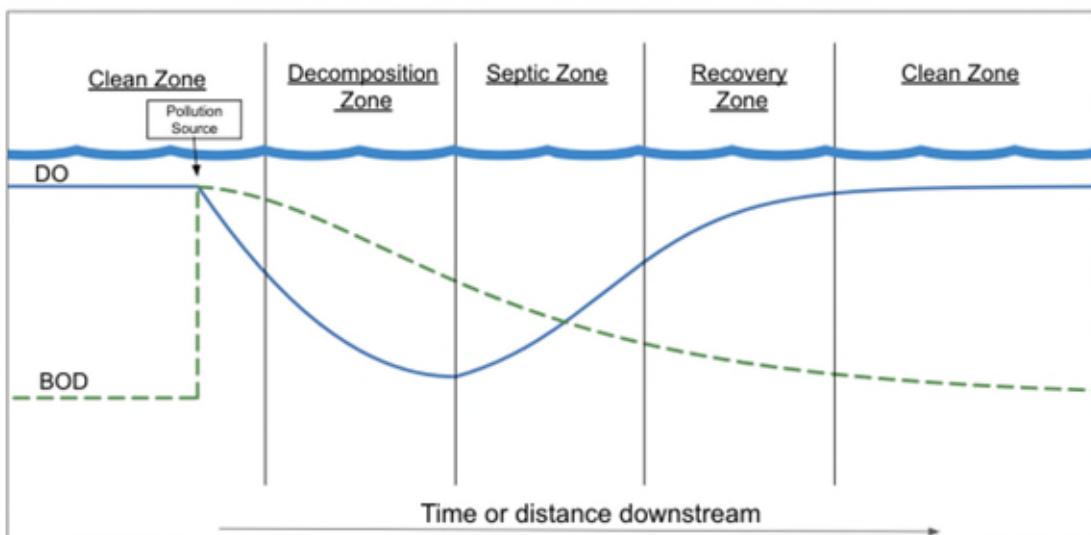


圖 2.2、氧垂曲線(Lawryshyn, 2024)

❖ 土地利用變遷(Land-use change):

森林砍伐與土壤裸露會使土壤中儲存之有機氮與礦化氮大量釋出，透過地表逕流與風蝕進入水體；同時 NH_3 與 NO_x 經大氣沉降，也會成為城市與農村等民生用水區域額外進入的氮源，進一步加重氮負荷。

這些人為擾動不僅引發水體優養化使藻類大量生長且水體底層溶氧過低，也危害飲用水安全，例如高硝酸鹽會造成嬰兒高鐵血紅蛋白症(Greer et

al., 2005)，並削弱生態穩定性，如生物多樣性下降、食物鏈結構改變。



2.1.3 廢水中氮去除的技術需求-以生物程序為例

針對廢水中氮污染的處理，在於有效去除廢水中不同型態的氮，包括氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、硝酸鹽氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、以及總氮(Total Nitrogen, TN)。目前工程實務上最常見的處理方式為硝化-脫硝(nitrification-denitrification)程序，透過對反應槽中曝氣，提供好氧條件給硝化菌(Nitrifying bacteria, NOB)，使其將 NH_4^+ 氧化為 NO_3^- ，或者於缺氧條件下由脫硝菌(Denitrifying bacteria, DNB)將 NO_3^- 還原成 N_2 ，重新釋放至大氣中完成脫氮。

然而，針對高氮濃度(如垃圾滲出液、部分工業廢水)與低 BOD/ COD 比值的廢水類型，此傳統程序(nitrification-denitrification)會受到許多限制，例如：反應時間長、耗能高、需額外添加碳源，以及副產物(e.g. N_2O)與污泥產量增加等問題，進而導致運行成本升高與處理結果不穩定(Miao et al., 2019)。

為了能避免上述所說之限制，近年已發展出多種自營型生物脫氮技術，在無需額外添加有機碳源的情況下仍可高效率進行脫氮，特別適用於生物降解性差之成熟滲出液與高氮低碳廢水。相關的去氮技術如下：

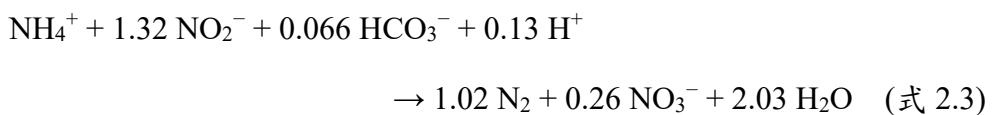
- ❖ 厭氧氨氧化(ANAMMOX, Anaerobic Ammonium Oxidation)
- ❖ SHARON-ANAMMOX (Single Reactor System for High Ammonia Removal Over Nitrite + ANAMMOX)

其中，ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation)是由 Planctomycetes 門中的自營厭氧菌進行的代謝反應，該菌群可以在缺氧條件下直接將 NH_4^+ 與 NO_2^- 同步轉化為 N_2 ，中間經過生成聯胺(Hydrazine)等特殊中間體。相較於傳統硝化-脫硝程序，此過程不需要額外添加有機碳源，同時也大幅降低曝氣需求與污泥產量，適合高氮、低有機負荷條件的應用，是極具潛力的節能型脫氮技術。

不過 ANAMMOX 菌(如 *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*)生長速率極慢，半生期可能需要 10–30 天，並且對操作溫度、溶氧與抑制物質(如游離胺、游離亞硝酸)相當敏感。因此，此法單獨運用於低氮濃度、溫度變化大的主流廢水處理仍具挑戰(Trinh et al., 2021)。

為提高 ANAMMOX 的實際應用穩定性與去氮效率，發展出了結合前段部分硝化的整合系統—SHARON-ANAMMOX 程序(Single Reactor System for High Ammonia Removal Over Nitrite + ANAMMOX)，其主要利用短污泥停留時間(SRT)與 30–35 °C 的操作溫度，選擇性促進氨氧化菌(AOB)生長並抑制亞硝酸氧化菌(NOB)，使氨僅被氧化為 NO_2^- ，提供 ANAMMOX 反應所需之電子受體。

兩段程序的耦合可透過串聯或單槽設計進行，整體反應如下：



此過程中，部分 NO_3^- 仍會生成，但是總體來說能大幅減少碳源與曝氣的需求。根據 Sri Shalini 等人對垃圾滲出液處理研究之回顧指出，SHARON-ANAMMOX 程序可達成約 84 %的總氮去除率與 97 %氨氮去除率，顯示其在高氮氮、低 C/N 比廢水中的實用性(Sri Shalini et al., 2012)。而在 Trinh 等人研究中，SHARON-ANAMMOX 程序可減少約 60–70 %能耗，而且在部分實廠系統中，例如荷蘭 Rotterdam、奧地利 Strass 與中國西安等地，已成功將 SHARON-ANAMMOX 應用於主流(Mainstream)或側流(Sidestream)脫氮。

此外，ANAMMOX 技術原本多應用在側流系統(Sidestream)，例如污泥脫水液、滲濾液等高濃度氮廢水的處理。但近年來也開始嘗試使用在主流系統(Mainstream)，也就是一般市政污水等，這類廢水的氮濃度較低，溫度不穩定，也有更多層面需要考量，如水中高有機碳含量、低溫造成 ANAMMOX 活性抑制或降低，且也因為 ANAMMOX 菌生長周期較長，容

易被水流帶走使菌群流失。為利於技術選擇與應用條件比對，表 2.1 彙整了目前常見生物脫氮技術的操作特性與優劣比較。



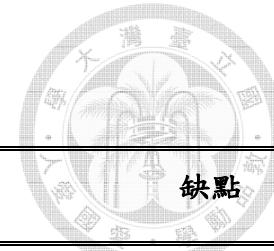


表 2.1、廢水處理中常見氮去除技術比較(以生物程序為主)

氮去除技術	碳源需求	氧氣需求	反應時間	污泥產量	適用廢水	優點	缺點
硝化 - 脫硝	需要(外加)	高(完整硝化)	長	高	一般市政廢水	技術成熟 穩定	碳源消耗大 能耗高
部分硝化 - 脫硝	部分需要	中(只至 NO_2^-)	中等	中	部分有機缺乏 廢水	降低曝氣與碳 源需求	NO_2^- 穩定控制 困難
ANAMMOX	不需要	低(厭氧)	短 - 中	低	高氮、低 C/N 廢水	節省碳源與能 耗	菌群培養需時 對環境敏感
SHARON-ANAMMOX	不需要	中(只部分硝化)	中等	低	高氮、低 C/N 廢水	高效率，系統 整合佳	需嚴格控制 SRT 與溫度



2.2 脫氮相關微生物及其功能

2.2.1 氨氧化菌(AOB)與硝酸鹽氧化菌(NOB)

氨氧化菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和硝酸鹽氧化菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB)是進行硝化作用的兩大微生物菌群。AOB 將 NH_4^+ 轉成 NO_2^- ，接著 NOB 再將 NO_2^- 氧化成 NO_3^- 。將兩階段合併，即為傳統硝化作用，廣泛應用在污水處理中。

常見 AOB 包括 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 等屬，這類微生物喜歡氧气、偏中性到弱鹼性的環境，但是對環境變化較為敏感，例如溫度太低或是 pH 改變太大就會影響活性。NOB 則有 *Nitrobacter* 與 *Nitospira* 等，其中 *Nitrosira* 較常在城市污水處理廠中出現，尤其在低濃度氮與低溶氧環境條件下表現良好適應性(Yao et al., 2017)。

傳統上 AOB 與 NOB 是功能性完全分開的菌群，但近年研究顯示，部分 *Nitrosira* 屬的部分菌種具備完整的氨氧化能力(Complete Ammonia Oxidation, COMAMMOX)，能單獨完成從 NH_3 到 NO_3^- 的整個硝化過程(Zheng et al., 2023)。這些 COMAMMOX (如 *Nitospira inopinata*)被發現廣泛分布於城市污水處理廠，且在多數反應槽中數量超越傳統 AOB 與 NOB，成為主導的硝化菌群。

此外近年來也有發現另一種氨氧化微生物—氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)。相較於 AOB，AOA(如 *Candidatus Nitrosopumilus*)在低氮濃度、低溫與低氧的極端條件下更能展現出較佳的環境適應性，其主要因為細胞體積小、能量維持需求較低，更適合在能源受限的生態位(Ecological niche)中生存(Yin et al., 2018)。

AOB 與 NOB 的交互影響在實際運用上常決定硝化效率。例如在偏低溶氧($< 1.0 \text{ mg/L}$)條件下，由於 AOB 與 NOB 競爭氧氣，常導致亞硝酸根累積，有利於後續 ANAMMOX 或者 Shortcut nitrification 應用。為了達成此種部分硝化(Partial nitritation)目標，常採用溶氧控制、SRT、溫度、FA(Free ammonia)、FNA (Free nitrous acid)等操作策略抑制 NOB (Su et al., 2023; Wang et al., 2020)。不過 NOB 族群本身具有高度多樣性，具備不同抑制物耐受性與代謝特性。例如 *Nitrobacter* 偏好高氧高亞硝酸鹽環境，可耐受 FNA 抑制，而 *Nitrospira* 則具備高氧親和性，在低濃度亞硝酸鹽下仍然可以穩定生長；部分 NOB 則能適應低溫或高溫條件(如 *Candidatus Nitrotoga*、*Nitrolancea*) (Su et al., 2023)。因此，AOB 與 NOB 之間的平衡以及 AOA/ COMAMMOX 的競爭取代會決定整體硝化效率與氮循環動態。

2.2.2 異營與自營特性之脫硝菌

傳統生物脫氮系統中，脫硝通常由異營菌進行，需要依賴有機碳源作為電子提供者，將硝酸鹽(NO_3^-)最終還原成氮氣(N_2)，*Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus* 等為代表性之異營脫硝菌，此類微生物廣泛存在於活性污泥與自然水體中，能利用碳源、乙酸、甲醇或葡萄糖進行電子傳遞以完成脫氮反應 (Meng et al., 2024; Yuan et al., 2025)。

然而在低 C/N 比或者碳源匱乏的情況下，異營菌脫硝效率會受限，此時自營性脫硝菌成為優勢。自營脫硝菌會利用無機還原物，例如:硫化物、亞鐵離子、氫氣，作為電子供體(Electron donor)，此時則無需額外添加有機碳。常見菌屬包括 *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Hydrogenophaga*，其中 *Thiobacillus denitrificans* 是研究最廣的硫氧化自營菌，可將 NO_3^- 還原成 N_2 並同時產生硫酸鹽(SO_4^{2-})。目前自營脫硝中以硫驅動自營脫硝(Sulfur-based Autotrophic Denitrification, SADN)最具代表性，相關反應機制與應用細節將於 2.2.4 小節

中進一步說明。

近年來也有研究發展所謂混合型脫硝(Mixotrophic denitrification)，即同時存在有機與無機電子供體(electron donor)，在同一反應槽中同時利用異營與自營菌群，實現脫氮效率的提升與降低碳源需求。例如應用電極系統(Biofilm Electrode Reactor, BER)於低碳氮比下促進氫氣自營脫硝與異營菌協同作用(Synergistic effect)，有效提升 20 %硝酸根去除率，並觀察到 *Thermomonas*、*Pelomonas* 及 *Hydrogenophaga* 等菌屬成優勢生長(Yuan et al., 2025)。

不同電子供體可能造成菌群間的競爭，例如硫自營系統中硝酸鹽與亞硝酸鹽的還原順序與速率會受電子供體濃度與菌種特性影響，進一步影響中間產物(e.g. NO_2^-)的累積與氮氣產率。若控制不佳可能會導致中間產物如 NO_2^- 的積累，甚至引發 N_2O 排放風險，影響整體減碳效益(Wang et al., 2021a)。

此外，pH、溫度、溶氧與電子供體濃度都會影響菌群優勢與活性。異營菌活性在中性環境下較高，而硫自營菌則更能耐受偏酸環境與氧化還原電位的變化。反應槽根據操作條件的調整，有助於菌群組成穩定並維持處理效能(Wang et al., 2023a; Zheng et al., 2024)。

總結來說，異營脫硝反應速度快，應用成熟，但需要依賴額外碳源；自營脫硝可節省碳源、適用特定廢水，但培養難度高、反應速率較慢。透過混合型模式進行操作，與菌群固定化設計，可助整合兩類優勢，達成更穩定高效的去氮目的。

2.2.3 厭氧氨氧化菌(ANAMMOX)的潛能與限制

厭氧氨氧化(Anaerobic Ammonium Oxidation, ANAMMOX)是一種由 Planctomycetes 門細菌主導的自營反應，能在無氧條件下將 NH_4^+ 和 NO_2^- 轉化為氮氣(N_2)。這項反應無需外部提供有機碳，可大幅減少曝氣與污泥處理的

成本，因此在去氮技術中頗受關注(Arora et al., 2019)。

常見 ANAMMOX 菌屬有 *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Kuenenia*、*Candidatus Scalindua* 及 *Candidatus Jettenia*，*Candidatus* 表示該細菌物種未能成功培養在培養皿或其他培養基中，通常縮寫為 *Ca.*，各菌屬對環境參數如酸鹼值、鹽度、溫度的適應性略有不同。例如 *Ca. Brocadia sinica* 能在 25–45 °C、pH 6.8–8.8 範圍內穩定生長，且其 NH_4^+ 與 NO_2^- 的半飽和常數(K_s)分別為 28 與 86 μM ，代表其對基質有不錯的親和力(Oshiki et al., 2011)。

ANAMMOX 技術具備下列幾項明顯優勢：

- ❖ 僅需提供氧氣至亞硝酸階段，曝氣需求降低
- ❖ 可完全脫氮而不需額外提供碳源
- ❖ 污泥產量少，有助於降低處理與清除成本
- ❖ 相較傳統脫硝方法，溫室氣體排放量可減少

然而雖然優勢明顯，實際運用上仍有瓶頸，包括 ANAMMOX 菌的生長週期較長(半生期約 1–2 週)，使反應槽中菌群啟動時間較長；此外，菌群對某些物質，如 NO_2^- 、游離氨、游離亞硝酸、硫化物，都相當敏感，容易受到環境波動影響(Talan et al., 2021)。

此外，ANAMMOX 系統中需要依賴上一階反應產生的 NO_2^- 作為電子受體(Electro adaptor)，但是在城市污水處理主流中，NOB 會與 ANAMMOX 菌競爭亞硝酸鹽，使其被氧化為硝酸鹽，降低 ANAMMOX 反應效率。為因應此問題，有研究提出利用 FA/ FNA 抑制 NOB 或將側流流程中產生的 NO_2^- 引入主流流程，以穩定提供 ANAMMOX 菌反應基質(Cao et al., 2022)。

除了應用於側流處理，目前也已開發如 MBBR、MBR、SBR 與氣體選擇策略等技術，有效促進 ANAMMOX 在主流程下的菌群固定與活性穩定(Arora et al., 2019; Yang et al., 2021)。此外，新興 Feammox 反應中，ANAMMOX 也可能與金屬還原菌(如 *Geobacter*)共同合作進行氮與鐵的耦合

反應，為資源回收與能源循環提供新的應用潛力。總結來說，ANAMMOX 系統具有節能、減碳、污泥產量少等優勢，只要克服操作穩定與啟動期長的挑戰，未來在廢水處理終將具高度發展潛力。

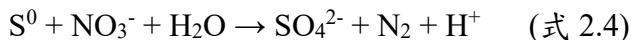


2.2.4 新興微生物路徑：n-DAMO 與硫脫氮等

傳統脫硝機制外，近年也發現多種具潛力的新興生物脫氮路徑。其中包括結合碳與氮代謝的甲烷氧化脫氮(n-DAMO)，以及前述硫驅動自營脫硝 (Sulfur-based Autotrophic Denitrification, SADN)之應用與機制。

n-DAMO (Nitrite/ nitrate-dependent anaerobic methane oxidation)是由 *Candidatus Methylomirabilis oxyfera* 等細菌主導的代謝路徑，能在無氧條件下，以 NO_2^- 或 NO_3^- 作為電子受體(即取代氧氣的位置)，將甲烷(CH_4)氧化成二氧化碳(CO_2)，並同時將 NO_2^- / NO_3^- 還原為氮氣(N_2)。n-DAMO 可與 ANAMMOX 共存進行協同，提升亞硝酸鹽去除效率並降低 N_2O 生成之可能 (Chen et al., 2022)。此機制已有在海洋沉積物、濕地、人工反應槽中被發現，表示其可應用於低碳氮比廢水。

硫驅動自營脫硝(SADN)是以還原型硫化物(如硫化物 S_2^- 、硫代硫酸鹽 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、或元素硫 S_0)作為電子供體，透過硫氧化菌(Sulfur-Oxidizing Bacteria, SOB)進行 NO_3^- 還原反應。常見菌屬有 *Thiobacillus*, *Sulfurimonas*, *Beggiatoa* 等，代表反應式如下：



SADN 適用於低有機碳、高硝酸鹽或含硫工業廢水，其優點包含：不需要投加碳源、污泥產量低、系統穩定性高。然而此系統反應與異營脫硝的速率相比而言較慢，且對環境酸鹼值、硫型態與中間產物(亞硫酸鹽)較敏感，需要透過控制條件優化反應速率(Chen et al., 2022; Shao et al., 2010)。為提升系統效率，Chen 等人研究提出混營型脫硝策略(Mixotrophic denitrification)，透

過同時提供有機與無機 electro donor (電子供體)促進異營菌與硫氧化菌的協同作用。實驗結果指出在 $C/N = 0.7$ 情況下，混營系統可達成最佳之脫氮效果，並提升抗生素(e.g. sulfamethoxazole)抑制的耐受性(Liang et al., 2020)。此外為提升 SADN 的實務可行性，也有研究污泥顆粒化，使 SOB 能在反應槽中形成顆粒，提升菌濃度與反應穩定性(Yang et al., 2016)。未來 n-DAMO 與 SADN 若與 ANAMMOX 等技術整合，將有助於強化整體去氮效率與系統永續性。表 2.2 為綜述脫氮相關微生物及其功能之比較。

表 2.2、脫氮相關微生物及其功能比較

菌群	代表菌屬	功能	氧氣需求	碳源需求	環境適應性	文獻來源
AOB	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i>	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	好氧	自營	中氮、中氧	Oshiki et al., 2015
NOB	<i>Nitrobacter</i> ; <i>Nitrosospira</i>	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	好氧	自營	NO_2^- 積累條件	Oshiki et al., 2015
AOA	<i>Nitrosopumilus</i> , <i>Nitrososphaera</i>	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ (低氮、低氧)	微氧至好 氧	自營	低氮、低氧、低 pH	Yin et al., 2018
COMAMMOX	<i>Nitrospira</i>	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ (完全硝化)	好氧	自營	中氮、穩定氧供	Daims et al., 2015
ANAMMOX	<i>Ca. Brocadia</i> <i>Ca. Kuenenia</i>	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	厭氧	自營	高氮、低有機物 、厭氧	Kartal et al., 2011 Sari et al., 2025
n-DAMO	<i>Ca. Methylomirabilis</i>	$\text{CH}_4 + \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	厭氧	自營	含甲烷、無氧	Chen et al., 2022
SADN	<i>Thiobacillus</i> , <i>Sulfurimonas</i>	$\text{S}^{2-} + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	缺氧	自營	含硫、低有機碳 、缺氧	Shao et al., 2010 Liang et al., 2020

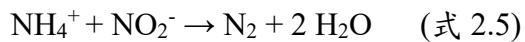


2.3 ANAMMOX 反應機制與菌群特性

前述已說明 ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation)是由 Planctomycetes 門細菌執行的自營型厭氧脫氮反應，然其機制、菌屬特性、培養條件與實際運用，在現代廢水處理中是非常重要的核心基礎，因此以下將針對 ANAMMOX 的代謝途徑、生理分類、操作限制與應用案例進行探討。

2.3.1 ANAMMOX 的生理與代謝路徑

ANAMMOX 的代謝核心為在無氧條件下將 NH_4^+ 與 NO_2^- 同步轉化為 N_2 ，反應過程中不需要使用有機碳作為碳源，菌群具備能耗低、產泥量少等優勢(Oshiki et al., 2011)。此反應主要透過三個步驟實現: NirS (cytochrome cd₁ nitrite reductase)催化 NO_2^- 還原為 NO，隨後 NO 與 NH_4^+ 透過 HZS (hydrazine synthase)催化，反應生成 N_2H_4 (聯胺)； N_2H_4 在 HDH (hydrazine dehydrogenase)催化下氧化成 N_2 ，同時釋出電子用以驅動 ATP 合成(Kartal et al., 2013; Sari et al., 2025)。此一反應在 ANAMMOX 菌中的特殊胞器— anammoxosome 中進行，該胞器膜構造中含有階梯狀脂質(ladderane lipids) (圖 2.3)，可防止中間產物外洩，保護菌體結構穩定，圖 2.4 為 *Kuenenia stuttgartiensis* 的生化途徑與酵素機制。整體反應可簡化為:



其標準自由能變化(ΔG^0)約為- 357 kJ/ mol，表示具有極高熱力學驅動力。

此外，ANAMMOX 細菌對反應過程中產出的中間產物 hydrazine 雖然具有一定耐受性，但是有文獻指出當外加 hydrazine 濃度高於 1.88 g/ L 時，會明顯抑制 hydrazine synthase 與 dehydrogenase 表現，進而降低能量代謝與氮

氣產量，反映出 ANAMMOX 細菌對毒性中間體的敏感性(Sari et al., 2025)。

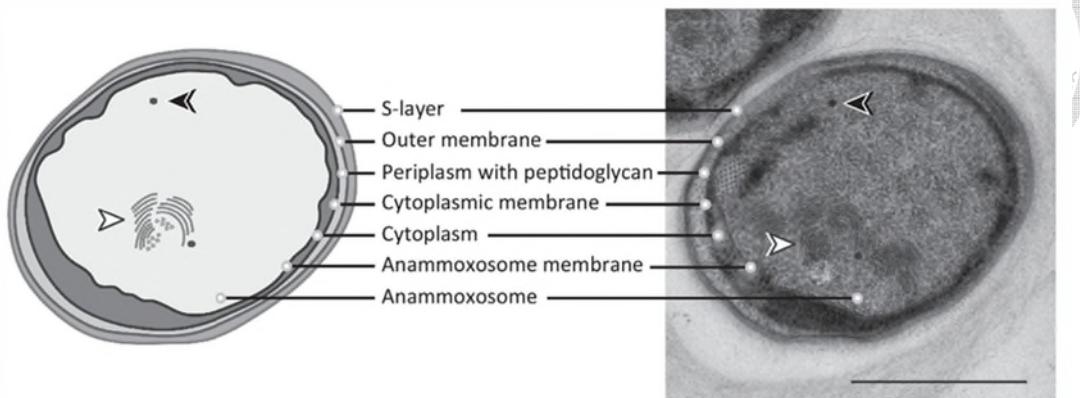


圖 2.3、ANAMMOX 細胞內構(Kartal et al., 2016)

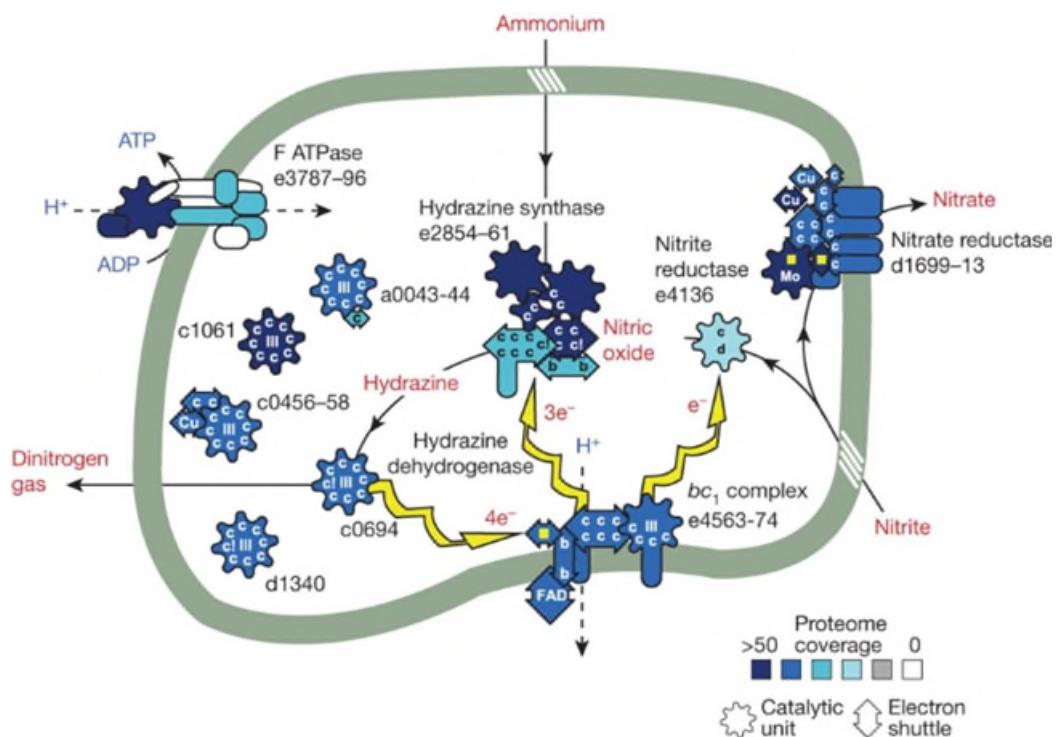


圖 2.4、Kuenenia stuttgartiensis 的生化途徑與酵素機制(Kartal et al., 2013)

2.3.2 常見 ANAMMOX 菌屬與其特徵

ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation) 菌屬皆隸屬於 Planctomycetes 門、Brocadiales 目，迄今已鑑定出至少六大類群，包括 *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Kuenenia*、*Candidatus Jettenia*、*Candidatus*

Scalindua、*Candidatus anammoxoglobus* 與 *Candidatus Bathyanammoxibius* (Zhang et al., 2025; Zhao et al., 2022b)。



其中 *Candidatus Brocadia* 為最常見於人為環境(如 SBR、生物膜反應槽)中的優勢菌屬，具有良好的附著能力與對中等濃度揮發性脂肪酸(VFA)的耐受性，適合在有機酸存在下進行厭氧脫氮反應(Kallistova et al., 2020)。部分菌株中，例如 *Candidatus Brocadia sinica*，在乙酸代謝與 acetyl-CoA 路徑表現具有高度潛力，能夠以 mixotrophic 模式穩定運作，對含有微量有機物的實際廢水具有應用價值。

Candidatus Kuenenia 通常在高氮低碳條件下表現穩定，其基因組較緊湊，核心代謝功能集中，具備極高的能量效率，也能合成多種胺基酸以及 B 群維生素等共生必需物質，為微生物群落中提供「commom goods(公品)」的主體，被類比為「Black Queen」菌屬。此概念源自於 Black Queen Hypothesis，該假說由 Morris 等人於 2012 年提出，指出某些微生物會喪失重要的代謝功能，而依賴整體菌群中能提供此功能的成員(Black Queen)，形成代謝上的共同演化與共生關係(Morris et al., 2012)。

Candidatus Jenttenia 雖然與前述兩者在功能上相似，但是此菌屬的生長與富集效率較低，對有機酸的利用能力也較弱，因此在多數系統中出現頻率較低。研究指出其核心菌群結構較為複雜，使穩定富集難度較高(Zhang et al., 2025)。

Candidatus Scalindua 則為海洋環境中的代表菌屬，常見於海洋沉積物以及鹽度濃度梯度變化明顯的區域。此類菌種對鹽度具高度適應性，為海水脫氮處理與海洋氮循環的重要角色。

近年來另有發現如 *Candidatus Bathyanammoxibius*，屬於深層分支新類群，首次在北極海洋沉積物中發現，其基因含有典型 ANAMMOX 功能酵素(e.g. HZS、HDH)，可能具有更廣泛的棲地適應性與演化潛力(Zhao et al.,

2022b)。

此外，不同菌屬之間的代謝能力、EPS 分泌、附著力、基質親和性等方面也呈現顯著差異。例如在低氮濃度環境下，*Candidatus Kuenenia* 表現出更高的 *hzs* 基因轉錄活性，而 *Candidatus Brocadia* 則在乙酸存在時展現較佳的成長與代謝效率(Hu et al., 2018)。

2.3.3 培養條件與富集限制因素

ANAMMOX 菌雖然具有高效的脫氮能力，但是其生長速率極慢(半生期約為 7–30 天)導致富集困難，且 ANAMMOX 菌群對操作條件相當敏感，因此在實際應用前必須克服一系列富集與穩定性挑戰(Parde et al., 2024)。首先，溫度與酸鹼值是影響 ANAMMOX 培養成功與否的關鍵參數。多數 ANAMMOX 菌最適合的生長溫度約為 30–70 °C，pH 為 7.0–8.5，若偏離此範圍，菌體活性將明顯下降。溶氧(DO)濃度應控制在 0.5 mg/L 以下，維持嚴格厭氧環境。

其次，氮源濃度與抑制性副產物是富集過程中的重要因子。雖然 NH_4^+ 和 NO_2^- 是 ANAMMOX 所需的底物(substrates)，但是過量將導致游離氮(FA)與游離亞硝酸(FNA)累積，進而抑制菌體代謝。FNA 的 IC_{10} 僅為 0.44–0.67 $\mu\text{g} / \text{L}$ ，而 FA 的 IC_{10} 約為 3.56–4.85 mg / L (Niu et al., 2016)。

營養成分與微量元素補充同樣對菌體合成酵素與胞內生化反應鏈有顯著影響。 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金屬離子為多種 ANAMMOX 酵素的輔酶，適當補充可提升比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)與細胞聚集表現。Ma 等人說明在基質中補加奈米 Fe_3O_4 或添加 ZVI (zero-valent iron)、腐植酸(humic acid)、活性碳(activated carbon)等促進劑(enhancers)可促進電子傳遞與菌群自聚集(auto-aggregation)，進一步強化反應槽性能(Ma et al., 2022)。

在反應槽啟動與種泥選擇方面，使用富含 AOB 的 partial-nitritation

sludge 或直接導入已活化之 ANAMMOX 種泥皆有助於縮短啟動時間與提升初期反應速率。不同反應槽形式也影響富集，例如 UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed)有助於顆粒形成，而 MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor)更適合使 ANAMMOX 於高負荷條件下穩定操作(Li et al., 2021; Tan et al., 2023)。

ANAMMOX 對飢餓與間歇操作具耐受性，能在長期斷流後逐步恢復活性，只是活型恢復時間與 SAA 受到明顯影響，並需要依靠 EPS 分泌與菌群穩定性維持其恢復能力。

2.3.4 ANAMMOX 在不同系統中的應用案例

ANAMMOX 技術已從實驗室規模逐步擴展至中試(pilot-scale)與實廠(full-scale)應用，也就是已經推進到能夠處理實際水量與測試工程可行性，並在不同廢水類型與處理系統中表現出良好脫氮效果。以下整理出目前文獻中幾類較具代表性的應用實例，用以說明其工程可行性與優勢。

在中國某膠原蛋白腸衣工廠案例中，建置單槽型 SNDA 系統處理低 C/N 的廢水，能在同一槽內實現同時完成氨氧化、脫硝與 ANAMMOX 反應，啟動期僅 2 個月，氨氮去除率穩定超過 90 %，且節省 30 – 40 %的佔地面積與 67.6 %的加鹼需求(Yu et al., 2022)。

IFAS (Integrated fixed film activated sludge process) 系統結合固定生物膜與懸浮活性污泥，使 AOB 主要分布於污泥，ANAMMOX 菌則附著於生物膜中，北京一座污泥脫水回流水處理案例中，TN 去除率達 85 %，氮去除速率 0.48– 0.5 kg N/ m³/ d，展現極高穩定性與生物群聚定位分離的優勢(Zhang et al., 2015a)。

南非 Cape Flats WWTP (Wastewater Treatment Plant)的研究比較了傳統 MLE 系統與 PN/ A 系統在處理消化液回流中的表現。儘管 MLE (Modified Ludzak-Ettinger)投資成本較低，但以 20 年全生命週期成本(Life Cycle Cost,

LCC)分析，MLE 在 20 年 LCC 中比 PN/A 高出 2.8 倍，並大幅減少曝氣能耗與污泥產量，兼顧能效與永續性(Jelliman, 2021)。

另有針對主流污水處理方面面臨低氮濃度與低溫等挑戰，一研究使用 iGB (integrated granular sludge and fixed-biofilm)反應槽，同時進行 ANAMMOX 與部分脫硝(partial denitrification, PD)，TN 去除率可達 91 %，有效提供 NO_2^- 來源避免 NO_3^- 累積(Zhuang et al., 2022)。

另一創新 MBfR (Membrane Biofilm Reactor)結合 ANAMMOX 與 DAMO (Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation)，成功降低主流反應槽之出流水 $\text{TN} < 5 \text{ mg/L}$ ，此應用表現出與甲烷代謝聯合的潛力(Xie et al., 2018)。

綜上所述，ANAMMOX 系統與不同反應槽設計的整合不僅能因應不同水質條件與不同菌群特性與組成進行調整，提供高效率、低碳排的廢水處理技術。

2.4 微生物固定化技術在廢水處理中的應用



微生物固定化(Microbial Immobilization)是一種透過物理或化學方式將微生物限制於特定空間或載體上的技術。此技術能有效提升菌體濃度、維持菌群穩定性、抑制菌體流失，並改善反應槽操作效率，特別適合用於自營型或生長速率緩慢的菌種，如 ANAMMOX。隨著污水處理對高效能與低能耗日益漸增的需求，固定化技術逐漸成為現今生物處理系統的核心組成之一。

2.4.1 微生物固定化技術類型、選擇與優缺點

微生物固定化依據其固定原理與操作方式可以區分為多種類型，包含物理吸附、包埋、共價鏈結、層層自組裝(Layer-by-layer, LBL)與複合固定等。其中物理吸附是最為簡便的一種方式，透過靜電力、凡德瓦爾力或氫鍵將菌體吸附於載體表面，適合低剪切之環境，但是吸附力較弱，無法長期運用(Najim et al., 2024)。包埋法則利用如海藻酸鈉(SA)、聚乙烯醇(PVA)等高分子材料形成凝膠，將微生物封存於載體內部，能有效保護菌體並維持活性，然而如果包埋材料過於緻密，會造成內部質傳效率降低，抑制微生物代謝反應效率(Zhang et al., 2015b)。

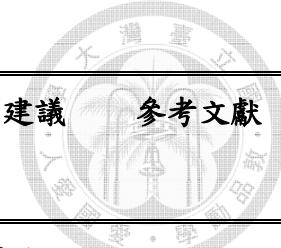
相較之下，共價鏈結則藉由官能基之化學反應將菌體穩定結合於載體上，固定力強但是有毒性疑慮，需要精確控制反應條件，避免菌體活性受損。LBL 技術則利用不同荷電層材料，逐層建構奈米薄膜包覆菌體，可以精確調整膜的厚度與功能性，對於感測或選擇性傳輸具有潛力，但其會受限於成本與操作穩定性(Hou et al., 2024)。近年發展出複合固定模式，主要為將上述不同方法進行整合，結合各方法之優勢來提升整體固定化效果與應用靈活性。

在固定化技術發展的過程中，載體材料的選擇也是關鍵。常用的材料可

以分為天然高分子、合成聚合物、無機材料與複合性材料四大類。天然高分子材料如海藻酸納、明膠、卡拉膠等具有良好的生物相容性與可生物降解性，且來源廣泛、成本低廉，只是此類型材料機械穩定性不佳，容易膨潤或崩解，在高負荷系統中較難單獨利用。合成聚合物(e.g. PVA、PEG、PEGDA)則兼具高穩定性與較佳的成膜性，可以透過交聯或冷凍凝膠劑技術強化機械性，適合長期操作，然需要注意部分交聯劑對菌體可能造成毒性(Jin et al., 2024; Zhang et al., 2015b)。

活性碳、生物碳、陶瓷載體等無機材料的孔隙率高、比表面積大，在吸附能力與抗腐蝕性方面較為出色，但是密度高、可塑性差，放入廢水系統中容易造成水流分布不均、攪拌效率下降、懸浮效果差等問題(Tong et al., 2021)。因此，複合型載體嘗試將合成與無機材料結合，例如磁性奈米粒子、導電材料或腐植酸結合於 PVA 基質中，提升載體被回收能力，在微生物進行代謝時增加電子傳導性與菌群選擇性(Pu et al., 2024)。表 2.3 為固定化載體常用材料之優缺與應用建議。

表 2.3、固定化載體常用材料之優缺與應用建議



材料類型	代表材料	優點	缺點	操作 壽命	質傳 效率	成本 附著 能力	工程應用建議		參考文獻
							工程應用建議	參考文獻	
天然高分子	SA	生物相容性高	易膨潤溶	中	中	低	高	初期固定化	(Jin et al., 2024)
	明膠		脹、抗剪切					低剪切系統	
	卡拉膠		性差						
合成聚合物	PVA	機械穩定性	需用交聯	高	中	中	中	高負荷系統	(Zhang et al., 2015b)
	PEG	佳、可調控性	劑、部分有						
	PEGDA	高	毒						
無機材料	活性碳	高穩定性、孔隙率高	可塑性差、表面吸附需	高	高	高	低	附著型反應槽與長期運作	(Tong et al., 2021)
	生物炭								
	陶瓷	壓高溫	要調整						
複合材料	磁性奈米粒子複合、導電粉載體	磁性導電性可 用於自動回收	穩定性視操 作條件而異	高	高	中高	高	有回收需求之操作系統	(Pu et al., 2024)
		與電導控制							



2.4.2 微生物固定化對菌體活性與穩定性的影響

固定化技術對於維持菌體生理活性與操作穩定性有顯著幫助。首先固定化能有效提升菌體對重金屬或者氧化性壓力之耐受性。例如 Liu 等人研究中發現，固定化 *Bacillus* sp. P1 後，該菌的超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性顯著提升，使此微生物在高 Cd (II)濃度條件下仍然維持良好的代謝活性，甚至比懸浮態的抗重金屬毒性要好(Liu et al., 2019)。此外固定化過程常伴隨胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)分泌增加，能對菌群增加保護。

其次，固定化載體可做為緩衝保護層，避免環境劇變對菌體造成衝擊，如 Han 等人所述，應用 PVA-SA 輽體可以穩定釋放基質，有效減緩劇烈變化的氯氣或亞硝酸氯對微生物代謝的抑制，此種緩衝特性對於需要嚴格操作條件(如 pH、DO)的菌群非常重要(Han et al., 2024)。

固定化技術同時也能增強微生物對長期缺乏養分、溫度波動明顯與毒性中間產物的抵抗力。穩定的結構與微孔道可以幫助菌群聚集附著生長，提升菌群在惡劣環境下的存活與修復能力。綜合而言，固定化技術可以有效增強微生物反應系統的操作穩定性，在高負荷或極端條件下仍能穩定使用。

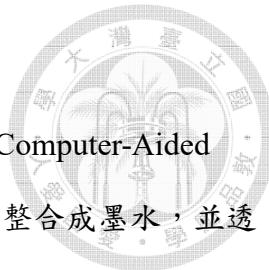
2.4.3 固定化 ANAMMOX 的應用現況與挑戰

ANAMMOX 菌因為其自營型代謝特性與極慢的增殖速率，在懸浮條件下容易發生菌體流失與活性不穩定的問題，進而影響到整體反應速率、啟動時間與啟動後穩定性。為能解決此類限制，固定化技術成為目前強化 ANAMMOX 系統穩定性的主要方案。ANAMMOX 可透過包埋、附著與膠體凝集等方式進行固定，並成功應用於 MBBR、SBR 與 UASB 等反應系統中(Manonmani et al., 2018)。

具體應用中，固定化 ANAMMOX 載體可顯著提升反應槽中的有效菌濃度，減緩菌體流失，同時延長菌群對 FNA、FA 與氧氣干擾。部分研究指出，在氨氮濃度高達 500 – 1000 mg / L、C / N 比低於 0.5 的條件下，固定化 ANAMMOX 系統依舊能夠維持 90 % 以上的去氮效率(Manonmani et al., 2018)。此外，在 Butelmann 等人文章中指出，使用 3D 列印與光固化材料能夠依據孔隙大小設計最佳的載體微結構，藉此有效控制底物的擴散效率，避免外層菌群快速生長過度覆蓋，降低內部菌體代謝受限或資源競爭的風險(Butelmann et al., 2021)。

雖然 ANAMMOX 固定化展現了極佳的去氮能力，但是在實際運用上仍有許多問題待解決，例如固定化載體若缺乏適當孔隙與通道設計，將限制氮氮與亞硝氮等底物的滲透分布，造成質傳效率不佳或使內部區域養分缺失導致菌群活性下降。此外反應槽設計若未能避免氧氣滲入或競爭性微生物(e.g. AOB、異營菌)增生，將搶奪 ANAMMOX 生存空間與資源，影響 ANAMMOX 的穩定。

在材料方面，天然材料(如 SA)雖具有生物相容性，但是較無法長期穩定，且容易破碎；而 PEGDA、磁性複合材料等合成材料雖然穩定性高，但是在材料配比中濃度太高會對菌體造成毒性；同理而言，光固化時間太長與交聯製程無適當控制，容易導致菌體內酵素結構損傷，延長啟動期與活性恢復時間(Butelmann et al., 2021)。



2.5 3D 生物列印技術概述

3D 生物列印(3D Bioprinting)是一種以電腦輔助設計(Computer-Aided Design, CAD)為基礎，將細胞、支架材料與功能性添加劑整合成墨水，並透過逐層堆疊方式建構具特定結構與功能的活性材料技術。該技術最早多應用於醫學領域，隨近年環境汙染與能源轉型議題興起，逐步將此技術擴展到廢水處理、生物能源與污染控制等方面。透過 3D 空間控制、細胞定向排列與材料特性調控，可依設計需求製造出具有特定幾何結構與功能分布的微生物載體，實現高效率的固定化效果與菌體活性維持。

2.5.1 3D 生物列印的基本原理與分類

3D 生物列印技術的分類根據材料傳送、沉積機制(生物墨水如何被傳遞至積材表面)以及固化方式的不同，分為擠出式、噴墨式與光固化式三大分類。這些技術各有適用的材料特性與應用情境。選擇時需要考量微生物本身特性(如細胞大小、代謝活性、剪切力耐受度)、細胞在材料中的生存與分布情形，以及想要設計的結構是否需要特定幾何形狀與孔隙結構(Vieira et al., 2021)。

例如若需固定高密度細胞於可穿透的多孔支架中，擠出式列印模式較能提供機械穩定性；而如果需要列印高精度排列之細胞膜式，如微藻的點狀列陣，則需要以噴墨式或是雷射輔助列印。擠出式列印是最常見的 3D 列印方式，適合列印黏度高的材料與細胞密度較高的結構，且適用於大多數環境微生物系統。相較之下，噴墨式雖能提供較高解析度與較小單位液滴體積，卻受限於墨水黏度與噴嘴堵塞風險；光固化則可以列印複雜微結構，但光源對細胞會有一定損傷，且需衡量使用光敏材料(Herzog et al., 2024)。表 2.4 為不同 3D 生物列印技術之比較。

這些列印方式在實際運用上各有優劣，需要依據微生物特性、反應需求與材料條件進行調整設計。與傳統固定化方法(如包埋、吸附與凝膠等)相比，3D 生物列印有更高的可設計性與空間控制性，依據不同需求可以調整孔隙、表面積與最佳化微結構。傳統技術較難以精準掌控多種菌種於特定位點共同生長、實現例如濃度梯度、營養供應路徑等細部設計，而 3D 列印則能透過層層堆疊與列印參數調整，使不同細胞或材料在特定空間準確分佈。在環境應用中，列印結構的物理與化學屬性(如導電性透性、比表面積)可依污染物去除機制量身調整，提升微生物反應效率與穩定性。

表 2.4、不同 3D 生物列印技術之比較(Herzog et al., 2024)



3D 生物列印類型	子技術與說明	原理	適用材料	優點	受限因素
噴墨式列印 (Jetting-based Bioprinting)	IBB :利用壓電或加熱產生微液滴 MBB :微閥控制液體釋放頻率與體積 LAB :雷射脈衝驅動墨滴	以熱、壓電、雷射或微閥形成液滴點狀沉積	低黏度 bioink (3 - 12 mPa·s)	高解析度、非接觸式、液滴精準控制	易乾或堵塞、熱剪切傷害細胞
擠出式列印 (Extrusion-based Bioprinting)	氣壓式 :透過氣體擠壓出墨水活塞式:機械推動活塞推擠材料螺旋式:螺旋推進控制出墨量	利用氣壓/機械方式將材料連續擠出堆疊	高黏度材料 (~10 ⁷ mPa·s)、細胞濃度高	可列印大體積、高細胞密度、材料廣泛	剪切力高、解析度受限
光固化列印 (Vat Polymerization-based Bioprinting)	SLA :雷射點掃描固化 DLP :整層面曝光一次固化 2PP :利用雙光子聚合技術	使用光源選擇性交聯光敏水凝膠進行高精度光聚合	中黏度、需光敏官能團	高解析度(< 10 μm)、微結構佳	光源與光引發劑具細胞毒性、耗材貴



2.5.2 微生物應用中材料特性與列印參數對微生物生存影響

3D 生物列印應用於微生物時，生物墨水的流變性、黏度與交聯方式、列印壓力、列印速度與噴嘴設計，均會影響微生物的存活與功能。Shakur 等人研究中發現當擠出式列印過程中超過 14 kPa 的剪切應力時，綠藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 會大量死亡，需要保持在 5–10 kPa 間 *C.reinhardtii* 才能維持基本光合作用功能(Shakur et al., 2024)。Perin 等人則建立生物墨水黏度變化與不同剪切速率之間關聯性的模型，提出「列印性窗口(Printability Window)」概念，用以判斷在特定流動性與黏度條件下，海藻酸鈉(alginate)與透明質酸(Hyaluronic Acid, HA)混合物是否能順利從噴嘴擠出、保持所需形狀，並在列印後維持良好的結構穩定性與支撐力(Perin et al., 2023)。此外 Pu 等人指出，添加導電性可以促進電子傳遞，且添加抗菌奈米粒子可抑制雜菌生長維持目標微生物為優勢族群，目的都是為增強微生物功能表現與環境適應性。適當選材與參數調整有助於加強列印精度與菌體活性(Pu et al., 2024)。

2.5.3 3D 列印於固定化微生物的應用案例與研究進展

近年來生物列印技術已被應用於多種環境系統，包括廢水處理、重金屬去除以及資源回收等。Liu 等人研究中開發具有胞外電子傳遞(Extracellular electron transfer, EET)能力的工程化活性材料(engineered living materials, e-ELMs)，將 *Shewanella oneidensis* (希瓦氏菌，具胞外電子傳遞能力之革蘭氏陰性菌)包埋於功能化水凝膠中，藉由 3D 列印控制結構特性與菌體分布，增強電子傳輸效率並促進有機汙染物分解(Liu et al., 2024)。

Yoon 等人將微藻嵌入由海藻酸鈉與甲基化纖維素(Methylcellulose, MC)組成的水凝膠支架中，應用於水中營養鹽去除，其總氮與總磷去除效率分別為 52 % 與 88 % (Yoon et al., 2024)；另外也有利用 3D 生物列印技術建構了細

菌-藻類共培養體系，用於化學物質的生物修復(He et al., 2022)。表 2.5 彙整 3D 生物列印材料於環境應用之案例。



表 2.5、3D 生物列印材料於環境應用之案例

微生物類型	應用目的	生物墨水	列印方式	應用結果
<i>Shewanella</i> spp.	污水脫氮+電子轉移	PEGDA/ SA/ EET 導電材料	擠出式	降解率上升、電流密度提升
<i>C. vulgaris</i>	營養鹽去除	SA/ MC	擠出式	總氮去除 52% 總磷去除率達 88%
菌藻共生系統	化學物質的生物修復	複合多醣	擠出式	90%以上的 acrylamide 與 methyl orange 去除率

2.6 高通量基因定序技術在微生物研究中的應用



隨著分子生物技術的進步，基因定序技術在微生物研究領域的應用逐步拓展。早期的第一代定序(First-Generation Sequencing, FGS)，以 Sanger 定序法為代表，受限於成本高昂及產量有限，難以滿足複雜微生物群落的研究需求(Akaçin et al., 2022)。次世代定序(Next-Generation Sequencing, NGS)自 2005 年問世後，透過高通量、低成本的特性，使得微生物群落結構與功能研究得以大幅擴展，尤其是在污水處理、土壤微生物與人體微生物等領域(Sanz et al., 2019)。然而，NGS 技術的短讀長限制，造成物種解析度無法細緻至屬(genus)或種(species)層級。

第三代定序(Third-Generation Sequencing, TGS)技術，如 PacBio 單分子即時定序(Single Molecule Real-Time Sequencing, SMRT)與 Oxford Nanopore 技術，具備長讀長及避免 PCR 偏差的優勢，能夠獲得完整基因序列，如全長 16S rRNA 基因，顯著提升分類解析度，適合用於複雜環境樣本中細菌群落的詳細分析(Akaçin et al., 2022; Ji et al., 2019)。因此，結合 NGS 與 TGS 技術，有助於全面揭示微生物多樣性與功能潛力，並推動脫氮系統等環境工程領域的微生物機制解析。

2.6.1 高通量基因定序技術簡介(NGS 與 TGS)

高通量基因定序技術主要可分為次世代定序(NGS)與第三代定序(TGS)兩大類。NGS 技術包括 Illumina MiSeq、Ion Torrent 等平台，特點為以平行反應方式快速定序大量短片段 DNA(約 150 至 300 bp)，廣泛應用於 16S rRNA 變異區(如 V3 –V4 區域)擴增子分析及宏基因體(metagenomics)研究(Sanz et al., 2019)。這些技術具備高通量、低成本等優點，但受限於短讀長，分類解析度多僅能達到屬或科階層(Ji et al., 2020)。

相較之下，TGS 技術，如 PacBio Sequel 平台，能夠一次讀取超過 10 kb 以上的長序列，避免因短讀長造成的基因拼接錯誤問題，並可直接定序無需

PCR 擴增。PacBio 的全長 16S rRNA 基因定序技術，涵蓋完整 V1 至 V9 區域，能有效提升分類精度至種階層，並降低誤分類風險。此外，TGS 亦可進行宏基因體組裝與功能預測分析，適合應用於複雜微生物群落結構與功能潛力的探討(Akaçin et al., 2022; Ji et al., 2019)。

綜上所述，NGS 與 TGS 各具優勢，選擇適當技術取決於研究目標、樣本特性及解析需求。近年來，結合兩種技術的混合應用亦逐漸受到重視，期望能在微生物多樣性解析與功能研究上提供更為全面的資訊。

2.6.2 高通量定序在脫氮系統微生物群落分析中的應用

脫氮系統(例如硝化-反硝化與厭氧氨氧化系統)中，微生物群落組成對脫氮性能具有決定性影響。傳統利用 NGS 技術，如 Illumina MiSeq，能夠揭示反應系統中硝化菌(如 *Nitrosomonas*、*Nitrospira*)、反硝化菌(如 *Pseudomonas*)及 ANAMMOX 菌(如 *Candidatus Brocadia*)等功能性菌群的多樣性與分布情況。然而，由於短讀長的限制，NGS 在屬或種層級的鑑定精度仍有所不足。

TGS 技術的引入，如 PacBio 全長 16S rRNA 定序，不僅提高了細菌群落分類的解析度，更可細緻解析脫氮功能相關菌種的演替變化。例如，研究顯示，利用 PacBio 定序能更準確地鑑定出脫氮系統中與氮磷去除功能相關的細菌，包括 *Pseudomonas yamanorum*、*Nitrospira* sp. ND1 及 *Rhodobacter* sp. WS22 等。此外，PacBio 技術也能克服 NGS 在低豐度菌群識別上的不足，有助於全面掌握系統內微生物社群的變遷與功能潛力。隨著第三代定序技術的發展，已可針對複雜微生物群落進行高解析度分析，特別適用於功能性微生物如脫氮菌群之演替研究，為後續相關系統運行機制之深入探討提供基礎。

總結而言，次世代定序(NGS)技術以其高通量、低成本的特點，促進了污水處理系統中微生物群落結構的解析與功能研究，但受限於短讀長，對於物種層級的精確鑑定存在挑戰。第三代定序(TGS)技術則以長讀長與單分子

測序的優勢，顯著提升了分類解析度，能夠更細緻地描繪微生物社群演替與功能特性。隨著定序技術的演進，未來結合 NGS 與 TGS 的高通量、多層次微生物群落分析，有望深化對脫氮系統中功能性微生物的理解，並為系統優化與操作提供科學依據。表 2.6 為次世代定序(NGS)與第三代定序(TGS)技術比較。



表 2.6、次世代定序(NGS)與第三代定序(TGS)技術比較

項目	次世代定序(NGS)	第三代定序(TGS)
代表技術	Illumina MiSeq、Ion Torrent	PacBio SMRT、Oxford Nanopore
讀長範圍	100–300 bp (短讀長)	> 10,000 bp(長讀長，可至 100 kb 以上)
定序方式	大量平行短片段定序 (Sequencing by Synthesis)	單分子即時定序(Single Molecule Real-Time, SMRT)或 奈米孔定序
準確度	高(> 99 %)，但需依靠拼接組 裝	早期略低，PacBio HiFi 已達 >99.9%
PCR 需求	需要 PCR 擴增	可免 PCR 擴增(降低偏差)
分類解析度	屬(genus)或科(family)層級為 主	可達種(species)層級解析
適用範圍	16S rRNA 片段定序、宏基因 體、轉錄體研究	全長 16S rRNA 定序、宏基因 體組裝、罕見菌群檢出
資料產出速度	快(短片段，容易處理)	相對較慢(資料量大，處理時 間長)
成本	每樣本成本較低	單次定序成本較高，但單讀取 資訊量大
主要限制	讀長短，分類精度受限	儀器與耗材成本較高，資料分 析較複雜



第三章 材料與方法



3.1 研究流程

本研究旨在探討以實驗室馴養出之 ANAMMOX 菌群，結合光固化 3D 列印技術製備之 ANAMMOX 載體之性能與應用潛力，整體研究流程可分為以下幾個主要階段：

首先，自一垃圾掩埋場滲出水處理廠生物處理單元與食品廢水處理廠中取得活性污泥進行馴養，馴養期間進行水質監測與總氮去除效率評估，並透過菌相分析確認菌群種類分布中 ANAMMOX 的相對豐度。以厭氧氨氧化比活性(SAA)測試確認所馴養出之污泥具備穩定活性後，進行固定化操作階段。

依據不同研究目的配置兩種生物墨水配方，分別為(1)海藻酸鈉與氯化鈣交聯之 (PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light)配方以及(2)不含海藻酸鈉之(PVA-PEGDA/ Light)配方，分別與馴化完成之 ANAMMOX 菌群混合。利用改裝後之光固化 3D 生物列印設備進行生物固定化載體列印，列印完成後依材料特性進行交聯與穩定。固定化後之生物載體將投入 $TN = 80 \text{ mg-N/L}$ 低氮源基質中進行活化，確認初步反應活性良好後並決定適用之墨水配方，再接續進行比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)測試，並與懸浮態菌群進行活性比較，評估不同固定化條件對菌群活性之影響。

此外，為探討固定化 ANAMMOX 載體之應用穩定性，進一步進行(1)氮源濃度漸增反應適應性測試($TN = 80 \text{ mg-N/L}$ 逐步提升至 $TN=200 \text{ mg-N/L}$)，以評估固定化菌群對高氮濃度環境之耐受性與功能穩定性與(2)保存性穩定性測試，將載體以不同保存條件下(4°C 、 -20°C 與室溫)經過 10 天放置保存後，載體再次活化並重新投入高氮源濃度中測試比活性(SAA)，分析其活性表現狀況與直接投入使用的載體比活性表現的區別，評估其實務應用可行性。

最後為了解載體物理與生物特性，進行固定化載體為結構分析與載體內菌體生長消亡狀態的觀察。結構分析以場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)觀察空隙與表面形貌，菌體活性則利用螢光染色與共軛焦顯微鏡進行活死菌分布分析。

綜上所述，本研究之研究流程涵蓋 ANAMMOX 菌群馴養、生物墨水配方開發、固定化操作、活性測試、穩定性評估與特性分析，系統性評估以光固化 3D 列印技術製備之固定化 ANAMMOX 載體之可行性與應用潛力。圖 3.1 為本研究流程圖。

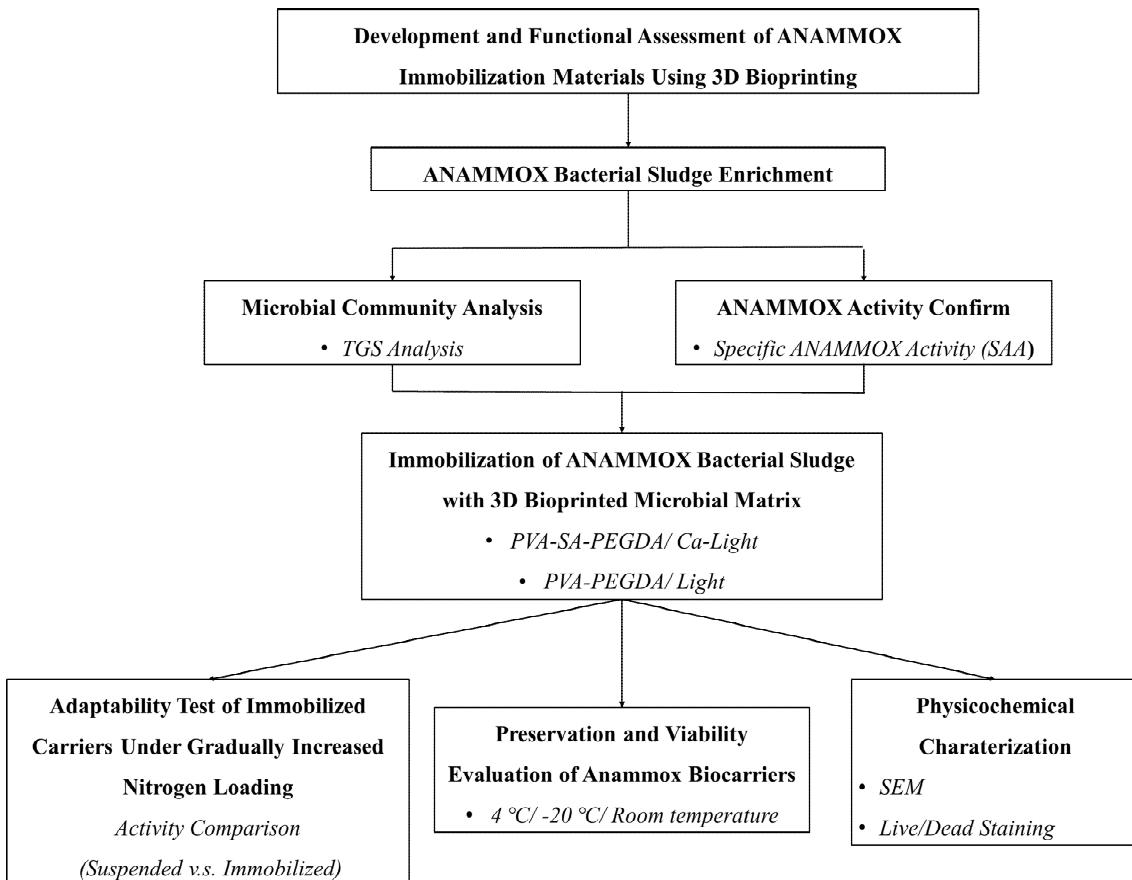


圖 3.1、研究流程圖

3.2 實驗藥品與設備



3.2.1 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
亞硝酸鈉	NaNO ₂	東昇化工	合成廢水配置
硫酸銨	(NH ₄) ₂ SO ₄	友和	/SAA 測試
氯化鈣	CaCl ₂	友和	
硫酸鎂	MgSO ₄	友和	
磷酸二氫鉀	KH ₂ PO ₄	林 純藥	
乙二胺四乙酸二 鈉	EDTA-2Na	友和	
氫氧化鈉	NaOH	日本製藥	
硫酸亞鐵	FeSO ₄ ·7H ₂ O	島久藥品	
六水合氯化鈷	CoCl ₂ ·6H ₂ O	石津	
七水合硫酸鋅	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Nacalai tesque	
四水合氯化錳	MnCl ₂ ·4H ₂ O	和光純藥	
五水合硫酸銅	CuSO ₄ ·5H ₂ O	景明	
鉬酸鈉	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	日本製藥	
硫酸胼	N ₂ H ₅ HSO ₄	友和	
磷酸鹽緩衝溶液	PBS buffer	友和	

表 3.1、實驗用藥品清單(續)

藥品名稱(中文)	藥品名稱(英文)	廠牌	用途
氨氮指示劑套組	Mineral Stabilizer Polyvinyl Alcohol Dispersing Agent	HACH	
陰離子儲備液	High-Purity IC-2-A High-Purity IC-2-B	HPS	IC 分析
98 %硫酸	H ₂ SO ₄	Honeywell	
丙酮	CH ₃ COCH ₃	MACRON	
碳酸鈉	Na ₂ CO ₃	日本製藥	
碳酸氫鈉	NaHCO ₃	日本製藥	IC 分析/合成 廢水配置
DNA 萃取套組	DNeasy® Power Soil Kit	QIAGEN	污泥 DNA 萃取
死活細胞	LIVE/DEAD™ BacLight™	Thermo	載體細胞染色
染色套組	Bacterial Viability Kit (L7012)	Fisher	
聚乙烯醇	Poly vinyl alcohol(PVA)	帝一化工	生物墨水材料
藻酸納	C ₆ H ₉ NaO ₇	Sigma-Aldrich	
40 nm 二氧化矽	40 nm SiO ₂	友和	
聚乙二醇二丙烯酸酯	Polyethylene Glycol Diacrylate (PEGDA)	雙鍵化工	

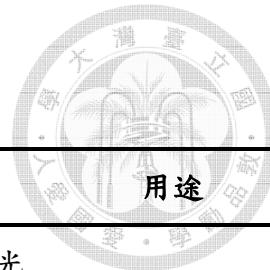


表 3.1、實驗用藥品清單(續)

藥品名稱(中文)	藥品名稱(英文)	廠牌	用途
偶氮二甲基 N-2	2,2'-azobis [2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide](VA-086)	日本和光	
無水酒精(乙醇)	C ₂ H ₅ OH	景明	消毒/脫水
99.5 %			

3.2.2 實驗用儀器設備

表 3.2、實驗用儀器與設備



儀器設備名稱	型號	廠牌
厭氧箱	EZ	BACTRON
氮氣機	QAR-709	東宇
分光光度計	DR3900	HACH
電子天秤	Precisa	XS 225A-SCS
落地式滅菌釜	FD50R	ZEALWAY
高溫爐	JH-6	章嘉
烘箱	68990N	AGILENT
抽氣幫浦	300	Rocker
超純水機	Milli-pore	Milli-Q
超音波震盪器	Delta	DC150H
低溫冷凍櫃	LSC-20	Fridigaire
冷凍乾燥機	COLE-PARMER	LABCONCO
離心機	MEGAFUGE8R	Thermo Fisher
水質監測儀	HQ2200	HACH
Nanodrop	ND-1000	Thermo Fisher
陰離子層析儀	Eco IC	Metrohm
ORP 計	MP103-3	EZDO
抽氣櫃	訂製	章嘉
共軛焦顯微鏡	SP5	Leica
場發射掃描式電子顯微鏡	JSM-7600F	JEOL

3.3 厭氧氨氧化菌(ANAMMOX bacteria)之培養條件與鑑定



3.3.1 污泥來源

本研究所使用之污泥取自一垃圾掩埋場滲出水處理設施之生物處理單元，該處理場長期處理較高濃度氨氮(200 – 250 mg-N/L)之成熟滲出水，推測系統中已自然馴化出具 ANAMMOX 活性潛力之微生物族群。根據 Yang 等人之研究，該場域過去曾檢測到多種 ANAMMOX 屬群，包括 *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Jettenia* 與 *Candidatus Kuenenia*，顯示其菌群具高度多樣性與功能潛能(引自廖婉婷，2023)。但根據近期分析結果，目前僅檢測到 *Candidatus Kuenenia*，推測與廠內操作條件調整(如甲醇添加)導致菌群組成改變有關(廖婉婷，2023)。為進一步開發固定化 ANAMMOX 載體並進行活性測試，本研究以該場域污泥作為 ANAMMOX 接種來源，並於實驗室條件下進行後續馴養與強化程序。圖 3.2 為該垃圾掩埋場滲出水處理廠活性污泥初期照片。

為進一步增殖 ANAMMOX 菌群，並提高菌量與活性，本研究另取一食品廠之廢水處理廠活性污泥，並以穩定狀態之 ANAMMOX 污泥進行植種操作，以擴大量體並加速菌群定殖。圖 3.3 為該食品廠植種後初期活性污泥照片。



圖 3.2、垃圾掩埋場滲出水處理廠活性污泥初期照片

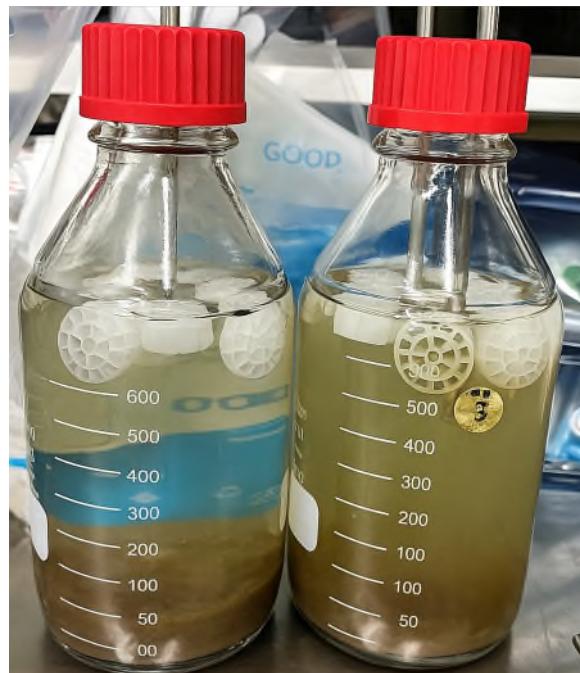


圖 3.3、食品廠廢水處理廠活性污泥植種後初期照片

3.3.2 厳氧氨氧化菌培養之合成廢水組成與反應條件設定

為成功富集並維持嚴氧氨氧化菌(ANAMMOX bacteria)之活性與穩定性，本研究依據 Van de Graaf 等人之研究(Van de Graaf et al., 1996)與相關之 ANAMMOX bacteria 飼養研究，調配適合其生長與代謝之合成廢水組成，並設定合適之反應條件。

本研究全程於無氧環境下進行反應槽操作，反應槽置於厭氧手套箱中 (Anaerobic Chamber)，以批次培養(batch culture)方式進行。反應期間之合成廢水 pH 控制於 7.5 – 8.5 之間，以符合 ANAMMOX 菌偏弱鹼性之最佳活性條件；由於厭氧箱中無加熱設備，反應溫度則依室溫(約 20 – 25 °C)自然變化進行操作。合成廢水基本組成感謝華盛頓大學 Mari Winkler 教授提供，如表 3.3，每次配置培養基前先以氮氣機曝氣 3-4 小時，再依配方表依序將藥加入，每公升合成廢水中有 6.07 mg-P 的 KH_2PO_4 、29.62 mg-Mg 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、48.01 mg-Ca 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，並分別添加 1 mL/ L 的微量元素溶液 I 與 II (表 3.4)，其中微量元素溶液 I 中含 6 g/ L EDTA-2Na 以及 9.14 g/ L 之 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，並以調整 pH 為 6.5-7 保留 Fe^{2+} 狀態；微量元素溶液 II 中則含有 15 g/ L EDTA-2Na、240 mg/ L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、430 mg/ L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、990 mg/ L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、250 mg/ L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、220 mg/ L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、190 mg/ L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、7 mg/ L H_3BO_3 。基質氮源提供由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提供 $\text{NH}_3\text{-N}$ ， NaNO_2 提供 $\text{NO}_2\text{-N}$ ，基質內 $\text{NH}_3\text{-N}$ 與 $\text{NO}_2\text{-N}$ 莫耳濃度比為 1:1，與 Van de Graaf 等人之研究相同(Uyanik et al., 2011; Van de Graaf et al., 1996)，另再加入 0.42 g/ L NaHCO_3 提供無機碳源，初始污泥培養以 TN 60 mg-N/ L ($\text{NH}_3\text{-N}$: 30 mg-N/ L ; $\text{NO}_2\text{-N}$: 30 mg-N/ L) 進行馴化，當去除效率穩定後，漸升 TN 濃度，最終反應槽負荷 TN 為 120 – 150 mg-N/ L。

表 3.3、ANAMMOX bacteria 培養基組成成分

(感謝華盛頓大學 Mari Winkler 教授提供)



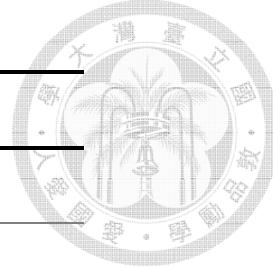
藥品	1X(1L)	Stock	每次取用量(1 L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Adjustment	-	-
NaNO_2	Adjustment	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.18 g	9 g/ 50 ml	1 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g	15 g/ 50 ml	1 ml
KH_2PO_4	26.7 mg	1.335 g/ 50 ml	1 ml
NaHCO_3	0.42	-	-
Trace element solution I	-	-	1 ml
Trace element solution II	-	-	1 ml

表 3.4、微量元素成分表

藥品	添加量
Trace element solution I *1 L 定容	
DI	900 ml
EDTA-2Na	6 g
NaOH	4 pieces
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.14 g

表 3.4、微量元素成分表(續)

Trace element solution II *1 L 定容	
DI	900 ml
EDTA-2Na	15 g
NaOH	(4-8 pieces)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	240 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	430 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	990 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	250 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	220 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	190 mg
H ₃ BO ₃	7 mg



此外，雖採用批次操作形式進行培養，但為後續操作條件評估與後續比較，本研究仍以理論水利停留時間(Hydraulic Retention Time, HRT)與污泥停留時間(Sludge Retention Time, SRT)進行表述。反應槽總體積為 1000 ml，污泥體積為 300 ml，每兩天進行一次基質更換，每次抽取反應槽上清液，並添加新的基質，故而可估算 HRT 約為 2 天。

本研究培養期間並未進行定期污泥排出更換，但每月會定期取出 20 ml 污泥懸浮液進行總懸浮固體(TSS)以及揮發性懸浮固體(VSS)之濃度分析，佔總系統體積 2 %。因此，雖 SRT 接近無限大，但仍然存在極微量生物量流失。總體來看，本實驗操作條件仍可視為高 SRT 系統，符合長期馴養厭氧氨氧化菌之需求。

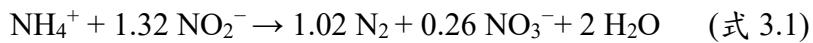
3.3.3 運行期間之定期監測與分析

為評估反應槽中厭氧氨氧化菌群之培養穩定性以及氮去除表現，反應槽運行期間內定期進行水質與生物量之監測與分析，主要觀測項目包含溶氧(DO)、酸鹼值(pH)、電導度(Conductivity, EC)、氨氮(NH₃-N)以及亞硝氮(NO₂⁻-N)以及硝氮(NO₃⁻-N)，以及總懸浮固體(TSS)與揮發性懸浮固體(VSS)。

其中水質基本參數(DO、pH、EC、ORP)以水質監測儀和ORP計進行定期紀錄監測，氨氮濃度以比色法進行測定，亞硝氮以及硝酸鹽氮則透過離子層析法進行分析。氨氮、亞硝氮以及硝酸鹽濃度測定方法詳見3.4節中SAA分析所採用之標準流程；TSS與VSS則依照環境部標準方法(NIEA.R212.02C, 2014; NIEA.W210.58A, 2013)進行測定。

此外，為判斷槽中反應是否由ANAMMOX反應主導，本研究亦參考理論上之反應比值(NH₄⁺:NO₂⁻:NO₃⁻ = 1:1.32:0.26, mol: mol: mol) (Hu et al., 2013)進行對比分析。

厭氧氨氧化反應主要反應式如下：



其中，亞硝酸根離子(NO₂⁻)作為電子受體與銨根(NH₄⁺)反應，產生氮氣(N₂)作為最終產物，並伴隨少量硝酸根(NO₃⁻)副產物產生，如運行期間實測之氨氮與亞硝氮濃度變化趨勢與理論接近，則可認為反應槽系統內ANAMMOX活性良好且運行狀況穩定。因此本研究每隔3至5天統計平均出流水氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度，計算各時期總氮(TN)濃度及去除效率。

總氮定義如下：

$$C^{\text{TN}} = C_{\text{NH}_3-\text{N}} + C_{\text{NO}_2-\text{N}} + C_{\text{NO}_3-\text{N}} \quad (\text{式 3.2})$$

總氮去除效率(Total Nitrogen Removal Efficiency, %)計算式為：

$$\text{TN Removal Efficiency (\%)} = \frac{C_{\text{in}}^{\text{TN}} - C_{\text{out}}^{\text{TN}}}{C_{\text{in}}^{\text{TN}}} \times 100\% \quad (\text{式 3.3})$$

其中， C_{in}^{TN} 與 C_{out}^{TN} 分別為進流水與出流水之總氮濃度(mg-N/L)。

ANAMMOX 活性效率(Anammox Activity, %)定義為氨氮與亞硝氮消耗總和之比例，計算公式如下：

$$\text{ANAMMOX Activity (\%)} = \frac{\Delta C_{NH_3-N} + \Delta C_{NO_2^--N}}{C_{in}^{TN}} \times 100\% \quad (\text{式 3.4})$$

其中， ΔC_{NH_3-N} 與 $\Delta C_{NO_2^--N}$ 分別為 NH_3-N 與 NO_2^--N 之消耗量(mg-N/L)。

另外為判斷反應是否由 ANAMMOX 反應主導，亦將氨氮消耗量推算理論硝酸氮生成量，並與出水硝酸氮實測值進行比較，理論產量依據 ANAMMOX 反應式計算：

$$NO_3^- - N_{theoretical} = \Delta C_{NH_3-N} \times 0.26$$

若硝酸氮實測量與理論推估量相符，可視為反應系統內主要進行 ANAMMOX 反應，且系統運行穩定。表 3.5 為本研究觀測之項目及其目的。

表 3.5、本研究反應槽觀測之項目及其目的

項目	測定方法	目的與說明
DO	HQ2200 多參數儀	評估溶氧是否維持於 ANAMMOX 所需低氧環境
pH	HQ2200 多參數儀	監測系統 pH 變化
EC	HQ2200 多參數儀	了解反應槽中離子濃度變化與基質狀 態
ORP	EZDO MP103-3	評估反應槽氧化還原環境
NH ₃ -N	Hach 氨氮試劑 + DR3900 分光光度計	評估氮源去除效率
NO ₂ ⁻ -N	Metrohm Eco IC 離子色譜儀	評估氮源去除效率及評估電子受體利 用與反應
NO ₃ ⁻ -N	Metrohm Eco IC 離子色譜儀	分析副產物生成情形
TSS	NIEA W210.58A, 2013	追蹤總懸浮固體含量，推估生物量
VSS	NIEA R212.02C, 2014	追蹤揮發性有機成分，推估活性菌量

3.3.4 微生物群落結構分析:PacBio 全長 16S rRNA 定序技術解析菌相變化

為評估反應系統中微生物群落隨運行時間之演替變化，本研究定期採集反應槽內之污泥樣本進行微生物定序分析。每次取樣約 20 mL 污泥懸浮液，經 8000 rpm、4 °C 離心 10 分鐘，去除上清液後收集菌塊。污泥塊樣本使用 QIAGEN 之 DNeasy® PowerSoil Pro Kit 進行 DNA 萃取，藉由機械破碎與矽膠膜吸附方式進行純化。萃取完成後，經 NanoDrop 分光光度計檢測確認 DNA 濃度與純度。

取得之 DNA 樣本送交專業定序公司，進行全長 16S rRNA 基因第三代定序(Third-Generation Sequencing, TGS)，採用 Pacific Biosciences (PacBio) 平台。定序資料經初步品質控制與分類註解後，計算各分類群之相對豐度 (relative abundance)，並以 R 語言進行群落組成變化趨勢分析，評估不同運行時間之菌相結構變化，特別關注 ANAMMOX 菌群之相對豐度動態。圖 3.4 為套組內提供之操作流程：

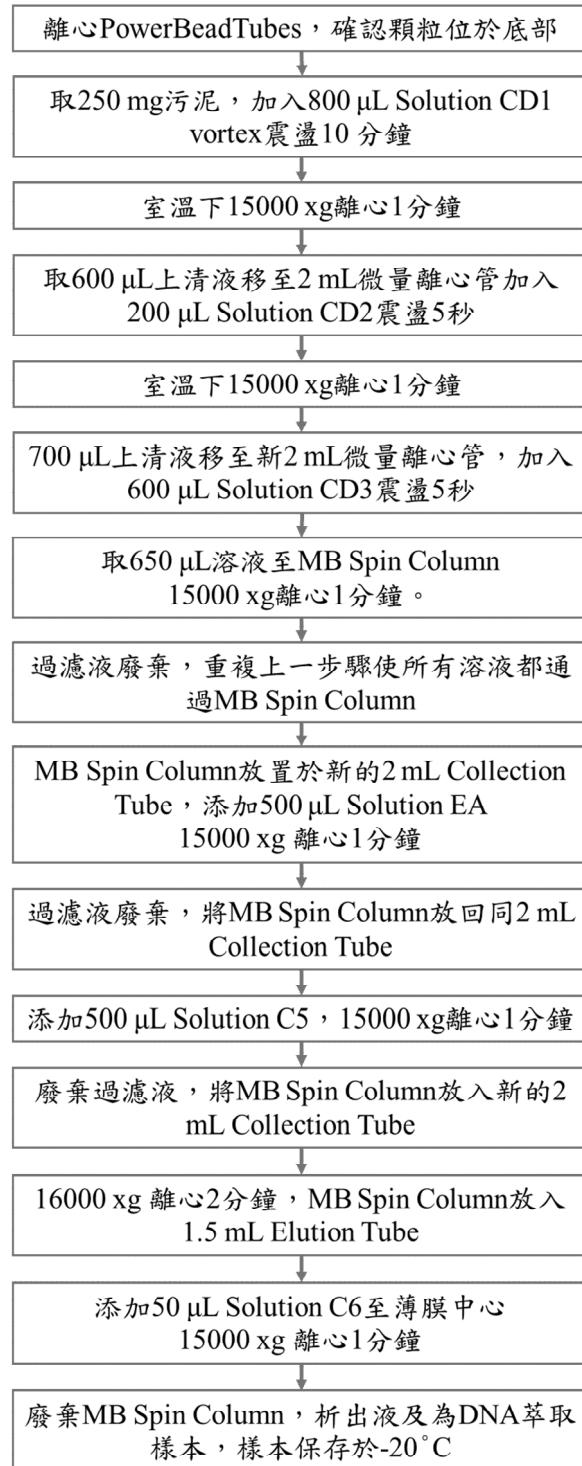


圖 3.4、DNeasy® Power Soil Pro Kit 之 DNA 萃取流程

3.4 厳氧氮氧化菌比活性分析(Specific ANAMMOX Activity, SAA)

為評估系統中嚴氧氮氧化菌群(ANAMMOX bacteria)利用氮源能力與活性強度，本研究參考 Bae 等人之研究(Bae et al., 2016)，以嚴氧氮氧化菌比活性測試(Specific ANAMMOX Activity Test, SAA Test)進行測試，SAA 測試設計原理為基於嚴氧氮氧化反應機制。此實驗抽取反應槽中馴養之污泥，於避光密閉條件下採批次模式進行短期反應觀察，生物量落在 175 – 200 mg-VSS/L，總反應體積 110 ml，並配置對應之基質條件(同 3.3.2 小節)於 35 °C，150 rpm 條件下進行氮源轉化評估，圖 3.5 為實驗操作流程。

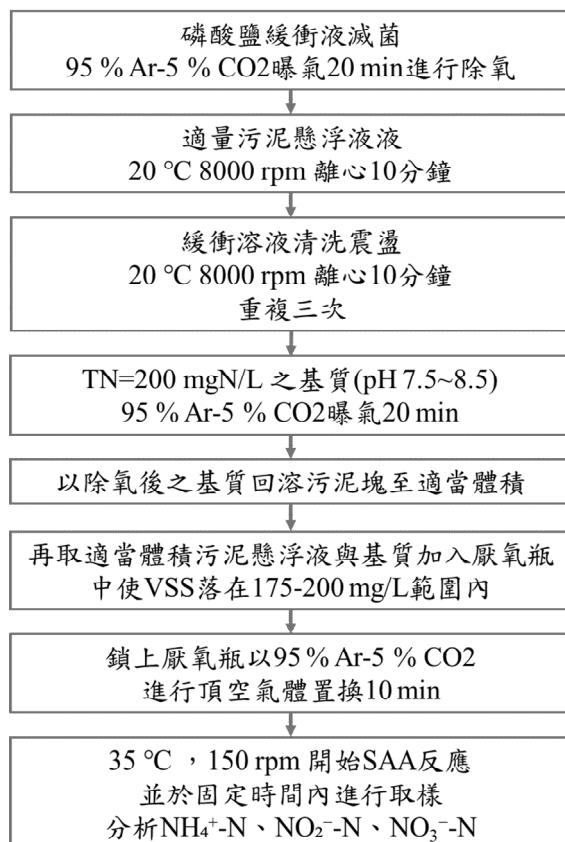


圖 3.5、嚴氧氮氧化菌比活性分析

(Specific ANAMMOX Activity, SAA)操作步驟

本實驗使用的基質條件與第 3.3.2 節所述之培養基相同，然而為提高反應速

率，故將氮源濃度提高至總氮(Total Nitrogen, TN)為 200 mg-N/ L(NH₃-N 與 NO₂⁻-N 各為 100 mg-N/ L)。厭氧瓶於 35°C 下進行反應，並全程保持厭氧狀態以模擬反應槽內之狀態。透過分析反應前後氨氮與亞硝氮濃度變化，結合污泥中之揮發性懸浮固體(VSS)濃度與反應時間，計算其比活性(SAA)數值，作為菌群氮源轉化速率與潛能之量化標準。

3.4.1 氨氮(NH₃-N)濃度測定方法

氨氮(NH₃-N)在厭氧氨氧化(ANAMMOX)反應中扮演主要的電子提供角色，在 ANAMMOX 反應中，氨氮會被厭氧氨氧化菌氧化產出氮，此過程中，氮原子由-3 價轉為 0 價，代表發生氧化反應，因此系統中氨氮濃度之降低可以直接反映出菌體之氮源利用效率以及活性表現。

本研究使用 HACH 水中氨氮分析試劑套組(納式比色法，Nitrogen-Ammonia Reagent Set, Nessler)，配合 HACH DR3900 分光度計中之 Program 8038 (380 N Ammonia Ness)進行氨氮測定，濃度測定範圍為 0.02 – 2.50 mg/ L NH₄⁺-N，此程式已內定檢量線，只需再次做空白進行校正即可開始測定。此方法基於 Nessler 試劑與氨氮反應生成黃色至橘棕色絡合物，其吸光值與氨氮濃度成正比。所使用之 Nessler 試劑套組包含三種試劑成分，如表 3.6 所示。

表 3.6、Nessler 試劑套組三種試劑成分與目的

試劑	目的
Nessler 試劑 (Nessler's Reagent)	含 HgI_2 與 KOH ，可與氨反應生成具吸光特性的有色絡合物。
礦物質穩定劑 (Mineral Stabilizer Reagent)	以沉澱水中干擾之金屬離子，避免影響測定反應。
聚乙烯醇分散劑 (Polyvinyl Alcohol Dispersing Reagent)	助於穩定反應懸浮體系，防止沉澱物干擾測定結果。

各階段取樣之樣品經 $0.45 \mu\text{m}$ 濾膜過濾後，再進行比色測量。所得之氨氮濃度變化速率用以計算厭氧氨氧化菌比活性分析(Specific ANAMMOX Activity, SAA)，作為系統內厭氧氨氧化菌活性強度之評估依據。依據試劑套組提供之標準方法，測定之總體積應為 25 ml 之稀釋後樣本溶液進行測定，然為節省藥品用量與減少廢液產生，本研究皆改以 15 ml 總體積之稀釋後樣本溶液進行測定，並確保反應條件與數據結果不受影響。圖 3.6 為本研究利用 HACH 水中氨氮分析試劑-納式比色法之操作步驟：

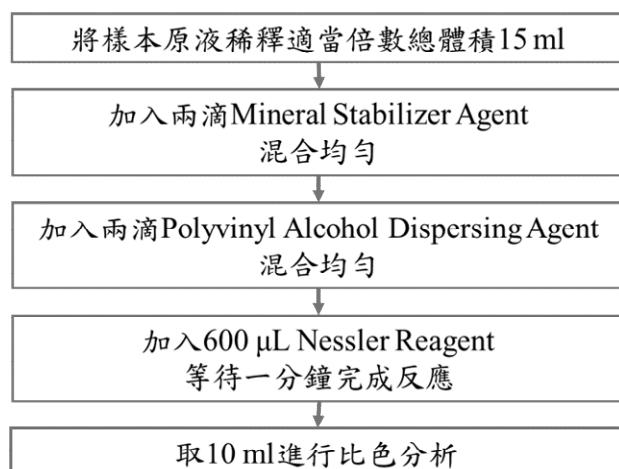


圖 3.6、HACH 水中氨氮分析試劑-納式比色法之操作步驟

3.4.2 亞硝氮(NO_2^- -N)與硝酸氮(NO_3^- -N)濃度測定方法



為評估本研究中 NO_2^- 作為電子受體利用效率與 NO_3^- 副產物生成情形，利用 Metrohm ECO IC 陰離子層析儀搭配 Metrosep A Supp 17-100/ 4.0 層析管柱進行亞硝酸根(NO_2^-)與硝酸根(NO_3^-)濃度分析。離子層析法之原理為利用樣品中各陰離子通過填有離子交換樹脂之層析柱時，根據各離子與固定相之間的親和力差異產生不同之停留時間(retention time)，從而進行分離。分離之陰離子進一步經由抑制裝置轉化為高導電度酸型態，最終經導電度偵測器量測導電訊號，再以圖譜呈現之停留時間與坡峰面積進行定性及定量分析。

本研究所測定之亞硝酸根與硝酸根之停留時間分別為 5.85 分鐘以及 8.46 分鐘。分析方法參考環境部公布之檢驗標準方法-水中陰離子檢測方法-離子層析法(NIEA.W415.54B, 2018)。檢量線使用 High-Purity 之標準儲備液，其販售之儲備液分為兩種，分為：

- IC-2A-100：氯離子、氯離子、溴離子、硫酸根、磷酸根，各 1000 mg/L
- IC-2B-100：1000 mg/L 之亞硝酸根

依序稀釋配置 1、2、4、6、8、10 mg/L 共六點檢量線，每次分析皆重新建立檢量線確保數據準確性，整體分析時間為 21 分鐘。圖 3.7 為所建立之檢量線。

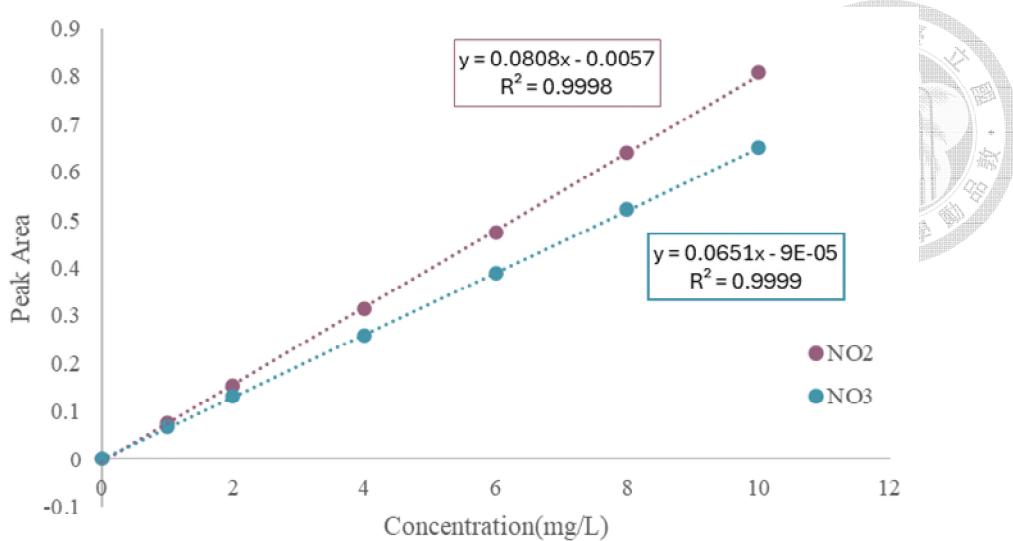


圖 3.7、本研究建立之 IC 檢量線

儀器操作條件為利用 5mM Na₂CO₃ 與 0.2 Mm NaHCO₃ 之混合液作為流動相，0.1 M H₂SO₄ 作為再生液。樣品分析前需要經過 0.22 μm 濾膜進行過濾方可上機分析以保護管柱，若無法立即進行分析，應儲存於 4 °C 下並於 48 小時內分析完畢。

3.4.3 厚氧氮氧化菌比活性(SAA)之計算與表示

厚氧氮氧化菌比活性(SAA)是以反應期間氨氮(NH₃-N)與亞硝氮(NO₂⁻-N)之總氮變化量(ΔTN)為基礎，計算單位時間與單位生物量所去除之總氮量，反映出系統中 ANAMMOX 菌群之反應速率與活性表現。其計算公式如下：

$$SAA = \frac{\Delta TN}{VSS \times \Delta t}$$

其中：

➤ ΔTN :反應期間氨氮與亞硝氮濃度變化總和(總氮變化量)，單位為

mg-N/ L

➤ Δt :反應時間，單位為天(day)

➤ VSS :混合液中之揮發性懸浮固體濃度(Volatile Suspended Solids)代表系統內生物量，單位為 mg-VSS/L

經單位換算後，SAA 之最終單位為：

mg-N/ mg-VSS-day



本研究依據實測之 $\text{NH}_3\text{-N}$ 與 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度變化，計算其總氮變化量 (ΔTN)，並選取濃度變化接近理論上之反應比值($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : \text{NO}_3^- = 1 : 1.32 : 0.26$ ，mol: mol: mol)之階段作為反應時間(Δt)，以確認反應槽內厭氧氨氧化菌群之活性強度繼而進行後續生物固定化載體之測試。

3.5 微生物固定化與 3D 列印設計



3.5.1 3D 生物列印機及列印參數

本研究參考前人研究(石丞均, 2022)使用 Creality Ender-5 之改機 3D 列印機進行生物載體之列印，列印機如圖 3.8。改機內容包含：

1. 同軸針取代原有加熱噴頭:同軸結構可將兩種不同材料各自於內外層同時擠出。
2. 同軸針連接兩組獨立管線與針筒:分別對應內軸與外軸材料之輸送達成複合型材料列印
3. 加裝波長 388nm 之藍光 LED 燈:列印同時進行光固化反應，提高材料成形效率與結構穩定性。
4. 修改列印機控制程式:從程式中去除加熱程序之設定使列過程不會進行加熱。

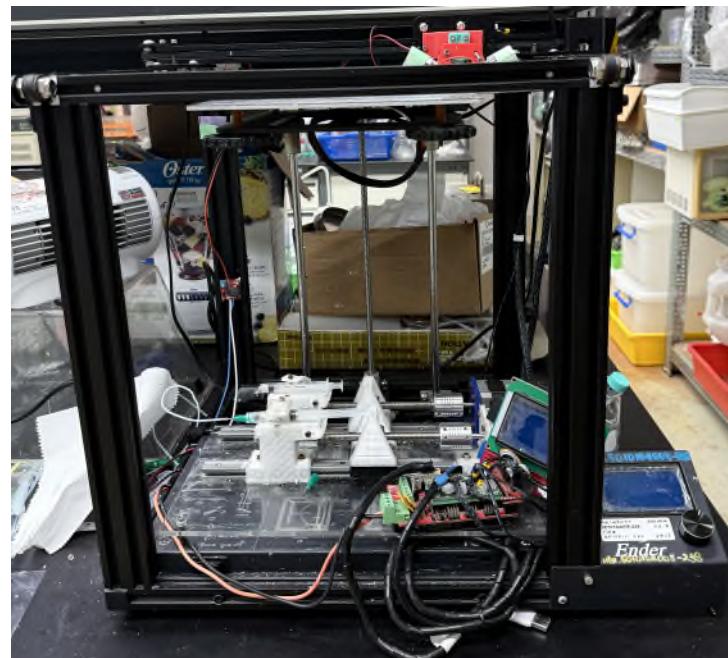


圖 3.8、3D 生物列印機

另本研究之生物載體 3D 圖形設計為使用 Solidworks 軟體繪製，完成之設計圖檔(.STL)匯入 Ultimaker Cura 軟體中進行切片處理並存檔(.gcode)，再次開啟檔案以文字編輯器進行程式修改調整列印參數。



3.5.2 固定化材料生物墨水配方製備

為製備適用於光固化 3D 列印之固定化材料，本研究配置含污泥之生物墨水，並利用改機之 Creality Ender-5 3D 列印進行列印。材料條件本實驗設定兩種條件，分別為海藻酸鈉-氯化鈣交聯並光硬化載體(PVA-SA-PEGDA/Ca-Light)與 PVA-PEGDA 並光硬化載體(PVA-PEGDA/ Light)，其中 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體為參考石等人之研究(石丞均，2022)。然 SA 雖具有良好之生物相容性及可交聯形成穩定結構，但是 SA 屬於有機質，可能在實驗中提供可溶性有機碳(Organic Carbon)進而影響系統內微生物的代謝活動，使污泥中厭氧氨氧化菌所進行之厭氧氨氧化反應被抑制。因此為釐清 SA 存在與否是否會影響反應過程，另依據原含有 SA 之配方設計剔除 SA 之配方，即為 PVA-PEGDA/ Light，藉以了解兩者間所列印之生物載體所呈現之反應結果是否主要為 ANAMMOX 反應，以下為兩種方法之配方：

➤ PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體配方：

配置之生物墨水總體積為 10 ml，材料內容包含聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、偶氮二甲基 N-2 羚丁基酰胺(VA-086)、40 nm 二氧化矽、聚乙二烯醇(PVA)、藻酸鈉(Sodium Alginate, SA)以及清洗後污泥菌塊，各材料最終配比如表 3.7。並另外配置 2 % CaCl_2 溶液，使用前以 0.22 μm 濾頭過濾。

表 3.7、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體配方

Material	Purpose	Conc.
PEGDA	架構水凝膠網絡，提供強度	20 %
VA-086	啟動交聯反應，固化結構	0.2 %
40 nm SiO ₂	增黏性與機械強度、改善列印效果	12 %
PVA	改善列印性、提升柔韌與穩定性	7.5 %
Sodium Alginate	增強列印即成型性，包埋微生物穩定	4 %

➤ PVA-PEGDA/ Light 載體配方：

配置之生物墨水總體積為 7.5 ml，材料內容包含聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、偶氮二甲基 N-2 羅丁基酰胺(VA-086)、聚乙烯醇(PVA)以及清洗後污泥菌塊，由於此配方無 SA，故不需要配置 2 % CaCl₂ 溶液，各材料最終配比如表 3.8。

表 3.8、PVA-PEGDA/Light 載體配方

Material	Conc.
PEGDA	25 %
VA-086	0.25 %
PVA	9.37 %

以上兩種配方中皆須配置 PVA 以及 VA-086 儲備溶液，其中 PVA 儲備溶液濃度為 16.66 %，而 VA-086 儲備溶液為 2.5 %。生物墨水配置步驟如圖 3.9。

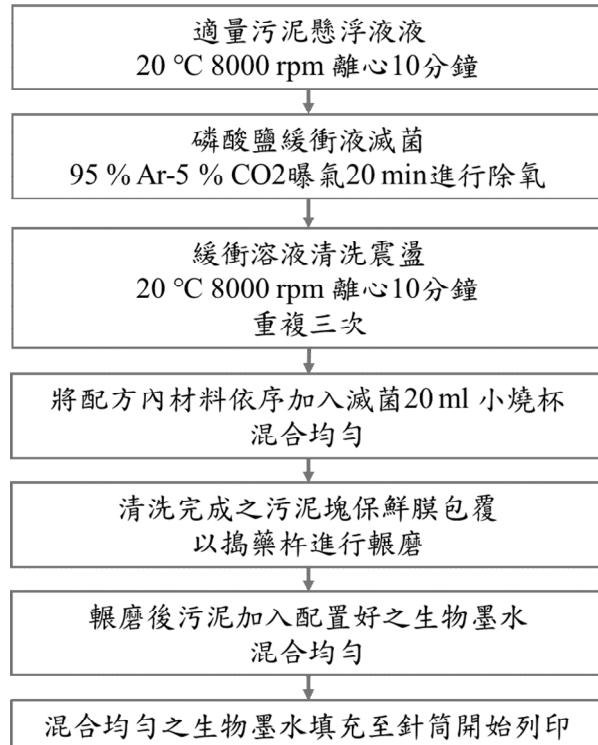
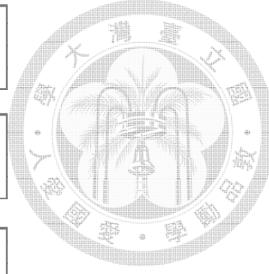


圖 3.9、生物墨水配置步驟

3.5.3 生物墨水材料列印步驟

鑑於 3D 列印機放置於實驗室開放空間中，列印過程材料容易暴露於環境中，為確保操作過程盡量無菌的狀態，本研究於列印前針對設備、管線與平台進行消毒處理，以 75 % 酒精消毒平台，列印過程中在平台上方覆蓋經酒精噴灑之鋁箔紙降低外部污染風險。此外，列印前後皆須對針頭及管線進行清潔消毒，以減少生物墨水殘留於針頭與管線中以致堵塞與污染。詳細列印機與列印操作步驟如下：

➤ PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體列印步驟

1. 設備啟動與噴頭調整：開啟列印機後，依序操作 `prepare > move axis > move Z > move 10 mm`，將噴頭高度調整至 170 mm。於噴頭下方放置一個 50 mL 小燒杯，以利清洗管線之液體排放。

2. 針筒與管線清洗:將內外針筒拆下，吸取並排放 DI 水清洗 3 至 4 次，確保針筒與連接管線通暢無阻。
3. 排除殘餘水分:以針筒吸取空氣，使管線內無殘留水分，避免稀釋生物墨水。
4. 內針筒填裝生物墨水:吸取 3 mL 生物墨水至內針筒，操作時注意避免產生氣泡，確保材料均勻填裝。
5. 安裝內針筒:將裝填完成之內針筒裝入設備中並鎖緊，轉動針筒使材料充分進入輸送管線。
6. 外針筒填裝交聯液:將經過 0.22 μm 濾膜過濾之 2% CaCl_2 溶液吸入外針筒，安裝並鎖緊後，推動針筒排出空氣以充滿管線。
7. 平台設定:取下燒杯，執行 `prepare > auto home` 指令，使噴頭回到原點，放置 2mm 亞克力板於平台上
8. 開始列印:選擇 `print from SD`，載入事先建立之列印檔案，開始列印操作。
9. 平台防污處理:在列印平台上覆蓋噴灑 75 % 酒精之鋁箔紙，降低操作過程中之污染風險。
10. 藍光照射光固化:列印過程中同步啟動 388 nm 波長藍光 LED 燈源，進行材料光固化以避免坍塌或變形。
11. 後固化處理:列印完成後，於材料上倒入適量 CaCl_2 溶液浸泡約 2 分鐘，使其進一步交聯與固化。
12. 載體暫存備用:列印後完成之載體浸泡於持續曝氮氣之無氮源基質水中 (pH 7.5 – 8.5)避免持續暴露於有氧環境中。
13. 再次清洗消毒:載體列印完成後，將所有針筒與管線皆以 DI 水沖洗 3-5 次，再使用 75 % 酒精消毒管線內部，避免污泥以及墨水殘留造成生物模形成。



14. 關機:點選 AUTO HOME 將針頭與平台回歸原點，才可關閉列印機電源。



➤ PVA-PEGDA/ Light 輽體

與 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 輽體相同，但因此配方不需交聯液，故外針不需填裝，步驟 6 與 11 可忽略。

3.5.4 固定化後載體之處理與活化

列印足夠數量之載體後，依照不同配方材料條件分別進行對應之後處理程序穩定載體結構穩定性，完成後立即進行培養操作與測試，以避免菌群喪失活性。各載體列印完成後，將直接投入 $TN = 80 \text{ mg-N/L}$ 之低氮源基質中進行活化並測試初步比活性(SAA)，確認載體中 ANAMMOX 菌群仍具活性表現且穩定，再進行後續實驗

3.6 最佳固定化載體與懸浮態 ANAMMOX 菌比活性(SAA)比較分析

為了比較固定化與懸浮態 ANAMMOX 菌群之反應能力，本研究將針對經兩種不同配方列印之固定化載體(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light)進行比活性(SAA)測試，並與懸浮態菌群的 SAA 值進行對照分析，以探討不同載體對 ANAMMOX 活性之影響，選擇最適合之生物墨水配方進行後續測試。

測試方法依據 3.4 節所述 SAA 測試方法，並選取濃度變化趨近理論反應比值 ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : \text{NO}_3^- = 1 : 1.32 : 0.26$ ，mol: mol: mol) 之反應時段進行分析。考量光固化過程與列印過程暴露氧氣對 ANAMMOX 菌群造成活性的降低，固定化 ANAMMOX 載體之 SAA 測試中將混合污泥濃度提升至兩倍，也就是每一測試組中 VSS 將調整為 350 – 400 mg/ L，以提高菌量確保反應可偵測。

此外，為進一步探討不同操作條件對固定化載體中菌群活性表現之影響，本研究將利用最適合之生物墨水配方所列印之固定化 ANAMMOX 載體延伸進行以下兩項測試：

- 氮源濃度漸增下之生物固定化載體反應適應性測試
- 固定化 ANAMMOX 載體保存穩定性測試

3.6.1 氮源濃度漸增下之生物固定化載體反應適應性測試

由於列印完成之載體內部菌群可能因光固化等因素導致受損以及活性抑制，故本研究將載體透過逐步提高反應基質中總氮濃度($\text{TN} = 80 \text{ mg-N/L}$ 漸增至 $\text{TN} = 200 \text{ mg-N/L}$)，以觀察固定化載體在氮負荷增加條件下之 SAA 表現，評估載體對高氮濃度環境的適應性與反應穩定性。考量可能混有其他非厭氧氨氧化菌群，曾參考 Ganesan 等人與 Swann 等人研究中 Hydrazine 可促進 ANAMMOX 菌群之活性展現與抑制其他菌群活性的策略作為設計參考 (Ganesan et al., 2019; Swann et al., 2009)。然而，本研究最終實驗中未添加聯

胺，直接以自然菌群組成進行測試，以貼近實際應用環境，並評估固定化載體在無額外添加抑制劑條件下的適應表現。

各階段反應期間，設定固定氮源濃度並持續監測氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)與亞硝氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)濃度變化，觀察反應進行情形，並以亞硝氮濃度降至低於偵測極限或氨氮濃度趨於穩定無顯著變化作為反應終止判斷依據。

3.6.2 生物固定化載體保存穩定性測試

為評估生物固定化載體於保存與運輸情境下之活性維持情形，本研究針對列印完成並經活化確認具活性之載體，進行 10 天保存測試。保存期滿後，於厭氧條件下取出載體並進行專一活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)測試，分析保存後之比活性與未經保存、直接使用載體之活性表現差異，作為載體保存可行性與後續實務應用之參考依據。

為避免氧氣進入測試瓶干擾菌群，保存操作全程於厭氧箱中進行，並移至設定溫度條件保存。保存性測試後之活性評估方法與前述漸增氮源濃度測試相同，反應基質中總氮濃度由 80 mg-N/L 起逐步提高至 200 mg-N/L，並於反應過程中持續監測氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)與亞硝氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)濃度變化。以亞硝氮濃度降至低於偵測極限或氨氮濃度無顯著變化作為反應終止判斷依據。以下列出本研究設計之三種保存條件與其對應處理步驟與文獻參考(表 3.9)：

表 3.9、本研究設計之三種保存條件與其對應處理步驟與文獻參考

保存條件	樣品處理與步驟	參考文獻
4 °C 冷藏保存	<ul style="list-style-type: none"> ■ 將載體置入已滅菌之厭氧瓶中 ■ 以無氧無氮源之滅菌基質沖洗載體 ■ 倒乾瓶中水分 ■ 包覆鋁箔紙 4°C 避光保存 	(Xing et al., 2016)
-20 °C 冷凍保存	<ul style="list-style-type: none"> ■ 以無氮源基質水配置 20 %甘油並滅菌 ■ 將載體置入已滅菌之厭氧瓶中 ■ 以無氧無氮源之滅菌基質沖洗載體 ■ 倒乾瓶中水分 ■ 瓶中加入足量之甘油(不可滿瓶) ■ 包覆鋁箔避光 ■ 先於 4°C 預冷 30 分鐘，再放入 -20°C 冷凍 ■ 開始測試前先於 35°C 水浴解凍 	(Viancelli et al., 2017)
室溫厭氧保存	<ul style="list-style-type: none"> ■ 將載體置入已滅菌之厭氧瓶中 ■ 以無氧無氮源之滅菌基質沖洗載體 ■ 倒乾瓶中水分 ■ 包覆鋁箔紙室溫避光保存 	(Xing et al., 2016)



3.7 固定化 ANAMMOX 載體之特性分析

為進一步瞭解固定化載體之內部結構特性與菌群分布情形，本研究針對載體微觀形貌與菌體活性進行觀察，透過掃描式電子顯微鏡與活/死細胞螢光染色結合共軛焦顯微鏡技術，分析載體物理結構與生物活性狀況。

3.7.1 輽體微結構觀察與分析：了解固定化形貌與孔隙結構

為觀察不同固定化材料載體之微觀結構與孔隙分佈，使用國立臺灣大學貴重儀器中心之場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM, JEOL JSM-7600F) (圖 3.10)進行分析。



圖 3.10、場發射掃描式電子顯微鏡儀器照片

場發射掃描式電子顯微鏡利用場發射電子槍產生高亮度、細聚焦之電子束掃描樣品表面，電子束與樣品互作用產生二次電子訊號，可用以解析樣品表面與斷面微結構。由於其解析度高且景深大，特別適用於觀察固定化材料之表面粗糙度、孔隙尺寸與分佈狀態，藉此評估質傳潛力與微生物棲息環境之適宜性。

樣品進行觀察前須經冷凍乾燥與導電鍍膜處理，以提高影像品質與訊號穩定性。圖 3.11 為樣品前處理步驟，以刀片將載體切至適當大小，經圖所示進行酒精濃度梯度脫水，脫水完成後冷凍乾燥：

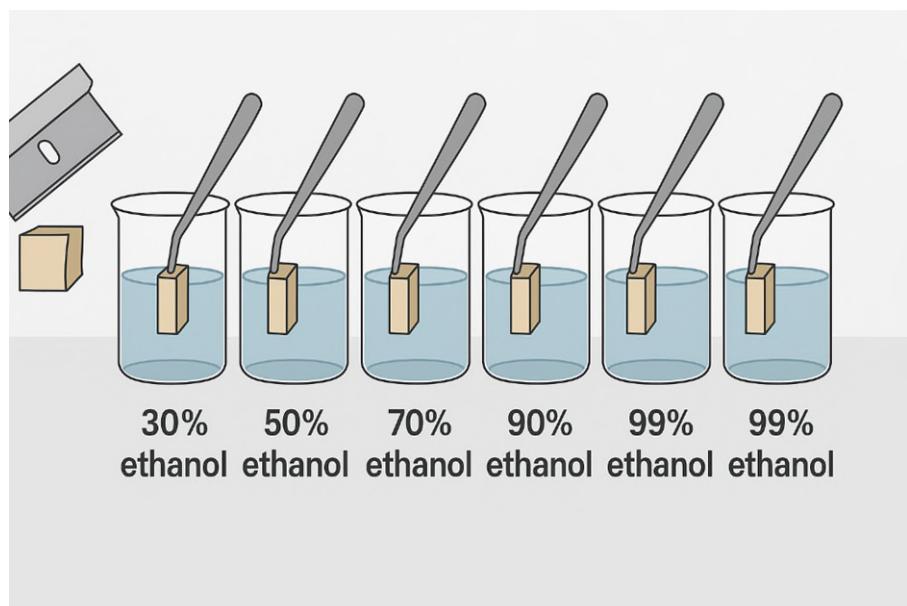


圖 3.11、切片後載體以濃度梯度酒精脫水

3.7.2 不同階段菌體生長狀態觀察：以螢光染色評估菌體活性

為評估固定化載體內部菌群於不同操作階段(活化初期、反應穩定期與保存後)之生長與活性狀態，本研究採用 Thermo Fisher 之 LIVE/ DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (L7012) 進行活死菌體螢光染色。

該試劑組合包含兩種染料：SYTO 9 (綠色螢光，488 nm 激發)可穿透所有細胞膜並染色所有細胞核酸，而 propidium iodide (PI) (紅色螢光，561 nm

激發)僅能穿透細胞膜受損之死菌，當兩者同時存在時，PI 會抑制 SYTO 9 的螢光，故可藉由綠紅螢光區分活死菌體。

染色後樣品使用國立臺灣大學貴重儀器中心之 Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System (共軛焦光譜顯微鏡) (圖 3.12)進行三維光學切片觀察。共軛焦顯微鏡可藉由雷射光源掃描樣品，取得不同深度之高解析影像並進行疊圖分析，有效分析固定化材料中菌體之分布與活性維持情形，螢光影像經 ImageJ 軟體進行分色與 Threshold 二值化處理後，利用 Analyze Particles 功能分析微生物活菌與死菌之面積比例。圖 3.13 為切片染色與顯微鏡操作步驟。



圖 3.12、Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System 共軛焦光譜顯微鏡

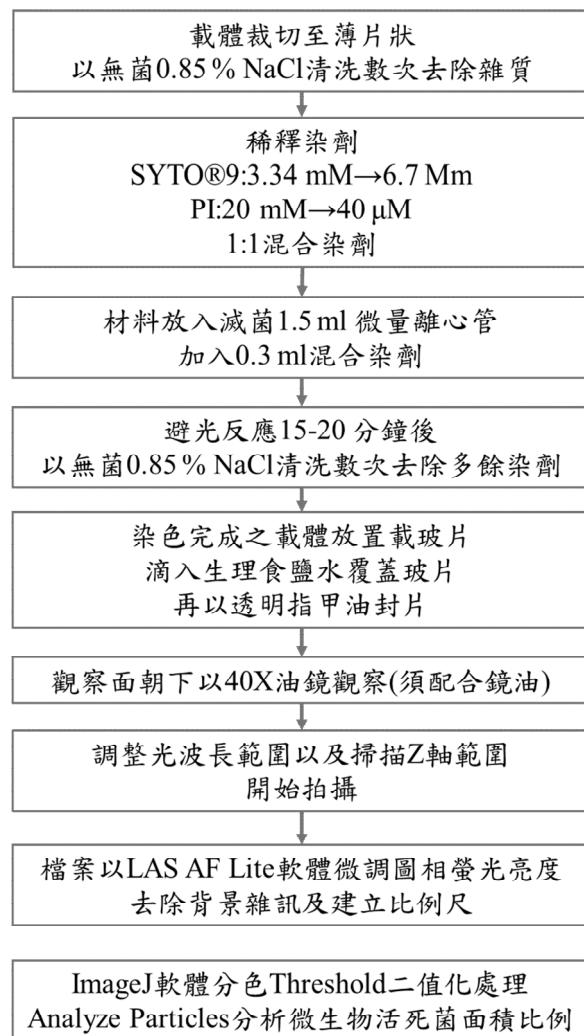


圖 3.13、載體切片染色顯微鏡操作與活死菌面積分析



第四章 結果與討論



4.1 厥氧氨氧化菌培養與反應系統運行分析

4.1.1 培養啟動過程與初期系統表現

本研究取自一垃圾掩埋場滲出水處理廠生物處理單元之活性污泥，作為ANAMMOX反應系統之接種源。合成廢水配置依據第3.3.2節所述方法，啟動初期，系統加入300mL原始污泥與50mL塑膠載體，以降低ANAMMOX菌群流失風險，並補充650mL合成廢水。混合後測量初始氨氮(NH₃-N)、亞硝氮(NO₂⁻-N)及硝酸氮(NO₃⁻-N)濃度，分別為30、28.35與0.18 mg-N/L。

系統運行第3天，亞硝氮濃度降至0.29 mg-N/L，而氨氮濃度降至12.25 mg-N/L，硝酸氮濃度變化不大，推測系統中仍以脫硝菌群為主，且可能伴隨硝化菌存在，抑制ANAMMOX反應進行。隨後至第21天，氨氮濃度呈上升趨勢，推測為高氨氮與亞硝氮濃度下，原始污泥中部分菌群因不耐厥氧環境而死亡裂解，釋放氨氮與有機碳源，促使脫硝菌優勢生長，進一步競爭亞硝氮，致使亞硝氮消耗過速，影響ANAMMOX反應穩定性。

運行至第30天，雖氨氮消耗速率提升，亞硝氮下降依然較快。此時污泥出現發黑現象(圖4.1 a)，顯示系統逐步向厥氧環境轉變。第39天基質更換時，參考華盛頓大學Mari Winkler教授之建議，於合成廢水中補充相當於初始亞硝氮濃度1/8至1/4比例之硝酸氮，當次監測硝酸氮濃度為9.03 mg-N/L。

經過兩次基質更換後，污泥顏色由黑色恢復為咖啡色(圖4.1 b)，顯示系統環境與菌群組成逐步改善。至第71天，氨氮與亞硝氮消耗雖未完全平

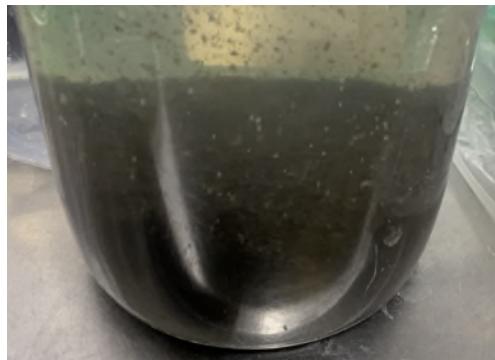
衡，但亞硝氮消耗趨勢已趨緩，反應逐漸轉向 ANAMMOX 主導。第 94 天後，氨氮與亞硝氮消耗趨於穩定，顯示系統已成功建立 ANAMMOX 菌群優勢，啟動程序達成。圖 4.2 為系統建立第 0 天至第 113 天之系統初始與出流之氨氮(NH₃-N)、亞硝氮(NO₂⁻-N)與硝酸氮(NO₃⁻-N)濃度變化。

為進一步評估系統運行條件對啟動過程之影響，本研究同步監測溶氧(DO)、pH、電導度(Conductivity, EC)及氧化還原電位(ORP)，結果如圖 4.3 所示。系統 DO 濃度(圖 4.3 a)維持於 0.15- 0.20 mg/ L 低氧環境，有利於 ANAMMOX 反應進行。pH 值(圖 4.3 b)由 7.5 逐漸上升至 8.5，穩定於 ANAMMOX 菌群適宜範圍(6.7 – 8.5)，反應異養菌逐步凋亡，ANAMMOX 菌群建立，氫離子釋放減少，系統穩定性提升。

電導度(圖 4.3 c)由初期約 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 上升至 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，推測與硝酸鹽等反應產物累積及溶解性無機離子增加有關，系統中電導度範圍亦與文獻中描述適合 ANAMMOX 培養之電導度條件(約 1000- 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$)相近，顯示本研究所建構之反應條件具可行性(Tsai et al., 2019)。氧化還原電位(ORP)(圖 4.3 d)則由初期約- 400 mV 至接近 0 mV 間震盪，經基質調整與反應穩定後，趨於穩定於- 200 至- 300 mV 範圍，形成有利 ANAMMOX 反應進行的厭氧條件。

綜合系統中不同氮源濃度與運行參數變化趨勢可知，系統於第 94 天起成功建立 ANAMMOX 菌群優勢，並為後續穩定運行奠定良好基礎。

(a)



(b)



圖 4.1、(a)ANAMMOX 系統中污泥發黑跡象；(b)更換含硝酸氮機質後之污泥狀況

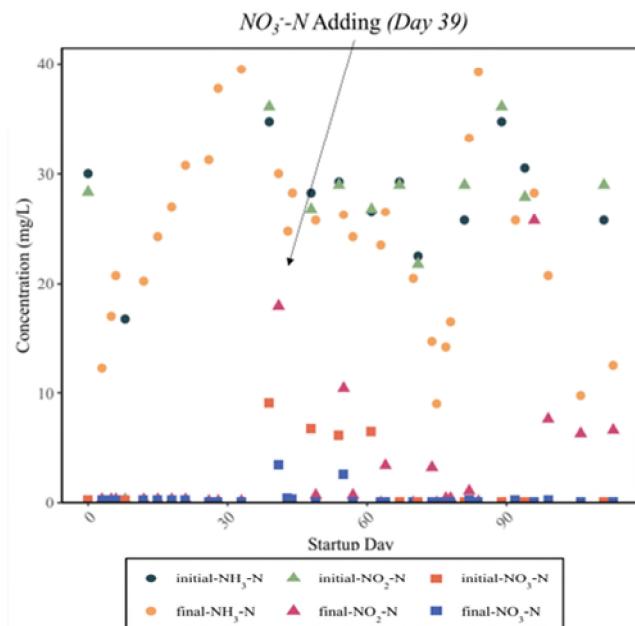


圖 4.2、ANAMMOX 反應系統建立第 0 天至第 113 天之系統初始與出流之氨
氮(NH₃-N)、亞硝氮(NO₂⁻-N)與硝酸氮(NO₃⁻-N)濃度變化

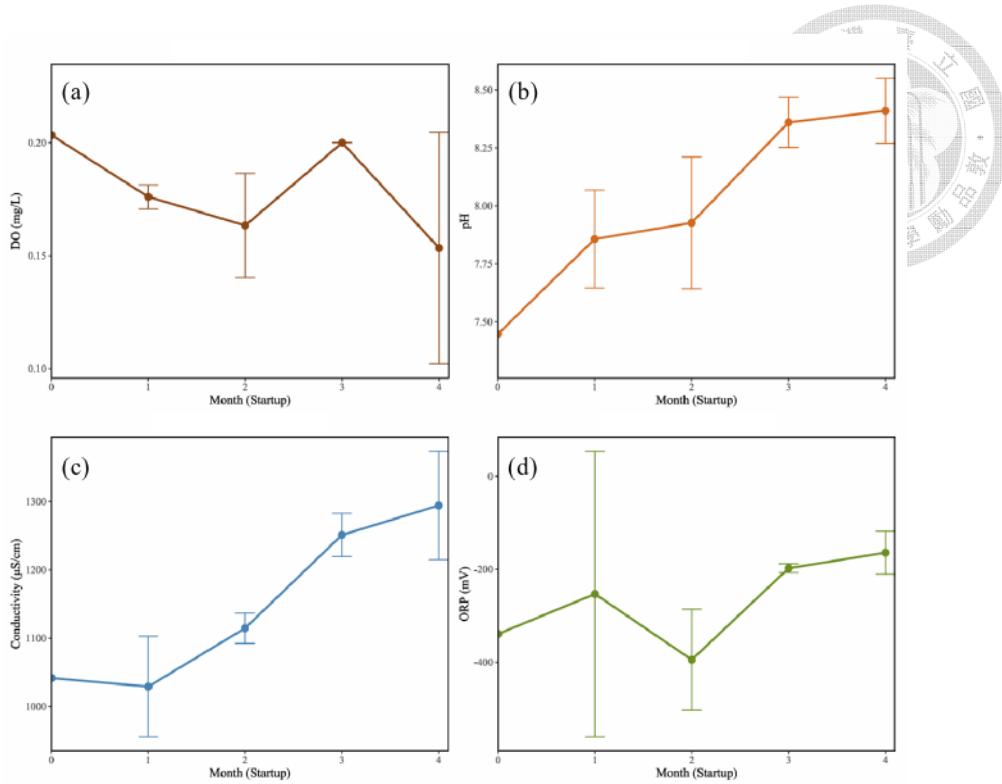


圖 4.3、ANAMMOX 反應系統初期啟動過程中主要運行參數變化情形

(a) DO ; (b) pH ; (c) 電導度 ; (d) ORP

4.1.2 培養過程之氮源濃度變化與系統穩定性分析

為提高 ANAMMOX 菌富集效率，在系統啟動且穩定後，第 113 天將反應槽中 ANAMMOX 污泥進行分瓶操作。污泥共分為兩瓶(分別命名為 AC1、AC2)，每瓶污泥體積為 200 ml，並添加塑膠載體至 250 ml，持續進行馴養。至第 150 天，兩瓶中有明顯紅色顆粒污泥(圖 4.4)，但是因為初期馴養過程中有段時間(Day 20-39)為完全厭氧狀態，導致污泥底色較深較難在瓶中分辨。

為分析系統中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 NO_2^- -N 與 NO_3^- -N 之變化趨勢，本研究分別於進流水與出流水進行監測，圖 4.5 a – d 分別統整 AC1 – AC4 反應槽各運行階段之氮源濃度變化。此外，圖 4.6 a – d 分別計算 AC1 – AC4 反應槽出流水氮源

比例分佈、總氮去除能力與 ANAMMOX 活性反應效率，而圖 4.7 a – d 將 AC1 – AC4 反應槽副產物 NO_3^- -N 之產生量與理論值進行比較。

首先 AC1 與 AC2 於初始階段(Day 113 -249) 初始 TN 為 60 – 70 mg-N/ L (NH₃-N 與 NO₂⁻-N 各 30 -35 mg-N/ L)。運行結果如下：

- ❖ AC1：出流水 NH₃-N 降至 10 – 15 mg-N/ L，NO₂⁻-N 降至 5 – 12 mg-N/L，TN 去除效率與 ANAMMOX 菌群活性反應效率皆約在 65 – 75 %之間
- ❖ AC2：出流水 NH₃-N 降至 7-11 mg-N/ L，NO₂⁻-N 降至 1 – 8 mg-N/ L，TN 去除效率與 ANAMMOX 菌群活性反應效率約在 75 – 90 %之間。

由於反應系統去氮效率良好，第 190 天時於 AC1 與 AC2 中各取 50 ml 污泥接種於食品廠廢水處理廠採樣之活性污泥，建立新的反應槽 AC3 與 AC4。由於 AC1 和 AC2 反應槽中污泥量下降，導致第 170 - 220 天左右之系統去氮效率下降。具體表現為：

- ❖ AC1 :去氮效率維持在 60 – 65 %左右，ANAMMOX 菌群活性反應效率較不受影響。
- ❖ AC2 :去氮效率與 ANAMMOX 菌群活性反應效率則維持在 75 %之間。

系統於 TN 60 – 70 mg-N/ L 條件下穩定運行一段時間後，將 TN 濃度提高至 120 – 150 mg-N/ L。在負荷提升階段(Day 250 – Day 270)之表現為：

- ❖ AC1 :總氮去除率依舊維持在 60 - 65 %左右，ANAMMOX 活性反應效率約在 75 %。
- ❖ AC2 :總氮去除率降至 65 - 70 %左右，ANAMMOX 活性反應效率維持在 75 %之間。

在第 113 天至 250 天，系統中 NO_3^- -N 都沒有明顯累積，推測因系統非

完全厭氧，且氮源濃度不足以完全抑制其他菌群(如硝化菌、脫硝菌)活性，產生的 NO_3^- -N 被立即消耗。然而，負荷提升後，系統中 NO_3^- -N 開始累積，顯示 ANAMMOX 反應進行；但 NO_3^- -N 濃度未達理論預期，推測仍有部分被其他菌群消耗。

系統負荷提升後運行至第 300 天開始逐漸穩定，直至 530 天系統負荷皆維持在 TN 120 – 150 mg-N/L。系統後期表現如下：

- ❖ AC1 去氮效率緩慢提升至 75 %以上
- ❖ AC2 去氮效率卻逐漸下降，推測原因是污泥增長速度較快導致基質置換效率有限。

AC3 與 AC4 穩定後污泥狀態如圖所示，運行時間至 38 天系統逐漸穩定。初期運行階段設定總氮(TN)負荷為 60 – 70 mg-N/L，系統表現如下：

- ❖ AC3：出流水 NH_3 -N 降至 9 – 22 mg-N/L， NO_2^- -N 降至 7 – 15 mg-N/L，TN 去除效率約在 65 – 75 %之間，ANAMMOX 菌群活性反應效率則在 75 %左右。
- ❖ AC4：出流水 NH_3 -N 降至 9 – 19 mg-N/L， NO_2^- -N 降至 1 – 7 mg-N/L，TN 去除效率與 ANAMMOX 菌群活性反應效率約在 75 – 90 %之間。

較特別的是，AC3 與 AC4 在前期運行階段即已偵測到 NO_3^- -N 產物，且其濃度接近 ANAMMOX 反應之理論產量，顯示系統中 ANAMMOX 反應占優勢，其他競爭性菌群(如硝化菌、脫硝菌)活性較低。

於第 228 天起，將總氮負荷至 TN 120 – 150 mg-N/L，由於負荷增加給予系統較大壓力，所以系統去氮效率與 ANAMMOX 菌群活性反應效率有稍微下降。反應系統表現如下：

- ❖ AC3：出流水 NH_3 -N 降至 10.5 – 28.2 mg-N/L， NO_2^- -N 降至 1.5 – 1.8 mg-N/L， NO_3^- -N 產生約 7 – 16 mg-N/L，TN 去除效率約在 60 –

75 %之間，ANAMMOX 菌群活性反應效率則在 75 %左右。

- ❖ AC4 :出流水 $\text{NH}_3\text{-N}$ 降至 $20 - 22.5 \text{ mg-N/L}$ ， $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 降至 $0.44 - 10.38 \text{ mg-N/L}$ ， $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 產生約 $15 - 20 \text{ mg-N/L}$ ，TN 去除效率約在 45 %之間，ANAMMOX 菌群活性反應效率則在 50 %左右。

隨著運行時間延長至第 309 天，AC3 與 AC4 系統整體去氮效率與 ANAMMOX 活性反應效率皆呈現逐步上升的趨勢。此外，在 AC1 至 AC4 系統中，皆可觀察到塑膠載體表面有 ANAMMOX 菌群附著生長，瓶壁亦形成明顯紅色生物膜(圖 4.8)，進一步驗證菌群成功富集，且展現良好的附著與生長能力。

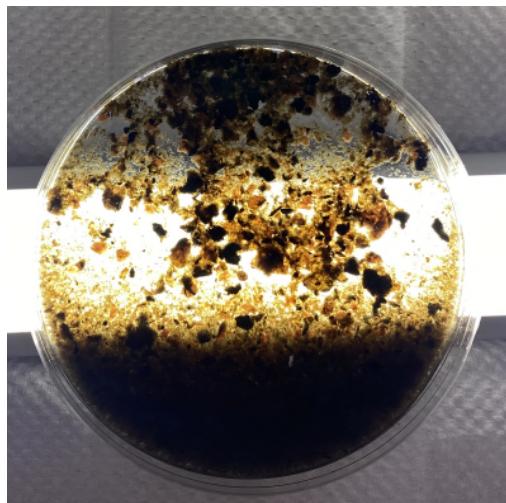


圖 4.4、系統中 ANAMMOX 紅色顆粒污泥

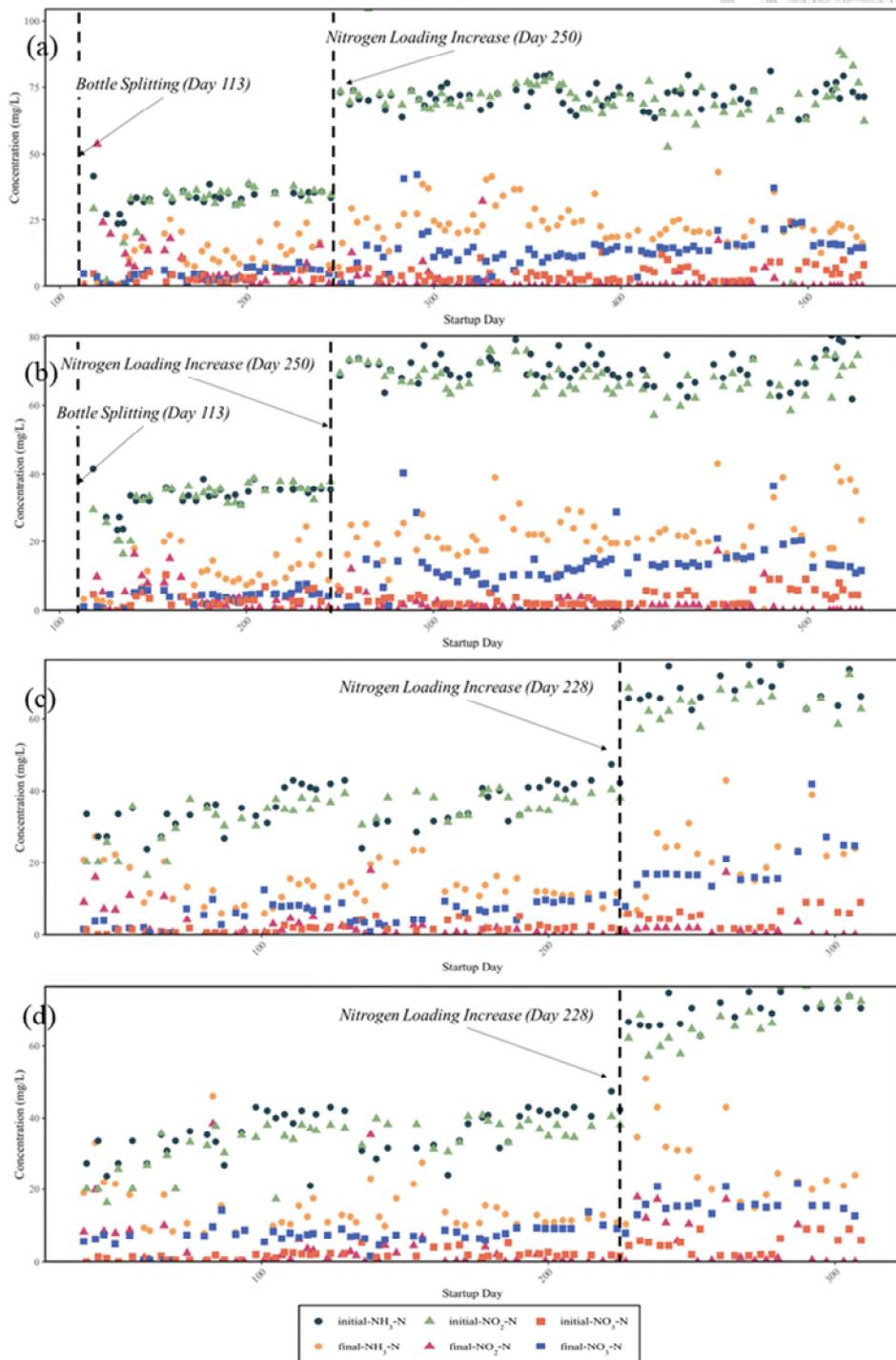


圖 4.5、不同反應槽各運行階段之氮源濃度變化(a) AC1；(b) AC2；(c) AC3；
(d) AC4

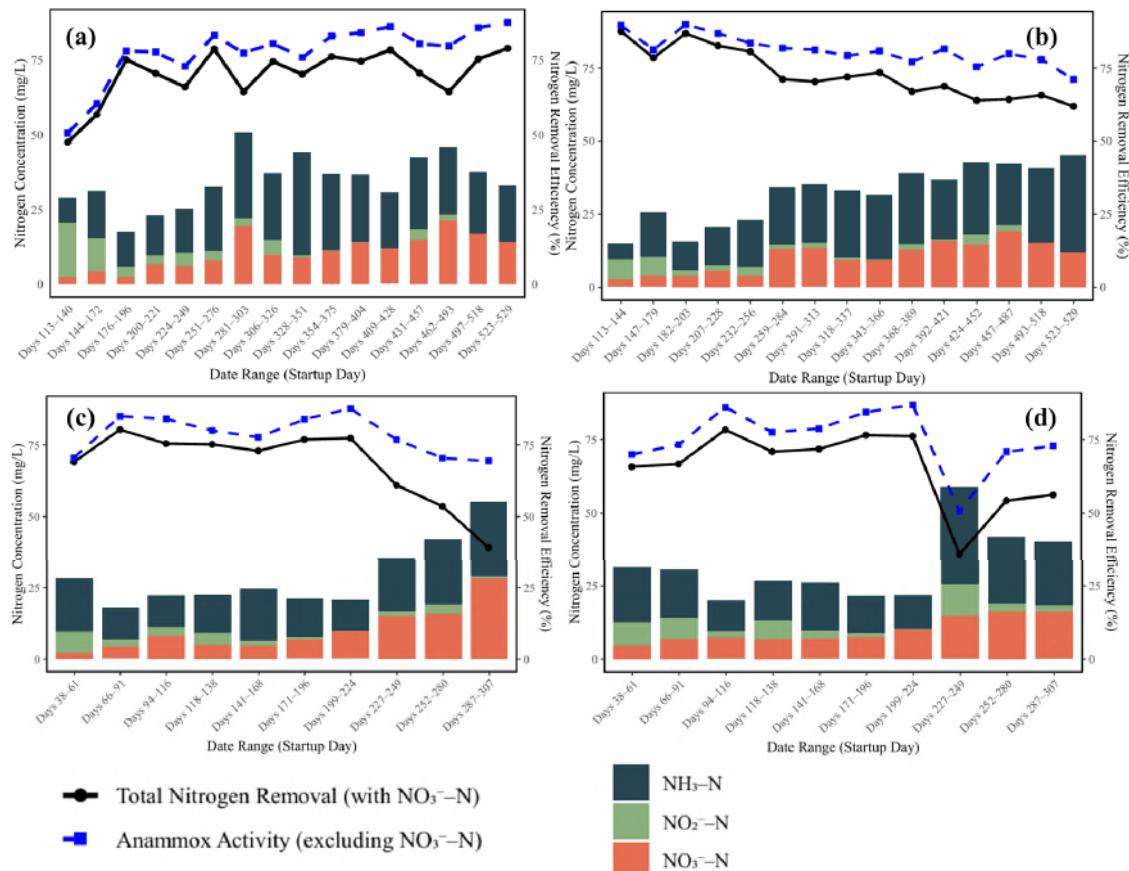


圖 4.6、各反應槽出流水氮源比例分佈、總氮去除能力與 ANAMMOX 活性反應效率(a) AC1；(b) AC2；(c) AC3；(d) AC4

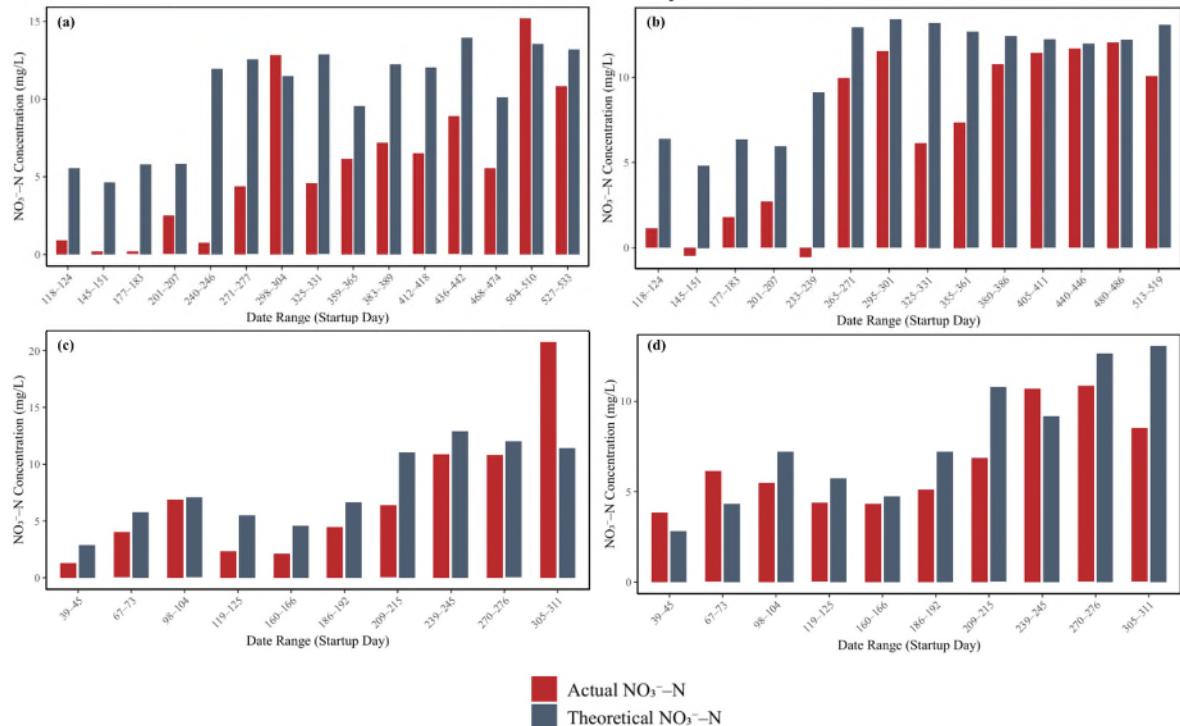


圖 4.7、各反應槽副產物 NO_3^- -N 之產生量與理論值比較

(a) AC1；(b) AC2；(c) AC3；(d) AC4

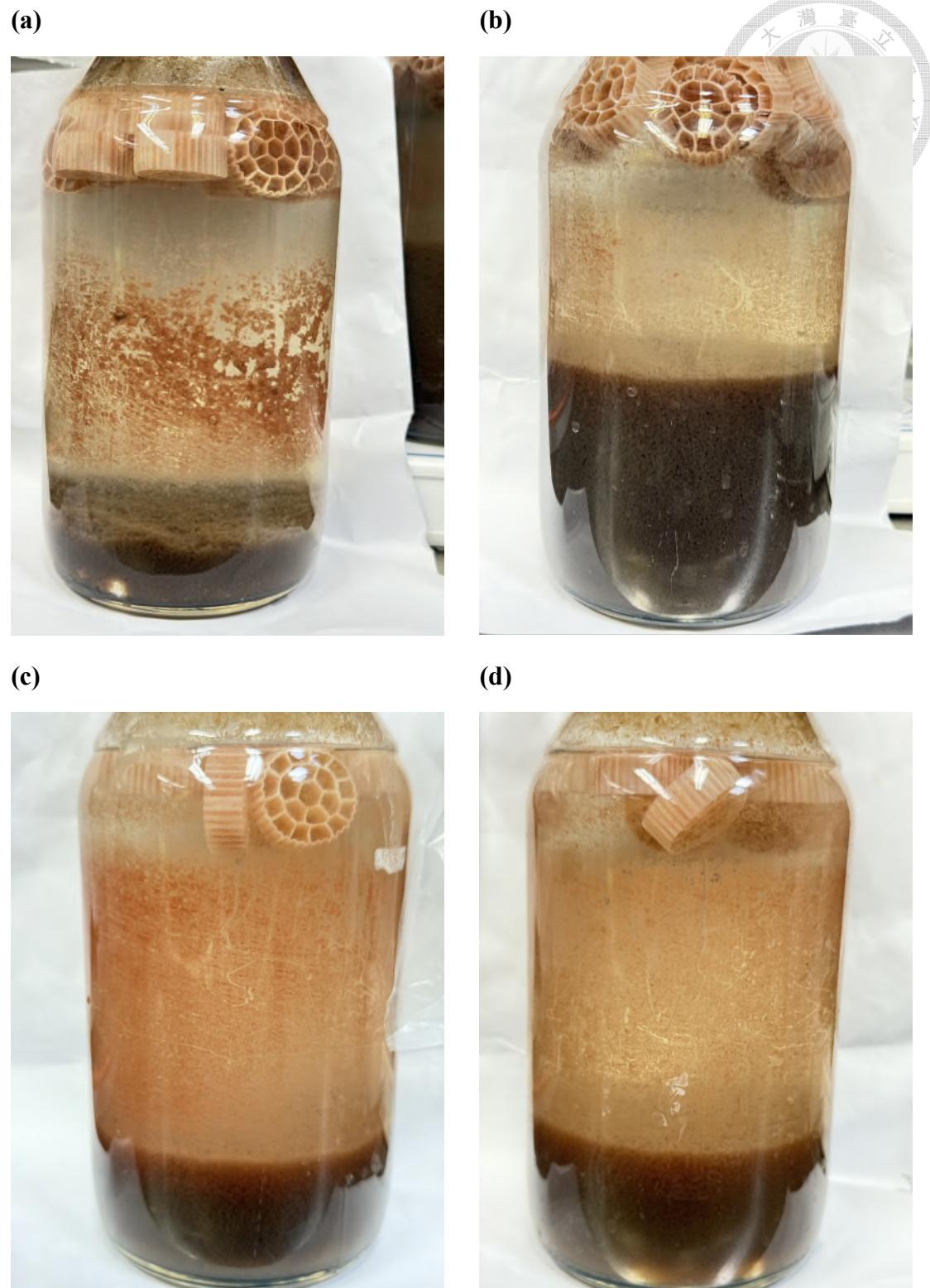


圖 4.8、AC1 至 AC4 反應槽中塑膠載體 ANAMMOX 菌群附著與瓶壁紅色生物
膜形成情形(a) AC1；(b) AC2；(c) AC3；(d) AC4

4.1.3 定期監測參數統整與趨勢探討

為瞭解各反應槽於啟動過程中的運行穩定性與微生物環境變化，本研究針對 AC1、AC2、AC3 與 AC4 四組反應系統進行定期水質參數監測。監測項目包含溶氧 (DO)、pH 值、電導度(Conductivity)與氧化還原電位 (ORP)，每月量測 3 – 4 次，平均並分析各參數隨運行時間之變化趨勢，以評估系統環境對 ANAMMOX 菌群生長與反應活性的影響。各反應槽水質參數變化趨勢圖分別彙整於圖 4.9 – 4.12，詳細結果說明如下：

整體而言，四組反應槽於啟動初期(啟動時間 0 – 2 月)均呈現明顯變動，隨運行時間推進，水質參數逐漸趨於穩定。AC1 – AC4 溶氧(DO)濃度(圖 4.9、4.10、4.11、4.12 a)初期皆維持於 0.18 – 0.22 mg/ L，AC1 及 AC2 分別於啟動時間 1 – 2 月出現局部高點，但仍低於 0.25 mg/ L，隨後逐漸下降並在啟動時間 5 – 6 月後穩定於 0.10 – 0.16 mg/ L。AC3 與 AC4 亦呈現類似趨勢，初期快速下降，並於中後期維持低濃度範圍。四組反應槽皆成功營造低溶氧環境，為 ANAMMOX 反應提供良好反應條件。

AC1 – AC4 pH 值變化(圖 4.9、4.10、4.11、4.12 b)整體介於 8.2 – 8.6 之間，符合 ANAMMOX 菌群偏好之弱鹼性範圍。雖然 ANAMMOX 反應過程中會消耗鹼度並釋放少量質子(H^+)，具有潛在酸化趨勢，但由於合成廢水有適當緩衝酸鹼值的機制(如碳酸氫鹽 HCO_3^- 添加)，可有效穩定系統 pH。推測初期由於氨氮氧化過程中伴隨的質子釋放，以及硝酸鹽生成對鹼度的消耗，造成部分反應槽 pH 出現短暫波動。AC2 及 AC4 的 pH 於啟動中後期穩定上升至 8.5 – 8.6，顯示系統緩慢適應並達穩定狀態；AC1 與 AC3 雖中期出現短暫波動，但最終亦穩定於 8.4 – 8.5 左右，整體變異幅小，有助於菌群活性維持。另外在文獻中提到，pH 太高(8.7 – 9.05)會導致游離銨升高，而太低又會導致游離亞硝酸銨升高，對 ANAMMOX 皆有抑制風險(Tomaszewski et al.,

2017)。本系統維持於適宜範圍，顯示具良好運行穩定性。

AC1 – AC4 電導度變化趨勢(圖 4.9、4.10、4.11、4.12 c)顯示，啟動初期四組反應槽電導度多維持於 1000 – 1200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。AC2 於中期(啟動時間第 6 月)明顯上升至 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，AC3 與 AC4 亦於後期(啟動時間 8 – 11 月)出現電導度回升現象，表示反應過程中有溶解性無機電解質與反應副產物(如硝酸鹽)累積。電導度上升趨勢表示系統內部反應活性逐漸增強。

AC1 – AC4 氧化還原電位(ORP)變化(圖 4.9、4.10、4.11、4.12 d)顯示，啟動初期四組反應槽 ORP 均由較低值(- 300 mV)開始，推測是因為系統處於剛啟動階段，微生物活性尚未完全建立，且反應槽內缺乏有效電子受體利用，導致氧化還原反應速率偏低。隨著微生物逐步適應系統環境與活性反應進行，ORP 逐漸回升接近- 50 至- 100 mV 可能與 ANAMMOX 菌群逐步適應並活化有關，基質轉化開始進行，氧化還原反應加速，使系統內氧化還原壓力上升，導致 ORP 回升。啟動時間第 6 月開始逐漸下降至穩定維持於- 100 至- 200 mV 區間，符合 ANAMMOX 反應所需之厭氧條件。AC2 與 AC3 在中期出現 ORP 正向波動，但最終仍回落至適合微生物生存範圍，顯示系統具良好恢復能力與環境穩定性。

為進一步評估系統內微生物生物量累積情形，本研究同步監測各反應槽之總懸浮固體濃度(TSS)與揮發性懸浮固體濃度(VSS)，AC1 – AC4 之結果如圖 4.13 所示。啟動初期(第 0 月)，AC1 與 AC2 反應槽 TSS 分別為 2280 mg/L 與 1080 mg/L，VSS 分別為 1720 mg/L 與 760 mg/L，反映初期微生物量偏低。隨著系統穩定與活性污泥累積，AC2 反應槽之 TSS 與 VSS 濃度於第 6 月後顯著上升，啟動第 12 月達 3740 mg/L 與 2540 mg/L，顯示微生物增殖情形良好。相對地，AC1 反應槽則於中後期出現下降趨勢，是由於此階段有從槽中取出污泥進行活性測試以及載體列印。

AC3 與 AC4 反應槽初期 TSS 與 VSS 濃度較低，AC4 濃度隨時間累積較

快，至第 4 月時 TSS 與 VSS 已分別達 2100 mg/L 與 1480 mg/L，並維持於較高水準。AC3 反應槽則於第 8 月出現濃度輕微下降。整體而言，四組反應槽之 VSS/TSS 比值均維持於 0.7 - 0.75 之間，顯示活性生物成分比例穩定，有助於 ANAMMOX 菌群脫氮活性之維持與反應性能穩定。

綜合而言，四組反應槽經過啟動與馴養後，溶氧濃度、pH 值、電導度、ORP 及 TSS/VSS 均呈現趨勢穩定，整體水質環境有利於 ANAMMOX 菌群之增殖與脫氮反應進行，為後續系統性能提升建立基礎。上述水質參數與微生物生物量累積結果，顯示系統環境已趨於穩定，為進一步評估 ANAMMOX 菌群於各時間段之群落結構變化與活性表現，本研究將採用 PacBio 定序技術分析菌群組成動態變化，並同步進行污泥專一活性(SAA)測試，以評估 ANAMMOX 菌群脫氮活性及系統功能穩定性。

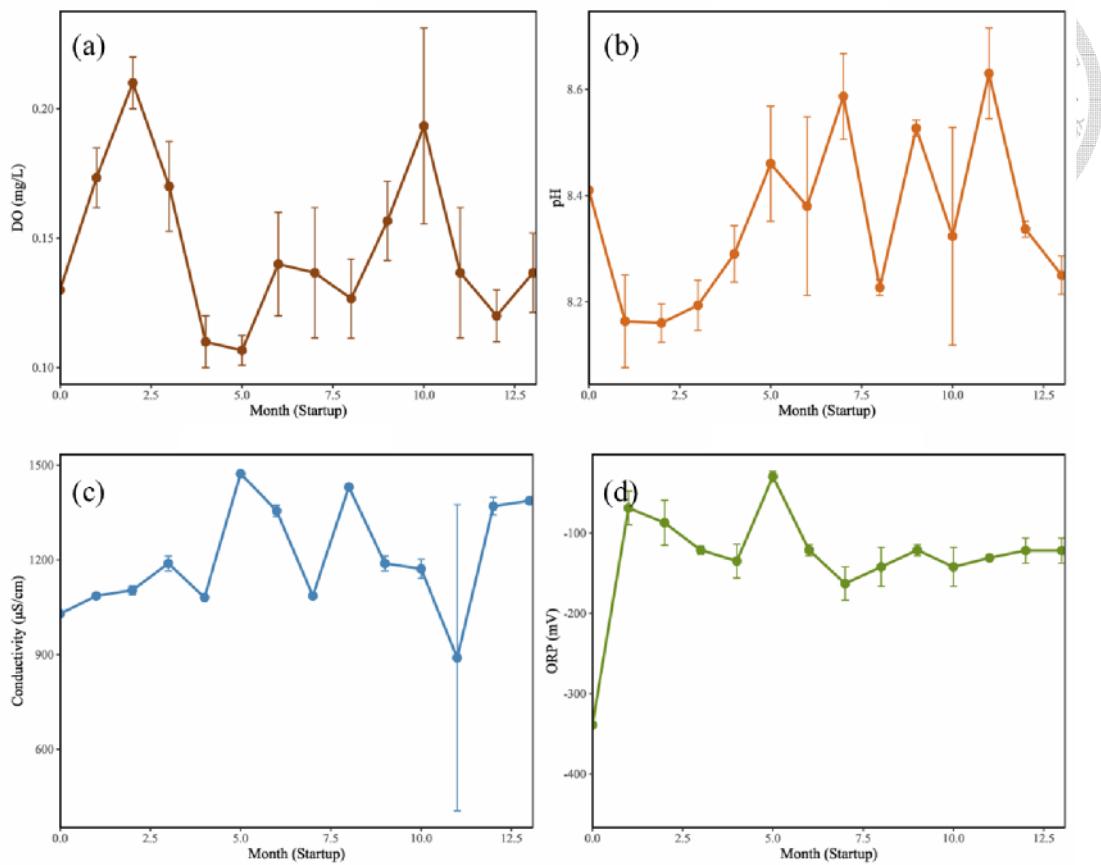


圖 4.9、AC1 之水質定期監測

(a) DO (mg/ L) ; (b) pH ; (c)電導度(EC, $\mu\text{s}/\text{cm}$) ; (d) ORP (mV)

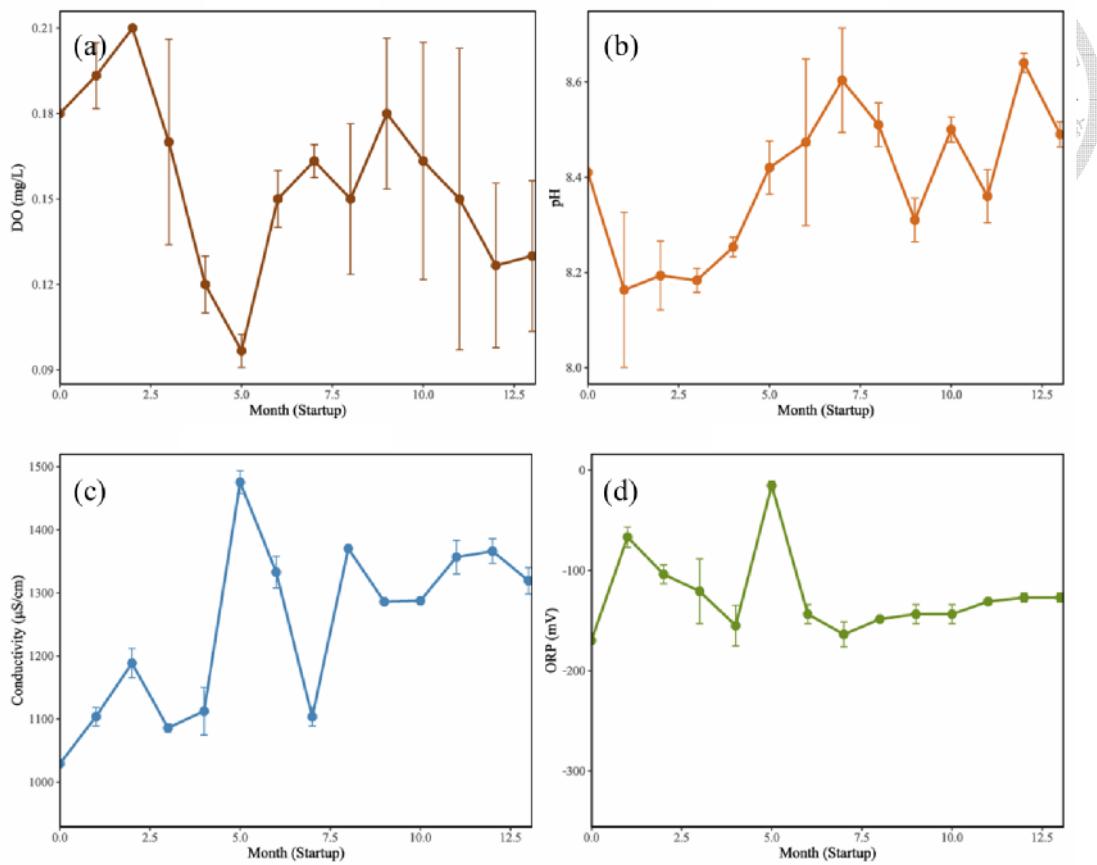


圖 4.10、AC2 之水質定期監測

(a) DO (mg/ L) ; (b) pH ; (c)電導度(EC, $\mu\text{s}/\text{cm}$) ; (d) ORP (mV)

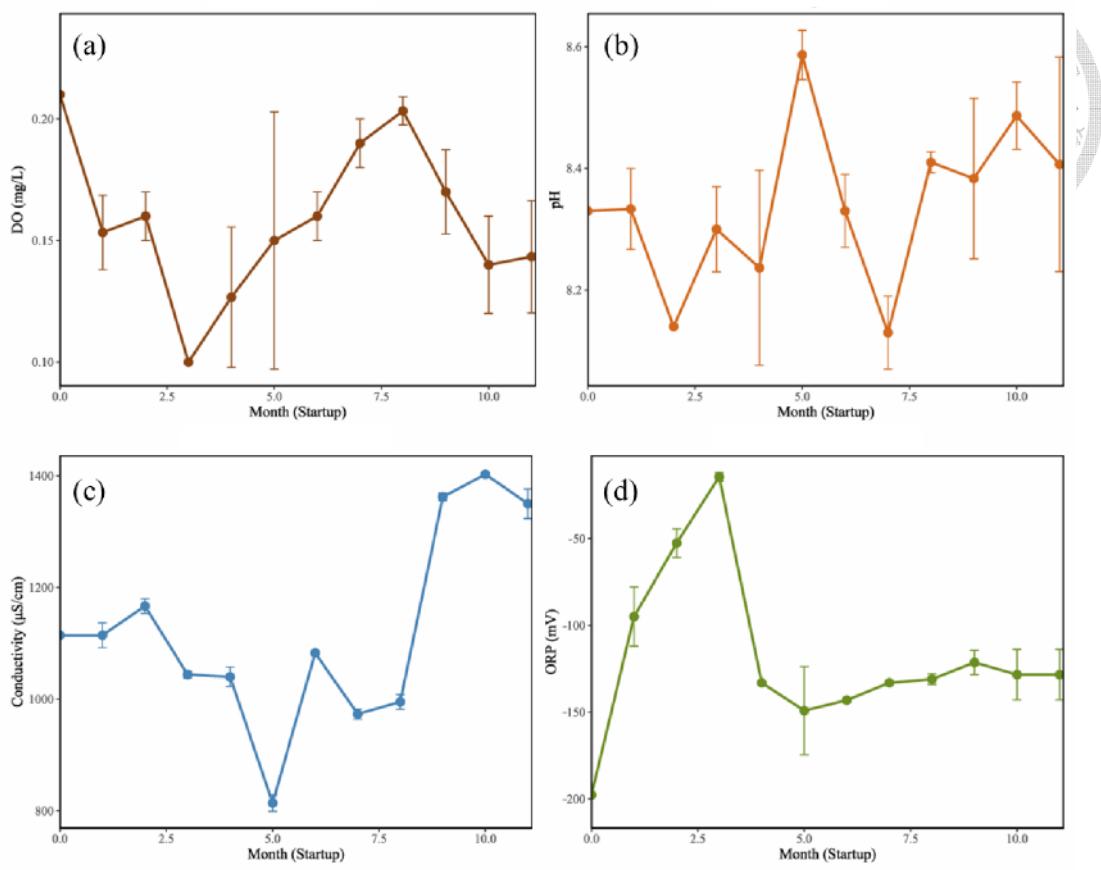


圖 4.11、AC3 之水質定期監測

(a) DO (mg/ L) ; (b) pH ; (c) 電導度(EC, $\mu\text{s}/\text{cm}$) ; (d) ORP (mV)

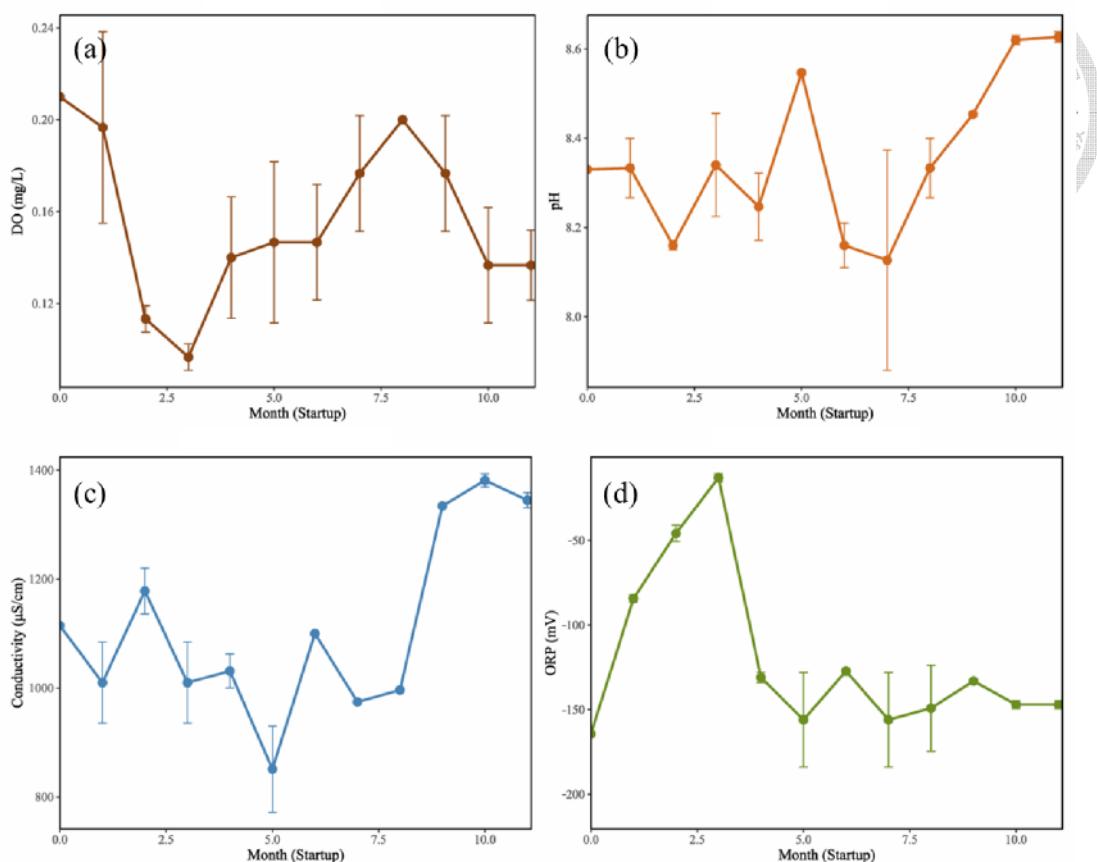


圖 4.12、AC4 之水質定期監測

(a) DO (mg/ L) ; (b) pH ; (c) 電導度(EC, $\mu\text{s}/\text{cm}$) ; (d) ORP (mV)

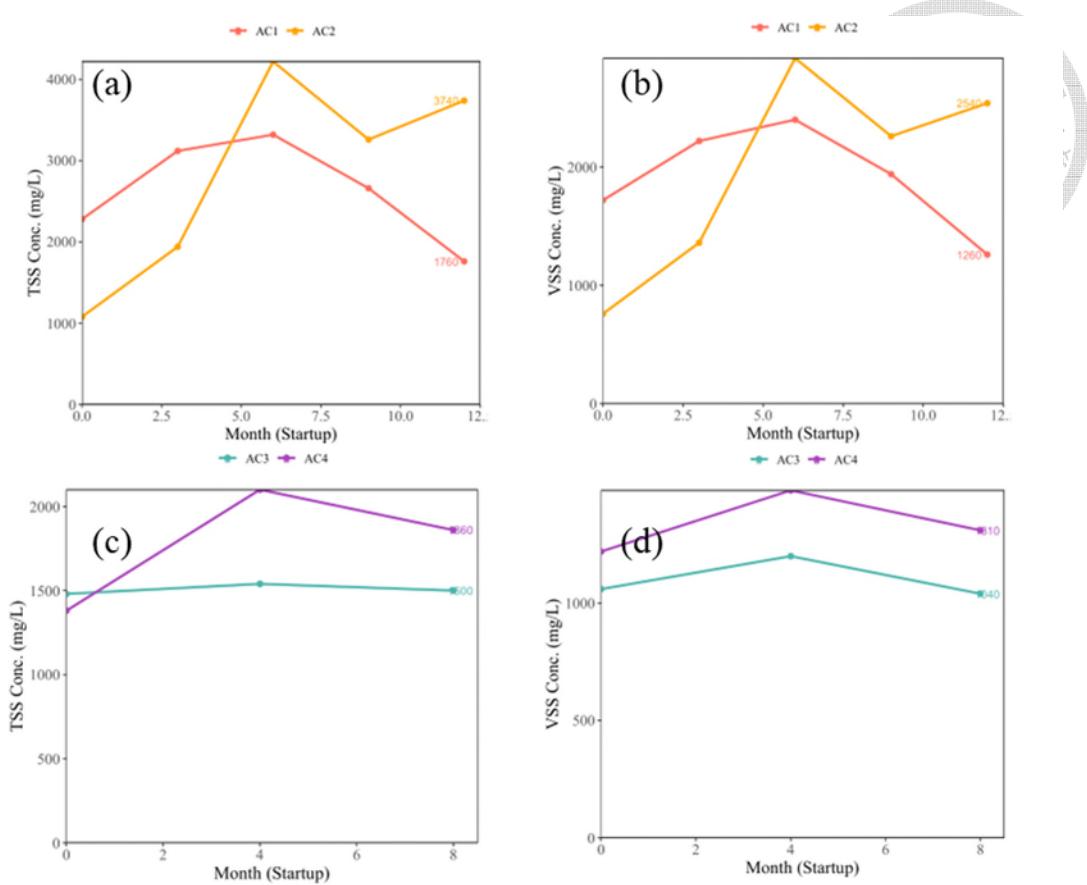


圖 4.13、各反應槽之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性懸浮固體濃度(VSS, mg/ L)定期監測(a) AC1；(b) AC2；(c) AC3；(d) AC4

4.2 微生物群落結構變化分析



4.2.1 微生物多樣性變化(Alpha & Beta Diversity)

為全面探討 ANAMMOX 系統操作期間微生物群落的豐富度與組成差異，本研究首先進行 α 多樣性(Alpha diversity)與 β 多樣性(Beta diversity)分析，並據此觀察各反應槽間菌群結構變化趨勢與穩定性。

Alpha 多樣性分析(圖 4.14 a、b)顯示，各組樣本在物種豐富度(Chao1 與 Observed Features)與均勻度(Shannon 與 Simpson 指數)上，皆呈現操作期間顯著差異。初期汙泥樣本(如 s112923AC (第 0 月)、s013024AC (第 3 月))中，Observed Features 與 Chao1 指數偏低，顯示系統啟動初期菌種豐富度有限，推測與汙泥來源單一、菌群尚未適應環境有關。隨系統逐步穩定，樣本如 s032924AC1 (AC1 第 0 月)與 s043024AC1 (AC1 第 1 月)呈現明顯上升趨勢，顯示菌群豐富度提升。

後期樣本中(如 s1024AC1 – s0322AC4 (AC1、2 之第 7、9、12 月；AC3、4 之第 5、7、10 月))，多數反應槽維持較高的 Shannon 與 Simpson 指數，代表菌群均勻度增加，顯示系統內具備穩定的微生物社群組成。尤以 AC1、AC2 較早穩定運行者，其 α 多樣性值整體高於後續植種之 AC3、AC4，推測菌群來源較早、穩定定殖，且具有較佳競爭與適應能力。

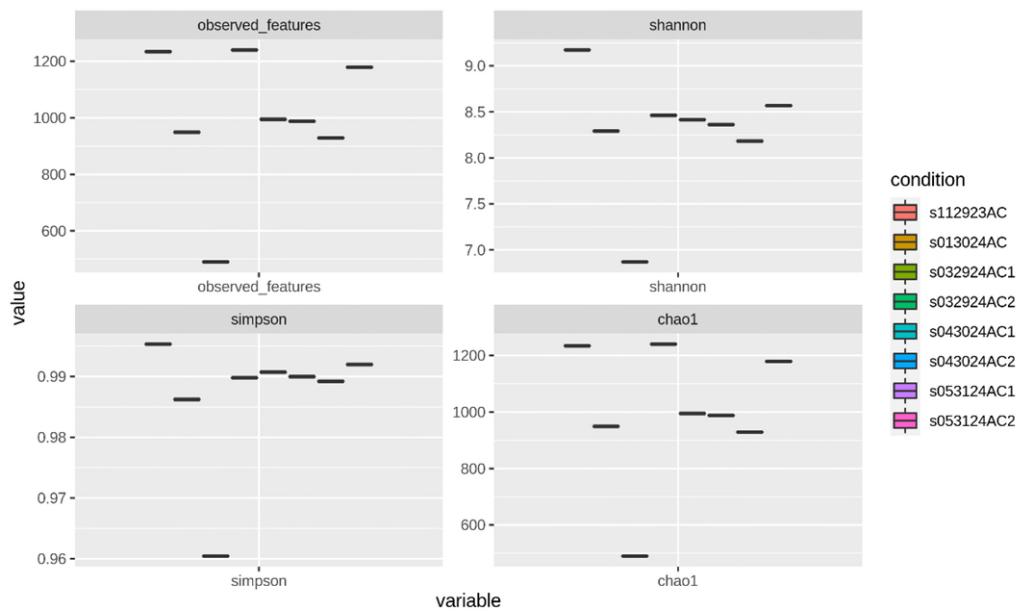
Beta 多樣性分析採用 Bray-Curtis 距離進行主座標分析(PCoA，圖 4.15 a、b)，結果顯示不同樣本間菌群組成存在明顯分群。初期汙泥樣本中(s112923AC (第 0 月)、s013024AC(第 3 月))彼此距離較遠，反映菌群尚未穩定、差異大。隨時間推進，AC1 與 AC2 間樣本趨向聚集，顯示微生物組成逐步一致。而在後期圖中，AC3 與 AC4 間亦呈現明顯分化，其中 AC3 樣本間距較小，群聚性佳，推測菌群演替已較穩定；而 AC4 則尚具一定差異，顯

示微生物群落仍處於重建或轉換階段。

綜合而言， α 多樣性結果反映操作期間菌種豐富度與均勻度之變化，而 β 多樣性分析則補充不同樣本間群落組成的差異性與趨同程度。整體而言，菌群於系統穩定運行期間表現出趨同與多樣性提升的特徵，特別是在 AC1 與 AC2 中，顯示 ANAMMOX 系統於穩定階段可建立結構穩定且具功能性 的微生物群落。相關菌相組成與功能群變化，將於 4.2.2 節中進一步探討。



(a)



(b)

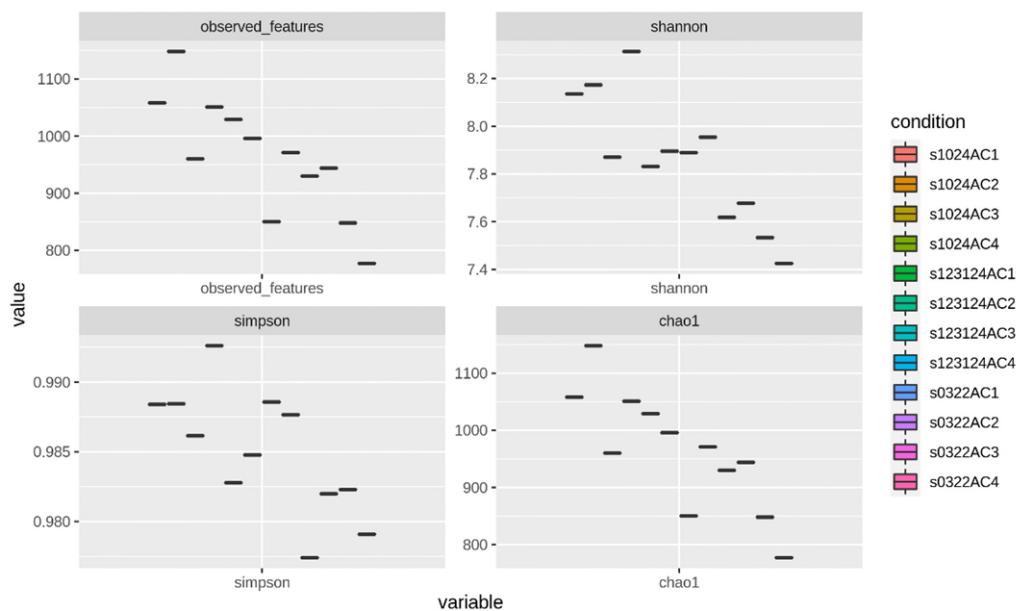
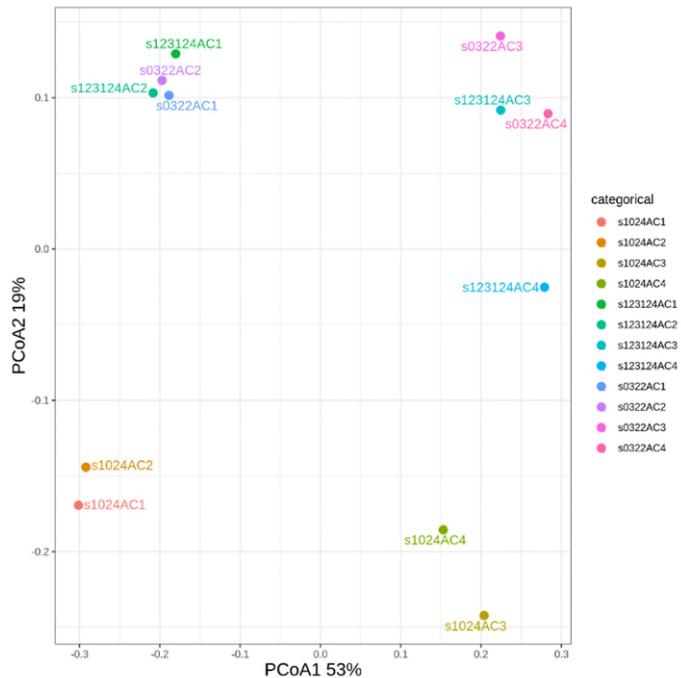


圖 4.14、各階段槽體 α 多樣性指數(Observed OTUs、Shannon、Simpson、Chao1) (a)前期樣本(b)後期樣本

(a)



(b)

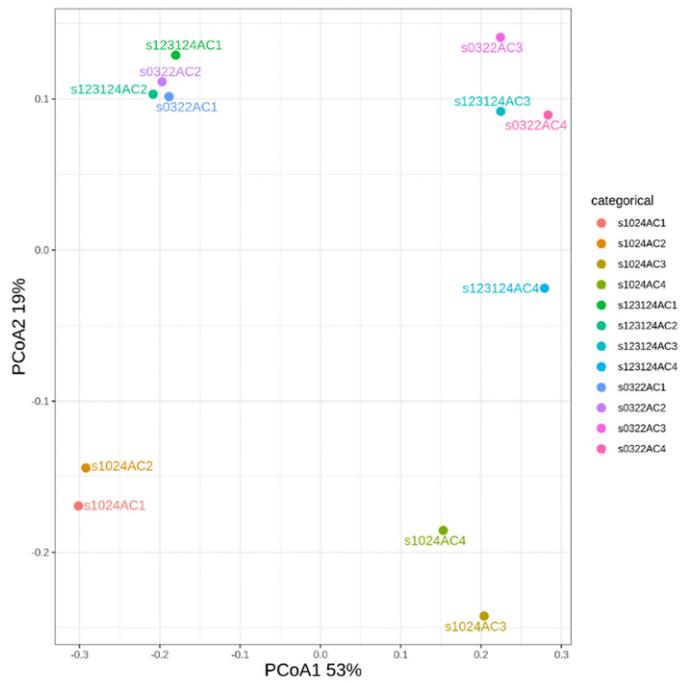


圖 4.15、各階段槽體 β 多樣性主座標分析(Bray-Curtis PCoA) (a)前期樣本(b)

後期樣本

4.2.2 ANAMMOX 系統運行期間菌相組成變化



為探討 ANAMMOX 系統運行期間微生物群落結構之演替變化，本研究以高通量 16S rRNA 基因定序技術進行菌相分析，首先以宏觀觀察各階段微生物群落組成變化，分析各樣本於門(Phylum)層級之相對豐度變化情形(圖 4.16 a-e)。

初始接種污泥中(Month 0)，主要優勢菌門為 Proteobacteria 、 Chloroflexi 、 Bacteroidota ，其中 Planctomycetota 所佔比例明顯偏低(低於 5 %)，顯示 ANAMMOX 功能菌尚未建立。此外， Firmicutes 、 Actinobacteriota 亦佔有顯著比例，推測多為來自垃圾掩埋場的異營厭氧菌群。在反應器長期操作過程中，隨著系統逐漸穩定， Planctomycetota 在各槽體中均有明顯上升趨勢：

- ◆ AC1 與 AC2 中， Planctomycetota 自初期低比例逐步提升，至第 9 – 12 月達約 15 – 20 % 。
- ◆ AC3 與 AC4 則於第 5 – 10 月期間即快速增長，至第 10 月後已成為前三大優勢門之一，顯示植種來自 AC1/ AC2 之效果良好， ANAMMOX 群快速建立。

同時，其他功能相關門別如：

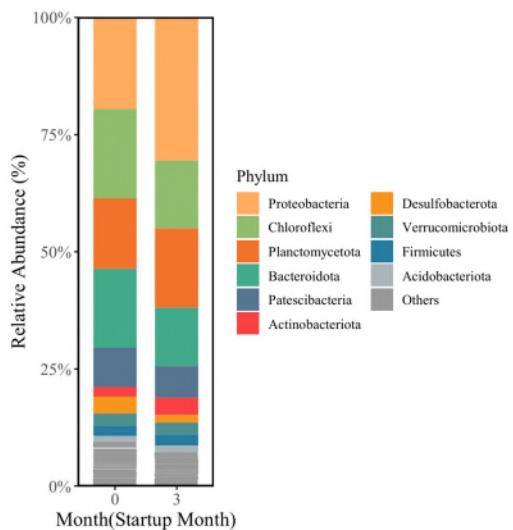
- ◆ Chloroflexi (如 Anaerolineaceae ，具絲狀支撐與分解有機物功能)在各時期皆維持一定比例，約 10 – 25 % ，可能為 ANAMMOX 系統中重要共生夥伴。
- ◆ Patescibacteria 與 Verrucomicrobiota 為常見的 CPR (Candidate Phyla Radiation) 類群，部分文獻指出其在低營養環境中具有潛在代謝交互 (Wang et al., 2023b) 。
- ◆ Proteobacteria 為異營脫硝菌主要來源，隨 ANAMMOX 優勢建立，

其比例自初期高值(> 30 %)下降至穩定期的 10 – 15 %。

總體而言，門層級分析結果與系統中氮去除效率與 *Candidatus Brocadia* 等優勢屬變化趨勢一致，佐證 ANAMMOX 功能菌群於各槽體中成功建立並逐步成為主導族群。



(a)



(b)

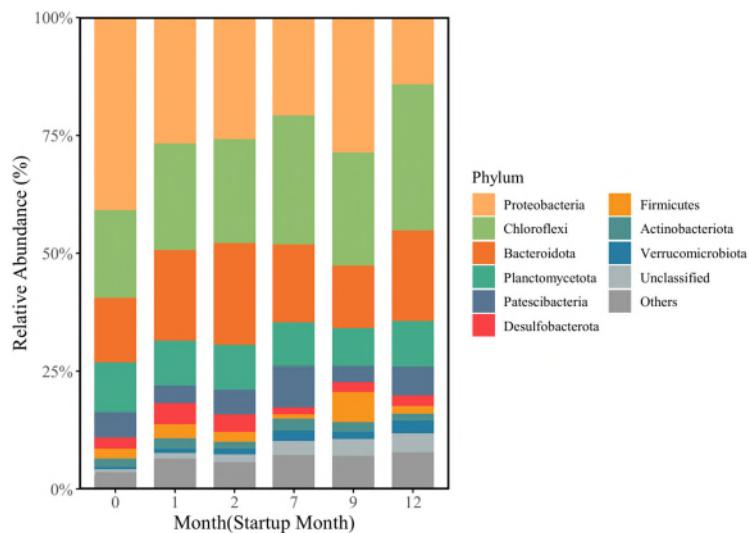
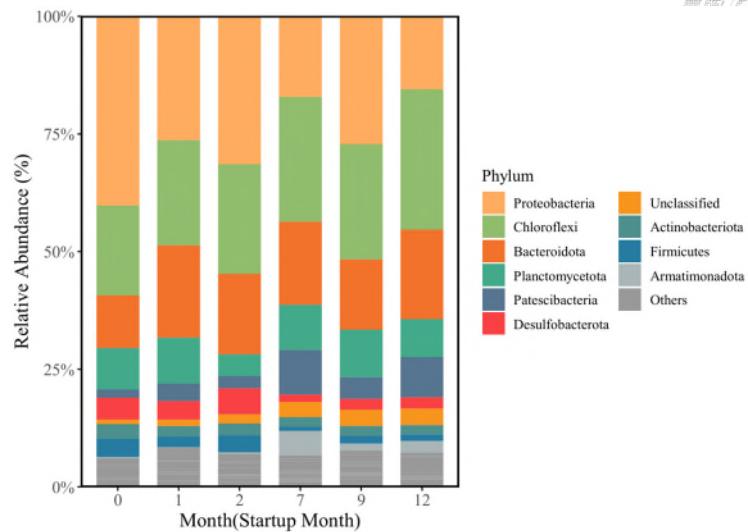


圖 4.16、各反應槽不同月份之門層級菌相堆疊長條圖(a)初始污泥；(b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4



(c)



(d)

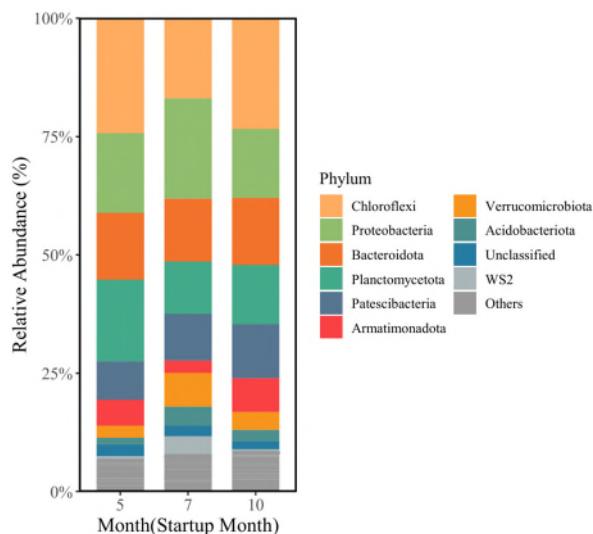


圖 4.16、各反應槽不同月份之間層級菌相堆疊長條圖(a)初始污泥；(b) AC1；

(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4 (續)

(e)

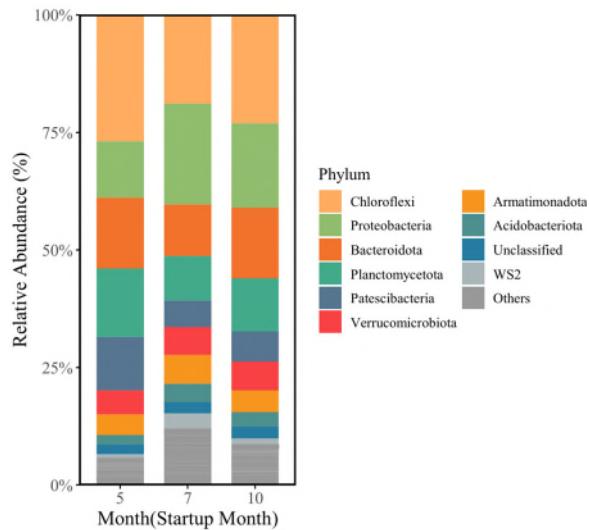


圖 4.16、各反應槽不同月份之門層級菌相堆疊長條圖(a)初始污泥；(b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4 (續)

接著探討 ANAMMOX 系統運行期間，以屬(genus)階層瞭解微生物群落結構之演替變化，依據定序結果前 15 – 20 佔比高之菌屬，繪製群落組成堆疊圖與功能分類堆疊圖，以揭示各菌屬及其功能群於初始污泥與不同運行月數的相對豐度變化趨勢。

初始污泥樣本之群落結構(圖 4.17 a)以有機物降解菌(如 *Anaerolineaceae* uncultured、*Bacteroidetes* vadinHA17)及環境未分類菌群為主，顯示原始污泥系統以異營型有機物降解菌為主，脫氮相關功能菌群相對豐度偏低。功能分類結果(圖 4.17 b)同樣顯示與此趨勢一致，ANAMMOX 類菌群僅佔極少數，顯示系統尚處於前驅菌群階段，尚未建立有效脫氮能力。

如圖 4.18 a 所示，AC1 系統在分瓶初期(Month 0)的菌群結構以有機物降解菌(如 *Anaerolineaceae* uncultured、*Bacteroidete* vadinHA17)為優勢，*Candidatus Brocadia* 的相對豐度極低。然而隨系統運行至第 7 個月後，*Candidatus Brocadia* 開始穩定增長，並於第 9 至 12 月達到高豐度(1 – 1.5

%)，顯示 ANAMMOX 菌群在系統中逐漸富集，成為優勢菌屬。同時，異營脫氮菌(如 *Denitratisoma*、*Thauera*)與有機物降解菌比例逐步下降，反應系統環境由初期有機物較高之條件轉變為適合自營脫氮反應的環境；AC2 系統的菌群變化趨勢與 AC1 類似(圖 4.19 a)，*Candidatus Brocadia* 於系統運行過程中顯著增長，至第 12 個月時已成為主要優勢菌群之一。另外，系統內異營脫氮菌 *Denitratisoma* 維持一定比例，而其他有機物降解菌則呈現下降趨勢，顯示系統內氮循環功能菌群穩定建立。

在圖 4.20 a 中，AC3 系統啟動初期菌群同樣以 *Anaerolineaceae* uncultured 等有機物降解菌為主，運行至第 10 月時，ANAMMOX 菌群相對豐度明顯提升(8.2 %)，並伴隨 CPR 群(Candidate Phyla Radiation)細菌(如 *Candidatus Gottesmanbacteria*、*Candidatus Roizmanbacteria*)的增加；AC4 系統在運行過程中也呈現相似變化(圖 4.21 a)。起初菌群以有機物降解與異營菌群為主，隨著運行時間延長，*Candidatus Brocadia* 優勢地位提升(6.28 %)，啟動至第 10 月後 ANAMMOX 菌及部分 CPR 群細菌逐漸增強，顯示系統內逐漸形成以自營型脫氮為主導的微生物生態系。AC3 與 AC4 系統中 ANAMMOX 菌群富集速度明顯比 AC1 與 AC2 快，表示以植種方式能快速啟動反應。

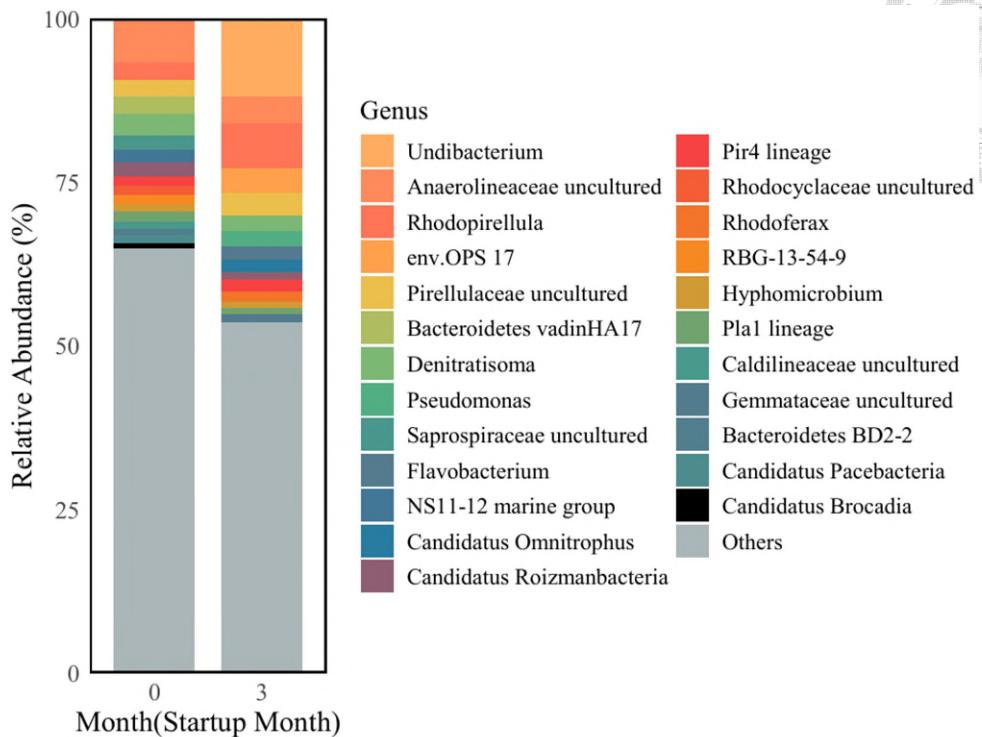
AC1 – AC4 反應槽之功能分類堆疊圖(圖 4.18 至圖 4.21 b)進一步揭示菌群功能組成隨時間之變化。起初各反應槽皆以有機物降解菌與異營脫氮菌為主要功能群，ANAMMOX 菌群僅占少數比例。隨著系統啟動與穩定運行，ANAMMOX 功能菌群相對豐度逐漸增加，並於後期佔據主導地位。環境未分類菌群與相對豐度< 0.5 % 之菌群(Environmental/ Unclassified/ Others)則隨時間逐漸下降，推測系統環境逐漸專一化，有利特定功能菌群定殖。值得注意的是，部分 CPR 群細菌於系統後期佔比上升，可能與資源競爭、微生物間交互作用與共生有關(Wang et al., 2023b)。

除 ANAMMOX 菌群本身外，定序結果亦顯示系統中部分異營菌與有機物降解菌(如 *Denitratisoma*、*Thauera*、*Comamonas*、*Ignavibacterium*、*Anaerolineaceae uncultured*)在初期及中期仍占有一定比例。雖非參與 ANAMMOX 反應之核心菌群，然而根據其代謝潛能與相關定序分析文獻 (González-Cortés et al., 2022; Li et al., 2024) 可推測其可能透過分解有機物、降低系統內有機負荷、釋放中間產物(如乙酸、H₂)或提供亞硝酸鹽，間接支援 ANAMMOX 菌群生長與活性發揮。此外，Anaerolineaceae 類絲狀菌亦可能作為附著基質或提供共生穩定結構，有助於生物膜系統中 ANAMMOX 菌群之定殖與持續富集。因此，本研究亦將此類菌群視為「潛在支援菌」，其動態變化可作為系統運行穩定性與功能轉移的重要指標之一。

表 4.1 至 4.5 為初始污泥、AC1、AC2、AC3 與 AC4 之功能性微生物隨啟動月數之相對豐度變化數值。

綜合上述結果可知，各反應槽微生物群落結構於系統運行期間皆發生明顯演替，由以有機物降解菌為主轉變為以 ANAMMOX 菌群為優勢之群落結構。此菌群變化趨勢與系統脫氮效率提升之結果相符，顯示系統成功建立 ANAMMOX 微生物群落，為穩定脫氮反應提供微生物基礎，並同時形成與之共生或互補之次要功能菌群，促進整體系統長期穩定運作。

(a)



(b)

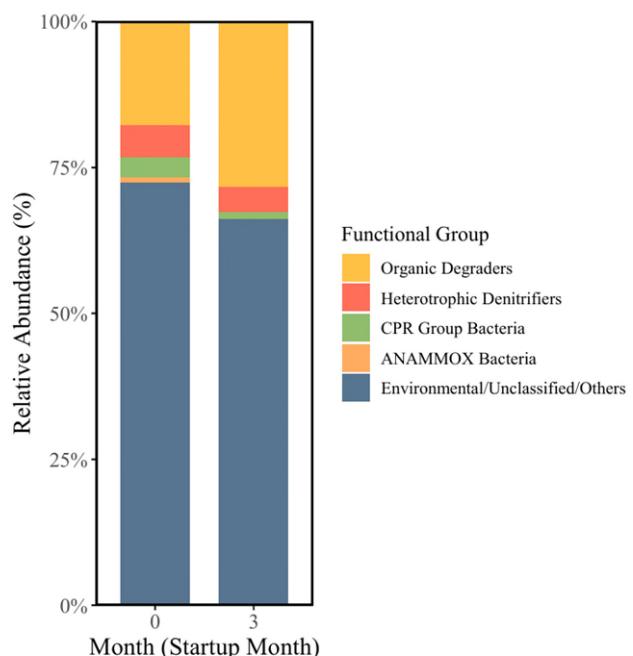
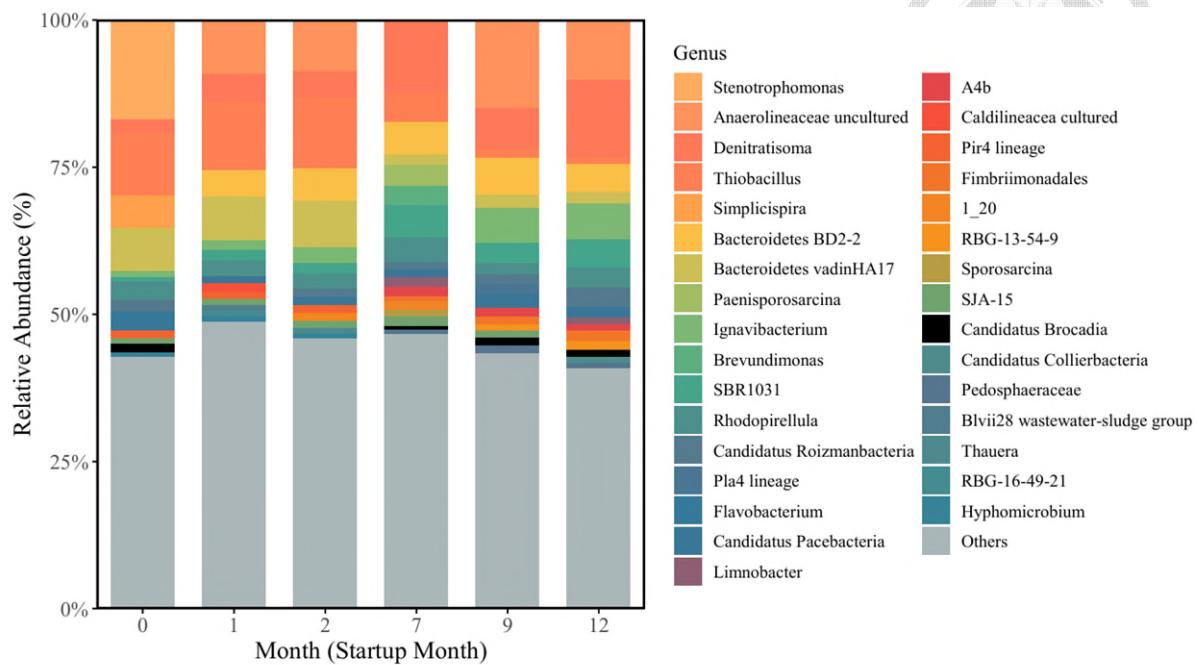


圖 4.17、不同階段初始污泥(未分瓶前)之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖

(a)



(b)

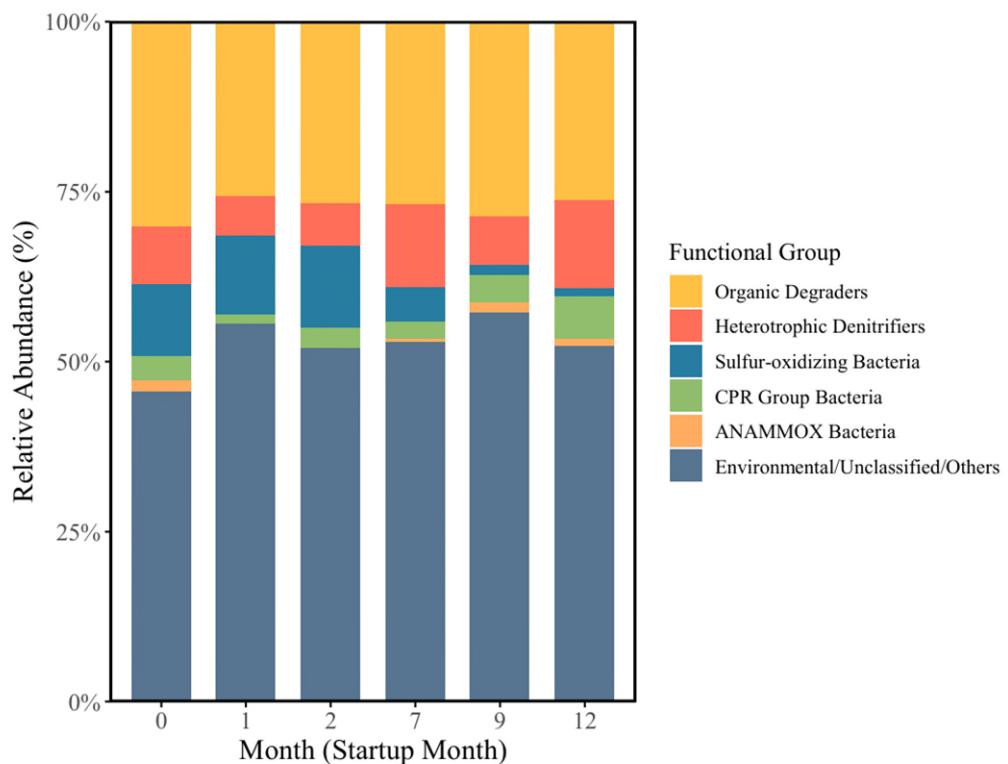
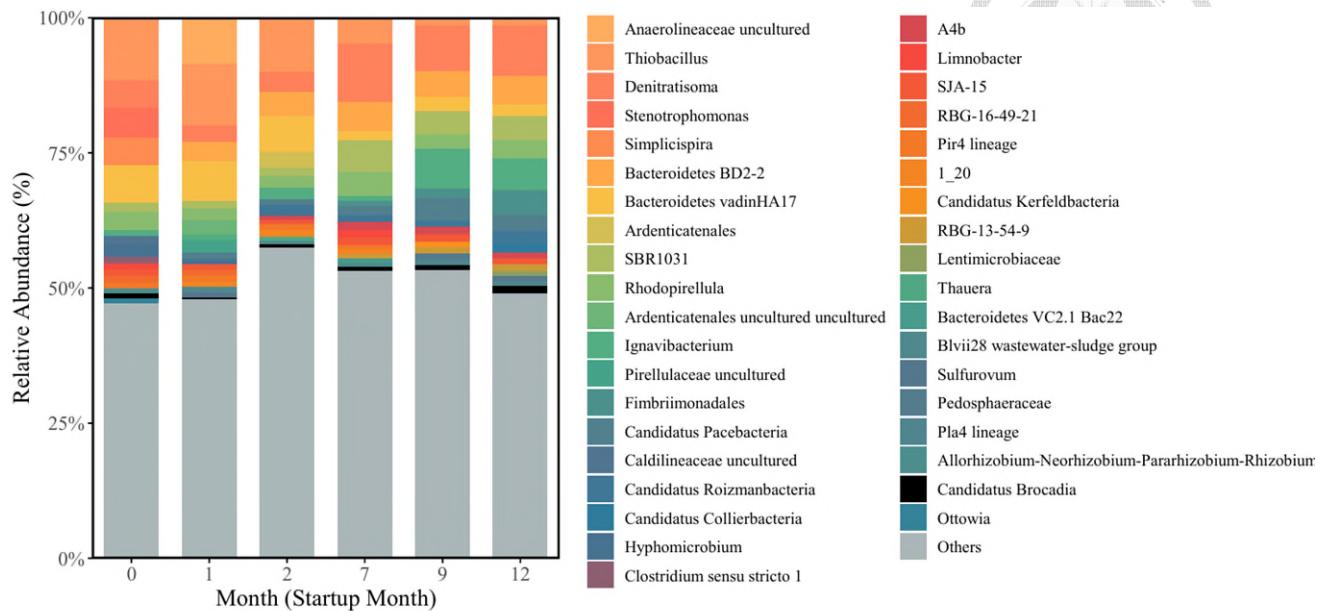


圖 4.18、不同階段 AC1 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖

(a)



(b)

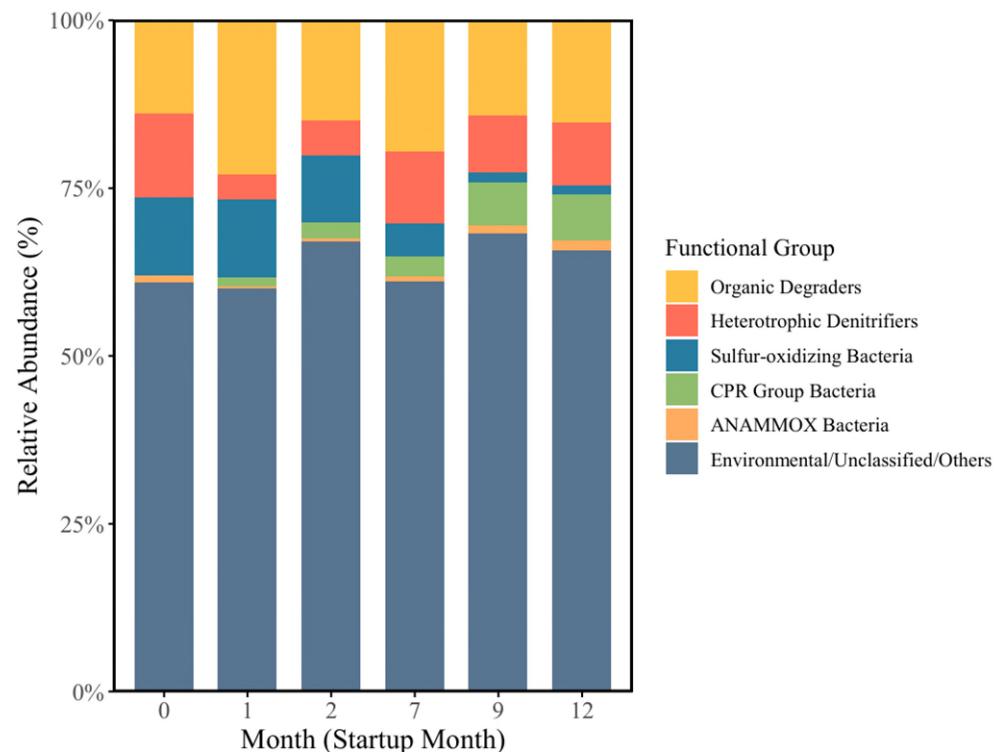
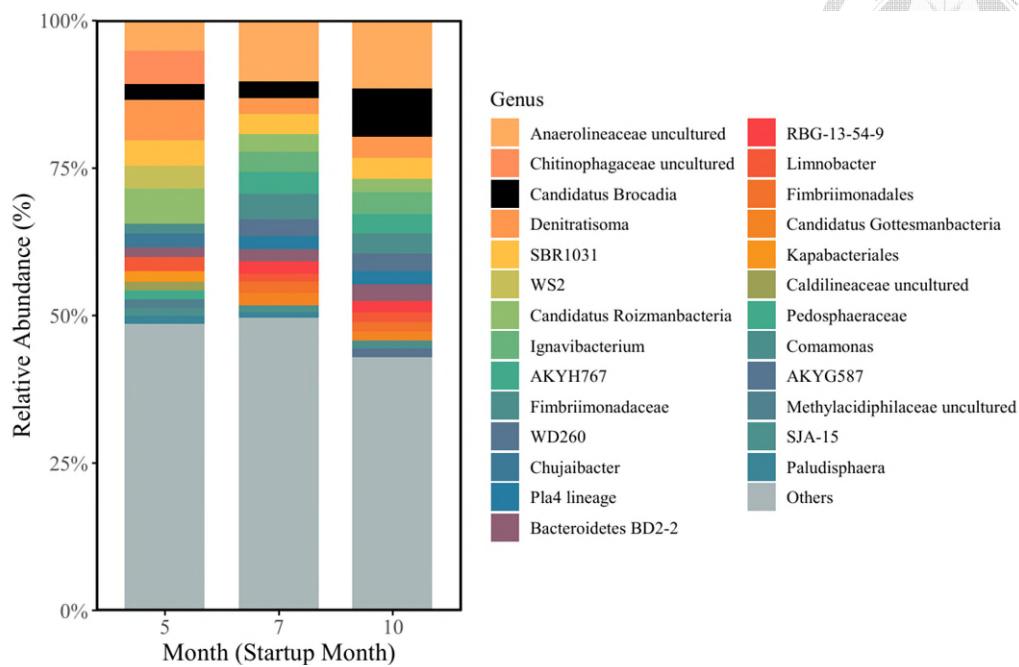


圖 4.19、不同階段 AC2 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖

(a)



(b)

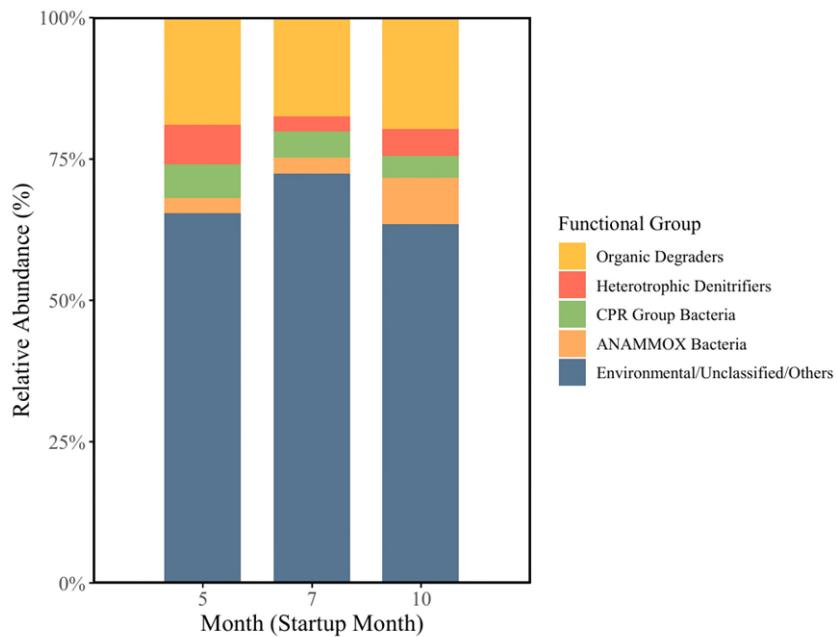
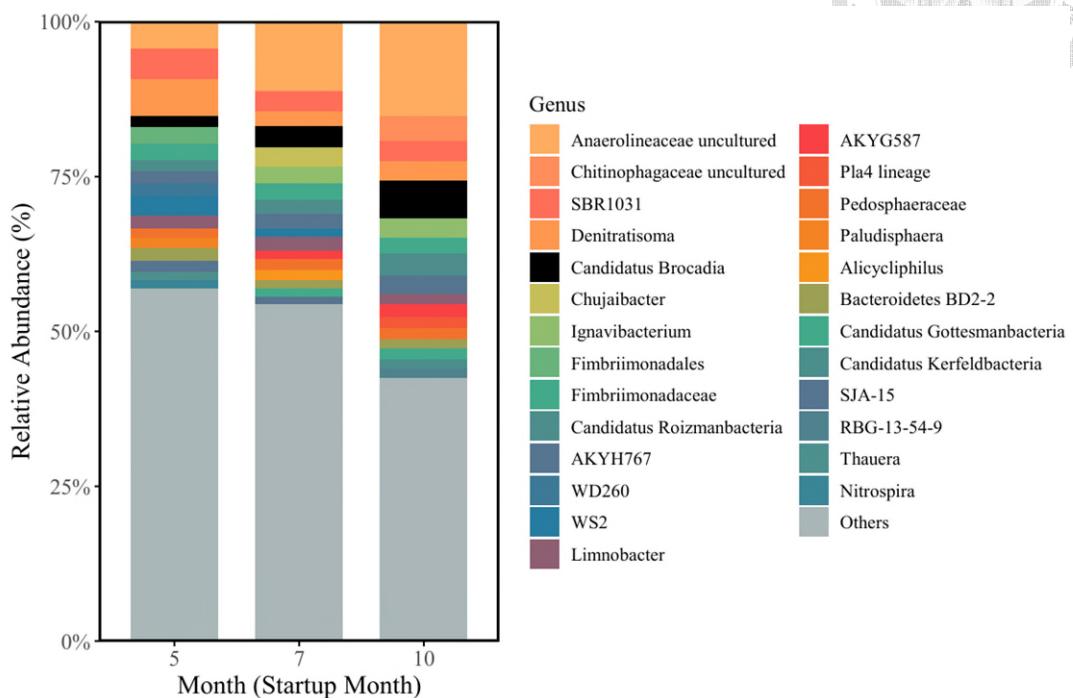


圖 4.20、不同階段 AC3 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖



(a)



(b)

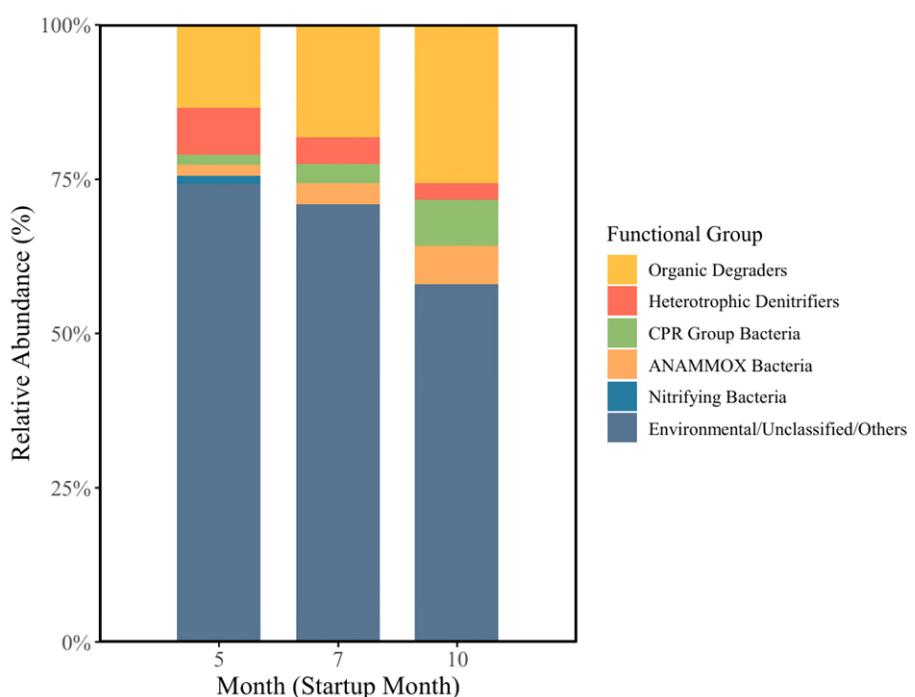


圖 4.21、不同階段 AC4 之(a)群落結構；(b)菌群功能分類堆疊圖

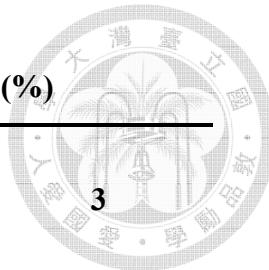


表 4.1、初始污泥之不同功能群相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month	
	0	3
ANAMMOX Bacteria	0.95	0.00
CPR Group Bacteria	3.25	1.17
Environmental/Unclassified/Others	72.40	66.12
Heterotrophic Denitrifiers	5.81	4.54
Organic Degraders	17.59	28.17

表 4.2、不同階段 AC1 之不同功能群相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month					
	0	1	2	7	9	12
ANAMMOX Bacteria	1.56	0.00	0.00	0.42	1.52	1.02
CPR Group Bacteria	3.43	1.16	2.80	2.44	3.96	6.21
Environmental/Unclassified/Others	62.73	55.70	52.15	62.93	57.22	53.44
Heterotrophic Denitrifiers	8.56	5.72	6.29	12.25	7.06	13.00
Organic Degraders	13.11	25.71	26.65	16.91	28.68	25.21
Sulfur-oxidizing Bacteria	10.62	11.71	12.10	5.05	1.56	1.11

表 4.3、不同階段 AC2 之不同功能群相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month					
	0	1	2	7	9	12
ANAMMOX Bacteria	1.02	0.37	0.78	0.81	1.01	1.47
CPR Group Bacteria	0.00	1.43	2.80	3.20	6.13	6.91
Environmental/Unclassified/Others	60.35	67.96	80.51	70.11	65.27	65.58
Heterotrophic Denitrifiers	12.51	4.31	6.29	12.08	8.09	9.35
Organic Degraders	14.46	25.93	17.86	20.41	13.58	15.22
Sulfur-oxidizing Bacteria	11.65	13.09	12.10	5.47	1.45	1.49

表 4.4、不同階段 AC3 之不同功能群相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month		
	5	7	10
ANAMMOX Bacteria	2.65	2.69	8.20
CPR Group Bacteria	6.00	2.87	2.18
Environmental/Unclassified/Others	71.77	75.67	68.15
Heterotrophic Denitrifiers	6.96	2.69	3.64
Organic Degraders	12.62	16.09	17.83

表 4.5、不同階段 AC4 之不同功能群相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month		
	5	7	10
ANAMMOX Bacteria	1.77	3.32	6.28
CPR Group Bacteria	1.77	2.11	5.25
Environmental/Unclassified/Others	77.54	76.34	65.58
Heterotrophic Denitrifiers	7.44	2.36	2.99
Organic Degraders	11.47	15.87	19.90

4.2.3 ANAMMOX 系統運行期間 ANAMMOX 群落相對豐度分析

為進一步了解初期之污泥與各反應槽內 ANAMMOX 類別與啟動時間之變化分部，本研究於定序結果中選取出已確認為 ANAMMOX 之菌屬，主要為以下四種類別：

- ❖ *Candidatus Brocadia*
- ❖ *Candidatus Anammoximicrobium*
- ❖ GWA2-50-13
- ❖ *Candidatus Jettenia*

這四種 ANAMMOX 菌屬中 *Candidatus Brocadia* 與 *Candidatus Jettenia* 為常見 ANAMMOX 菌屬，而 GWA2-50-13 在 Quast 等人研究中被確認過其基因序列與 ANAMMOX 菌群相近(Quast et al., 2012; Zhao et al., 2022a)；除此之外，*Candidatus Anammoximicrobium* 在 Lodha 等人研究中被視為 ANAMMOX 菌屬(Lodha et al., 2021)。因此 AC1 – AC4 可繪出各菌屬在初始污泥以及不同反應槽隨啟動月數增加之變化(圖 4.22)。

初始污泥樣本(圖 4.22 a)中，ANAMMOX 菌群主要偵測到 *Candidatus Brocadia* 與 *Candidatus Anammoximicrobium*，第 0 月之相對豐度分別為 0.953 % 與 0.046 %；而當系統啟動至第三月，*Candidatus Brocadia* 下降至 0.295 %，*Candidatus Anammoximicrobium* 消失，而 GWA2-50-13 出現，相對豐度為 0.036 %。於 4.4.1 小節說明初始污泥於此階段有偏向完全厭氧狀態，且於前一節之群落結構可知有厭氧菌(如 *Denitratisoma*、*Thauera*、*Simplicispira*)出現，但是認為此階段系統狀態不適合 ANAMMOX 生存導致相對豐度的減少。

AC1 與 AC2 (圖 4.22 b、c)第 0 月為分瓶階段，此階段已認為系統內 ANAMMOX 反應穩定進行，ANAMMOX 總相對豐度分別為 1.583 % 與 1.035 %。兩個反應槽內 ANAMMOX 菌屬總相對豐度在啟動第三月時皆出現下降趨勢，爾後又逐漸上升，顯示在長期運行下 ANAMMOX 菌屬具一定競爭優勢，能重新建立優勢地位。同時運行後期(啟動第 2、7、9、12 月)*Candidatus Anammoximicrobium* 出現，表示系統內部出現潛在的功能性菌群演替。

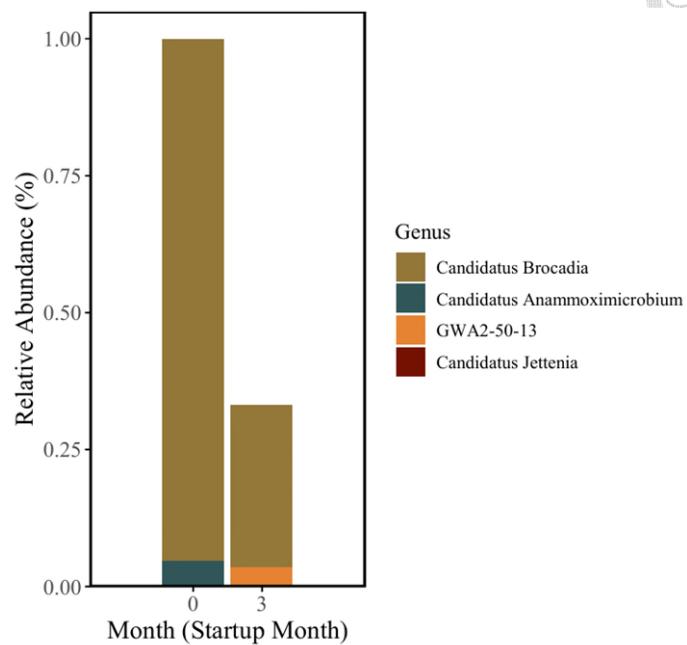
AC3 系統於啟動第 5 月 ANAMMOX 菌群總相對豐度為 3.043 %，於第 10 月提升至 8.281 %，而 AC4 啟動第 5 月 ANAMMOX 菌群總相對豐度為 1.955 %，於第 10 月提升至 6.522 %。此兩系統以 ANAMMOX 富集狀況探討可認為運行狀況較前兩槽穩定，整體 ANAMMOX 豐度隨時間漸增(圖 4.22 d、e)。

整體而言，在四個反應系統中，以 *Candidatus Brocadia* 為最主要的 ANAMMOX 菌屬，此一結果與 Kallistova 等人所述相同，此菌屬多見於人工建立之反應系統(Kallistova et al., 2020)。而 AC1 與 AC2 中初期有 *Candidatus Jettenia* 出現但相對豐度極低且運行一段時間後便消失，與 Zhang 等人之研究相符，富集難度極高(Zhang et al., 2025)。表 4.6 – 4.10 為初始污泥、AC1、

AC2、AC3 與 AC4 之 ANAMMOX 相關菌屬隨啟動月數之相對豐度變化。



(a)



(b)

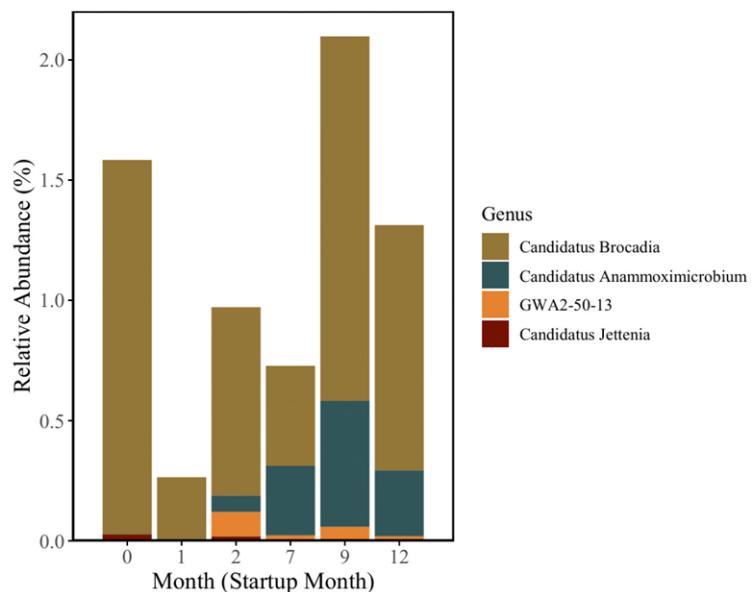
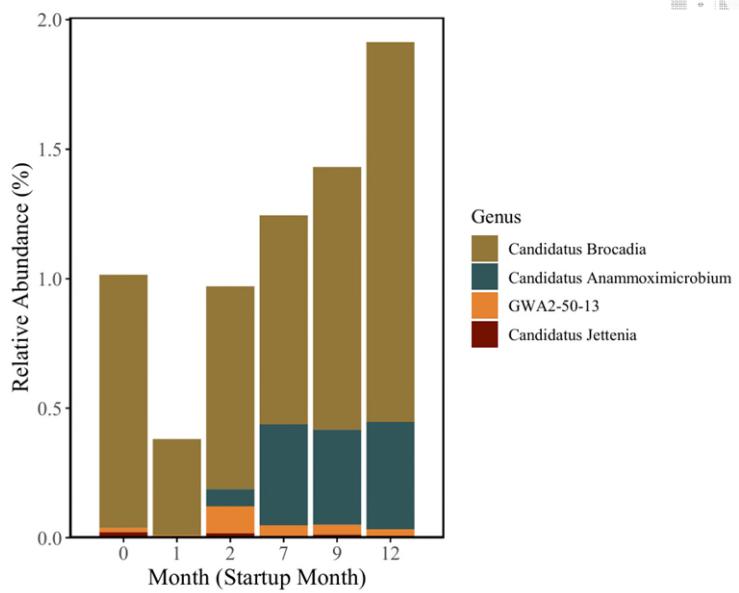


圖 4.22、各菌屬在初始污泥以及不同反應槽隨啟動月數增加之變化(a)初始污泥；(b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4



(c)



(d)

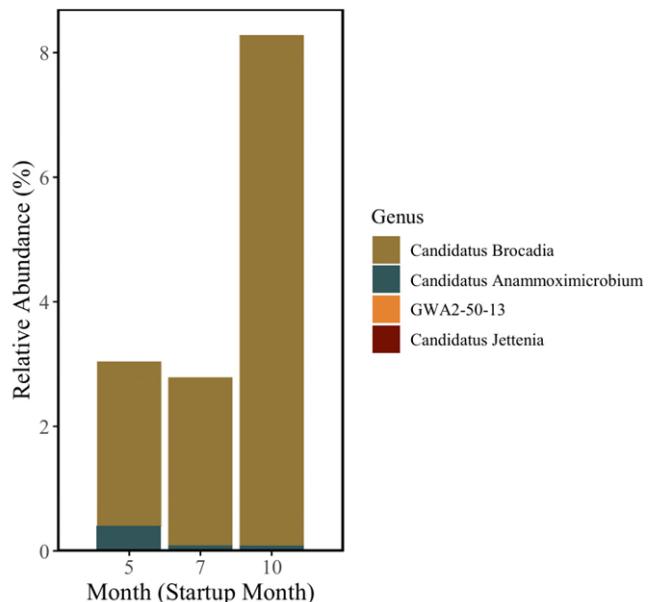


圖 4.22、各菌屬在初始污泥以及不同反應槽隨啟動月數增加之變化(a)初始污泥；(b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4 (續)

(e)

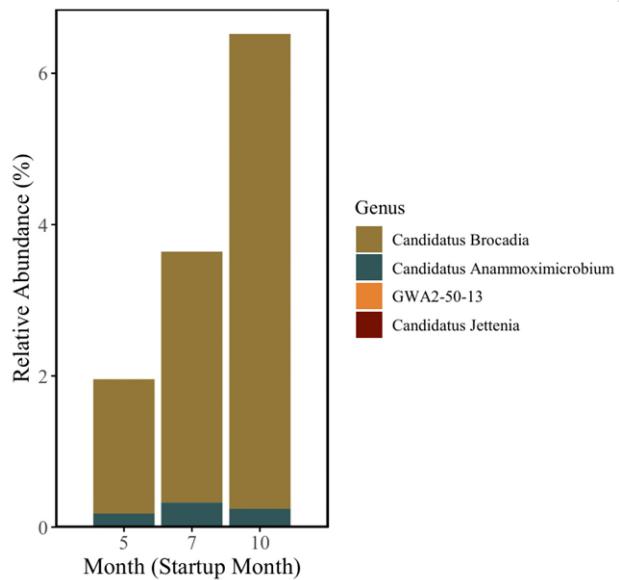


圖 4.22、各菌屬在初始污泥以及不同反應槽隨啟動月數增加之變化(a)初始污
泥；(b) AC1；(c) AC2；(d) AC3；(e) AC4 (續)

表 4.6、初始污泥之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month	
	0	3
<i>Candidatus Brocadia</i>	0.953	0.295
<i>Candidatus Jettenia</i>	0	0
<i>GWA2-50-13</i>	0	0.036
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	0.046	0

表 4.7、AC1 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month					
	0	1	2	7	9	12
<i>Candidatus Brocadia</i>	1.556	0.264	0.783	0.415	1.515	1.02
<i>Candidatus Jettenia</i>	0.027	0	0.019	0	0.009	0.007
GWA2-50-13	0	0	0.103	0.024	0.051	0.012
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	0	0	0.066	0.288	0.522	0.272

表 4.8、AC2 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month					
	0	1	2	7	9	12
<i>Candidatus Brocadia</i>	0.977	0.371	0.783	0.807	1.014	1.466
<i>Candidatus Jettenia</i>	0.022	0	0.019	0.008	0.012	0.007
GWA2-50-13	0.016	0.009	0.103	0.04	0.038	0.026
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	0	0	0.066	0.389	0.367	0.414

表 4.9、AC3 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month		
	5	7	10
<i>Candidatus Brocadia</i>	2.649	2.693	8.195
<i>Candidatus Jettenia</i>	0	0	0
GWA2-50-13	0.006	0	0
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	0.388	0.091	0.086

表 4. 10、AC4 之 ANAMMOX 菌屬隨啟動月數之相對豐度變化(%)

Functional Group	Starup Month		
	5	7	10
<i>Candidatus Brocadia</i>	1.775	3.316	6.28
<i>Candidatus Jettenia</i>	0	0.006	0
GWA2-50-13	0	0.004	0.009
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	0.18	0.318	0.233

4.3 懸浮態污泥中 ANAMMOX 菌群活性評估(SAA 測試)



由於 AC1 與 AC2 反應槽啟動時間較長，且均已進入穩定運行階段，根據 4.1.2 小節結果顯示，AC1 之去氮效率較為穩定，故本研究選擇 AC1 進行 ANAMMOX 比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)測試。測試期間，生物量濃度維持於 175 – 200 mg-VSS/ L，反應體積為 110 mL，並依據 3.3.2 小節設定之基質條件進行氮源轉化評估。為模擬實際操作條件，反應於密閉批次反應器中進行，控制溫度於 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，並保持避光，無氧環境中測試。測試期間定期取樣，分析 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 NO_2^- -N 與 NO_3^- -N 濃度變化。本測試目的為評估 AC1 系統中 ANAMMOX 菌群於穩定運行階段之比活性表現，作為後續載體固定化前之活性基準參考。圖 4.23 為 AC1 懸浮態 ANAMMOX 菌群於比活性(SAA)測試中之反應瓶狀態。



圖 4.23、AC1 懸浮態 ANAMMOX 菌群於比活性(SAA)測試中之反應瓶狀態

4.3.1 氨氮與亞硝氮去除效率分析

在懸浮態 ANAMMOX 菌群比活性(SAA)測試過程中，監測氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、亞硝氮(NO_2^- -N)及硝酸氮(NO_3^- -N)濃度隨時間之變化，結果如表 4.12 所

示。為驗證氮源的去除是因為生物反應，並排除物理吸附或化學反應等非生物因素干擾，本實驗設置無菌空白組(Blank)作為對照。空白組中未接種任何活性污泥，僅添加與測試組相同之基質，於相同條件下進行操作(表 4.11)。

反應初期(0 小時) $\text{NH}_3\text{-N}$ 與 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度分別為 106.75 mg-N/L 與 108.30 mg-N/L，隨著反應進行，兩者濃度逐步下降，至 96 小時時分別降至 32.25 mg-N/L 與 15.42 mg-N/L，顯示 ANAMMOX 反應有效進行氨氮及亞硝氮之去除。空白組中各氮源濃度變化幅度極小，證明測試組中氮源消耗主要來自於活性菌群進行之生物反應。

硝酸氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)作為 ANAMMOX 反應之副產物，於反應過程中逐漸累積，初始反應瓶中濃度為 0 mg-N/L 逐漸上升至 17.90 mg-N/L，符合 ANAMMOX 反應機制中副產物為 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 之特性。整體數據趨勢證實了 AC1 反應系統內 ANAMMOX 活性確實存在與進行。空白組則無任何硝酸氮產生。

空白組(圖 4.24 a)直至反應結束都維持趨進水平的狀態。圖 4.25 a 顯示氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度隨時間變化之趨勢。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 與 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 同步下降， $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 隨反應進行逐步累積，且數據均以三組平行實驗之平均值表示並附標準差，結果展現系統內菌群具穩定且有效的脫氮活性，符合 ANAMMOX 反應特性。

此外，為進一步探討整體氮源的利用消耗，本研究繪製氮源變化堆疊圖(圖 4.24 b、4.25 b)。圖中不同區域分別代表氨氮(灰綠色)、亞硝氮(紫色)與硝酸氮(粉色)濃度變化，並以黑色虛線標示總氮(Total Nitrogen, TN)隨時間之變化趨勢。測試組之 TN 濃度隨反應進行逐漸下降，推測為 ANAMMOX 反應中氮氣生成逸散所致，符合 ANAMMOX 反應中將氨氮與亞硝氮轉化為氮氣釋放至大氣之機制。氨氮總消耗量是 74.5 mg-N/L，硝酸氮產生 17.09 mg-

N/L，而理論值的硝酸氮產生量為 19.37 mg-N/L，雖然有一些落差但是整體氮源變化趨勢仍與反應理論機制一致，證明 AC1 系統內 ANAMMOX 活性是存在且有效的。

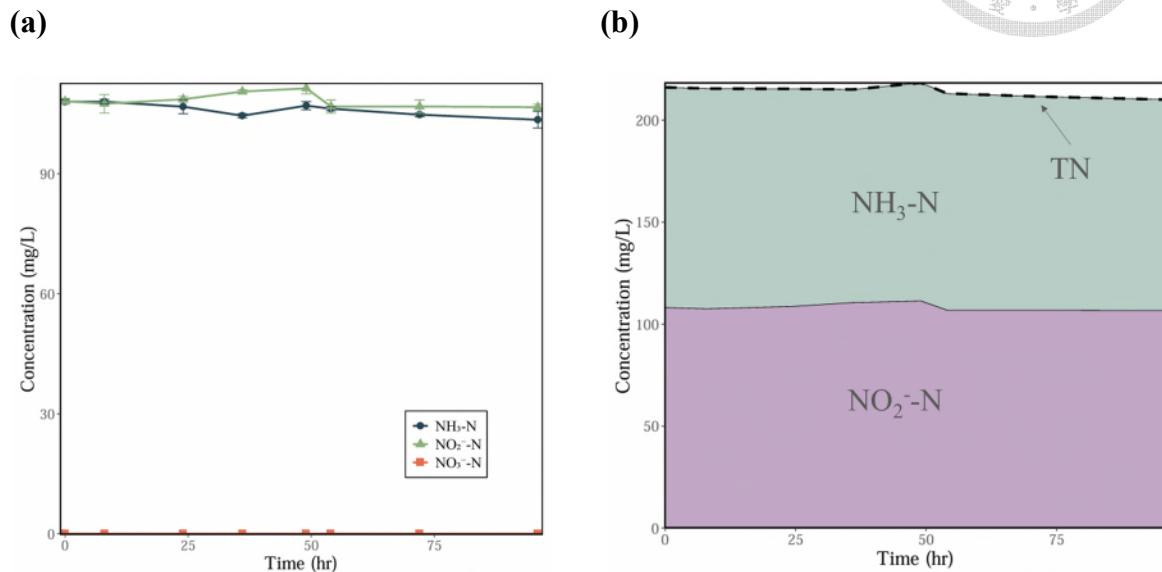


圖 4.24、(a)懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試空白對照組之氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度變化趨勢；(b) 氮源轉化過程總濃度堆疊圖

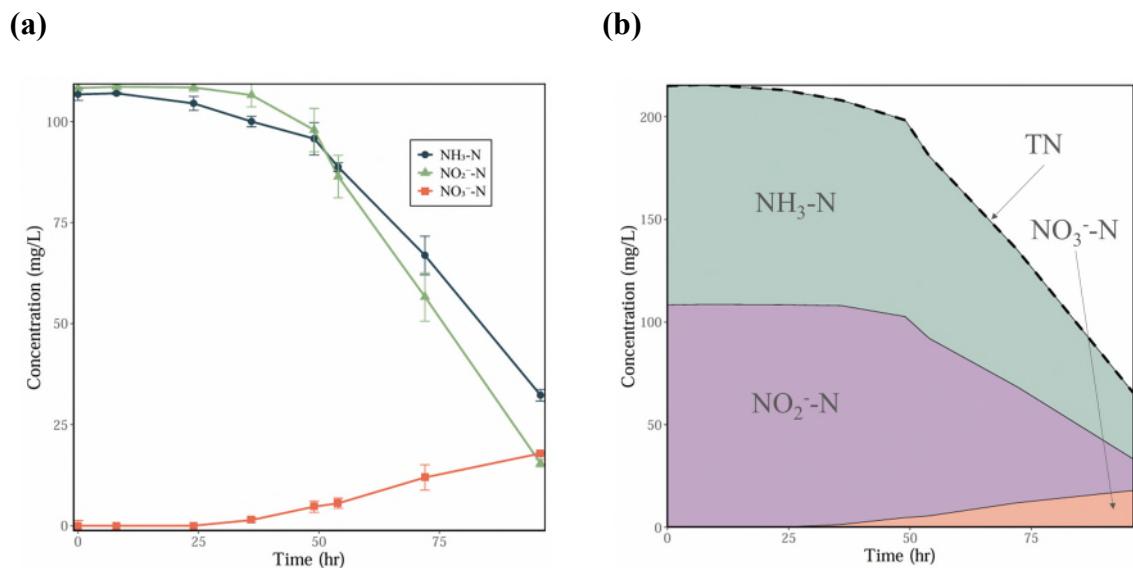


圖 4.25、(a)懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之氨氮、亞硝氮及硝酸氮濃度變化趨勢；(b) 氮源轉化過程總濃度堆疊圖

表 4. 11、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之空白對照組氮源濃度變化

Time (hr)	NH ₃ -N (mg - N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg - N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg - N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
0	108	0.58	108.14	0.67	0.00	0.00
8	108	0.58	107.50	2.31	0.00	0.00
24	106.75	1.75	108.62	0.67	0.00	0.00
36	104.5	0.50	110.54	0.49	0.00	0.16
49	107	1.04	111.34	1.36	0.00	0.00
54	106.25	0.50	106.80	1.65	0.00	0.00
72	104.75	11.40	123.99	15.42	0.00	0.00
96	103.5	2.08	106.64	0.74	0.00	0.00

表 4. 12、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試之氮源濃度變化

Time (hr)	NH ₃ -N (mg - N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg - N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg - N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
0	106.75	1.5	108.30	0.18	0.00	1.27
8	107	0.29	108.62	0.49	0.00	0
24	104.5	1.73	108.46	0.97	0.00	0
36	100	1.32	106.54	2.90	1.38	0.57
49	95.75	3.97	97.90	5.37	4.70	1.42
54	88.75	1.06	86.41	5.26	5.55	1.27
72	66.875	4.77	56.61	6.02	11.93	3.14
96	32.25	1.41	15.42	0.91	17.90	0.20

4.3.2 SAA 計算結果與活性趨勢評估

根據 3.4.3 小節計算懸浮態 ANAMMOX 菌群之比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)，SAA 以反應期間氨氮(NH₃-N)與亞硝氮(NO₂⁻-N)濃度變化總和(ΔTN)為基礎，考量反應體系中混合液揮發性懸浮固體(VSS)濃度，依總反應體積換算毫克數，時間換算為天。

由於反應至第 96 小時之時，氮源消耗趨勢與理論比值有所偏離，故僅選取 0 – 72 小時期間之數據進行計算。此期間內， ΔTN 為 91.56 mg-N/L，總反應時間(Δt)為 3 天(72 小時)，每個反應瓶中 VSS 濃度皆為 209 mg-VSS/L，總反應體積為 110 ml，計算後每瓶中為 22.99 mg-VSS，據此計算 AC1 系統之 SAA 為 1.33 mg-N/ mg-VSS-day。

本研究測得之 SAA 值與文獻中 Bae 等人之結果相近(≈ 1.5 mg-N/ mg-VSS-day)，表示本研究所培養之懸浮態 ANAMMOX 菌群具有良好脫氮活性，且活性水準位於文獻研究結果之範圍內。此結果同時驗證菌群於穩定運行階段具備後續 ANAMMOX 菌具備載體固定化之應用潛力。表 4.13 為懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試結果。

表 4.13、懸浮態 ANAMMOX 菌群 SAA 測試結果

項目	數值
ΔTN	91.56 mg-N/L
反應時間 Δt	3 天
VSS 濃度	209 mg-VSS/L
反應體積	110 ml
單瓶 VSS	22.99 mg – VSS
SAA	1.33 mg - N/ mg – VSS – day

4.4 微生物固定化與 3D 列印之應用成果



4.4.1 列印參數設定與製程穩定性觀察

本研究參考前人方法(石丞均，2022)，使用 SOLIDWORKS 進行載體建模，設計 $10 \times 10 \times 6$ mm 之方體作為基本載體形狀。完成之圖檔(.STL)匯入 Ultimaker Cura 軟體，選擇 Custom FFF printer 模式，擠出機數目設定為 3，並依據表 4.14 進行參數設定。匯出之 GCODE 檔案需另外以文字檔開啟後手動刪除加熱程序，如圖 4.26 所示，未刪除會導致 3D 列印機無法進行列印。SOLIDWORKS 載體建模如圖 4.27，經切片後之預覽圖如圖 4.28 所示，載體內部為網格狀結構，設計目的為提升 ANAMMOX 菌群之接觸反應面積。

表 4.14、3D 生物列印機參數設定

列印參數	數值
內外針速率比(內針:外針)	❖ 0.8 : 0.2 (PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light) ❖ 1 : 0 (PVA-PEGDA/ Light)
整體列印速度	6 (mm/ s)
擠出流速	75 %
填充率	40 %
層高	0.12 mm
列印樣式	90° 垂直
列印時間	6 分鐘

;%FLAVOR:Marlin
;%TIME:361
;%Filament used: 0.0591066m, 0m, 0m
;%Layer height: 0.12
;%MINX:104.67
;%MINY:104.67
;%MINZ:0.2
;%MAXX:115.33
;%MAXY:115.33
;%MAXZ:5.96
;%Generated with Cura_SteamEngine 4.6.1
T0
M104 S-14
M105
M109 S-14
M82 ;absolute extrusion mode
G28 ;Home
G92 E0 ;Reset Extruder
G1 Z2.0 F3000 ;Move Z Axis up
;Mixing
M163 S0 P0.80
M163 S1 P0.20
M164 S2



圖 4.26、GCODE 檔案文字檔開啟後刪除之部分(石丞均，2022)

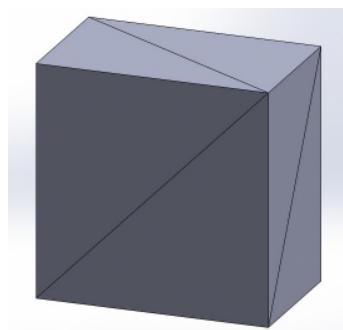


圖 4.27、SOLIDWORKS 建模之 $10 \times 10 \times 6$ mm 之方體載體型狀

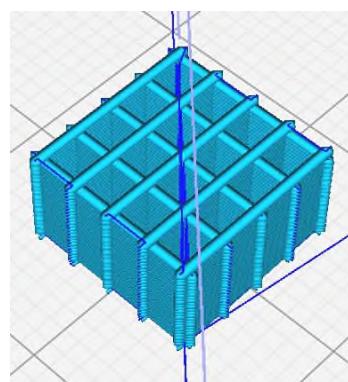


圖 4.28、Ultimaker Cura 軟體切片後之網格設計

考量海藻酸鈉(SA)可能釋放可溶性有機碳源，影響固定化後 ANAMMOX 菌群之反應穩定性，本研究設計同時使用含 SA 之 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 配方與不含 SA 之 PVA-PEGDA/ Light 配方進行列印，並觀察兩種載體之成型穩定性與製程表現，以提供後續材料選擇之依據。

應用 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 墨水列印所得之空白載體與 ANAMMOX 載體如圖 4.29 a、b 所示。空白載體形狀穩定網格狀清晰；固定化 ANAMMOX 載體由於污泥顏色較深，可能影響藍光穿透性，所以雖然已延長照光時間，但是成品仍然偏軟，不過結構基本可以成型。

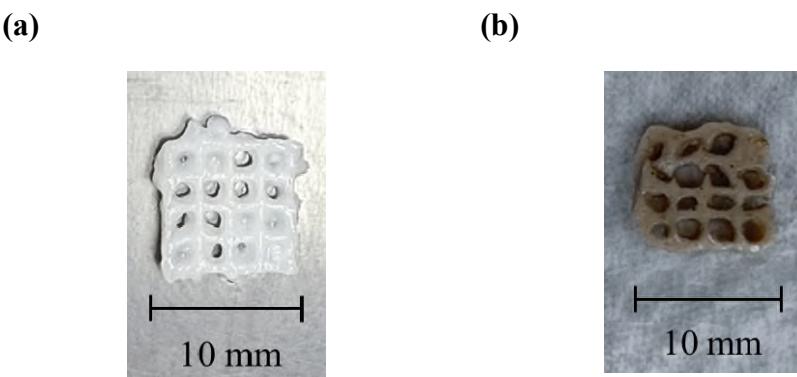


圖 4.29、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 墨水列印所得之
(a) 空白載體與(b) ANAMMOX 輽體

以 PVA-PEGDA/ Light 墨水進行列印時，因為黏性較低，若直接採用原先網格設計，列印成品無法形成清晰網格，呈現實心方塊狀(圖 4.30)。為提升墨水黏性，嘗試添加 40 nm 二氧化矽，但是 40 nm 二氧化矽高濃度添加會進一步降低藍光穿透率，導致列印失敗無法固化(圖 4.31)。為解決此問題，本研究針對 PVA-PEGDA/ Light 墨水特性，重新設計載體形狀，維持 $10 \times 10 \times 6$ mm 之外觀尺寸，並於方體中央開設 5×5 mm 之方形孔洞(圖 4.32)，以降低材料流動性造成的塌陷風險並增加表面積。經同樣參數設定切片後如圖 4.33 所示，列印所得空白載體與固定化 ANAMMOX 輽體分別如圖 4.34 a、b



所示，形狀穩定且孔洞結構清晰，顯示新設計可有效改善低黏度墨水列印之穩定性。

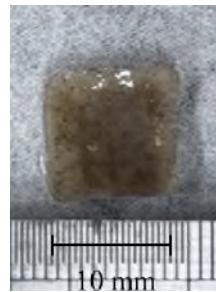


圖 4.30、根據網格設計列印之 PVA-PEGDA/ Light 輽體

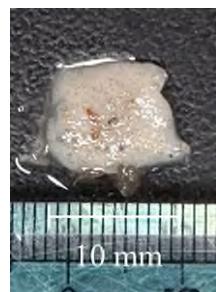


圖 4.31、添加 40 nm 二氧化矽導致無法固化之 PVA-PEGDA/ Light 輽體

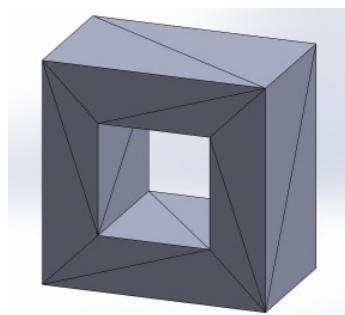


圖 4.32、SOLIDWORKS 建模之 $10 \times 10 \times 6\text{ mm}$ 具 $5 \times 5\text{ mm}$ 之 方形孔洞之方體載體型狀

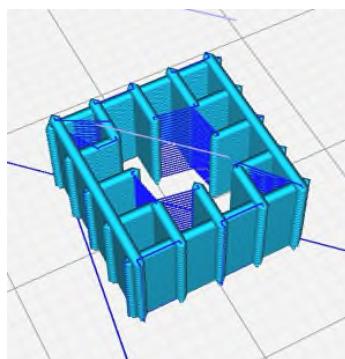


圖 4.33、Ultimaker Cura 軟體切片後之方形孔洞設計

(a)



(b)



圖 4.34、PVA-PEGDA/ Light 墨水列印所得之(a)空白載體與(b)

ANAMMOX 輽體

綜合上述結果，載體形狀設計需要根據墨水特性進行調整，提升列印成品之成型品質與結構穩定性。然而，墨水與材料配方本身亦對列印成品之固化與成型特性具有關鍵影響，相關探討將於 4.4.2 小節進一步說明。

4.4.2 墨水與材料配方對列印成品的影響

本研究使用兩種不同配方之墨水進行列印，分別為 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA -PEGDA/ Light，並觀察其對列印成品之成型與固化影響。

PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 配方中，海藻酸鈉(SA)可與鈣離子(Ca^{2+})進行離子交聯，形成穩定水凝膠結構，具有良好的生物相容性。然而，固定化

ANAMMOX 菌群後，成品仍偏軟，推測主要原因為污泥顏色較深，導致藍光穿透率降低，使光固化反應效率下降，且墨水中有 40 nm 二氧化矽，同樣影響藍光穿透效率，影響成品硬度。

相比之下，PVA-PEGDA/ Light 配方未添加海藻酸鈉及鈣交聯劑，材料組成單純，藍光固化反應可直接進行，理論上有利於形成更均勻且緻密之聚合結構。然而，由於墨水黏度較低，列印過程中支撐性不足，網格結構容易在固化前融合，造成失型。為提升黏度，雖嘗試添加 40 nm 二氧化矽，但高濃度二氧化矽會降低藍光穿透率，導致固化效果不佳，最終列印失敗。重新設計載體型狀後，可增加表面積且不易融合。

在前人之研究中，以海藻酸鈉(Alg-GMA)與明膠(Gel-MA)為基材的光固化墨水中，添加了微量光吸收劑 Orange G (0.007% w/v)，以抑制光在非照射區域的擴散與暗固化現象，進而提升列印精度與成型邊界控制。本研究雖未使用光吸收劑，但觀察列印成品之光固化效果與支撐性，顯示墨水中顏色、填料與光線穿透之交互作用對成品成型性具有明顯影響。未來若欲進一步優化固化邊界清晰度與層間結構穩定性，可考慮參考文獻中之作法，於墨水中引入適當波長對應之光吸收劑，以改善藍光聚合過程之控制性與列印準確度(林宛瑩，2024)。

綜合兩種墨水配方在藍光固化後之成品觀察，彙整比較如表 4.15：

表 4.15、PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light 載體列印比較

比較項目	PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light	PVA-PEGDA/ Light
光穿透性	受污泥顏色影響且有 40 nm 二氧化矽添加穿透率可能降低	穿透性較佳
成品觀察結果	成品偏軟、支撑性較低	結構緻密、支撑性較佳
成形完整性	結構完整、整體偏軟	結構完整、固化效果好
生物相容性	良好	良好

4.4.3 固定化載體培養條件之適用性分析

為評估海藻酸鈉(SA)是否影響固定化 ANAMMOX 菌群之活性表現，本研究將列印完成之載體置入初始總氮濃度(TN) 80 mg-N/ L 之低氮基質中進行預活化，並進行初步比活性(Specific Anammox Activity, SAA)測試。測試過程中，所有反應瓶均採無氧密封操作，以確保 ANAMMOX 反應條件。

批次反應瓶配置如圖 4.35 所示，圖 4.35 a 為 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 載體，圖 4.35 b 為 PVA-PEGDA/ Light 載體。

(a)



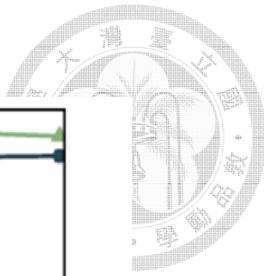
(b)



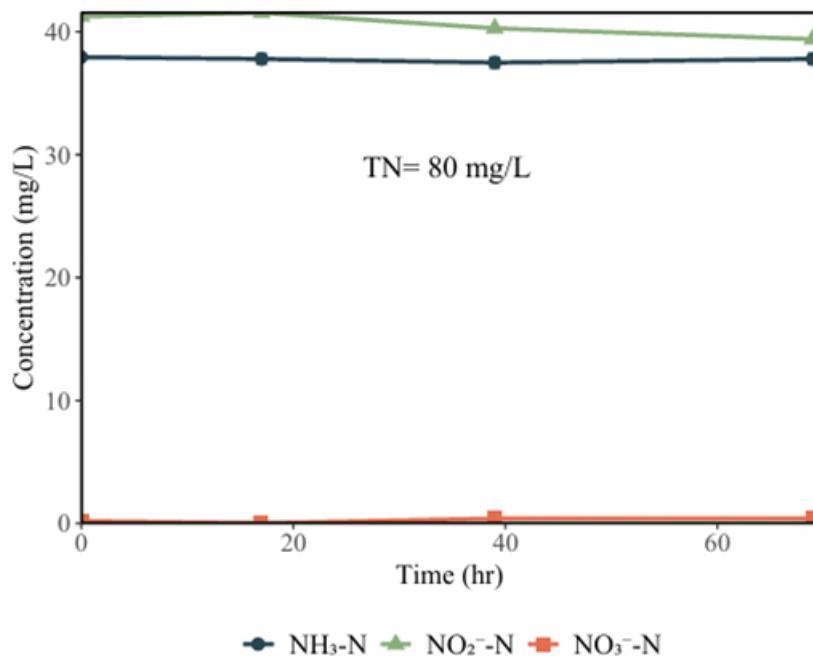
圖 4.35、ANAMMOX 固定化載體批次反應瓶測試狀態(a) PVA-SA-PEGDA/

Ca-Light 載體；(b) PVA-PEGDA/ Light 載體

初步空白載體測試結果如圖 4.36 所示，圖 4.36 a、b 分別為 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light 空白載體之反應趨勢。從反應趨勢可見，兩組空白載體於反應期間氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)及亞硝酸氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)濃度雖有些微波動，但整體變化趨勢穩定，顯示載體本身不會吸附氨氮與亞硝氮，且於測試期間未檢出硝酸氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)產生，顯示系統維持良好之無氧密封條件，並可有效排除硝化作用之干擾。相關濃度變化數據整理如表 4.16。



(a)



(b)

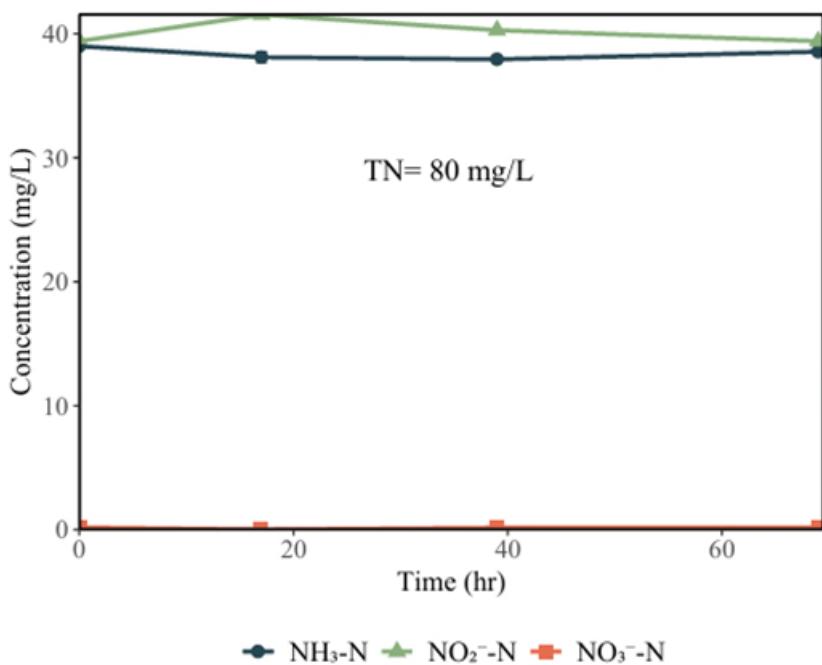


圖 4.36、初步空白載體(TN = 80 mg/ L)測試結果(a) PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light ; (b) PVA-PEGDA/ Light

表 4.16、初步空白載體(TN = 80 mg/ L)測試結果

(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light & PVA-PEGDA/ Light)

Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ -N
PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light						
0	37.95	0.21	41.24	0.05	0.18	0.25
17	37.80	0.42	41.53	0.06	0.00	0.00
39	37.50	0.42	40.29	0.01	0.39	0.00
69	37.80	0.42	39.40	0.07	0.38	0.01
PVA-PEGDA/ Light						
0	39.00	0.00	39.51	0.04	0.11	0.28
17	38.10	0.40	41.24	0.02	0.00	0.00
39	37.95	0.25	40.19	0.00	0.16	0.00
69	38.55	0.25	39.22	0.06	0.18	0.05

PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light 兩種固定化

ANAMMOX 載體之初步測試如圖 4.37 所示，兩者於 69 小時內的氮源變化呈現顯著差異。首先是 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light ANAMMOX 載體(圖 4.37 a)，反應時間內 NH₃-N 從 37.7 mg-N/ L 降至 36.8 mg-N/ L ，基本持平，然而 NO₂-N 却從 33.01 mg-N/ L 下降至 23.72 mg-N/ L ；而 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體(圖 4.37 b)在反應期間 NH₃-N 濃度由 38.0 mg-N/ L 下降至 26.2 mg-N/ L ，NO₂-N 則由 40.16 mg-N/ L 下降至 6.27 mg-N/ L ，表示此配方之 ANAMMOX 載體具有較良好之反應活性。表 4.17 為 PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之初步測試(TN = 80 mg/ L)

結果。

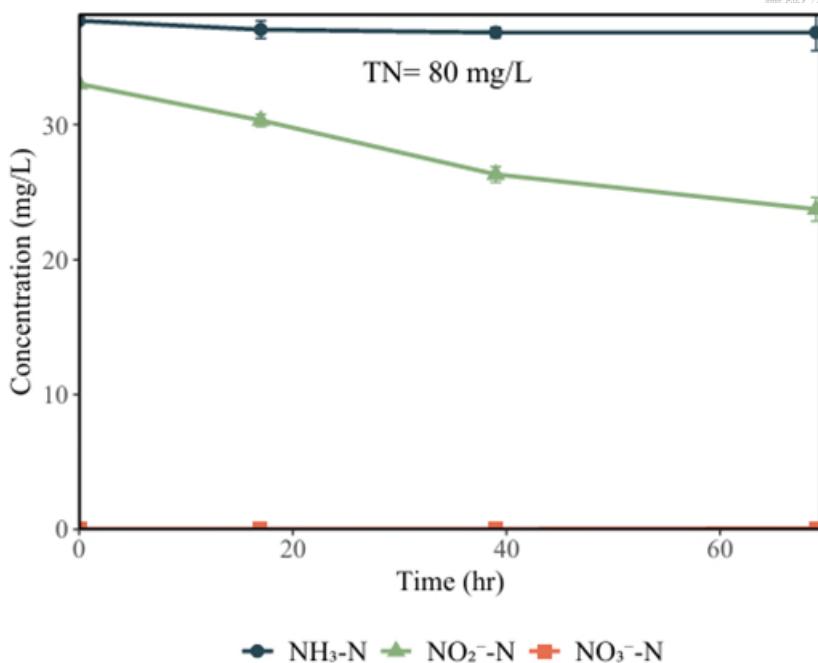
造成此兩種載體活性表現差異之可能原因推測如下：首先，PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 輽體中 SA 成分雖然經鈣離子交聯固定，但是仍可能於反應初期釋放可溶性有機碳源。前人研究中也指出，固定化載體於反應初期可觀察到總有機碳(TOC)濃度有上升的現象(楊采儒，2023)，而有機碳的提升，可能促進系統內異營菌(如脫硝菌)增生，進而與 ANAMMOX 競爭養分，抑制 ANAMMOX 反應的進行；其次，交聯型水凝膠結構較密，可能限制基質質傳效率(Lewus et al., 2001)，然而在前人研究中，雖然生物固定化載體反應效率與懸浮態相比偏弱，並非最主要的因素(楊采儒，2023)。

相對而言，PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體配方未含 SA 成分，固化結構致密均勻(Zhang et al., 2015b)，可減少可溶性有機碳釋放，提高質傳效率，可對 ANAMMOX 菌創造較適宜之無機環境進行生長與反應。反應期間未偵測到 NO_3^- -N 累積，推測可能因載體列印後初期菌群活性尚未完全恢復所致。

綜合上述之結果，初步測試顯示 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體具有較佳之 ANAMMOX 活性反應與去氮效率，顯示此墨水配方更適合做為固 ANAMMOX 菌群固定化之載體材料，後續研究將依據此配方之墨水進行試驗。另外，為了進一步量化載體固定化之效果，將進行比活性(SAA)測試與分析。



(a)



(b)

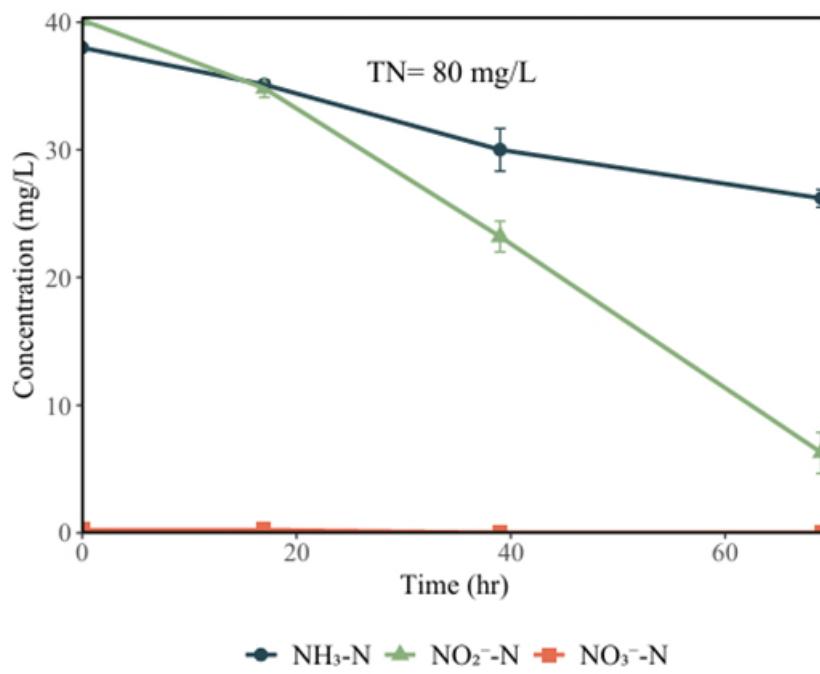


圖 4.37、初步 ANAMMOX 載體(TN = 80 mg/L)測試結果(a) PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light ; (b) PVA-PEGDA/ Light

表 4.17、ANAMMOX 載體(TN = 80 mg/ L)測試結果

(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light & PVA-PEGDA/ Light)



Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light						
0	37.70	0.00	33.01	0.70	0.00	0.00
17	37.05	0.65	30.32	0.45	0.00	0.00
39	36.83	0.37	26.31	0.58	0.00	0.00
69	36.83	1.35	23.72	0.88	0.06	0.10
PVA-PEGDA/ Light						
0	38.00	0.17	40.15	0.22	0.24	0.21
17	35.10	0.30	34.80	0.69	0.23	0.21
39	30.00	1.67	23.20	1.20	0.00	0.00
69	26.20	0.69	6.26	1.62	0.00	0.00

4.5 固定化與懸浮態 ANAMMOX 菌之活性比較分析



4.5.1 氮源濃度漸增下之活性反應與耐受性分析

為探討固定化 ANAMMOX 菌群在不同氮濃度負荷條件下的反應性與耐受性，本研究分別設定漸升總氮(Total Nitrogen, TN)初始濃度為 80、120、160 與 200 mg-N/ L，並進行批次反應測試，同樣有進行空白載體測試，結果如圖 4.38 a，氨氮(NH₃-N)、亞硝酸氮(NO₂⁻-N)與硝酸氮(NO₃⁻-N)濃度基本持平。PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體於各對應條件下的氮源濃度變化趨勢如圖 4.38 b 所示。各 Cycle 之 PVA-PEGDA/ Light 空白載體與 ANAMMOX 輽體 SAA 表現見附表 8、9。主要監測氨氮(NH₃-N)、亞硝酸氮(NO₂⁻-N)與硝酸氮(NO₃⁻-N)濃度隨時間的變化，並計算反應期間的專一活性(Specific Anammox Activity, SAA)。

在 TN = 80 mg-N/ L (C1)條件下，約 2.9 天內氨氮濃度由 38 mg-N/ L 降至 26.2 mg-N/ L，而亞硝氮則是由 40.16 mg-N/ L 降至 6.27 mg-N/ L，亞硝氮濃度降低速率較快，推測可能是因為系統中仍然存在脫硝菌的殘存活性以及固定化載體列印過程造成部分菌群死亡從而釋放有機碳進而促進異營菌競爭有關。根據氨氮下降速率推算亞硝酸氮理論消耗量並計算比活性(Specific ANAMMOX Activity, SAA)，結果顯示，TN = 80 mg-N/ L 之 SAA 值為 0.49 mg-N/ mg-VSS-day。

系統原計畫將氮源濃度提升至 TN = 120 mg-N/ L (C2)，然實際偵測 TN = 100 mg-N/ L，反應天數延長至 4 天，氨氮濃度由 51.3 mg-N/ L 降至 16 mg-N/ L，而亞硝氮則是由 52.32 mg-N/ L 降至 0.49 mg-N/ L，SAA 值提升至 1.06 mg-N/ mg-VSS-day。

隨後將總氮濃度提升至 TN = 160 mg-N/ L (C3)，反應天數為 4.6 天，氨

氮濃度由 82.2 mg-N/L 降至 29.8 mg-N/L，而亞硝氮則是由 80.10 mg-N/L 降至 9.00 mg-N/L，SAA 值提升至 1.40 mg-N/mg-VSS-day。

最終提高至 $TN = 200 \text{ mg-N/L}$ (C4)，於 4.95 天完成反應，氮氮濃度由 102.8 mg-N/L 降至 40.6 mg-N/L，而亞硝氮則是由 101.25 mg-N/L 降至 21.10 mg-N/L，SAA 值最終提升至 1.51 mg-N/mg-VSS-day。

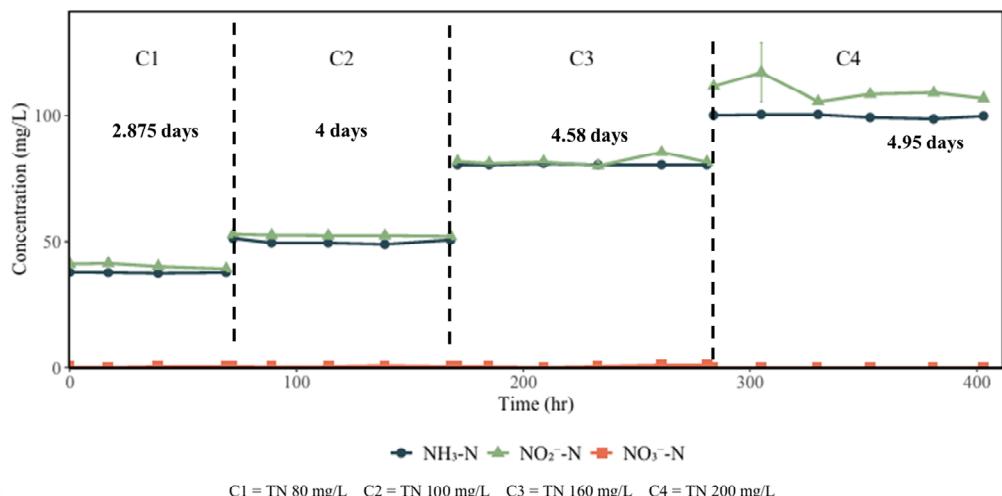
在總體測試中，隨著總氮濃度的提升，氮氮與亞硝氮的降解速率同步提高，且 NO_3^- -N 累積量增加，符合 ANAMMOX 反應中硝酸氮作為副產物的特性，初期 C1 ($TN = 80 \text{ mg-N/L}$) 並無觀察到硝酸氮，C2 ($TN = 100 \text{ mg-N/L}$) 上升至 3.51 mg-N/L，C3 ($TN = 160 \text{ mg-N/L}$) 產生 3.20 mg-N/L，最後 C4 ($TN = 200 \text{ mg-N/L}$) 之硝酸氮濃度達到 5.32 mg-N/L。懸浮態 ANAMMOX 菌之 SAA 結果為 1.33 mg-N/mg-VSS-day，表示本研究列印之 PVA-PEGDA/Light ANAMMOX 載體經過一系列氮源濃度提升活化復甦後，其菌群活性可迅速恢復甚至比懸浮態之 ANAMMOX 要高，在 Ali 與 Wang 等人研究中都表明，將 ANAMMOX 菌固定化後明顯提升活性(Ali et al., 2015; Wang et al., 2025)。各 Cycle 之 PVA-PEGDA/Light ANAMMOX 載體 SAA 表現如表

4.18。



(a)

Blank Carrier



(b)

$$\text{VSS (mg)} = 350 \text{ mg/L} * 0.055 = 19.25 \text{ mg}$$

0.49 mg-N/ mg-VSS-day

1.40 mg-N/ mg-VSS-day

1.51 mg-N/ mg-VSS-day

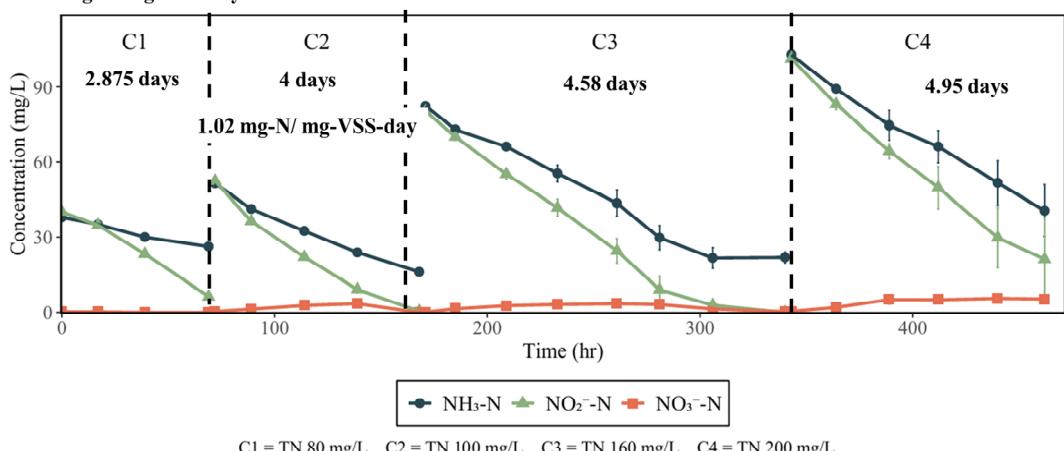


圖 4.38、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之趨勢與 SAA 結果

(a) 空白載體；(b) PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體

表 4.18、不同氮源濃度下 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之 SAA

Cycle	TN (mg-N/ L)	反應時間 (Day)	SAA (mg-N/ mg-VSS-day)
C1	80	2.9	0.49
C2	100	4	1.06
C3	160	4.58	1.40
C4	200	4.95	1.51

4.5.2 固定化載體之保存穩定性與活性維持效果探討

為探討不同保存條件對固定化載體活性穩定性的影響，本研究將製備完成且已確認初始活性之固定化載體分為三組，分別進行以下保存處理：S1 組以 4 °C 條件下濕潤保存，S2 組於- 20 °C 條件下添加 20 % (v/v) 甘油進行冷凍保存，S3 組則於室溫(約 25 °C)條件下濕潤保存，保存為期 10 天，解封立刻投入總氮濃度 80 mg-N/L 之基質中進行活化同時測定比活性(SAA)，並持續增加總氮濃度(TN = 120 mg-N/L、160 mg-N/L、200 mg-N/L)，評估 ANAMMOX 載體在不同飢餓條件下菌群活性是否能夠恢復。圖 4.39 為各組解封後狀態。

結果顯示如圖 4.40，數據結果見附表 10 – 12。空白載體(圖 4.40 a)同樣不受影響，各氮源濃度持平。S1 組(圖 4.40 b)在 TN = 80 mg-N/L 下，氨氮濃度由 38.20 降至 19.00 mg-N/L，亞硝氮由 38.60 降至 9.81 mg-N/L，為期 2.79 天，SAA 為 0.68 mg-N/mg-VSS-day；TN = 120 mg-N/L 時，氨氮濃度由 63.4 降至 34.4 mg-N/L，亞硝氮由 61.13 降至 7.26 mg-N/L，為期 2.875 天，SAA 上升至 1.00 mg-N/mg-VSS-day；重新更換基質使 TN = 160 mg-N/L，反應時間 4.95 天，氨氮由 82.20 降至 23.80 mg-N/L，亞硝氮由 70.87 降

至 1.76 mg-N/L，SAA 提升至 1.05 mg-N/mg-VSS-day，而最終 TN = 200 mg-N/L 時，氨氮由初始 102.40 mg-N/L 降至 28.00 mg-N/L，亞硝氮則從原始的 102.03 降到 8.17 mg-N/L，SAA 確認為 1.56 mg-N/mg-VSS-day。

S2 組(圖 4.40 c)在 TN = 80 mg-N/L 情況下，發現在反應期間雖然亞硝氮有明顯下降(37.99 降至 0 mg-N/L)，但是氨氮濃度無任何變化，且再經過一輪測試發現狀況依舊如此，亞硝氮的消耗速率甚至更快，且厭氧瓶內開始出現混濁的情況(圖 4.41 a)，除此之外，載體開始出現破碎的情形(圖 4.41 b)，顯示載體內部已出現菌群死亡且因破損情況造成菌群流失，因此 S2 組認為已無任何 ANAMMOX 活性反應發生，測試中止於 TN = 120 mg-N/L。

而 S3 組別(圖 4.40 d)，狀況與 S1 組別相近，TN = 80 mg-N/L 下，氨氮濃度由 37.70 降至 17.90 mg-N/L，亞硝氮由 38.16 降至 8.75 mg-N/L，為期 2.79 天，SAA 為 0.70 mg-N/mg-VSS-day；TN = 120 mg-N/L 時，氨氮濃度由 62.40 降至 33.00 mg-N/L，亞硝氮由 62.05 降至 18.79 mg-N/L，為期 2.875 天，SAA 提升至 1.01 mg-N/mg-VSS-day；TN = 160 mg-N/L 時，反應時間 4.95 天，氨氮由 80.60 降至 21.60 mg-N/L，亞硝氮由 78.30 降至 1.11 mg-N/L，SAA 為 1.18 mg-N/mg-VSS-day；最後，TN = 200 mg-N/L 時，氨氮由初始 102.60 mg-N/L 降至 32.00 mg-N/L，亞硝氮則從原始的 103.01 降到 6.60 mg-N/L，SAA 最終認為 1.55 mg-N/mg-VSS-day。

相對地，S2 組(-20 °C 甘油保存)儘管添加了 20 % (v/v) 甘油作為保護劑，然而因材料特性影響，推測甘油難以充分滲透至載體內部，致使內部細菌無法有效抗凍，進而導致大量細胞死亡。且保存期間載體長時間浸泡於甘油溶液中，導致結構溶脹、穩定性下降，進而產生載體破碎與菌群流失情形。此結果與 Wang 等人之研究趨勢相符，該研究指出冷凍保存條件下 ANAMMOX 顆粒活性大量下降，且菌群流失嚴重，即使復甦處理，能恢復活性之機率極低(Wang et al., 2021b)。而以 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^-$ 觀察，初期 S1 與 S3 都

是亞硝酸氮消耗較多，到後期($TN = 160, 200 \text{ mg-N/L}$)S1 組亞硝酸氮消耗仍然較多，S3 則較穩定。因此以最經濟且活性較穩定的保存方法進行挑選，以室溫保存 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體是短期保存的最佳選擇。表

4.19 為不同保存條件下 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之比活性(SAA)比較。

(a)



(b)



(c)

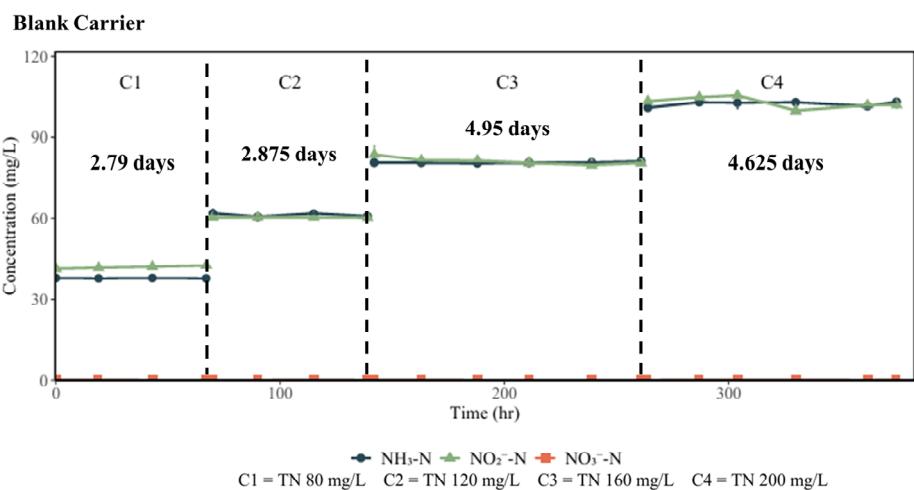


圖 4.39、保存性各測試組 10 天保存後載體狀態

(a) 4°C 保存(S1)；(b) -20°C 冷凍保存(S2)；(c)室溫保存



(a)



(b)

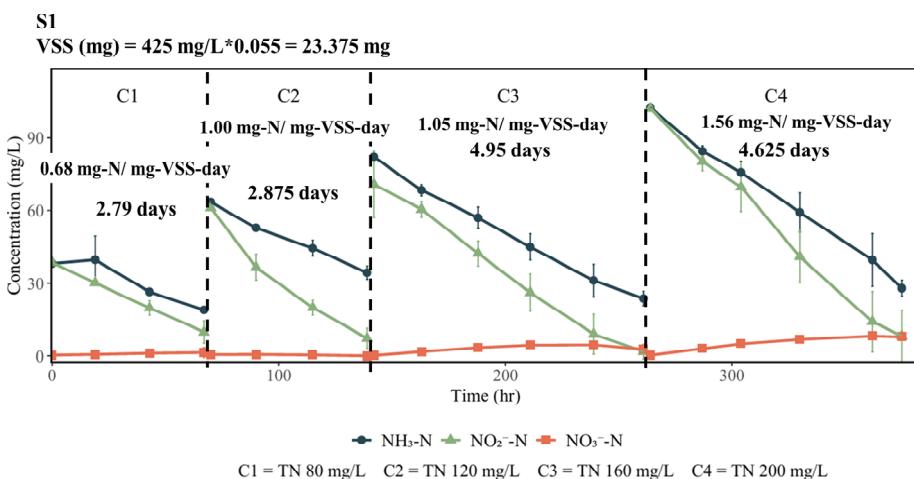
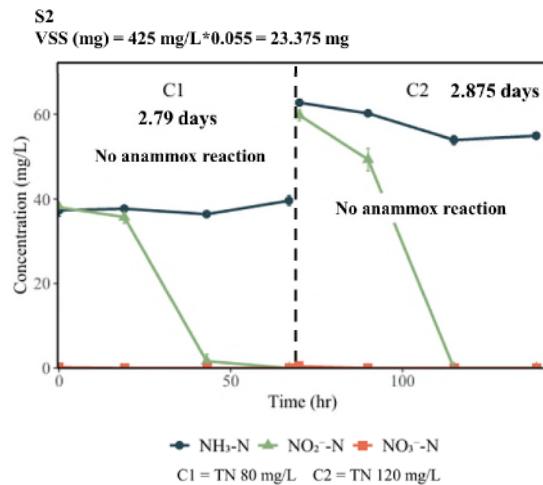


圖 4.40、保存性測試各組氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之趨勢與 SAA
結果(a)空白載體；(b) 4°C 保存(S1)；(c) -20°C 冷凍保存(S2)；(d)室溫保存



(c)



(d)

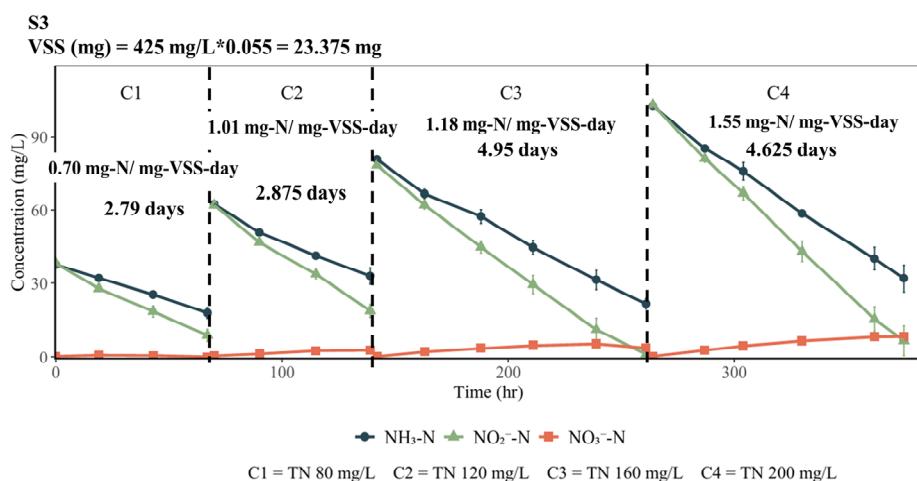
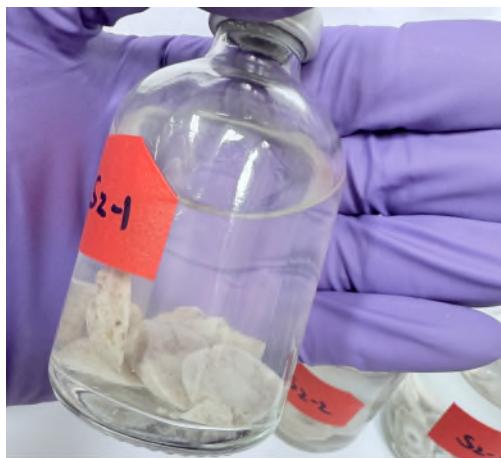


圖 4.40、保存性測試各組氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之趨勢與 SAA 結果(a)空白載體；(b) 4°C 保存(S1)；(c) -20°C 冷凍保存(S2)；(d)室溫保存 (續)

(a)



(b)



圖 4.41、S2 組(-20 °C冷凍保存) (a)反應後厭氧瓶混濁情形；(b)載體破碎狀況

表 4.19、不同保存條件下 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體之比活性

Cycle	TN (mg-N/ L)	反應時間 (Day)	SAA (mg-N/ mg-VSS-day)
S1			
C1	80	2.79	0.68
C2	120	2.875	1.00
C3	160	4.95	1.05
C4	200	4.625	1.56
S2			
C1	80		No ANAMMOX activity was detected
C2	120		
S3			
C1	80	2.79	0.70
C2	120	2.875	1.01
C3	160	4.95	1.18
C4	200	4.625	1.55



4.6 固定化載體之結構與菌體生長狀態分析

為確認所選用固定化載體材料之微結構特性與微生物生長情形，本研究針對 PVA-PEGDA/ Light 輽體進行掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscopy, SEM)觀察載體內外結構與雷射共軛焦顯微鏡(Confocal Microscope)結合活/死細胞螢光染色(LIVE/ DEAD Cell Staining)進行載體內菌體存活狀態分析。藉由載體微結構與菌體生存狀態之探討，作為後續固定化效果與反應性能評估之依據。

4.6.1 輽體微結構觀察(SEM)結果與孔隙性探討

本研究以場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM, JEOL JSM-7600F)觀察 PVA-PEGDA/ Light 空白(內部)與反應一段時間後之 ANAMMOX 輽體(內、外部)結構特性與微生物附著情形。圖 4.42 a 與 b 為空白載體放大 500 X 與 1000 X 之內部結構，呈現小顆粒狀，與分佈不均之小孔洞。由於列印方式是層狀向上列印，所以可看到載體內走向會略有不同。

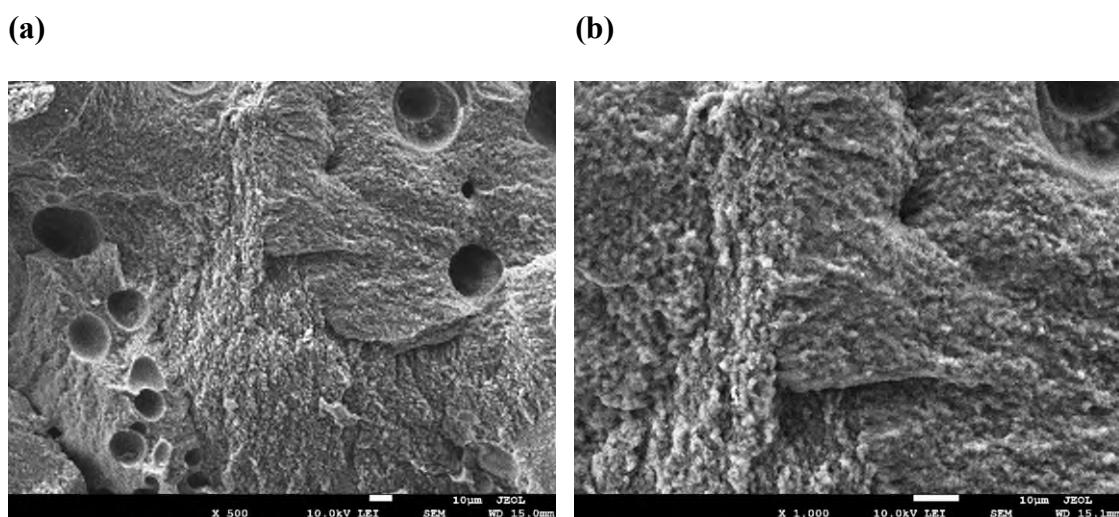


圖 4.42、PVA-PEGDA/ Light 空白載體 SEM 拍攝之內部結構

(a) 500 X ; (b) 1000 X

圖 4.43 為 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體內外結構不同放大倍率之掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察結果。以高倍率(1000 X)觀察載體表面結構(圖 4.43 a)，可以看見表層具有發達的網狀孔洞結構，孔徑範圍落在 5–10 微米，且孔洞分佈均勻，此觀察結果與 Zang 等人結果相符(Zhang et al., 2015b)。此細孔之網絡結構可以大幅提升載體之比表面積(specific surface area)，提供微生物附著與生長所需的空間，促進生物膜形成，利於提升固定化之效果。除此之外，連通性良好的細孔結構有助於反應物(如氨氮、亞硝氮)擴散滲透進入載體內部，同時也能釋放產物(如氮氣)，降低質傳阻力，促進 ANAMMOX 菌群生理活性與反應速率。整體而言，PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體的表層兼具促進微生物附著與增進物質交換之功能，對於提升固定化系統之反應性有重要貢獻。

進一步觀察載體的內部結構，首先以 50 X 觀察(圖 4.43 b)，可以看見載體內部是分部大量不規則孔洞(50–100 微米)，且部分孔洞彼此連通，形成三維多孔結構，其餘部分是呈現緻密結構，上面可見一些條狀物附著。此宏觀孔隙結構有助於增進物質交換及提供微生物附著棲息空間，同時維持載體之機械穩定性。

針對孔隙較發達部分放大至 1000 X(圖 4.43 c)，可以看見更明顯的條狀與團塊聚集在孔壁表面，推測認為是菌群聚集與生物膜形成(Zhang et al., 2022)。此圖可說明孔隙發達區域能夠有效支持微生物固定與生長，幫助載體穩定運行。而內部孔隙稀疏區域放大 1000 X 之結果如圖 4.43 d，由於結構較為緻密，孔隙分部較稀疏且孔徑較小，僅能看見少量絲狀微生物附著，相較於孔隙發達區域顯著減少，推測可能是因為孔隙結構密實限制了反應物滲透與微生物生長空間，導致固定效果相對較差。

綜合以上觀察結果，PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體內部具備多尺度孔隙結構，表面孔隙網絡適合基質傳輸與微生物附著，內部孔隙發達區域

有利於微生物滲透生長，而緻密區域則顯示微生物附著量較少。此載體結構可以提升微生物固定化效果與反應性能，同時兼顧機械穩定性，顯示 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體具有良好的應用潛力。

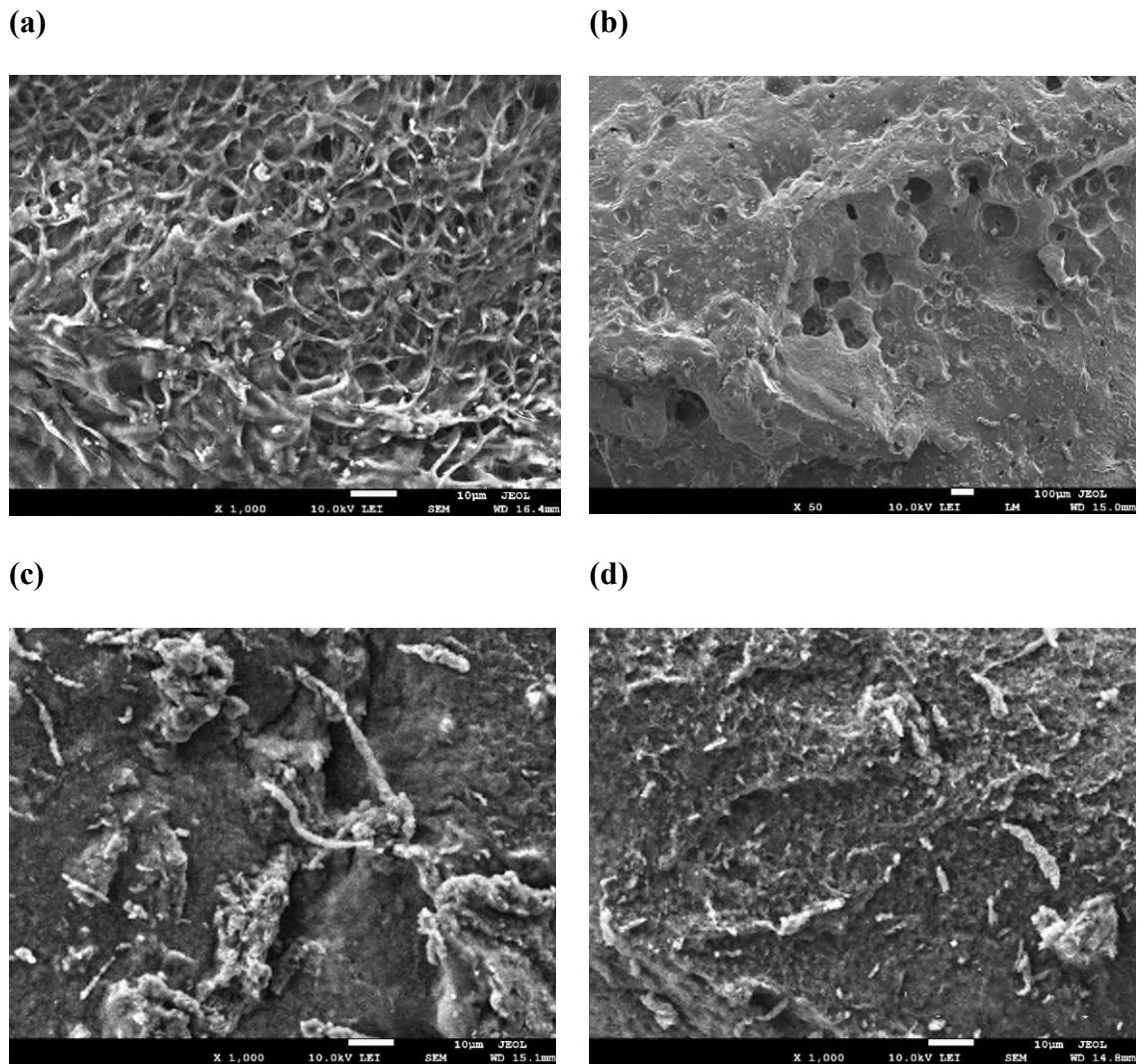


圖 4.43、PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體內外結構不同放大倍率拍攝之觀察結果(a) 1000 X 載體表面；(b) 50 X 載體內部；(c) 1000 X 內部孔隙發達區域；(d) 1000 X 內部孔隙稀疏區域

4.6.2 輽體內部菌體生長狀態螢光染色結果分析

為進一步評估 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體內部微生物生長與存活情形，本研究採用 Thermo Fisher 之 LIVE/ DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (L7012) 進行螢光染色分析。

染色後利用國立臺灣大學貴重儀器中心之 Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System (共軛焦光譜顯微鏡) 進行觀察，設定 488 nm 雷射激發綠色螢光 (SYTO 9，標示活菌)，及 561 nm 雷射激發紅色螢光 (Propidium Iodide, PI，標示死菌)，倍率設定 40 X 進行影像擷取。螢光影像經 ImageJ 軟體進行分色與 Threshold 二值化處理後，利用 Analyze Particles 功能分析微生物活菌與死菌之面積比例。

圖 4.44 為空白載體染色後進行顯微鏡觀察之白光與雷射光激發後拍攝，白光呈現均質狀態無任何團聚的物質，而雷射光激發後無任何螢光反應，表示空白載體於列印、反應與染色過程無受到汙染，且材料本身不具自發螢光現象，因此不影響後續 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體的結果判讀。

進一步分析列印完後直接使用之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 輽體，分為反應前之載體及經氮源濃度漸增測試達 TN 200 mg-N/L 之載體，其白光與雷射光激發後之結果如**圖 4.45**。結果顯示，初始載體內菌群分布狀態有明顯團聚現象，而經過一段時間的使用後，團塊明顯分散，顯示菌體分布趨於均勻。

本研究也分析了保存性測試之各組別反應前後活/死細胞差異。其中 S1 (4 °C 保存) (**圖 4.46**) 與 S3 (室溫保存) (**圖 4.48**) 組別經飢餓處理並重新供給養分 (氮源濃度漸增測試達 TN 200 mg-N/L) 後，活菌比例明顯變多，且菌群分布呈現向外擴散趨勢；相對而言，S2 (-20 °C 保存) (**圖 4.47**) 組別在反應後卻能看到菌數變少且死菌比例變高，表示經過冷凍之載體極容易破碎，造成載體



內菌群流失死亡，與 4.5.2 小節之保存性結果相符。

活菌與死菌面積比例經 ImageJ 分析彙整於表 4.20。直接使用之載體反應前活菌(SYTO 9)面積相對比例為 62.11 %，死菌(PI)面積相對比例為 38.14 %。而反應後活菌相對比例上升至 79.37 %，死菌相對比例下降至 20.62 %，表示載體內部環境有利於微生物生長，能有效提升群落活性並降低死亡率。

而保存性測試組別之反應前結果顯示，S1 活菌相對比例為 68.11 %，死菌相對比例為 31.89 %；S2 活菌相對比例為 44.49 %，死菌相對比例為 55.51 %；S3 活菌相對比例為 65.94 %，死菌相對比例為 34.06 %，S1 與 S3 之反應前活死菌分佈結果與直接使用之載體反應前結果相近，顯示此兩種保存條件對菌群的傷害較小，而 S2 之死菌比例較高，顯示此載體內菌群經冷凍後受到一定程度的損傷。各組別經養分供給反應後，活死菌相對比例結果如下：S1 組活菌相對比例上升至 84.65 %，死菌相對比例降至 15.34 %；S3 組活菌相對比例上升至 83.62 %，死菌相對比例為 16.38 %，總體菌群覆蓋面積提升，且活菌相對佔比較高；S2 總菌群相對佔比面積下降，僅剩 3.413 %，其中有 57.26 %為死菌，再次證明 S2 組別菌群流失死亡嚴重，不適合作為 PVA-PEGDA/ Light 輽體之保存條件。

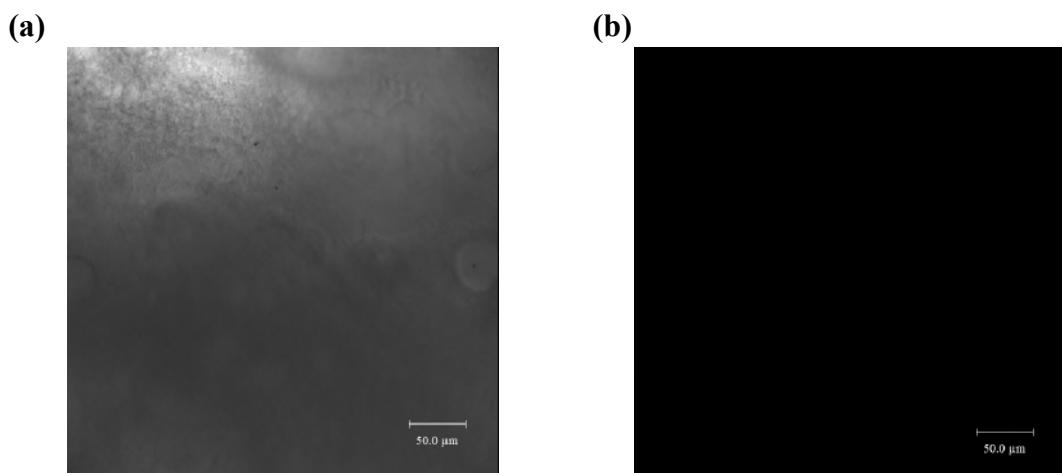


圖 4.44、共軛焦顯微鏡拍攝之 PVA-PEGDA/ Light 空白載體(a)白光拍攝；(b)雷射光激發後拍攝

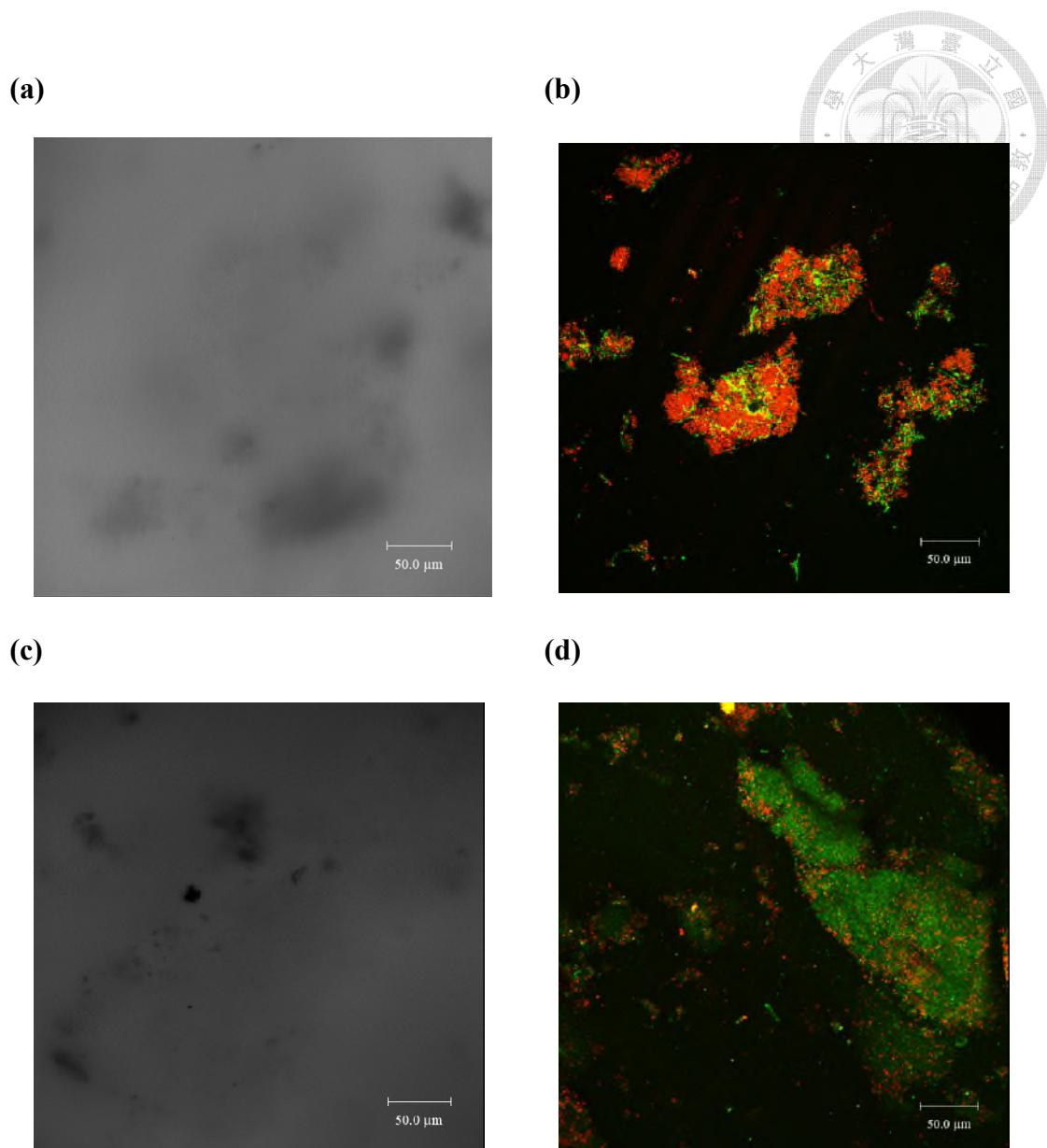


圖 4.45、直接使用之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度漸增測試(TN 200 mg-N/ L) 之白光與雷射光激發後結果
 (a)反應前白光；(b)反應前雷射光激發；(c)測試後白光；(d)測試後雷射光激發

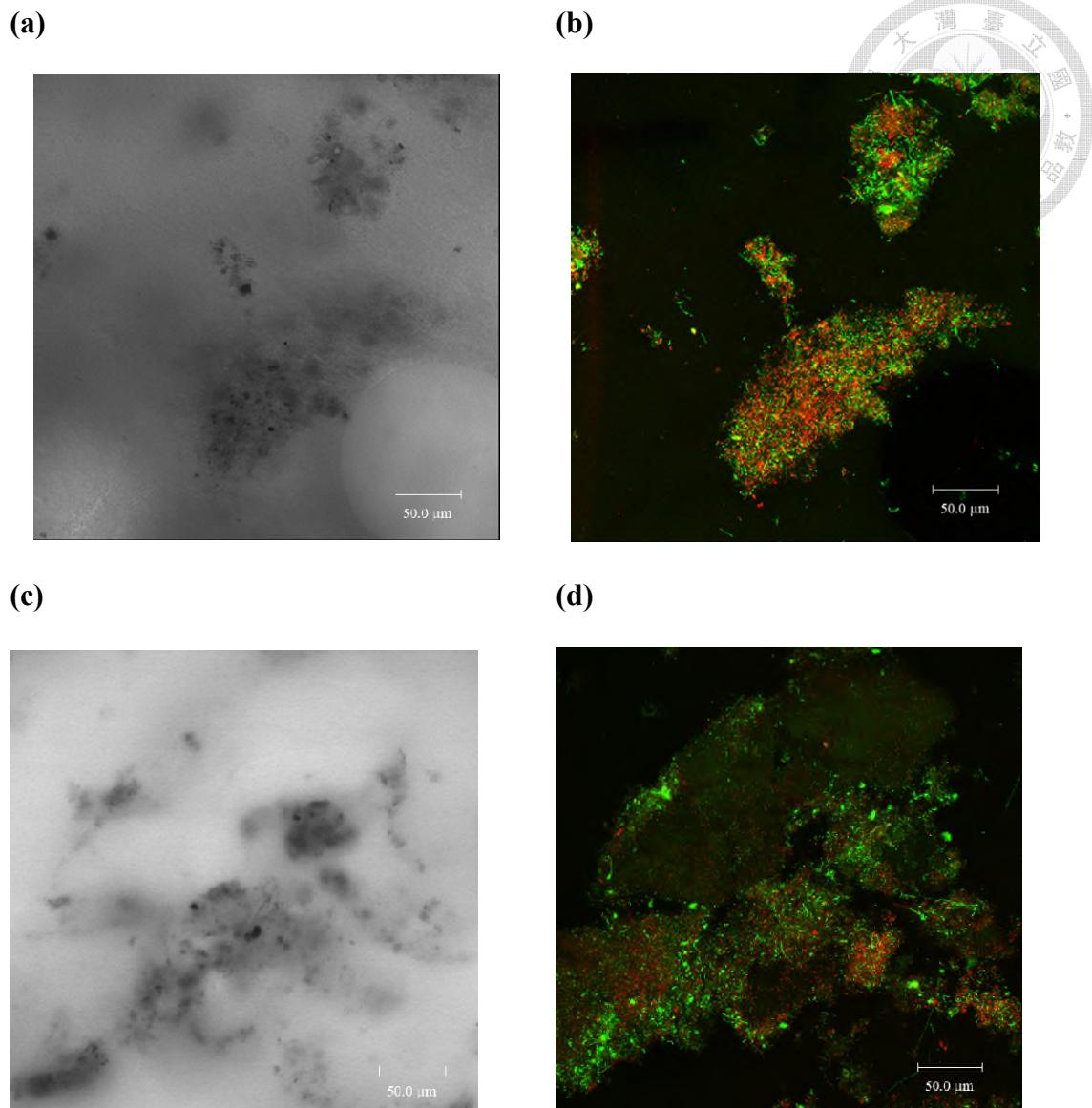


圖 4.46、4 °C 保存之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源濃度漸增測試(TN 200 mg-N/ L)之白光與雷射光激發後結果

(a)反應前白光；(b)反應前雷射光激發；(c)測試後白光；(d)測試後雷射光激發

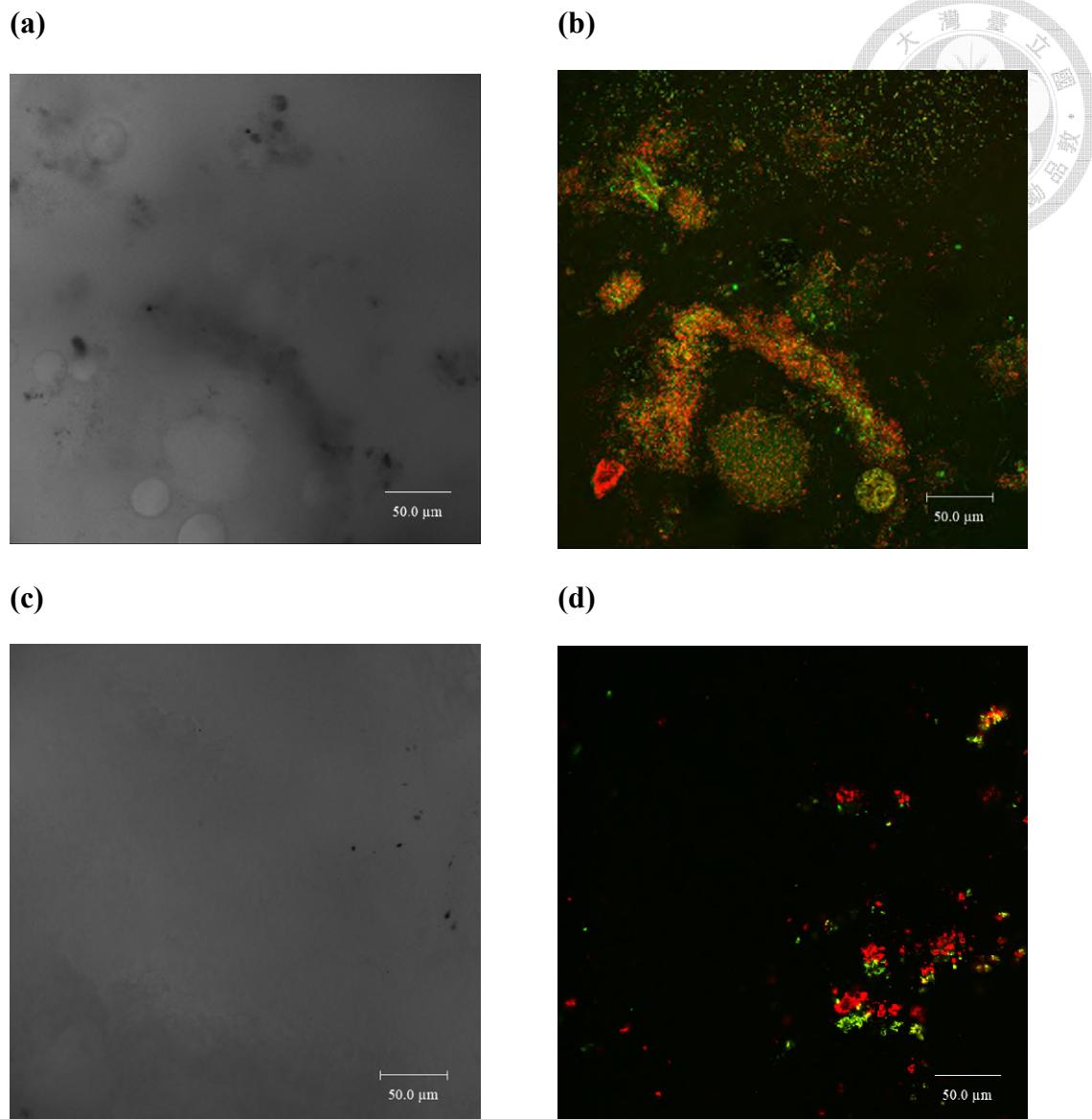
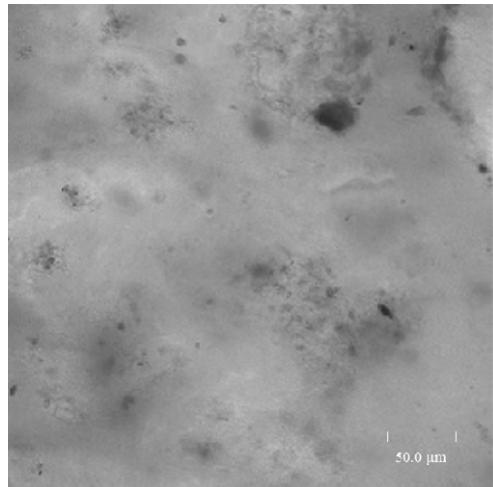


圖 4.47、-20 °C 保存之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源

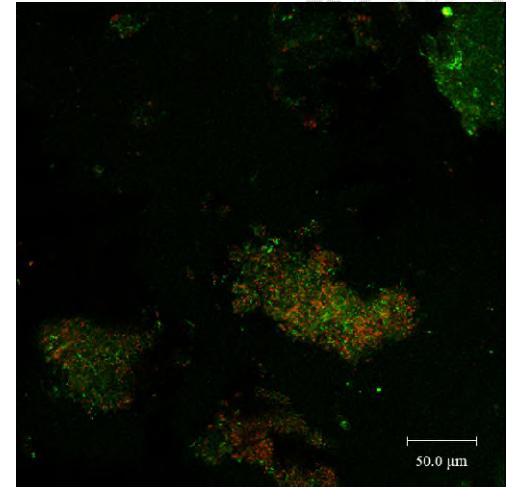
濃度漸增測試(TN 200 mg-N/ L)之白光與雷射光激發後結果

(a)反應前白光；(b)反應前雷射光激發；(c)測試後白光；(d)測試後雷射光激發

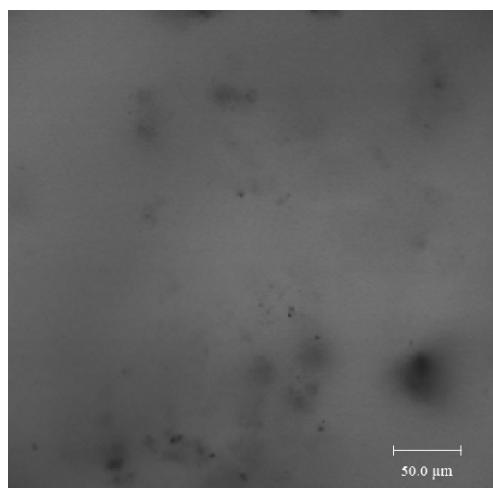
(a)



(b)



(c)



(d)

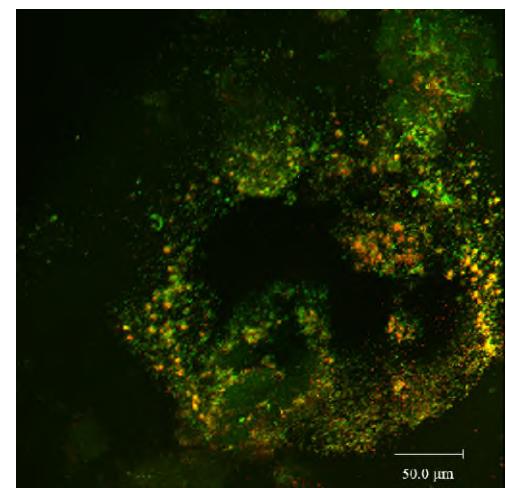


圖 4.48、室溫保存之 PVA - PEGDA/ Light ANAMMOX 載體反應前與經氮源

濃度漸增測試(TN 200 mg-N/ L)之白光與雷射光激發後結果

(a)反應前白光；(b)反應前雷射光激發；(c)測試後白光；(d)測試後雷射光激發

表 4.20、PVA-PEGDA/ Light 固定化載體於反應前後及不同保存條件下微生物活
菌與死菌面積比例分析結果

狀態	活菌面積相		SD	死菌面積相		SD
	對比例(%)	Live Cell		對比例(%)	Dead Cell	
直接使用(反應前)	62.11	0.090		38.14	0.093	
直接使用(反應後)	79.37	0.009		20.62	0.009	
S1 (4°C , 反應前)	68.11	0.066		31.89	0.067	
S1 (4°C , 反應後)	84.65	0.009		15.34	0.009	
S2 (-20°C , 反應前)	44.49	0.042		55.51	0.042	
S2 (-20°C , 反應後)	42.74	0.064		57.26	0.064	
S3 (室溫 , 反應前)	65.94	0.036		34.06	0.036	
S3 (室溫 , 反應後)	83.62	0.009		16.38	0.009	



第五章 結論與建議



5.1 結論

本研究評估以實驗室建立之 ANAMMOX 反應系統的整體運行與穩定性，並進一步探討不同固定化材料對 ANAMMOX 菌群活性之影響與應用可行性。研究內容涵蓋：(1)系統啟動與反應槽之總氮去除表現；(2)反應槽內菌群演替與 ANAMMOX 優勢菌分析；(3)懸浮污泥與固定化載體之 SAA 表現比較；(4)列印材料篩選與保存性測試。研究主要成果如下

1. 本研究以垃圾掩埋場滲出水處理廠生物處理單元活性污泥與食品廠廢水處理廠之活性污泥為接種源，成功建立並穩定運行兩組 ANAMMOX 反應系統 (AC1、AC2)，於第 94 天觀察到氨氮與亞硝氮穩定消耗，顯示已活化系統中 ANAMMOX 活性，並以此進行植種建立 AC3 與 AC4，成功快速啟動。整體四組反應槽去氮效率逐漸提升，最終達 60 – 90 % 不等。
2. 菌相定序結果顯示，各槽初期以有機物降解菌與異營脫氮菌為主，隨運行時間演替為以 *Candidatus Brocadia* 為優勢的 ANAMMOX 群落結構。其中以 AC3 富集效果最佳，ANAMMOX 相對豐度達 8.2%。此外，系統內亦偵測到 *Denitratisoma* 與 *Anaerolineaceae uncultured* 等潛在支援菌，其比例變化與系統功能密切相關。
3. 懸浮 ANAMMOX 菌群活性以 Specific ANAMMOX Activity (SAA) 測試量化，AC1 反應槽測 SAA 為 1.33 mg-N/ mg-VSS-day，顯示其活性表現良好，適合作為固定化前之基準。

4. 固定化材料方面，兩種配方(PVA-SA-PEGDA/ Ca-Light 與 PVA-PEGDA/ Light)均可成功列印，但後者於初步活性測試中表現優異，最終選定作為後續固定化研究主體。



5. 使用 PVA-PEGDA/ Light 配方製成之固定化載體，於低氮濃度條件下 SAA 為 $0.49 \text{ mg-N/ mg-VSS-day}$ ，隨 TN 濃度提升至 200 mg-N/ L ，SAA 最高達 $1.51 \text{ mg-N/ mg-VSS-day}$ ，優於懸浮態菌群。

6. 載體保存 10 天後進行活性測試，S1 (4°C) 與 S3 (室溫) 條件下 SAA 分別為 1.56 與 $1.55 \text{ mg-N/ mg-VSS-day}$ ，而 S2 (-20°C 冷凍保存) 無 ANAMMOX 活性表現。考量保存條件、設備成本與實務操作性，S3 為最具應用潛力之保存方式，不需冷藏且無需添加保護劑，仍可有效維持載體活性。



5.2 建議

- 1. 系統啟動策略:** ANAMMOX 系統啟動初期可透過環境條件調控或添加抑制劑進行菌群篩選，排除硝化菌與脫硝菌等與 ANAMMOX 菌群競爭資源之微生物，以加快啟動時間並穩定菌群結構。
- 2. 生物墨水之列印性:** PVA-PEGDA/ Light 輽體雖具較佳 SAA 活性表現，但因墨水黏性較低，適用之載體形狀與 PVA SA PEGDA/ Ca-Light 略有差異。建議未來可透過添加增稠劑提升黏性，以利列印表面積更佳與結構穩定性的載體。
- 3. 輽體保存穩定性延伸測試:** 保存性方面，本研究僅探討 10 天內之短期穩定性，後續可延長保存天數以瞭解載體活性維持時間與菌群變化趨勢，了解不同保存條件下之活性影響。
- 4. 實際廢水條件測試與機械性能評估:** 建議於實際廢水中進行運行測試，評估固定化載體之抗剪切能力與重複使用壽命，並可搭配共軛焦顯微鏡或掃描式電子顯微鏡觀察微生物附著與成膜情形，作為載體設計優化與應用可行性之參考。
- 5. 分子與影像技術輔助分析:** 為進一步了解載體內部菌群結構與功能，建議後續可導入以下技術：
 - ◆ 定量 PCR (qPCR)：針對 ANAMMOX 功能基因(如 *hzsA*, *hzo*)進行定量，評估固定化載體中菌群之增殖與活性。
 - ◆ KEGG 功能預測：利用次世代定序資料進行功能性基因路徑推估，了解

載體中主要菌群的代謝潛能與相互作用機制。

- ◆ FISH 活死細胞染色與定位觀察：結合螢光原位雜交技術(FISH)與活死細胞染色分析，可視覺化呈現 ANAMMOX 菌之空間分布與存活情況，進一步探討載體內微生物群落之空間結構與穩定性。



參考文獻



- 石丞均。(2022)。評估 3D 生物列印於微生物固定化之應用:以尿素分解菌與重金屬去除為例。碩士 (國立臺灣大學)。
- 林宛瑩。(2024)。應用光固化 3D 列印技術固定化微生物降解辛基苯酚聚乙氧基醇。碩士 (東吳大學)。
- 楊采儒。(2023)。真菌在去氮上的研究及其在 3D 生物列印微生物固定化的應用。碩士 (國立臺灣大學)。
- 廖婉婷。(2023)。三個垃圾滲出水處理廠的微生物氮循環交互作用。碩士 (國立臺灣大學)。
- Akaçin, İ., Ersoy, Ş., Doluca, O., and Güngörümüşler, M. (2022). Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiological Research* 264, 127154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127154>.
- Ali, M., Oshiki, M., Rathnayake, L., Ishii, S., Satoh, H., and Okabe, S. (2015). Rapid and successful start-up of anammox process by immobilizing the minimal quantity of biomass in PVA-SA gel beads. *Water Research* 79, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.024>.
- Arora, A.S., Nawaz, A., Yun, C.M., Cho, H., and Lee, M. (2019). Ecofriendly Anaerobic Ammonium Oxidation System: Optimum Operation and Inhibition Control Strategies for Enhanced Nitrogen Removal. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 58, 20847-20856. 10.1021/acs.iecr.9b04591.
- Bae, H., Paul, T., Kim, D., and Jung, J.-Y. (2016). Specific ANAMMOX activity (SAA) in a sequencing batch reactor: optimization test with statistical comparison. *Environmental Earth Sciences* 75, 1452. 10.1007/s12665-016-6252-7.
- Butelmann, T., Priks, H., Parent, Z., Johnston, T.G., Tamm, T., Nelson, A., Lahtvee, P.-J., and Kumar, R. (2021). Metabolism Control in 3D-Printed Living Materials Improves Fermentation. *ACS Applied Bio Materials* 4, 7195-7203. 10.1021/acsabm.1c00754.
- Cao, S., Koch, K., Du, R., Wells, G.F., Ye, L., and Drewes, J.E. (2022). Toward Mainstream Anammox by Integrating Sidestream Treatment. *Environmental Science & Technology* 56, 10553-10556. 10.1021/acs.est.2c03256.

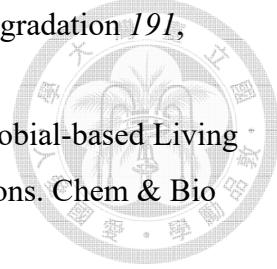
- Chen, Y., Zhao, Y.-G., Wang, X., and Ji, J. (2022). Impact of sulfamethoxazole and organic supplementation on mixotrophic denitrification process: Nitrate removal efficiency and the response of functional microbiota. *Journal of Environmental Management* 320, 115818. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115818>.
- Ganesan, S., and Vadivelu, V.M. (2019). Effect of external hydrazine addition on anammox reactor start-up time. *Chemosphere* 223, 668-674. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.104>.
- Ghaly, A., and Ramakrishnan, V. (2015). Nitrogen sources and cycling in the ecosystem and its role in air, water and soil pollution: A critical review. *Journal of Pollution Effects & Control* 3, 1-26.
- González-Cortés, J.J., Valle, A., Ramírez, M., and Cantero, D. (2022). Characterization of bacterial and Archaeal communities by DGGE and next generation sequencing (NGS) of nitrification bioreactors using two different intermediate landfill leachates as ammonium substrate. *Waste and Biomass Valorization* 13, 3753-3766.
- Greer, F.R., Shannon, M., Nutrition, C.o., and Health, C.o.E. (2005). Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics* 116, 784-786.
- Han, R., Ma, H., Su, X., Song, J., Liu, P., Wu, Y., and Liu, Y. (2024). Improved nitrate removal by polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel beads entrapping salt-tolerant composite bioagent AHM M3. *Desalination* 591, 118009. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2024.118009>.
- He, F., Ou, Y., Liu, J., Huang, Q., Tang, B., Xin, F., Zhang, J., Jiang, M., Chen, S., and Yu, Z. (2022). 3D Printed biocatalytic living materials with dual-network reinforced bioinks. *Small* 18, 2104820.
- Herzog, J., Franke, L., Lai, Y., Gomez Rossi, P., Sachtleben, J., and Weuster-Botz, D. (2024). 3D bioprinting of microorganisms: principles and applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 47, 443-461. 10.1007/s00449-023-02965-3.
- Hou, L., Hu, K., Huang, F., Pan, Z., Jia, X., Liu, W., Yao, X., Yang, Z., Tang, P., and Li, J. (2024). Advances in immobilized microbial technology and its application to wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, 131518.
- Hu, Q.-Y., Kang, D., Wang, R., Ding, A.Q., Abbas, G., Zhang, M., Qiu, L., Lu, H.-F., Lu, H.-J., and Zheng, P. (2018). Characterization of oligotrophic AnAOB culture:

- morphological, physiological, and ecological features. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 995-1003. 10.1007/s00253-017-8587-8.
- Hu, Z., Lotti, T., de Kreuk, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., Kruit, J., Jetten, M.S., and Kartal, B. (2013). Nitrogen removal by a nitritation-anammox bioreactor at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 79, 2807-2812. 10.1128/aem.03987-12.
- Jelliman, S. (2021). The Economic and Technical Feasibility of the Application of Partial Nitritation Anammox Technology Over Conventional Nitrification Denitrification for the Treatment of Sidestream Liquor at Cape Flats WWTP.
- Ji, B., Wang, S., Guo, D., and Pang, H. (2020). Comparative and comprehensive analysis on bacterial communities of two full-scale wastewater treatment plants by second and third-generation sequencing. *Bioresource Technology Reports* 11, 100450. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100450>.
- Ji, B., Zhang, X., Zhang, S., Song, H., and Kong, Z. (2019). Insights into the bacterial species and communities of a full-scale anaerobic/anoxic/oxic wastewater treatment plant by using third-generation sequencing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 128, 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.007>.
- Jin, Y., Liu, D., Xiong, W., Wu, Z., Xiao, G., Wang, S., and Su, H. (2024). Enhancing nitrogen removal performance using immobilized aerobic denitrifying bacteria by modified polyvinyl alcohol/sodium alginate (PVA/SA). *Chemosphere* 357, 141954. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141954>.
- Kallistova, A.Y., Nikolaev, Y.A., Mardanov, A.V., Berestovskaya, Y.Y., Grachev, V.A., Kostrikina, N.A., Pelevina, A.V., Ravin, N.V., and Pimenov, N.V. (2020). Investigation of Formation and Development of Anammox Biofilms by Light, Epifluorescence, and Electron Microscopy. *Microbiology* 89, 708-719. 10.1134/S0026261720060077.
- Kartal, B., de Almeida, N.M., Maalcke, W.J., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Keltjens, J.T. (2013). How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 428-461. 10.1111/1574-6976.12014.
- Kartal, B., and Keltjens, J.T. (2016). Anammox Biochemistry: a Tale of Heme *c* Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 998-1011. 10.1016/j.tibs.2016.08.015.

- Lawryshyn, A. (2024). Travelling Waves of the Diffusive Streeter-Phelps Equations with Braun-Berthouex BOD Decay. *SIAM Undergraduate Research Online* 17. 10.1137/24S1667427.
- Lewis, R.K., and Carta, G. (2001). Protein Transport in Constrained Anionic Hydrogels: Diffusion and Boundary-Layer Mass Transfer. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 40, 1548-1558. 10.1021/ie0006054.
- Li, X., Yao, J., Jia, Y., Liu, J., and Chen, Y. (2024). Initiation of Anammox in an Up-Flow Anaerobic Sludge Bed Reactor: Bacterial Community Structure, Nitrogen Removal Functional Genes, and Antibiotic Resistance Genes. *Water* 16, 3426.
- Li, Y., Cui, N., Xuan, K., Xu, D., Wang, D., Li, C., Li, Z., and Wang, Y. (2021). Start-up performance and process kinetics of a UASB-Anammox reactor at low substrate concentration. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 106726.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106726>.
- Liang, Z., Sun, J., Zhan, C., Wu, S., Zhang, L., and Jiang, F. (2020). Effects of sulfide on mixotrophic denitrification by *Thauera*-dominated denitrifying sludge. *Environmental Science: Water Research & Technology* 6, 1186-1195.
- Liu, S.-H., Zeng, Z.-T., Niu, Q.-Y., Xiao, R., Zeng, G.-M., Liu, Y., Cheng, M., Hu, K., Jiang, L.-H., Tan, X.-F., and Tao, J.-J. (2019). Influence of immobilization on phenanthrene degradation by *Bacillus* sp. P1 in the presence of Cd(II). *Science of The Total Environment* 655, 1279-1287.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.272>.
- Liu, X.-L., Wang, X., Wang, Y., Huang, D., Li, K.-W., Luo, M.-J., Liu, D.-F., and Mu, Y. (2024). 3D Bioprinting of Engineered Living Materials with Extracellular Electron Transfer Capability for Water Purification. *Environmental Science & Technology* 58, 16905-16914. 10.1021/acs.est.4c06120.
- Lodha, T., Narvekar, S., and Karodi, P. (2021). Classification of uncultivated anammox bacteria and *Candidatus* Uabimicrobium into new classes and provisional nomenclature as *Candidatus* Brocadiia classis nov. and *Candidatus* Uabimicrobiiia classis nov. of the phylum Planctomycetes and novel family *Candidatus* Scalinduaceae fam. nov to accommodate the genus *Candidatus* Scalindua. *Systematic and Applied Microbiology* 44, 126272.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126272>.

- Ma, M., Cao, Q., Mabruk, A., Xie, J., Wu, P., Liu, W., and Chen, C. (2022). Promotion of nitrogen removal and microbial enrichment on anammox by exogenous substance addition: A critical review. *Journal of Water Process Engineering* 49, 103096. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103096>.
- Manonmani, U., and Joseph, K. (2018). Research advances and challenges in anammox immobilization for autotrophic nitrogen removal. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93, 2486-2497.
- Meng, J., Di, Y., Geng, Y., Li, W., Huo, R., and Zhou, S. (2024). Enhanced nitrate removal efficiency and microbial response of immobilized mixed aerobic denitrifying bacteria through biochar coupled with inorganic electron donors in oligotrophic water. *Bioresource Technology* 396, 130457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130457>.
- Miao, L., Yang, G., Tao, T., and Peng, Y. (2019). Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments—A review. *Journal of environmental management* 235, 178-185.
- Morris, J.J., Lenski, R.E., and Zinser, E.R. (2012). The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *mBio* 3. 10.1128/mBio.00036-12.
- Najim, A.A., Radeef, A.Y., al-Door, I., and Jabbar, Z.H. (2024). Immobilization: the promising technique to protect and increase the efficiency of microorganisms to remove contaminants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 99, 1707-1733.
- Niu, Q., He, S., Zhang, Y., Ma, H., Liu, Y., and Li, Y.-Y. (2016). Process stability and the recovery control associated with inhibition factors in a UASB-anammox reactor with a long-term operation. *Bioresource Technology* 203, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.003>.
- Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H., and Okabe, S. (2011). Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘Candidatus Brocadia sinica’. *Microbiology* 157, 1706-1713. <https://doi.org/10.1099/mic.0.048595-0>.
- Parde, D., Behera, M., Dash, R.R., and Bhunia, P. (2024). A review on anammox processes: Strategies for enhancing bacterial growth and performance in

wastewater treatment. International Biodeterioration & Biodegradation 191, 105812. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105812>.



Pu, X., Wu, Y., Liu, J., and Wu, B. (2024). 3D Bioprinting of Microbial-based Living Materials for Advanced Energy and Environmental Applications. Chem & Bio Engineering 1, 568-592. 10.1021/cbe.4c00024.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41, D590-D596. 10.1093/nar/gks1219.

Sanz, J.L., and Köchling, T. (2019). Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 18, 635-680. 10.1007/s11157-019-09513-0.

Sari, T., Yapsakli, K., Akgul, D., and Mertoglu, B. (2025). Physiological and transcriptomic response of enriched anammox culture upon elevated hydrazine exposure. Biodegradation 36, 39. 10.1007/s10532-025-10132-6.

Shao, M.-F., Zhang, T., and Fang, H.H.-P. (2010). Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications. Applied Microbiology and Biotechnology 88, 1027-1042. 10.1007/s00253-010-2847-1.

Sri Shalini, S., and Joseph, K. (2012). Nitrogen management in landfill leachate: Application of SHARON, ANAMMOX and combined SHARON-ANAMMOX process. Waste Management 32, 2385-2400.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.06.006>.

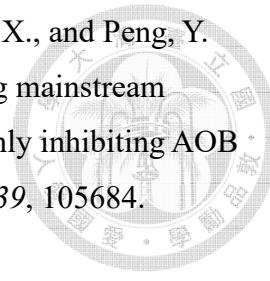
Su, Z., Liu, T., Guo, J., and Zheng, M. (2023). Nitrite Oxidation in Wastewater Treatment: Microbial Adaptation and Suppression Challenges. Environmental Science & Technology 57, 12557-12570. 10.1021/acs.est.3c00636.

Swann, J., Wang, Y., Abecia, L., Costabile, A., Tuohy, K., Gibson, G., Roberts, D., Sidaway, J., Jones, H., and Wilson, I.D. (2009). Gut microbiome modulates the toxicity of hydrazine: a metabonomic study. Molecular BioSystems 5, 351-355.

Talan, A., Tyagi, R.D., and Drogui, P. (2021). Critical review on insight into the impacts of different inhibitors and performance inhibition of anammox process with control strategies. Environmental Technology & Innovation 23, 101553.

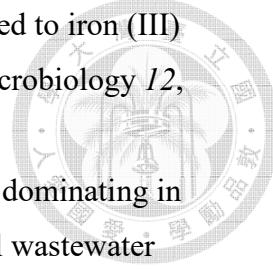
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101553>.

- Tan, Q., Xia, S., Xu, W., and Jian, Y. (2023). Rapid Start-Up Characteristics of Anammox under Different Inoculation Conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20, 2979.
- Tomaszewski, M., Cema, G., and Ziemińska-Buczyńska, A. (2017). Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis. *Chemosphere* 182, 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.003>.
- Tong, Q., Wang, G., Zheng, C., Chen, M., Chen, Y., and Guo, Y. (2021). Preparation and biofilm culturing characteristics of a novel porous carrier. *Environmental Engineering Science* 38, 31-40.
- Trinh, H.P., Lee, S.-H., Jeong, G., Yoon, H., and Park, H.-D. (2021). Recent developments of the mainstream anammox processes: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105583. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105583>.
- Tsai, T.-Y., Lo, H.-S., Chuang, H.-P., Ji, Y., Yang, M., and Jou, C.-J. (2019). Effects of conductivity in wastewater for the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 20, 1904-1911.
- Uyanik, S., Bekmezci, O.K., and Yurtsever, A. (2011). Strategies for successful ANAMMOX enrichment at laboratory scale. *Clean–Soil, Air, Water* 39, 653-657.
- Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S., and Kuenen, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142, 2187-2196.
- Viancelli, A., Pra, M.C., Scussiato, L.A., Cantão, M., Ibelli, A.M.G., and Kunz, A. (2017). Preservation and reactivation of *Candidatus Jettenia asiatica* and *Anammoxoglobus propionicus* using different preservative agents. *Chemosphere* 186, 453-458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.053>.
- Vieira, J.L., Carneiro, D.C., Soares, M.B., and Barbosa, J.D. (2021). Fundamentals of 3D bioprinting technology. *JOURNAL OF BIOENGINEERING, TECHNOLOGIES AND HEALTH* 4, 63-70.
- Wang, A., Wu, X., Sun, H., Wang, N., and Liu, Y. (2025). Anammox at low temperature: effectiveness, mechanisms and prospect of embedding immobilization to enhance AnAOB activity. *Environmental Monitoring and Assessment* 197, 685. 10.1007/s10661-025-14170-8.



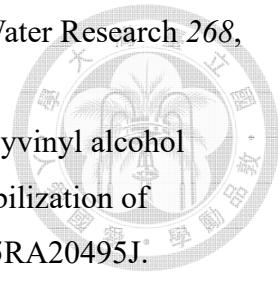
- Wang, B., Wang, Z., Wang, S., Qiao, X., Gong, X., Gong, Q., Liu, X., and Peng, Y. (2020). Recovering partial nitritation in a PN/A system during mainstream wastewater treatment by reviving AOB activity after thoroughly inhibiting AOB and NOB with free nitrous acid. *Environment International* 139, 105684. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105684>.
- Wang, J.-J., Xu, L.-Z.-J., Huang, B.-C., Li, J., and Jin, R.-C. (2021a). Multiple electron acceptor-mediated sulfur autotrophic denitrification: Nitrogen source competition, long-term performance and microbial community evolution. *Bioresource Technology* 329, 124918. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124918>.
- Wang, T., Li, X., Wang, H., Xue, G., Zhou, M., Ran, X., and Wang, Y. (2023a). Sulfur autotrophic denitrification as an efficient nitrogen removals method for wastewater treatment towards lower organic requirement: A review. *Water Research* 245, 120569. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120569>.
- Wang, X., Huang, J., and Gao, D. (2021b). Effects of three storage conditions on the long-term storage and short-term reactivation performances of anammox granular sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation* 164, 105310. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105310>.
- Wang, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Liu, L., Liu, S.-J., and Zhang, T. (2023b). Genome-centric metagenomics reveals the host-driven dynamics and ecological role of CPR bacteria in an activated sludge system. *Microbiome* 11, 56.
- Xie, G.-J., Liu, T., Cai, C., Hu, S., and Yuan, Z. (2018). Achieving high-level nitrogen removal in mainstream by coupling anammox with denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor. *Water Research* 131, 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.037>.
- Xing, B.-S., Guo, Q., Jiang, X.-Y., Chen, Q.-Q., Li, P., Ni, W.-M., and Jin, R.-C. (2016). Influence of preservation temperature on the characteristics of anaerobic ammonium oxidation (anammox) granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 4637-4649. 10.1007/s00253-016-7292-3.
- Yang, W., Lu, H., Khanal, S.K., Zhao, Q., Meng, L., and Chen, G.-H. (2016). Granulation of sulfur-oxidizing bacteria for autotrophic denitrification. *Water Research* 104, 507-519. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.049>.
- Yang, X.-R., Li, H., Su, J.-Q., and 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.



- Yao, Q., and Peng, D.-C. (2017). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express* 7, 25. 10.1186/s13568-017-0328-y.
- Yin, Z., Bi, X., and Xu, C. (2018). Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) in Nitrogen Removal from Wastewater. *Archaea* 2018, 8429145. 10.1155/2018/8429145.
- Yoon, S.-W., Kim, S.-Y., Jeon, J.-S., Oh, S., Chung, S.-Y., Kim, J.-S., and Maeng, S.-K. (2024). 3D-printed *Chlorella vulgaris* biocarriers: A novel approach to wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering* 57, 104711.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104711>.
- Yu, D., Zhang, W., Wang, D., and Jin, Y. (2022). Full-Scale Application of One-Stage Simultaneous Nitrification and Denitrification Coupled with Anammox Process for Treating Collagen Casing Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 5787.
- Yuan, X., Chao, C., Niu, J., Song, J., Liu, Y., Zhai, S., and Zhao, Y. (2025). Mechanistic insights into nitrogen removal performance and electron competition with mixed electron donor supply in a biofilm electrode reactor. *Eco-Environment & Health* 4, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2025.100153>.
- Zhang, F., Shi, X., Lian, S., Chen, Y., Lu, M., Feng, Q., and Guo, R. (2022). A novel magnetic microparticles as biocarriers for promoting enrichment of nitrifying bacteria. *Journal of Water Process Engineering* 47, 102794.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102794>.
- Zhang, L., Zhang, S., Peng, Y., Han, X., and Gan, Y. (2015a). Nitrogen removal performance and microbial distribution in pilot- and full-scale integrated fixed-biofilm activated sludge reactors based on nitritation-anammox process. *Bioresource Technology* 196, 448-453.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.090>.
- Zhang, Q., Ji, X.-M., Wang, X., Wang, W., Xu, X., Zhang, Q., Xing, D., Ren, N., Lee, D.-J., and Chen, C. (2025). Differentiation of the Anammox core microbiome:

Unraveling the evolutionary impetus of scalable gene flow. *Water Research* 268, 122580. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122580>.



Zhang, Y., Hui, B., and Ye, L. (2015b). Reactive toughening of polyvinyl alcohol hydrogel and its wastewater treatment performance by immobilization of microorganisms. *RSC Advances* 5, 91414-91422. 10.1039/C5RA20495J.

Zhao, R., Biddle, J.F., and Jørgensen, S.L. (2022a). Introducing *Candidatus Bathyanammoxibiaceae*, a family of bacteria with the anammox potential present in both marine and terrestrial environments. *ISME Commun* 2, 42. 10.1038/s43705-022-00125-4.

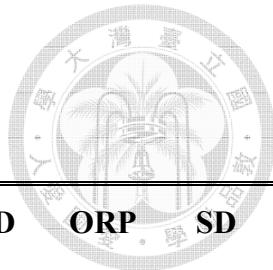
Zhao, R., Biddle, J.F., and Jørgensen, S.L. (2022b). Introducing *Candidatus Bathyanammoxibiaceae*, a family of bacteria with the anammox potential present in both marine and terrestrial environments. *ISME communications* 2, 42.

Zheng, L., Wu, H., Ding, A., Tan, Q., Wang, X., Xing, Y., Tian, Q., and Zhang, Y. (2024). Optimization of operating parameters and microbiological mechanism of a low C/N wastewater treatment system dominated by iron-dependent autotrophic denitrification. *Environmental Research* 250, 118419. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118419>.

Zheng, M., Tian, Z., Chai, Z., Zhang, A., Gu, A., Mu, G., Wu, D., and Guo, J. (2023). Ubiquitous occurrence and functional dominance of comammox Nitrospira in full-scale wastewater treatment plants. *Water Research* 236, 119931. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119931>.

Zhuang, J.-L., Sun, X., Zhao, W.-Q., Zhang, X., Zhou, J.-J., Ni, B.-J., Liu, Y.-D., Shapleigh, J.P., and Li, W. (2022). The anammox coupled partial-denitrification process in an integrated granular sludge and fixed-biofilm reactor developed for mainstream wastewater treatment: Performance and community structure. *Water Research* 210, 117964. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117964>.

附錄



附表 1、初始污泥水質每月平均參數

Startup	DO	SD	pH	SD	EC	SD	ORP	SD
Month	(mg/L)	DO		pH	(μ S/cm)	EC	(mV)	ORP
0	0.20	0.02	7.45	0.13	1041.66	33.29	-339	106.97
1	0.18	0.00	7.85	0.21	1029.16	73.56	-253	307.37
2	0.16	0.02	7.93	0.28	1114.58	22.18	-394	108.1
3	0.20	0.00	8.36	0.11	1251.04	31.56	-197	9.50
4	0.15	0.05	8.41	0.14	1294.27	79.47	-164	46.26

附表 2、AC1 水質每月平均參數

Startup	DO	SD	pH	SD	EC	SD	ORP	SD
Month	(mg/L)	DO		pH	(μ S/cm)	EC	(mV)	ORP
0	0.13	0.02	8.41	0.14	1029.17	73.57	-339.0	107.0
1	0.17	0.01	8.16	0.09	1085.94	6.24	-68.9	20.9
2	0.21	0.01	8.16	0.04	1103.65	14.57	-87.2	27.9
3	0.17	0.02	8.19	0.05	1188.54	23.25	-121.4	5.3
4	0.11	0.01	8.29	0.05	1080.73	8.02	-135.0	21.1
5	0.11	0.01	8.46	0.11	1472.92	7.64	-29.6	6.5
6	0.14	0.02	8.38	0.17	1355.21	17.93	-121.4	7.0
7	0.14	0.03	8.59	0.08	1085.94	6.24	-163.0	20.7
8	0.13	0.02	8.23	0.02	1430.21	1.15	-142.2	24.2
9	0.16	0.02	8.53	0.02	1188.54	23.25	-121.4	7.0

附表 2、AC1 水質每月平均參數(續)

Startup Month	DO (mg/L)	SD DO	pH	SD pH	EC (μ S/cm)	SD EC	ORP (mV)	SD ORP
10	0.19	0.04	8.32	0.21	1171.35	29.96	-142.3	24.3
11	0.14	0.03	8.63	0.09	889.84	484.9	-131.0	3.1
12	0.12	0.01	8.34	0.02	1369.79	27.57	-121.9	15.6
13	0.14	0.02	8.25	0.04	1386.98	4.04	-121.9	15.6

附表 3、AC2 水質每月平均參數

Startup Month	DO (mg/L)	SD DO	pH	SD pH	EC (μ S/cm)	SD EC	ORP (mV)	SD ORP
0	0.18	0.03	8.41	0.14	1029.17	73.57	-169.8	169.1
1	0.19	0.01	8.16	0.16	1103.65	14.57	-66.8	10.1
2	0.21	0.00	8.19	0.07	1188.54	23.25	-103.8	9.3
3	0.17	0.04	8.18	0.03	1085.94	6.24	-120.8	32.3
4	0.12	0.01	8.25	0.02	1112.50	37.80	-155.1	20.3
5	0.10	0.01	8.42	0.06	1475.52	18.01	-15.3	4.5
6	0.15	0.01	8.47	0.18	1332.81	25.16	-143.6	9.5
7	0.16	0.01	8.60	0.11	1103.65	14.57	-163.8	12.4
8	0.15	0.03	8.51	0.05	1370.31	0.00	-148.6	0.0
9	0.18	0.03	8.31	0.05	1285.94	2.65	-143.6	9.5
10	0.16	0.04	8.50	0.03	1287.50	0.00	-143.6	9.5
11	0.15	0.05	8.36	0.06	1356.77	26.58	-131.0	3.1
12	0.13	0.03	8.64	0.02	1366.15	19.40	-127.2	4.4

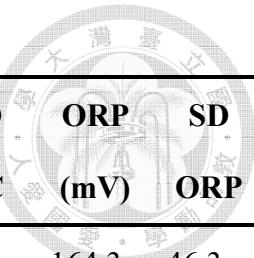
附表 3、AC2 水質每月平均參數(續)

Startup Month	DO (mg/L)	SD DO	pH	SD pH	EC (μ S/cm)	SD EC	ORP (mV)	SD ORP
13	0.13	0.03	8.49	0.03	1319.27	21.01	-127.2	4.4

附表 4、AC3 水質每月平均參數

Startup Month	DO (mg/L)	SD DO	pH	SD pH	EC (μ S/cm)	SD EC	ORP (mV)	SD ORP
0	0.10	0.02	8.32	0.04	1156.77	10.97	-197.7	9.5
1	0.15	0.02	8.33	0.07	1114.58	22.19	-95.0	17.1
2	0.16	0.01	8.14	0.00	1166.67	13.20	-52.6	8.2
3	0.10	0.00	8.30	0.07	1044.27	6.03	-14.4	2.5
4	0.13	0.03	8.24	0.16	1040.11	17.67	-133.1	0.7
5	0.15	0.05	8.59	0.04	814.06	14.80	-149.1	25.4
6	0.16	0.01	8.33	0.06	1082.81	0.00	-143.1	0.0
7	0.19	0.01	8.13	0.06	973.44	9.00	-133.1	0.7
8	0.20	0.01	8.41	0.02	995.31	13.00	-131.0	3.1
9	0.17	0.02	8.38	0.13	1361.98	6.81	-121.4	7.0
10	0.14	0.02	8.49	0.06	1402.61	3.21	-128.4	14.5
11	0.14	0.02	8.41	0.18	1350.00	26.46	-128.4	14.5

附表 5、AC4 水質每月平均參數



Startup Month	DO (mg/L)	SD DO	pH	SD pH	EC (μ S/cm)	SD EC	ORP (mV)	SD ORP
0	0.11	0.00	8.18	0.10	1162.50	10.44	-164.3	46.3
1	0.20	0.04	8.33	0.07	1009.89	74.63	-84.4	2.1
2	0.11	0.01	8.16	0.01	1178.13	42.00	-45.9	4.8
3	0.10	0.01	8.34	0.12	1009.89	74.63	-13.0	2.4
4	0.14	0.03	8.25	0.08	1031.25	31.10	-131.0	3.1
5	0.15	0.04	8.55	0.01	851.05	79.07	-156.0	28.0
6	0.15	0.03	8.16	0.05	1100.00	0.00	-127.2	0.0
7	0.18	0.03	8.13	0.25	974.48	4.16	-156.0	28.0
8	0.20	0.00	8.33	0.07	996.36	3.06	-149.1	25.4
9	0.18	0.03	8.45	0.01	1334.38	1.73	-133.1	0.7
10	0.14	0.03	8.62	0.01	1381.25	12.29	-147.0	2.4
11	0.14	0.02	8.63	0.01	1344.80	14.01	-147.0	2.4

附表 6、AC1 與 AC2 反應槽每 3 個月之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性
懸浮固體濃度(VSS, mg/ L)監測

分瓶後啟動月數	反應槽	TSS (mg/ L)	VSS (mg/ L)
0	AC1	2280	1720
	AC2	1080	760
3	AC1	3120	2220
	AC2	1940	1360
6	AC1	3320	2400
	AC2	4220	2920
9	AC1	2660	1940
	AC2	3260	2260
12	AC1	1760	1260
	AC2	3740	2540

附表 7、AC3 與 AC4 反應槽每四個月之總懸浮固體濃度(TSS, mg/ L)與揮發性
懸浮固體濃度(VSS, mg/ L)監測

分瓶後啟動月數	反應槽	TSS (mg/ L)	VSS (mg/ L)
0	AC3	1480	1060
	AC4	1380	1220
4	AC3	1540	1200
	AC4	2100	1480
8	AC3	1500	1040
	AC4	1860	1310

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
1-20	未分類環境菌	底泥環境菌功能不明	
A4b	未分類環境菌	底泥環境菌功能不明	
AKYH767	未分類環境菌	未培養細菌，環境底泥樣本	
AKYG587	未分類環境菌	可能來自海洋或土壤的未培養細菌	環境樣本常見，功能未知
<i>Alicycliphilus</i>	Proteobacteria 門	異營脫氮菌，可脫氮/脫氯化合物降解	廢水常見脫氮菌 ANAMMOX潛在支援菌
<i>Allorhizobium-</i>	Proteobacteria 門	固氮菌群，植物根瘤共生	
<i>Neorhizobium-</i>			
<i>Pararhizobium-Rhizobium</i>			
Anaerolineaceae uncultured	Chloroflexi 門	厭氧絲狀菌 有機物降解菌	廢水處理常見 ANAMMOX 可能支援菌

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Ardenticatenales/</i>	Chloroflexi 門	有機物分解，嗜	
<i>Ardenticatenales uncultured</i>		熱菌	
<i>Bacteroidetes BD2-2/</i>	Bacteroidota 門	有機物分解菌	
<i>Bacteroidetes vadinHA17/</i>			
<i>Bacteroidetes VC2.1 Bac22</i>			
<i>Blvii28 wastewater-sludge group</i>	未分類環境菌	污泥底泥環境菌	
<i>Brevundimonas</i>	Proteobacteria	有機物降解菌部	
	門	分耐受污染	
<i>Caldilineaceae cultured</i>	Chloroflexi 門	厭氧絲狀菌	
		有機物降解菌	
<i>Caldilineaceae uncultured</i>	Chloroflexi 門	厭氧絲狀菌	
		有機物降解菌	
<i>Candidatus Brocadia</i>	Planctomycetota	ANAMMOX 厭 氮氧化菌	核心脫 氮／脫 氮關鍵
	門		

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Candidatus Collierbacteria/ Candidatus Gottesmanbacteria/ Candidatus Kerfeldbacteria/ Candidatus Pacebacteria/ Candidatus Roizmanbacteria</i>	Patescibacteria 門	CPR 群 超小細菌推測 功能未知，可代謝	功能未知
<i>Candidatus Omnitrophus</i>	Omnitrophota 門	碳循環 潛力菌	依賴
<i>Chitinophagaceae uncultured</i>	Bacteroidota 門	分解幾丁質、有機物 環境中常見有機物降解菌	
<i>Chujaibacter</i>	Bacteroidota 門	有機碳降解相關 新興分類群，資料少	
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	Firmicutes 門	有機物發酵菌 產甲烷 菌群	

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Comamonas</i>	Proteobacteria 門	有機物降解，部分種耐受污染	廢水處理 環境樣本常見 ANAMMOX 可能 支援菌
<i>Denitratisoma</i>	Proteobacteria 門	異營反硝化菌	脫氮能力
env.OPS 17	未分類環境菌	底泥環境菌	
<i>Fimbriimonadaceae</i>	Armatimonadota 門	環境菌，功能不明	土壤/水體中發現
<i>Fimbriimonadales</i>	Armatimonadota 門	底泥土壤環境菌功能不明	
<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidota 門	有機物分解菌	
<i>Gemmataecae</i>	Planctomycetota	有機物處理菌	
uncultured	門		
<i>Hypomicrobium</i>	Proteobacteria 門	甲基營養菌，脫氮潛力	
<i>Ignavibacterium</i>	Ignavibacteriae 門	厭氧有機物降解菌	廢水污泥、湖泊 底泥 ANAMMOX 可能 支援菌
<i>Kapabacteriales</i>	Proteobacteria 門	有機物降解，功能多樣	原屬 Chloroflexi

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Lentimicrobiaceae</i>	Bacteroidota 門	有機物降解菌	
<i>Limnobacter</i>	Proteobacteria 門	有機物降解，中 度好氧性	水體環境菌
<i>Luteolibacter</i>	Verrucomicrobiota 門	環境菌，參與碳 循環	
<i>Methylacidiphilaceae</i> uncultured	Verrucomicrobiota 門	甲烷氧化、嗜酸 性菌	土壤、溫泉 等
NS11-12 marine group	未分類海洋菌群	海洋/河口環境菌	
<i>Nitrospira</i>	Nitrospirota 門	硝化菌，亞硝酸 氧化成硝酸	完成硝化反 應第二步
<i>Ottowia</i>	Proteobacteria 門	有機物降解，廢 水常見	ANAMMOX 可能支援菌
<i>Paenispelosarcina</i>	Firmicutes 門	環境有機物降解 菌	
<i>Paludisphaera</i>	Verrucomicrobiota 門	環境菌，碳循環	
<i>Pedosphaeraceae</i>	Verrucomicrobiota 門	土壤細菌，碳循 環	

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Pir4</i> lineage	未分類環境菌	底泥環境菌	
<i>Pirellulaceae</i> uncultured	<i>Planctomycetota</i> 門	ANAMMOX 相關/底泥菌群	
<i>Pla1</i> lineage/ <i>Pla4</i> lineage	未分類環境菌	底泥環境菌	
<i>Prevotellaceae</i> UCG-001	<i>Bacteroidota</i> 門	有機物分解菌，產酸潛力	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i> 門	有機物分解，部分具脫氮能力	
<i>RBG-13-54-9/ RBG-16-49-21</i>	未分類環境菌	湖泊、底泥菌	
<i>Rhizobacter</i>	<i>Proteobacteria</i> 門	有機物分解，根際細菌	
<i>Rhodanobacter</i>	<i>Proteobacteria</i> 門	脫氮、耐污染菌	
<i>Rhodocyclaceae</i> uncultured	<i>Proteobacteria</i> 門	異營脫氮潛能菌	
<i>Rhodoflexar</i>	<i>Proteobacteria</i> 門	有機物降解，少見菌群	
<i>Rhodopirellula</i>	<i>Planctomycetota</i> 門	有機物降解菌	

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
<i>Sphaerotilaceae</i> uncultured	Bacteroidota 門	有機物降解， 聚合物分解	
<i>SBR1031</i>	Chloroflexi 門	廢水處理菌 群，有機物降解	廢水脫氮系統常見 ANAMMOX 潛在 支援菌
<i>Simplicispira</i>	Proteobacteria 門	有機物降解、 脫氮潛能菌	
<i>SJA-15</i>	未分類環境菌	底泥/污泥菌群，功能不明	
<i>Sporosarcina</i>	Firmicutes 門	有機物分解、 氮氧化潛能	
<i>Stenotrophomonas</i>	Proteobacteria 門	有機物分解， 耐污染能力強	
<i>Sulfurovum</i>	Campylobacterota 門	硫化物氧化， 能源獲取	
<i>Thauera</i>	Proteobacteria 門	異營反硝化脫氮菌	廢水脫氮主力菌 ANAMMOX 潛在 支援菌
<i>Thiobacillus</i>	Proteobacteria 門	硫化物氧化， 參與硫循環	

附表 8、彙整 TGS 分析結果相對豐度列出之所有菌群(續)

名稱	所屬分類群	可能特徵或功能	備註
WD260	未分類環境 菌	底泥菌群，功能不明	
WS2	未分類環境 菌	湖泊底泥菌，低養分環境菌	
<i>Zixibacteria</i>	未分類環境 菌	底泥環境菌群	

附表 9、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之空白載體結果

Cycle	Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	38.00	0.17	40.16	0.22	0.24	0.21
	17	35.10	0.30	34.81	0.69	0.23	0.20
	39	30.00	1.67	23.20	1.20	0.00	0.00
	69	26.20	0.69	6.27	1.62	0.00	0.00
TN = 100 mg-N/ L (C2)							
C2	0	51.30	0.87	52.32	0.39	0.40	0.03
	17	41.30	0.30	36.46	1.38	1.33	0.09
	42	32.50	0.46	21.94	0.87	2.81	0.21
	67	23.80	0.46	9.06	1.22	3.51	0.46
	96	16.00	0.69	0.49	0.85	0.00	0.00
TN = 160 mg-N/ L (C3)							
C3	0	82.20	1.04	80.10	0.22	0.18	0.31
	14	73.00	1.39	70.15	1.39	1.48	0.12
	38	66.20	0.92	55.08	2.22	2.71	0.18
	62	55.40	3.41	41.81	3.31	3.19	0.32
	90	43.60	5.10	24.42	4.94	3.46	0.31
	110	29.80	4.89	9.00	5.32	3.20	0.09

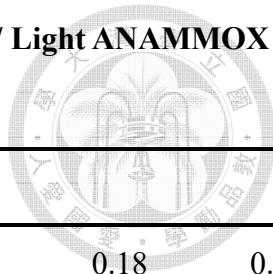
附表 9、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之空白載體結果(續)

TN = 200 mg-N/ L (C4)							
C4	0	102.80	0.92	101.25	0.34	0.45	0.39
	21	89.20	1.39	82.94	2.12	1.99	0.45
	46	74.60	5.92	64.37	3.02	5.09	1.72
	69	66.20	6.47	49.72	8.42	5.04	0.79
	97	51.60	8.88	29.77	12.12	5.57	0.73
	119	40.60	10.26	21.10	16.71	5.32	0.46

附表 10、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX

載體							
Cycle	Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	38.00	0.17	40.16	0.22	0.24	0.21
	17	35.10	0.30	34.81	0.69	0.23	0.20
	39	30.00	1.67	23.20	1.20	0.00	0.00
	69	26.20	0.69	6.27	1.62	0.00	0.00
TN = 100 mg-N/ L (C2)							
C2	0	51.30	0.87	52.32	0.39	0.40	0.03
	17	41.30	0.30	36.46	1.38	1.33	0.09
	42	32.50	0.46	21.94	0.87	2.81	0.21
	67	23.80	0.46	9.06	1.22	3.51	0.46
	96	16.00	0.69	0.49	0.85	0.00	0.00

附表 10、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 PVA-PEGDA/ Light ANAMMOX



載體(續)

TN = 160 mg-N/ L (C3)						
C3	0	82.20	1.04	80.10	0.22	0.18
	14	73.00	1.39	70.15	1.39	1.48
	38	66.20	0.92	55.08	2.22	2.71
	62	55.40	3.41	41.81	3.31	3.19
	90	43.60	5.10	24.42	4.94	3.46
	110	29.80	4.89	9.00	5.32	3.20
TN = 200 mg-N/ L (C4)						
C4	0	102.80	0.92	101.25	0.34	0.45
	21	89.20	1.39	82.94	2.12	1.99
	46	74.60	5.92	64.37	3.02	5.09
	69	66.20	6.47	49.72	8.42	5.04
	97	51.60	8.88	29.77	12.12	5.57
	119	40.60	10.26	21.10	16.71	5.32

附表 11、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之保存性測試空白載體

Cycle	Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	37.80	0.30	41.32	0.15	0.02	0.02
	19	37.70	0.46	41.72	0.14	0.03	0.00
	43	37.80	0.30	42.12	0.13	0.01	0.02
	67	37.70	0.46	42.52	0.13	0.00	0.00
TN = 120 mg-N/ L (C2)							
C2	0	61.80	1.56	60.29	0.04	0.00	0.00
	20	60.40	0.62	60.27	0.04	0.01	0.02
	45	61.70	0.87	60.29	0.04	0.02	0.01
	69	60.60	0.30	60.15	0.09	0.00	0.00
TN = 160 mg-N/ L (C3)							
C3	0	80.60	0.35	83.57	3.17	0.06	0.01
	21	80.60	0.92	81.42	0.17	0.06	0.02
	46	80.40	0.00	81.32	0.26	0.00	0.00
	69	80.60	0.35	80.54	0.26	0.00	0.00
	97	80.60	0.35	79.76	0.26	0.00	0.00
	119	81.00	0.00	80.54	0.26	0.00	0.00

附表 11、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之保存性測試空白載體(續)

TN = 200 mg-N/ L (C4)							
C4	0	100.80	0.60	103.23	0.56	0.02	0.03
	23	102.80	1.25	104.71	0.33	0.02	0.04
	40	102.60	2.08	105.45	0.95	0.07	0.01
	66	102.80	1.25	99.78	0.53	0.03	0.05
	98	101.40	0.60	101.75	1.03	0.00	0.00
	111	103.00	0.35	101.90	1.19	0.05	0.04

附表 12、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 4°C 保存後 PVA-PEGDA/ Light

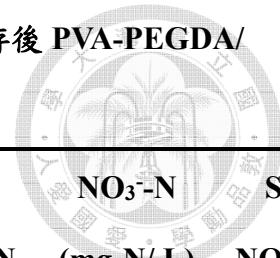
ANAMMOX 輽體(S1)							
Cycle	Time (hr)	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	38.20	0.35	38.60	1.15	0.31	0.08
	19	39.70	9.79	30.19	0.98	0.61	0.16
	43	26.50	1.35	19.87	3.03	1.07	0.95
	67	19.00	1.35	9.81	4.61	1.37	2.07
TN = 120 mg-N/ L (C2)							
C2	0	63.40	0.35	61.13	0.86	0.48	0.06
	20	52.80	0.79	36.67	5.33	0.59	0.52
	45	44.50	3.30	19.99	3.16	0.41	0.41
	69	34.40	2.79	7.26	4.17	0.00	0.00

附表 12、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之 4°C 保存後 PVA-PEGDA/ Light

ANAMMOX 載體(S1)(續)

TN = 160 mg-N/ L (C3)						
C3	0	82.20	0.60	70.87	13.73	0.17
	21	68.40	2.40	60.44	3.25	1.73
	46	57.00	4.33	42.31	5.15	3.35
	69	45.00	5.40	26.26	7.75	4.43
	97	31.20	6.68	8.98	8.35	4.57
	119	23.80	3.02	1.77	3.06	2.69
TN = 200 mg-N/ L (C4)						
C4	0	102.40	0.92	102.03	0.54	0.21
	23	84.60	2.16	80.27	3.77	2.96
	40	75.80	4.50	69.74	10.20	4.94
	66	59.20	8.10	40.95	10.77	6.84
	98	39.60	10.85	14.12	12.53	8.24
	111	28.00	3.30	8.17	10.72	7.86

附表 13、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之- 20 °C 保存後 PVA-PEGDA/
Light ANAMMOX 載體(S2)



Cycle	Time	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	37.30	1.42	38.00	0.05	0.22	0.19
	19	37.70	0.46	35.69	1.40	0.00	0.00
	43	36.40	0.35	1.67	1.70	0.00	0.00
	67	39.60	1.20	0.00	0.00	0.00	0.00
TN = 120 mg-N/ L (C2)							
C2	0	62.70	0.60	59.75	1.28	0.45	0.03
	20	60.20	0.35	49.29	2.67	0.00	0.00
	45	53.90	1.05	0.00	0.00	0.00	0.00
	69	54.90	0.79	0.00	0.00	0.00	0.00

附表 14、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之室溫保存後 PVA-PEGDA/ Light
ANAMMOX 輽體(S3)

Cycle	Time	NH ₃ -N (mg-N/ L)	SD NH ₃ -N	NO ₂ -N (mg-N/ L)	SD NO ₂ -N	NO ₃ ⁻ -N (mg-N/ L)	SD NO ₃ ⁻ -N
TN = 80 mg-N/ L (C1)							
C1	0	37.70	0.35	38.16	0.03	0.20	0.18
	19	32.10	0.79	27.86	1.03	0.72	0.07
	43	25.40	1.39	18.49	2.23	0.54	0.49
	67	17.90	2.17	8.75	2.51	0.00	0.00

附表 14、氮源濃度漸增下各氮源隨時間變化之室溫保存後 PVA-PEGDA/ Light

ANAMMOX 載體(S3)(續)

TN = 120 mg-N/ L (C2)						
C2	0	62.40	0.52	62.05	0.23	0.42
	20	50.90	0.62	46.85	0.63	1.28
	45	41.40	0.52	33.73	1.96	2.54
	69	33.00	3.38	18.79	2.68	2.77
TN = 160 mg-N/ L (C3)						
C3	0	80.60	0.35	78.30	0.95	0.18
	21	66.60	1.80	62.08	1.65	2.09
	46	57.40	2.77	44.94	2.38	3.51
	69	44.80	2.84	29.48	3.73	4.64
	97	31.40	3.99	11.08	4.71	5.29
	119	21.60	2.16	1.11	1.93	3.67
TN = 200 mg-N/ L (C4)						
C4	0	102.60	0.60	103.01	0.78	0.22
	23	85.20	1.59	80.99	1.62	2.74
	40	75.80	3.52	66.88	2.67	4.45
	66	58.60	0.35	43.13	4.20	6.45
	98	40.20	4.69	15.42	4.98	8.04
	111	32.00	5.54	6.60	6.08	8.19