

利用16S rDNA分子生物技術探討薄膜生物反應器 處理ABS樹脂廢水之硝化菌菌群結構

張家源* 陳安成* 林陳彥* 沈麟明** 邱建銘* 蕭獻章*

*嘉南藥理科技大學環境工程與科學系

**高雄應用科技大學化學工程系

摘 要

本研究之實驗室薄膜生物反應器處理ABS樹脂廢水，在水力停留時間0.75 day及污泥停留時間30 day之高污泥濃度操作下，對於COD及BOD之去除相當顯著，且硝化現象相當明顯，故本研究進一步採取此操作條件下之污泥進行DNA萃取、聚合酶鏈反應(PCR)、選殖(Cloning)、限制性片段長度多樣性(RFLP)、定序(Sequencing)及親源樹狀圖(Phylogenetic tree)等分子生物實驗，探討硝化菌在實驗室兩槽式薄膜生物反應器內之種類及樣態分佈。研究結果得知在氨氧化菌方面，以限制性片段長度多樣性樣態分類後為12株，且Clone NO.AOB-2在總數160個菌落中佔了121個，為本研究AOB之優勢菌株(dominate)，並與*Thauera mechernichensis*相似度為96%，此菌在相關文獻中指出其特性是能在好氧及厭氧下都能進行脫硝作用，為硝化作用下被分離出來之菌株，故本研究氨氧化菌75.6%類似於此類菌種。而Clone NO.AOB-11、AOB-23、AOB-33、AOB-34、AOB-71及AOB-139組成一個聚落，在總數160個菌落中佔了24個(15%)，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。亞硝酸氧化菌研究方面，以RFLP樣態分類後為17株，且Clone NO.NOB1-3在總數147個菌落中佔了59個，為本研究NOB1之第一優勢菌株，並與亞硝酸氧化菌相似度分別為99%，推估實驗室MBR系統之NOB1約有40%屬於此類菌種。Clone NO.NOB1-6在總數147個菌落中佔了44個，為本研究NOB1之第二優勢菌株，並與*Uncultured Nitrobacter sp.*(AY683484)相似度為97%，此菌已被證明指出生長在含有鹽分之養殖水內，推估實驗室MBR系統之NOB1約有30%屬於此類菌種。Clone NO.NOB1-106及NOB1-132兩株在兩槽總數147個菌落共佔5個，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。本研究綜合討論結果得知，實驗室MBR系統其樣態較一般活性污泥法有所差異，可作為未來MBR反應槽設計、操作及菌相分析之依據。

關鍵詞：薄膜生物反應器、ABS樹脂廢水、硝化作用、氨氧化菌、亞硝酸氧化菌(*Nitrite-oxidizing bacterium*)、16S rDNA

前 言

ABS(Acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer)樹脂廢水是由丙烯腈(Acrylonitrile)、丁二烯(Butadiene)及苯乙烯(Styrene)共聚合而成,1981年國人研發出“接枝混合法”突破傳統製程,並隨著不斷改良將這種公認為“特用塑膠”的產品變成廣泛化,1990年更已躍居全球第一,達年產量50萬噸⁽¹⁾,且ABS樹脂原料的用途於目前台灣的需求遍及電子產品、汽車業等週邊相關產品的製造,在未來仍具有極大發展性。許多相關研究指出其ABS廢水性質為高氮系廢水,氮化物存在形式以胺基、氰基或醯胺基有機物為主,此類廢水不同於一般天然有機氮或氨氮為主的含氮廢水,其組成結構複雜且化學性穩定,多不易以生物分解,甚至對微生物具有抑制性⁽²⁾,若使用傳統活性污泥程序處理此類廢水,是很難達到良好的處理成效,且林氏⁽³⁾指出,ABS樹脂廢水之TKN/COD範圍為0.04~0.11,有機氮佔總凱氏氮72%以上,因此常導致生物處理受抑制,使其處理效能不彰。

薄膜生物反應器(Membrane bioreactor, MBR)合併生物處理及物理處理兩大程序而建立,一為以微生物處理廢水中生物能分解之物質,另一為利用物理性過濾方式,將微生物處理後的廢水經過過濾,使出流水濁度及懸浮固體物有效的降低,甚至具有消毒的作用⁽⁴⁾。薄膜生物處理系統能將活性污泥有效保留在反應槽內,避免傳統活性污泥操作上污泥流失的問題,有效提高反應槽內的活性污泥量,相對提高對進流的負荷衝擊;另一薄膜生物處理系統特性是佔地面積小,薄膜取代傳統活性污泥的終沉池所佔的面積,對於一些地窄人稠的國家或市區,薄膜生物處理系統較具前瞻性。相關文獻指出⁽⁵⁾,利用MBR系統及延長曝器法兩種系統對工業有機廢水處理效能進行比較,得知MBR系統之碳系及濁度去除效能優於延長曝器法,並可避免傳統活性污泥操作污泥膨化之干擾,且MBR系統整體體積小於延長曝氣法所佔的體積,處理量也大於延長曝氣法。

硝化作用在含氮廢水之處理是常見的,硝化作用其實是由兩大菌相進行工作,由氨氮氧化成亞硝酸氮之工作者稱為氨氧化菌(Ammonia-oxidizing bacteria),而亞硝酸氮氧化成硝酸氮之工作者稱為亞硝酸氧化菌(Nitrite-oxidizing bacteria)⁽⁶⁾。相關文獻^(7,8)指出,在廢水處理廠系統中,自營硝化菌在混合液中佔總微生物族群非常小的比例,但卻是反應器內主要負責硝化作用之工作者。根據型態區分⁽⁹⁾,氨氧化菌可被分為五屬(genera),其中包括*Nitrosomonas*、*Nitrosococcus*、*Nitrospira*、*Nitrosolobus*及*Nitrosovibrio*,而亞硝酸氧化菌可略分四屬,其中有*Nitrobacter*、*Nitrospina*、*Nitrococcus*及*Nitrospira*。

近幾年來,分子生物技術快速發展,利用分子生物技術可以不經過培養而直接進行分析,解決傳統方法的缺點,利用DNA序列來判定微生物親源上之關係,且許多研究常利用分子生物技術對環境中微生物或生物處理反應器做定性及定量之研究,探討其族群變化、數量及特定菌株與其他菌株之關係^(10,11)。因此,在工業或是都市生活廢水之生物處理系統中,菌相的多樣性及群落分佈值得我們探討。故本研究利用分子生物技術探討實驗室MBR系統內硝化菌樣態分佈,將其所得知結果資訊回饋於未來反應槽設計、操作及控制,以及對於薄膜生物反應器的硝化族群有更進一步的瞭解。

材料與方法

一、實驗背景探討及污泥來源

實驗室之薄膜生物系統(Membrane bioreactor, MBR)由前學者林氏⁽³⁾所建立，其MBR系統以兩座好氧活性污泥槽組成，第一座活性污泥槽有效水體體積為2.8升（簡稱生物處理槽），其曝氣量控制在7.5 L/min，第二座活性污泥槽有效水體體積為3.5升，其曝氣量控制在4.5 L/min，薄膜組件沉浸於第二座槽內（簡稱薄膜槽），利用pump負壓式間歇抽取，其膜材為MITSUBISHI公司生產之中空纖維膜，薄膜孔徑為0.4 μm ，薄膜總表面積為0.0283 m^2 ，此系統操作條件為改變水力停留時間(Hydraulic retention time, HRT)為0.5、0.75、1及1.25天，固定SRT為30天，並以即時監測器(pH、DO、Temp)監測兩槽內變化及溫度控制器控制水溫32~33 $^{\circ}\text{C}$ ，其整體反應槽之示意圖如圖1所示。

污泥來源為實驗室雙槽式MBR系統，第一槽為生物處理槽，第二槽為薄膜槽，污泥背景為系統在水力停留時間0.75天、污泥停留時間30天之操作，碳系去除效率（BOD、COD及TOC去除率為97%、92%及94%）相當良好，且硝酸氮累積最高（出流硝酸氮累積為總氮41%），為此操作條件為最明顯硝化作用⁽³⁾。故假設在此條件之亞硝酸氧化菌的樣態、數量可能是最豐富或活性最旺盛時期，待污泥生長量及出流水質達到穩定狀態，採取兩槽內污泥進行分子生物實驗。

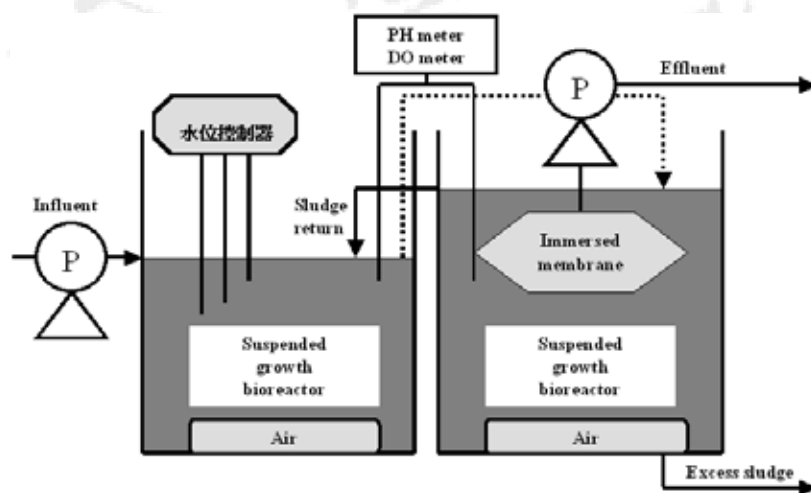


圖1 本研究實驗室之薄膜生物反應器(MBR)示意圖

二、分子生物實驗

本研究之分子生物實驗，實驗單元步驟為DNA萃取、聚合酶鏈反應(PCR)，選殖實驗(Cloning)、限制片段長度多樣性(RFLP)，定序(Sequencing)、親源樹狀圖(Phylogenetic tree)，而研究流程架構如圖2所示，其各實驗單元分別說明如下。

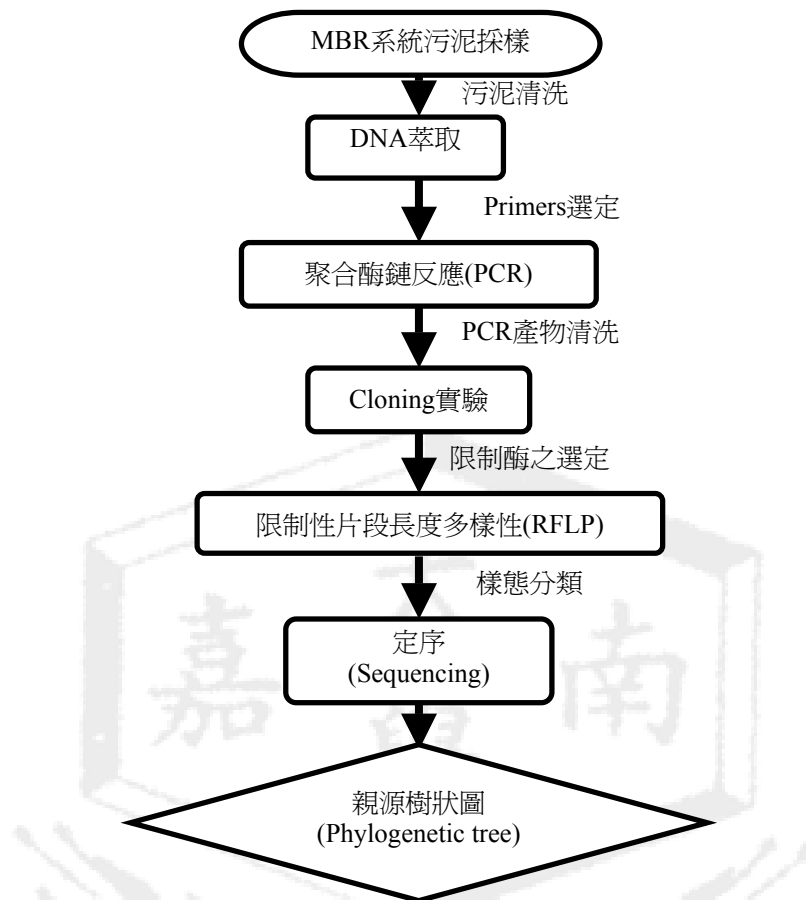


圖2 本研究之分子物實驗流程圖

三、DNA萃取

本研究利用Puregene Kits其操作步驟依序為細胞溶胞、RNA水解酶(RNase)、蛋白質沉澱、DNA萃取及DNA水合作用，最後DNA萃取完後，使用瓊膠電泳搭配0.7%的Agarose確定DNA抽出是否成功，以及測其DNA萃取產物之 A_{260} 及 A_{280} ，確定DNA理論濃度及是否受蛋白質或是RNA之干擾。

四、聚合酶鏈反應(PCR)

本研究利用Nested PCR技術放大氨氧化菌16S rDNA片段，係先將DNA萃取物以11f⁽¹²⁾及1492r⁽¹³⁾之引子先行放大Bacteria 16S rDNA片段，再將其PCR放大產物進行純化，之後將純化後PCR產物再一次當作模板進行聚合酶鏈反應反應，使用Eub338f⁽¹⁴⁾及Nso1225r⁽¹⁵⁾之引子放大氨氧化菌16S rDNA片段。另外使用Eub338f及NIT3⁽¹⁶⁾之引子放大亞硝酸氧化菌16S rDNA片段。而本研究之PCR反應溫度操作為先Hot start(94°C):10 min，隨後進行Denaturation (94°C):40 sec、Annealing(50°C): 30 sec、Extension(72°C):2 min，循環次數40次，最後在一次Final Extension(72°C):10 min。PCR反應後，接著進行選殖實驗，將其各菌株單一分離。

五、選殖實驗(Cloning)

本研究Cloning實驗是使用Promega公司之pGEM-T Easy vector systems產品，質體為pGEM-T Vector，勝任細胞為JM109。將氨氧化菌PCR產物經過純化後，插入質體DNA內，再殖入勝任細胞內，以藍白篩選實驗篩選出選殖成功之菌落，並以Eub338f及Nso1225r放大氨氧化菌之primers，進行聚合酶鏈反應之Insert check確定克隆實驗是否成功。

六、限制片段長度多樣性(RFLP)

本實驗利用RFLP技術，將本研究之氨氧化菌樣態分類，使用Hae III（切點位置：5'.GGΔCC..3'）為主進行分類，但避免單一酵素分類時，因限制酶針對固定序列切點位置，而造成某些不同基因切出結果為不同片段，但長度卻相同，而在瓊膠電泳結果呈現出卻是一樣之片段樣態，使其樣態分類不完整。故避免分類不完善，將PCR產物搭配另一限制酶Alu I（切點位置：5'.AGΔCT..3'）進行重複檢查確定分類的完整性。
3'.TCΔGA..5'

七、基因定序(Sequencing)

將Cloning經過RFLP樣態分類後之樣本，經過定序儀將其DNA定序。本研究基因定序實驗係前往日本長岡科學技術大學環境建設系原田秀樹教授之水圈・土壤環境研究室進行，所使用之定序儀為CEQ8000型號，耗材為Beckman公司kit組，定序所使用之forward引子為341f、530f及907f，並用相反引子為907r及530r進行定序作為確認。

八、親源樹狀圖(Phylogenetic tree)

本實驗定序結果利用ATGC MFC application軟體將其序列連接，將連接好之DNA序列上網至NCBI(National Center for Biotechnology Information)，利用核甘酸查詢並與已知序列進行比對。進一步將查詢到最接近之5~10個已知序列下載整理存檔，之後再將下載整理好的已知序列與實驗得知序列一並匯入Mega 3軟體，由Mega 3進行組合後存檔，再由Mega 3軟體的繪製樹狀圖功能，氨氧化菌之親源樹狀圖製作即完成。

結果及討論

一、DNA萃取結果

本研究利用分子生物技術探討實驗是雙槽式MBR系統內之氨氧化菌樣態，由DNA萃取測其A₂₆₀及A₂₈₀之結果由表1所示，得知其A₂₆₀/A₂₈₀比值為1.26（生物處理槽）及1.33（薄膜槽），結果得知不受蛋白質及干擾，而理論DNA濃度換算得知3125μg/mL（生物處理槽）及1720μg/mL（薄膜槽）。

表1 DNA萃取理論濃度值與A₂₆₀/A₂₈₀之關係

	生物處理槽	薄膜槽	備註
A ₂₆₀	0.625	0.344	DNA吸光度
A ₂₈₀	0.496	0.258	Protein吸光度
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.26	1.33	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ <1受Protein干擾
DNA Concentration (μg/mL)	3125	1720	A ₂₆₀ =1理論DNA為50μg/mL

二、硝化菌之PCR放大及選殖(Cloning)結果

經過PCR放大氨氧化菌16S rDNA片段，其片段長度約為887 bp，再利用選殖將其各氨氧化菌16S rDNA片段單一分離，其藍白篩選效率約為70%~80%，由Insert check得知選殖成功率為100%。而亞硝酸氧化菌之16S rDNA片段經由聚合酶鏈反應放大，其片段長度約為697 bp，再利用選殖將其各亞硝酸氧化菌16S rDNA片段單一分離，其藍白篩選效率約為60%~70%，其經由Insert check得知選殖成功率為91.8%。

三、限制片段長度多樣性(RFLP)

本研究經限制片段長度多樣性分類，結果得知AOB經由*Hae* III分類之結果為11類，而*Alu* I分類結果為8類，將*Hae* III分類結果與*Alu* I分類結果進行交叉比對，最後得知AOB分類出12類，而NOB由*Hae* III分類之結果為11類，而*Alu* I分類結果為9類，將*Hae* III分類結果與*Alu* I分類結果進行交叉比對，最後得知NOB1分類出17類。

四、定序(Sequencing)及親源探討

將RFLP分類後之氨氧化菌12株菌株及亞硝酸氧化菌17株菌株進行定序，隨後將其定序成功之基因序列，以NCBI資料庫提供之BLAST軟體與基因資料庫之16S rDNA序列比對，進一步將查詢到最接近之已知序列下載整理成記事本檔，然後再將再將下載整理好的已知序列與實驗得知序列一並匯入Mega 3軟體，繪製本研究得知菌株與已知菌株之親源關係進行探討。

氨氧化菌(AOB)之親緣關係如圖3所示，得知可簡單分為3個聚落(Cluster)，聚落 2由Clone NO. AOB-1、AOB-2、AOB-4及AOB-50組成一個聚落，而AOB-1在雙槽總數160個菌落中佔了6個(3.7%)。AOB-2在生物槽80個菌落中佔了58個(72.5%)，薄膜槽總數80個菌落中佔63個(78.7%)，在雙槽總數160個菌落中佔了121個(75.6%)，為本研究AOB之優勢菌株。AOB-4在兩槽總數160個菌落中佔了6個(3.7%)。AOB-50在雙槽總數160個菌落中佔了1個。由親緣關係探討得知聚落2之本研究菌群與*Thauera mechemichensis*(Y17590)相似度為96%、96%、97%及98%，且Clone NO. AOB-2為本研究雙槽式MBR系統之主要優勢菌株，佔整體反應槽75.6%，此菌株由德國某垃圾滲出水處理廠之旋轉生物圓盤法硝化系統(Rotating Biological Contactor，簡稱RBC)中分離出之新菌株(TL1^T)，此菌為異營菌，重要特性是能在好氧及厭氧下都能進行脫硝作用，其外型長為1.5 μ m寬為0.7 μ m，單一鞭毛，且文獻指出此菌種在40 $^{\circ}$ C時生長速率為最快，喜愛生長在含有醋酸鹽、丁酸及乙醇之基質內，但不使用甲醇⁽¹⁷⁾，由此可推測此菌類可與硝化菌於一個好氧系統下共存。而本研究之雙槽式MBR系統，由前學者⁽³⁾研究結果得知，在HRT為18小時操作下，生物處理槽溶氧平均為2.5 mg/L，而薄膜槽溶氧平均為3.5 mg/L，皆屬於適合硝化作用之範圍，且因為薄膜能保留微生物在反應器內之特性，在水力停留時間18小時下之操作，氮系的平衡有22%是無法平衡，可能推測反應器內具有脫硝作用反應，使其氮氣揮發而造成，故本研究MBR反應器內可能有相關好氧脫硝菌的存在。

聚落1由AOB-56及AOB-126組成聚落，與*Nitrosopira sp.*(AJ012105)相似度為91%及90%，此菌由受鉛污染土壤中，pH調整依據文獻⁽¹⁸⁾指出*Nitrosopira*適合在pH 7.5~8範圍生長，故調整pH為7.5並在暗室室溫培養4個月，分離出來之菌株⁽¹⁹⁾。

聚落3由AOB-11、AOB-23、AOB-33、AOB-34、AOB-71及AOB-139組成聚落，與氨氧化菌離

群索居之聚落，在雙槽總數160個菌落中佔了24個(15%)，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。

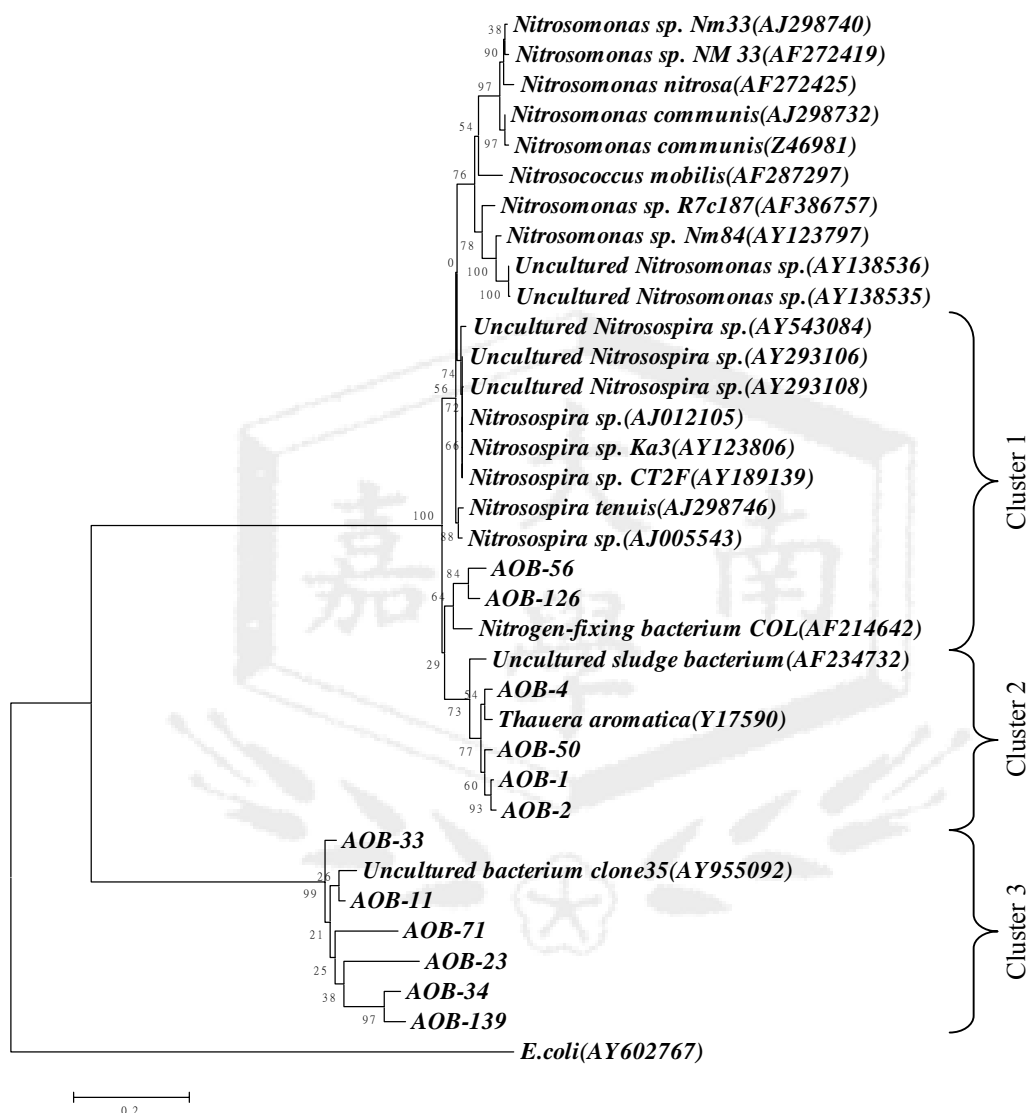


圖3 實驗室MBR系統之氨氧化菌(AOB)親源樹狀圖

而亞硝酸氧化菌(NO₂)之親緣關係如圖4所示，得知可簡單分為5個聚落(Cluster)，聚落 1由 NOB1-3、NOB1-13、NOB1-18、NOB1-35、NOB1-44、NOB1-48、NOB1-71及NOB1-131組成一個聚落，NOB1-3在生物槽73個菌落中佔了31個(42.4%)，薄膜槽總數74個菌落中佔28個(37.8%)，在雙槽總數147個菌落中佔了59個(40.1%)，為本研究NOB之第一優勢菌株。NOB1-13在雙槽總數147個聚落中佔了2個(1.3%)。NOB1-18在雙槽總數147個聚落中佔了1個。NOB1-35在雙槽總數147個聚落中佔了3個(2%)。NOB1-44在雙槽總數147個聚落中佔了4個(2.7%)。NOB1-48在雙槽總數147個聚落中

佔了9個(6%)。NOB1-71在雙槽總數147個聚落中佔了1個。NOB1-131在雙槽總數147個聚落中佔了2個(1.3%)。而NOB1-3、NOB1-13、NOB1-18、NOB1-35、NOB1-44、NOB1-48及NOB1-71與*Nitrite-oxidizing bacterium*(AY135357)相似度分別為99%、97%、96%、98%、98%、97%及97%，此菌株以試管培養方式，提供所需基質如CaCl₂、MgSO₄、Fe²⁺、Na₂MO₂O₄、CoCl₂等，控制pH範圍在7~7.4之間，室溫培養33天，之後植入實驗室尺寸之SBR系統內提高系統硝化效率，之後使用聚合酶鏈反應-TGGE技術分析硝化菌之樣態菌種⁽²⁰⁾。NOB1-131與*Nitrobacter hamburgensis*(L35502)相似度為97%，此菌株為在一演化氨氧化菌與亞硝酸氧化菌親屬關係中被分類出，係屬於α-subdivision之*Nitrobacter hamburgensis*，此菌與*Nitrobacter winogradskyi*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Afipia felis*、*Afipia clevelandensis*為較高親源性⁽²¹⁾。

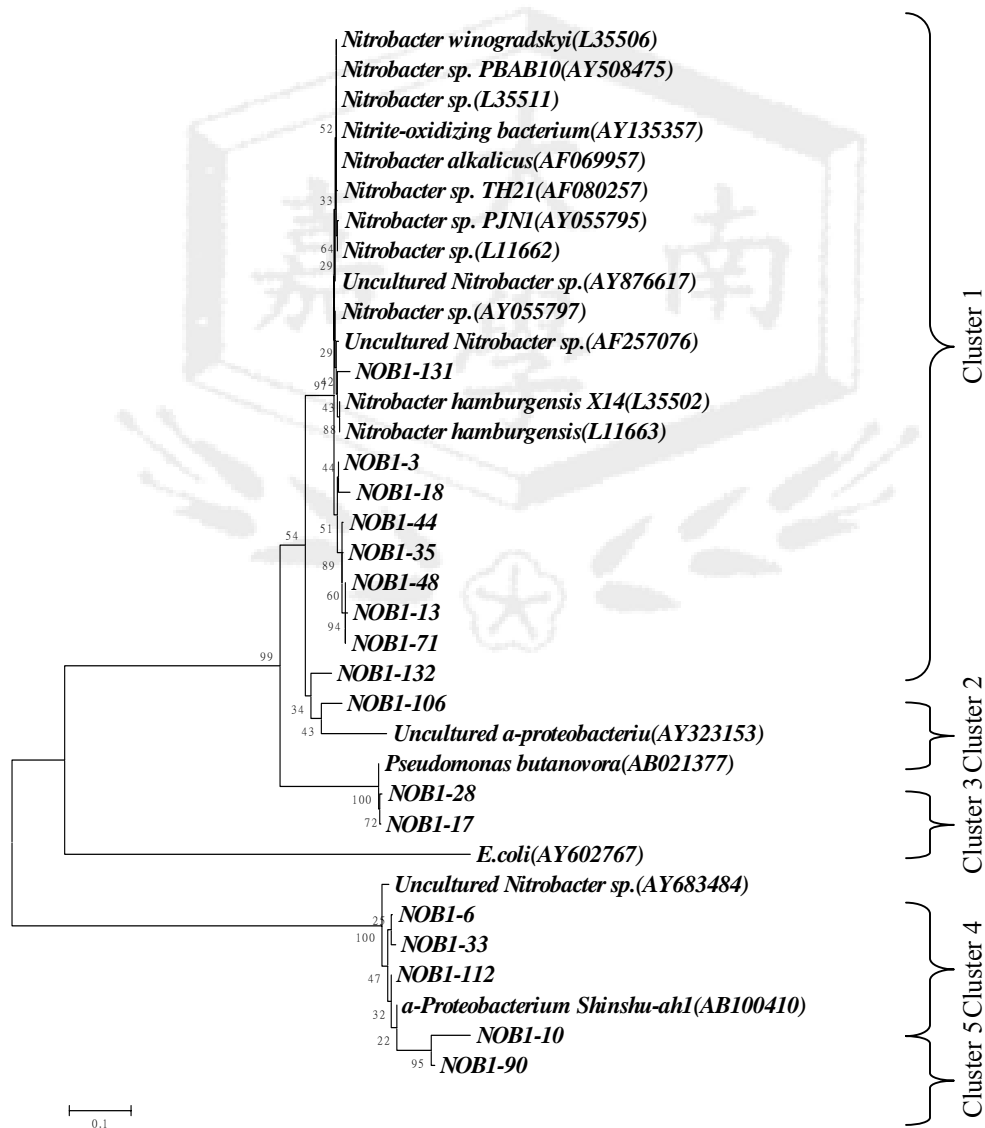


圖4 MBR系統之亞硝酸氧化菌(NO₂-oxidizing bacteria)樹狀親源圖

聚落2由NOB1-106及NOB1-132組成，兩株在雙槽總數160個菌落共佔5個，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。

聚落3由NOB1-17及NOB1-28組成，兩株在雙槽總數147個菌落共佔4個，且與*Pseudomonas butanovora*(AB021377)相似度為99%。聚落4由NOB1-6、NOB1-33及NOB1-112組成聚落，而NOB1-6在生物槽73個菌落中佔了20個(27.4%)，薄膜槽總數74個菌落中佔24個(32.4%)，在雙槽總數147個菌落中佔了44個(29.9%)，為本研究NOB之第二優勢菌株，且與*Uncultured Nitrobacter sp.*(AY683484)相似度分別為97%、97%及98%，此菌為在含有鹽分之養殖水生物膜內分離出來，其文獻⁽²²⁾指出以人工海水方式，固定pH約7.9，提供溶氧約為7.8 mg/L在20°C培養，發現水中TAN(Total ammoniacal nitrogen)能有效降低。

聚落5由NOB1-10及NOB1-90組成聚落，NOB1-90在雙槽總數147個菌落共佔1個(0.6%)，且與*α-Proteobacterium Shinshu-ah1*(AB100410)相似度為93%，此菌由實驗室土壤試管25°C~30°C培養中分離出來，且由親源關係中發現，*Shinshu-ah1*與*Nitrobacter alkalicus AN1*及*Nitrobacter winogradsky W*親源相似度為97%⁽²³⁾，有此可推測本研究之NOB1-90也具有氧化亞硝酸鹽能力之菌株。

結 論

- 一、利用選殖技術將其AOB單一分離株菌，經Insert Check檢查，其成功率為100%，以及限制性片段長度多樣性分類選殖後之個別硝化菌株，得知AOB分類出12株。
- 二、本研究實驗室MBR系統之NOB樣態，由限制性片段長度多樣性技術分類得知分類17株。
- 三、實驗室MBR系統內氨氧化菌，Clone NO. AOB-2為本研究AOB之優勢菌株，與*Thauera mechernichensis*相似度為96%，此菌重要特性是能在好氧及厭氧下都能進行脫硝作用，由此推測此菌類可與硝化菌於一個好氧系統下共存，故本研究氨氧化菌75.6%類似於此類菌種。
- 四、Clone NO. NOB1-3為本研究NOB第一優勢菌株，與亞硝酸氧化菌相似度分別為99%，相關研究指出，此菌生長pH值範圍為7~7.4之間，而實驗室MBR系統操作控制兩槽pH值範圍平均約為6.9~7.5，與本研究得知結果接近，所以推估實驗室MBR系統之NOB1約有40%屬於此類菌種。
- 五、Clone NO. NOB1-6為本研究NOB之第二優勢菌株，與*Uncultured Nitrobacter sp.*相似度為97%，此菌被證實生長在含有鹽分之養殖水生物膜內，故推估實驗室MBR系統之NOB1約有30%屬於此類嗜鹽性亞硝酸氧化菌種。
- 六、本研究之氨氧化菌，其聚落3(Clone NO. AOB-11、AOB-23、AOB-33、AOB-34、AOB-71及AOB-139共6株)組成一個聚落，在總數160個colonies中佔了24個，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。而亞硝酸氧化菌方面，Clone NO. NOB1-106及NOB1-132兩株在雙槽總數147個菌落共佔5個，且無相近已知菌株可知其此菌落之特性及生長條件，可能為新菌株。

參考文獻

1. 林俊一，“工業化學”，初版，台北縣新莊市：全威圖書，pp.122-123，1998。

2. Yamada, H., K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto, and Watanabe, "Optimum culture conditions for production by *Pseudomonas Chlororaphis* B23 of nitrilehydratase", *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 50, pp.2859-2865, 1986.
3. 林曜文, "沉浸式薄膜生物程序處理ABS樹脂廢水之研究"。碩士論文, 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系, 2004。
4. S. S. Madaenl, "The Application of membrane technology for water disinfection", *Wat. Res.*, 33, pp.301-308, 1999.
5. 張家源、張錦松、鍾依靜、甘鳳琴, "利用延長曝氣法與MBR法處理工業有機廢液之效率研究"。中華民國環境工程學會第二十九屆廢水處理技術研討會論文集, 台南市, 2004。
6. Halling-Sorensen, B. and Jorgensen, S. E., "The removal of nitrogen compounds from Wastewater", Elsevier, Amsterdam, 1993.
7. Randall, C. W., "Introduction and principles of biological nutrient removal. In: Design and Retrofit of Wastewater Treatment Plants for biological Nutrient Removal, C. W. Randall (Ed.)", Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, pp.7-84, 1992.
8. Robertson, L. A. and Kuenen, J. G., "Physiology of nitrifying and denitrifying bacteria. In: Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides and Halomethanes, J. E. Rogers and W. B. Whitman (Ed.)", American Society for Microbiology, Washington D.C., pp.189-199, 1991.
9. Bock E. and H. P. Koops., "The genus *Nitrobacter* and related genera", Springer-Verlag, New York, pp.2302-2309, 1992.
10. 莊蕙萍, "三段式流體化床生物程序處理PNA廢水之程序功能評估與微生物族群動態變化之探討"。碩士論文, 國立成功大學環境工程學系, 2003。
11. 黃俊霖, "以分子生物技術探討厭氧生物產氫之菌群結構"。碩士論文, 國立中央大學環境工程研究所, 2001。
12. Kane, M. D., L. K. Poulsen, and D. A. Stahl., "Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp.682-686, 1993.
13. Lin, C., and D. A. Stahl., "Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, pp.1348-1351, 1993.
14. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl., "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, pp.1919-1925, 1990.
15. Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl., "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, pp.2156-2162, 1997.

16. Wagner, M., G. Rath, H.-P. Koops, J. Flood, and R. Amann., “In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants”, *Water Sci. Tech.*, 34, pp.237-244, 1996.
17. Edzard Scholten., Thomas Lukow., Georg Auling., Reiner M. Kroppenstedt, Fred A. Rainey and Hans Diekmann., “*Thauera mechernichensis* sp. Nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant”, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 49, pp.1045-1051, 1999.
18. Jiang, Q. Q., Bakken, L. R., “Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, pp.2679-2684, 1999.
19. Agot Aakra., Janne B. Utaker., Ingolf F. Nes., Lars R. Bakken., “An evaluated improvement of the extinction dilution method for isolation of ammonia-oxidizing bacteria”, *Journal of Microbiological Methods.*, 39, pp.23-31, 1999.
20. Melissa A. Fouratt., Jeremy S. Rhodes., Charles M. Smithers., Nancy G Love., Ann M. Stevens., “Application of temperature gradient gel electrophoresis to the characterization of a nitrifying bioaugmentation product”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, pp.277-286, 2003.
21. A. Teske., E. Alm., J. M. Regan., S. Toze., B. E. Rittmann., and D. A. Stahl., “Evolutionary relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria”, *Journal of Bacteriology.*, 176, pp.6623-6630, 1994.
22. Roeland Grommen, Lenny Dauw, Willy Verstraete., “Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters”, *FEMS. Microbiology Ecology.*, 53, pp.1-11, 2005.
23. Yojio Anzai., Hongik Kim., Ju-Young Park., Hisatsugu Wakabayashi., and Hiroshi Oyaizu., “Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence”, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 50, pp.1563-1589, 2000.

ABSTRACT

Nitrifying Bacterial Diversity in the Membrane Bioreactor System Treating ABS Wastewater Revealed by 16S rDNA Molecular Approach

Chia-Yuan Chang*, Ann-Cheng Chen*, Chen-Yen Lin*,
Lin-Ming Shen**, Chien-Ming Chiou* and Hsien-Chang Hsiao*

*Department of Environmental Engineering and Science,
Chia-Nan University of Pharmacy and Science,
Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

**Department of Chemical and Material Engineering,
National Kaohsiung University of Applied Sciences,
Kaohsiung, Taiwan 80778, R.O.C.

ABSTRACT

Molecular biology techniques were applied to analyze nitrifying bacterial diversity in the laboratory-scale membrane bioreactor (MBR) system. The high removal efficiencies of COD and BOD were obtained under the steady state, at which hydraulic retention time (HRT) and sludge retention time (SRT) were 0.75 days and 30 days, respectively. The MBR system was able to retain high concentrations of MLSS at tank in the range of 28000–32000 mg L⁻¹. The results indicated that nitrification is a crucial process in the system. Therefore, the diversity of nitrifying bacteria in the system had been investigated by 16S rDNA molecular approach, including DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR), cloning, restriction fragment length polymorphism (RFLP), sequencing and construction of phylogenetic tree. The results of AOB in this study, 12 strains were classified from the results of RFLP. Besides, the clone NO.AOB-2 was dominant, the clone percentage of AOB-2 being 75.6% (121/160) in the system, similar to *Thauera mechernichensis* with the similarity of 96% by the sequencing data. The identified strain *Thauera mechernichensis*, characterized as nitrifying bacteria under aerobic and anaerobic condition, was isolated under the process of nitrification. In addition, Clone NO.AOB-11, AOB-23, AOB-33, AOB-34, AOB-71 and AOB-139) were clustered far away from the identified AOB in the gene bank, the percentage of the above mentioned clones being 15.0% (24/160), could be novel bacteria due to the low similarity with identified AOB. In terms of NOB, the clone NO.NOB1-3 was the first

dominate, the clone percentage of NOB1-3 being 40.1% (59/147) in the system, similar to *Nitrite-oxidizing bacterium* with the similarity of 99% by the sequencing data. The clone NO.NOB1-6 was the second dominate, the clone percentage of NOB1-6 being 30% (44/147) in the system, similar to *Uncultured Nitrobacter sp.* with the similarity of 97% by the sequencing data. We proposed that 30% of NOB1 was affiliated to the *Uncultured Nitrobacter sp.*, characterized as nitrifying bacteria in the high salinity breeding water. In addition, Clone NO. NOB1-106 and NOB1-132 were 5/147, could be novel bacteria due to the low similarity with identified NOB. The molecular data indicates that nitrifying bacterial diversity in the MBR system was different from nitrifying bacterial diversity in the traditional activated sludge process. The results of molecular data could be applied for designing, operation and analyses of bacteria in the MBR system.

Key words: SBR, ABS wastewater, Nitrification, AOB, NOB, 16S rDNA

