

# 以次世代定序方式分析畜產廢水處理活性污泥之 細菌多樣性<sup>(1)</sup>

廖仁寶<sup>(2)</sup> 黃雅玲<sup>(3)</sup> 黃子瑄<sup>(3)</sup> 陳若菁<sup>(4)</sup> 程梅萍<sup>(5)(6)</sup>

收件日期：111 年 8 月 8 日；接受日期：112 年 1 月 13 日

## 摘 要

本研究之目的在於利用次世代定序方式探討畜產廢水處理設施中活性與厭氧污泥中細菌多樣性，藉以瞭解不同活性污泥中細菌群落組成之差異，並期以延伸利用。試驗樣品含 4 種，包括在熱季採集 2 個活性污泥與 1 個厭氧污泥樣品，以及在涼季採集 1 個活性污泥樣品。使用瓷珠震盪方式直接萃取 4 種污泥樣品中之微生物 DNA，其後利用次世代定序方式進行 16S rRNA 基因變異區 V3 – V4 序列解序，並以生物資訊學工具分析樣品中之細菌多樣性。分析結果顯示，樣品物種豐度以厭氧污泥樣品含量最高，平均可達 2,205 種，活性污泥樣品則介於 1,682 – 1,854 種。活性污泥樣品含有占比較高之菌門為 *Bacteroidetes* 與 *Proteobacteria*；厭氧污泥樣品則為 *Bacteroidetes* 與 *Patescibacteria*。依操作分類單位 (operational taxonomic unit, OTU) 分析結果，占比前 10 名的菌屬有 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、DMER64、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B*、*Smithella*、*Limnobacter*、*Ignavibacterium*、*Nitrosomonas*、*Christensenellaceae R7 group* 及 *Arcobacter*，其中源自活性污泥之菌屬，多與氮循環相關。此外，PCoA (principal coordinates analysis)、NMDS (non-metric multidimensional scaling)、PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) 及 t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 分析結果顯示，4 種樣品可區分為 3 大群，即熱季所採集之好氧樣品 2 個為 1 群、厭氧樣品 1 群，而涼季所採集之好氧樣品則為另 1 群。綜而言之，以次世代定序方式解析涼、熱季污泥之細菌組成，可獲得重要的優勢細菌種類資訊，提供未來之研究或應用參考。

關鍵詞：活性污泥、細菌多樣性、廢水處理。

## 緒 言

國內畜牧廢水大多採用三段式處理，即固液分離、厭氧處理及好氧處理，期使放流水能夠達到環保法規規定的標準，如非草食動物與草食動物在化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD)、生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 及懸浮固體 (suspended solid, SS) 的規定量值須分別不大於 600 vs. 450、80 vs. 80 及 150 vs. 150 mg/L，若畜牧業者違反規定將被處以罰鍰 (行政院環境保護署，2014)。依據調查顯示，養豬場廢水若採用三段式處理且正常操作，絕大多數場放流水品質都可符合排放標準 (郭等，2008)。實務上，應用微生物可分解大量廢水中的營養鹽與降解有毒物質，減少排放水對環境的衝擊 (Amanatidou *et al.*, 2015)，且為一種經濟可行的操作方式 (Wagner and Loy, 2002; Rajasulochana and Preethy, 2016)。

廢水處理場中之活性污泥含有多種微生物，但僅約 1 – 15% 微生物屬可分離培養者 (Amann *et al.*, 1995)。許多的研究探討不同廢水種類如都市污水與工業廢水之處理廠中的活性污泥細菌組成，期以瞭解有機物代謝途徑與潛力 (Qin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021)。可作為探討活性污泥中微生物多樣性的方式，包括分離培養鑑定 (van Veen, 1973)、16S rRNA 基因庫 Sanger 定序 (廖等，2015; Liaw *et al.*, 2010)、16S rRNA 基因限制酶圖譜 (程等，2009)、16S rRNA 聚合酶連鎖反應 – 變性梯度膠體電泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) (Zhou *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013)、16S rRNA 基因高度變異區域

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2730 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室。

(6) 通訊作者，E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw。

V3 — V4 (the V3–V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene) (Isazadeh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020) 或全長次世代基因定序及多源基因體定序、分子探針 (Xu *et al.*, 2020)。其中 16S rRNA 基因 V3 — V4 次世代定序方式為一種可較完整性探討活性污泥中的細菌群落組成，廣為應用的評估方法。

本研究藉由次世代定序技術解析 16S rRNA 基因 V3 — V4 區序列，分析廢水處理設施中活性與厭氧污泥中細菌之組成，並藉以探討不同樣品的細菌群落分布及其差異，同時期能從中找出優勢細菌，以供後續活性污泥的跨域應用、廢水處理品質監測之參考或菌體及功能性基因之利用。

## 材料與方法

### I. 活性污泥樣品採集

分別於 2005 年 5 月 26 日、6 月 8 日及 2006 年 1 月 6 日在行政院農業委員會畜產試驗所總廢水處理場各採取活性污泥 1 L；2005 年 8 月 22 日採取厭氧污泥 1 L，測定其 pH 與溫度後，再個別自採樣瓶吸取 3 — 4 重複適量約 1 mL 污泥樣品至微量離心管，離心後去除上層液，冷凍保存於 -70°C 冷凍櫃。所採樣品之編號 2006 年 1 月 6 日採樣者命名為 AS1，2005 年 5 月 26 日、6 月 8 日及 8 月 22 日者分別命名為 AS2、AS3 及 AS4。畜產試驗所總廢水處理場採用三段式處理方式處理養豬廢水，因預期 5、6 月活性污泥微生物活性與組成較為穩定，篩選新穎脂解酵素基因機率較大，故密集採樣，1 月屬於涼季，採集樣品以當作對照。一般而言，厭氧污泥微生物組成較為穩定，所採集樣品亦當作對照。

### II. 活性污泥微生物 DNA 之萃取

利用 DNA 萃取試劑組 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO, USA) 分別進行活性與厭氧污泥中微生物 DNA 之萃取。將凍存之污泥樣品置入含陶瓷珠緩衝液之微量管，加入 60  $\mu$ L C1 緩衝液 (含 SDS 之試劑，用以溶解細胞)，震盪混勻 5 s。以組織均質機 (MagNA Lyser, Roche, Germany) 在 5,500 rpm 條件下，作用 25 s。在 10,000  $\times$  g 下離心 30 s，吸取上清液至新的微量離心管。依序以不同的緩衝液 (C2 — C6：C2 含特定試劑以沉澱非 DNA 之有機與無機物質，C3 含特定試劑以沉澱額外的非 DNA 之有機與無機物質，C4 為高濃度鹽溶液，C5 為含乙醇之溶液，C6 為洗提溶液) 與旋轉過濾管進行 DNA 純化步驟，最後可得 100  $\mu$ L DNA。

### III. 細菌多樣性分析

污泥細菌多樣性分析委託圖爾生物科技股份有限公司，採用微生物體 16S 擴增子定序方式進行。利用 16S rRNA 基因引子對 341F 與 805R，增幅放大 V3 — V4 區域，並進行序列解序。根據 barcode 序列和 PCR 擴增引物序列從分出各樣品數據，去除 barcode 和引物序列後，使用 FLASH (v. 1.2.11) 進行樣品的序列拼接 (最小重疊長度 10 bp；重疊區域最大錯配率為 0.1)，拼接後的序列稱為 raw tags。以 Qiime (v. 1.9.1) 進行序列品質過濾處理而獲得 clean tags，再以 UCHIME 演算法與資料庫 (Gold Database (16S) / Unite Database (ITS)) 篩除嵌合體序列後得到最終用於後續分析的 effective tags。利用 USEARCH (v.7.0.1090) 中的 UPARSE 演算法進行操作分類單位 (operational taxonomic unit, OTU) 分析，以 97% 的序列相同性 (identity) 當作 OTU 分類閾值。以 RDP Classifier (v. 2.2) 對 OTUs 代表序列進行物種注釋分析。使用 Qiime (v. 1.9.1) 分析 alpha 多樣性，含計算 Observed-species、Shannon、Simpson、ACE、Chao1、PD\_whole\_tree 及 Good's coverage 指數，以 Tukey 和 Kruskal (Post-hoc test) 分析 alpha 多樣性指數組間差異。使用 Qiime (v. 1.9.1) 分析 beta 多樣性，含計算 UniFrac (unique fraction distance) 距離與建構非加權配對群團分析法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 樣品聚類樹。以 R (v. 3.3.1) 繪製主成分分析 (principal component analysis, PCA)、主座標分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA)、非度量多維度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 及偏最小平方判別分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 分析圖。進一步以 t-分佈隨機鄰域嵌入 (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) 或利用線性判別分析 (linear discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe) 進行組別間主要微生物分析，LDA Score 的篩選值設定為 4。使用 R vegan 套件分別進行 Anosim、MRPP 及 Adonis 分析。T-test 檢驗組間物種差異顯著性分析。使用 R 的 Corplot 套件分析優勢物種 Spearman 相關係數。相關基因功能預測則採 PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, v. 1.1.1)，使用 Greengenes 資料庫與 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫，進行多源基因體功能預測。另外亦利用 BugBase 進行微生物表型預測，所使用的表型資料庫來源有 IMG (Integrated Microbial Genomes)、KEGG 及 PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center)，包括好氧性 (aerobic)、兼性厭氧性 (facultative anaerobic)、革蘭氏陰性 (Gram negative)、革蘭氏陽性 (Gram positive)、生物膜形成 (biofilm forming)、

移動元件 (mobile elements containing)、致病性 (pathogenic potential) 及氧化壓力耐受性 (oxidative stress tolerance)。

## 結果與討論

### I. 活性污泥樣品 pH 與溫度

自畜產試驗所總廢水處理場採集污泥樣品後，隨即攜回實驗室進行 pH 與溫度測定。活性污泥樣品 AS1、AS2 及 AS3 之 pH 與溫度，分別為 7.94、20℃；7.59、30℃；7.70、30℃，厭氧污泥樣品 AS4 之 pH 與溫度則為 7.07、29℃。活性污泥的 pH 會影響所含微生物的組成與其活性，在 pH 6.5–8.5 的環境下，微生物有較佳分解污染物的活性 (Painter and Loveless, 1983)，另有研究指出，在 pH 7.5 狀態下，微生物有最佳的生長率與受質移除率 (Yavuz and Celebi, 2000)。由此推論，本研究所採集的活性污泥之有機物降解活性處於良好的狀態。

### II. 活性污泥微生物 Alpha 多樣性分析

在活性污泥樣品的 alpha 多樣性指數分析中 (表 1)，同為好氧性質的活性污泥樣品裡，AS3 之 4 重複分析平均值  $1,812.0 \pm 29.1$ ，具最高的物種豐富度，其次為 AS2 之 3 重複分析平均值  $1,770.7 \pm 46.8$ ，最低者為 AS1 之 4 重複分析平均值  $1,700.5 \pm 19.1$ ；另厭氧污泥樣品 AS4 之 4 重複分析物種豐富度平均值達  $2,204.5 \pm 17.8$ ，較活性污泥高。在 Shannon 與 Simpson 指數的比較，其重複樣品分析之平均數值高低，分別依序為 AS4 ( $8.70 \pm 0.02$  vs.  $0.9906 \pm 0.0004$ )、AS2 ( $8.00 \pm 0.04$  vs.  $0.9897 \pm 0.0003$ )、AS3 ( $7.86 \pm 0.02$  vs.  $0.9887 \pm 0.0003$ )、AS1 ( $7.66 \pm 0.11$  vs.  $0.9834 \pm 0.0021$ )，然而其他的相關指數如 Chao1 與 ACE 之比較，其重複樣品分析之平均數值高低，則分別依序為 AS4 ( $2,435.1 \pm 26.8$  vs.  $2,411.8 \pm 29.8$ )、AS3 ( $2,265.2 \pm 32.4$  vs.  $2,271.8 \pm 22.8$ )、AS2 ( $2,202.3 \pm 105.5$  vs.  $2,182.3 \pm 83.2$ )、AS1 ( $2,094.9 \pm 41.8$  vs.  $2,082.7 \pm 31.1$ )。此外，各樣品分析之 Good's Coverage 平均值介於 99.22 – 99.45%，由此顯示定序分析的覆蓋率足夠說明樣品中之族群分析可靠性 (Good, 1953; Singleton *et al.*, 2001)。Shi *et al.* (2021) 調查分析豬場廢水處理系統活性污泥的物種豐富度為  $1,777.0 \pm 34.8$ ，與本研究相近，而在厭氧污泥樣品的物種豐富度為  $1,887.6 \pm 35.66$ ，則低於本研究分析所得之數值；另其厭氧與活性污泥樣品之 Shannon 指數分析數值分別為 5.37 與 5.24，亦低於本研究所得之分析數值 7.53 – 8.73。Yan *et al.* (2021) 分析養牛場廢水處理系統的 11 個污泥樣品，發現 Chao、Ace、Shannon 及 Simpson 指數的數值範圍分別為 786.90 – 1,394.97、702.67 – 1,427.56、4.063 – 5.024 及 0.0147 – 0.0947，皆低於本研究分析所得者。

表 1. 不同污泥樣品操作分類單元 alpha 多樣性分析

Table 1. Estimates of alpha diversity for operational taxonomic units (OTUs) for different sludge samples

| Group | Sample | Species richness | Shannon | Simpson | Chao1      | ACE        | Good's coverage |
|-------|--------|------------------|---------|---------|------------|------------|-----------------|
| AS1   | AS1.1  | 1,703            | 7.5276  | 0.9804  | 2,128.5939 | 2,095.3928 | 0.9929          |
|       | AS1.2  | 1,726            | 7.7563  | 0.9846  | 2,133.2468 | 2,113.6133 | 0.9929          |
|       | AS1.3  | 1,682            | 7.6229  | 0.9833  | 2,064.3790 | 2,081.3319 | 0.9930          |
|       | AS1.4  | 1,691            | 7.7376  | 0.9852  | 2,053.5677 | 2,040.4517 | 0.9934          |
| AS2   | AS2.1  | 1,756            | 8.0157  | 0.9896  | 2,193.0270 | 2,161.0179 | 0.9929          |
|       | AS2.2  | 1,733            | 7.9882  | 0.9894  | 2,101.8140 | 2,111.7683 | 0.9932          |
|       | AS2.3  | 1,823            | 8.0657  | 0.9900  | 2,312.1181 | 2,274.1229 | 0.9922          |
| AS3   | AS3.1  | 1,809            | 7.8862  | 0.9890  | 2,229.6753 | 2,253.7284 | 0.9923          |
|       | AS3.2  | 1,793            | 7.8488  | 0.9887  | 2,292.0615 | 2,267.3517 | 0.9920          |
|       | AS3.3  | 1,854            | 7.8469  | 0.9882  | 2,245.8576 | 2,304.9256 | 0.9922          |
|       | AS3.4  | 1,792            | 7.8745  | 0.9888  | 2,293.3840 | 2,261.1941 | 0.9921          |
| AS4   | AS4.1  | 2,199            | 8.6933  | 0.9905  | 2,416.2333 | 2,409.0380 | 0.9945          |
|       | AS4.2  | 2,225            | 8.6907  | 0.9904  | 2,463.9200 | 2,449.0421 | 0.9942          |
|       | AS4.3  | 2,183            | 8.7037  | 0.9904  | 2,408.6818 | 2,376.0762 | 0.9947          |
|       | AS4.4  | 2,211            | 8.7292  | 0.9912  | 2,451.6653 | 2,413.0165 | 0.9944          |

在本研究 4 個活性污泥樣品中所含 OTUs 相似性的分析方面，由 Venn diagram 顯示 4 個樣品總共含 3,767 個 OTUs，其中 1,077 個相同 (相似性  $\geq 97\%$ )，各樣品特有的 OTU 數目依序為 200、34、41 及 647 個，特有 OTUs 占 24.5% (圖 1)。3 個同為活性污泥樣品 AS1、AS2 及 AS3 有 1,647 個相同 OTUs，其中 AS2 與 AS3 有 2,021 個相同 OTUs，高於 AS1 與 AS2 之 1,783 個相同 OTUs，以及 AS1 與 AS3 之 1,876 個 OTUs。依樣品的採集日期，AS2 與 AS3 在同一年 5、6 月採樣，而 AS1 則在次年的 1 月採集，故而顯示活性污泥的微生物多樣性隨著季節與月份變化，兩個樣品的採集月份相近則有較高相似性的微生物組成。微生物多樣性之變化，常隨著季節、溫度、pH 及營養等因素而進行動態改變 (Ijoma *et al.*, 2021)。

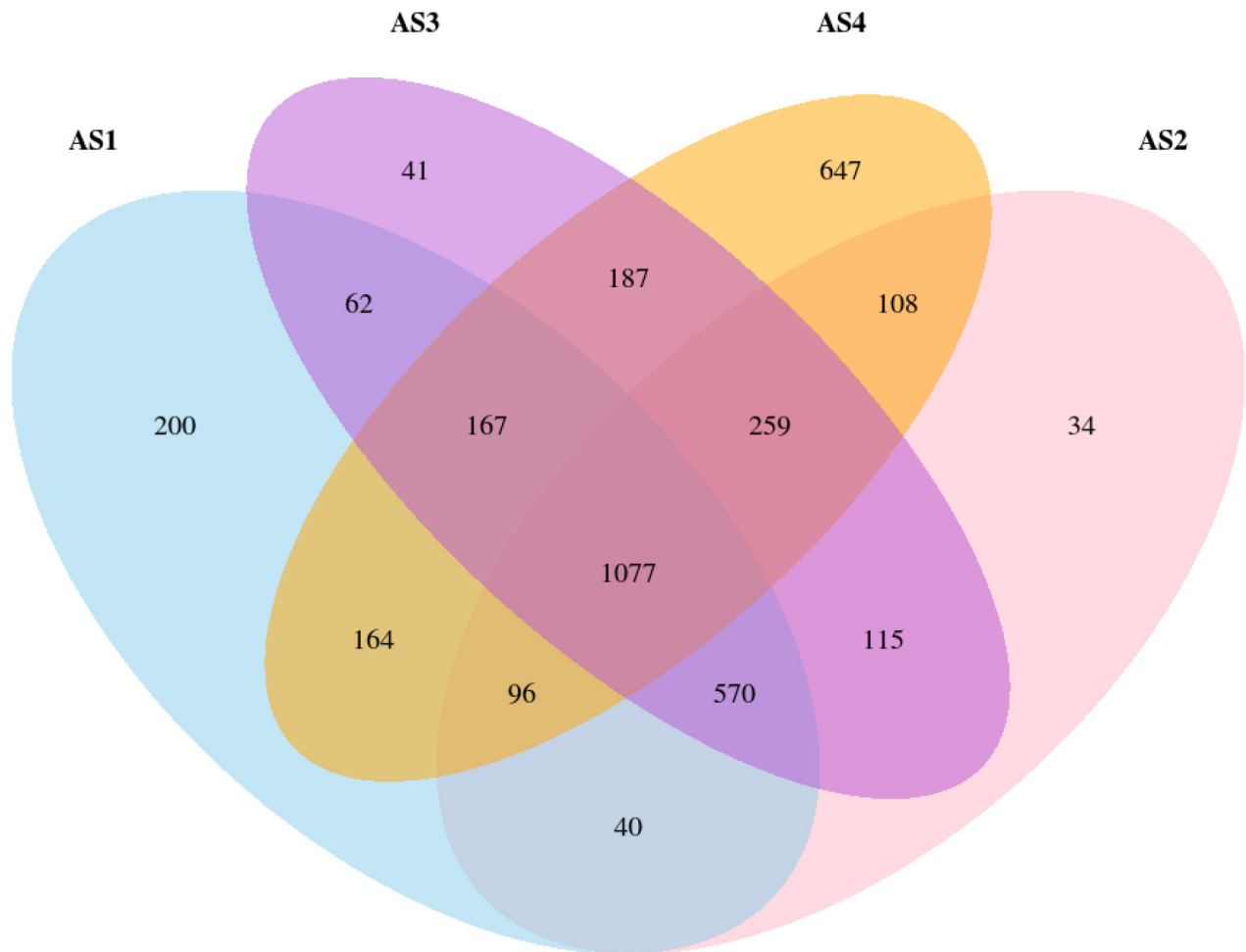


圖 1. 4 種污泥 OTUs 之分布。

Fig. 1. OTUs distribution among 4 sludge samples.

### III. 活性污泥微生物 Beta 多樣性分析

當以 unweighted UniFrac KW.post-hoc.LSD 法對 4 種活性污泥樣品進行分析，結果顯示每種樣品間皆有顯著性的差異 (圖 2a)；然若以 weighted UniFrac KW.post-hoc.LSD 方式分析，結果顯示 AS1 與 AS2 和 AS1 與 AS3 之間有顯著的差異 (圖 2b)。當以 weighted UniFrac 距離進行 PCoA 分析作圖時，發現 4 個樣品之個別重複分析樣品均緊密在一起，此顯示重複樣品的一致性甚佳 (圖 3a)。而 AS2 與 AS3 則分布在同一象限接近處，顯示此兩者樣品性質相近。進一步以 NMDS (圖 3b)、t-SNE (圖 3c)、PLS-DA (圖 3d) 方式統計分析，皆有類似的分析結果。上述分析結果顯示，AS2 與 AS3 在取樣的日期較接近且無環境過大變化的狀況下，兩者有較接近的微生物組成。同時，各組組內樣品相異性低，一致性佳，且組間的差異性，無論使用本段上述何種分析方法均可適當呈現。

### IV. 活性污泥微生物功能預測

利用 PICRUSt 結合 16S rRNA 定序資料、GreenGenes 資料庫及 KEGG 資料庫，進行多源體基因體功能預測。在第二層代謝 (metabolism) 的分析中，基因占比較高的代謝種類依序為胺基酸、醣類及能量，最低者為



其他次級代謝物生合成 (圖 4)。其中在醣類代謝部分，厭氧樣品 AS4 的基因占比高於好氧樣品 AS1、AS2 及 AS3，顯示三段式廢水處理過程，在厭氧處理階段可分解碳水化合物以生成沼氣。另於 BugBase 的分析，針對好氧的表型做出與實際採樣樣品性質一致的結果，即 AS1–AS3 為好氧樣品，AS4 為厭氧樣品。其他分析結果顯示，兼性厭氧菌較多存在於 AS2 與 AS3，同時顯示較容易生成生物膜、含較多革蘭氏陰性菌、可動遺傳因子、較高致病性及較耐環境壓力者均為好氧樣品。另外，分析推估厭氧樣品含較高之革蘭氏陽性菌比率 (圖 5)。

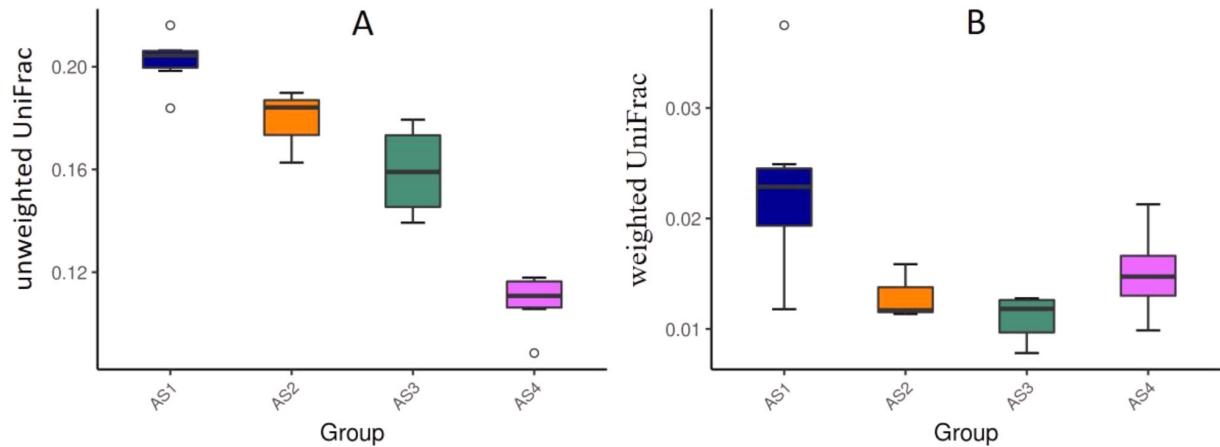


圖 2. 以 unweighted 與 weighted UniFrac 比較各組樣品 beta 多樣性分析箱型圖。

Fig. 2. Comparison of beta diversity of 4 sludge samples by unweighted and weighted UniFrac methods. A: unweighted UniFrac; B: weighted UniFrac. The circles mean outliers.

#### V. 優勢物種分析

在各種污泥樣品所含 OTUs 類別的比較，本研究的活性污泥的優勢菌門包括 *Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Patescibacteria* 及 *Chloroflexi*，厭氧污泥的優勢菌門則為 *Bacteroidetes*、*Patescibacteria*、*Firmicutes* 及 *Proteobacteria* (圖 6)。在牛場廢水處理系統中發現，整體處理過程的優勢菌門為 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 及 *Firmicutes* (Yan *et al.*, 2021)。而在豬場廢水處理系統中，活性污泥含有的優勢菌門則為 *Proteobacteria*、*Chlorolipid*、*Bacteroidetes*、*Spirochetes* 及 *Firmicutes* (Shi *et al.*, 2021)，另有研究養豬廢水處理過程中的優勢菌門為 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 及 *Actinobacteria* (Da Silva *et al.*, 2015)。Kumar *et al.* (2020) 分析豬糞中微生物組成，發現豬糞經過連續 14 週的儲存，每週取樣分析，菌門分布之平均數值顯示，以 *Firmicutes* 占 76.2% 為優勢菌門，次為 *Bacteroidetes* (14.4%) 及 *Proteobacteria* (4.9%)，但經過 14 週儲存後，*Firmicutes* 占比漸減，而 *Bacteroidetes* 占比則漸增。

本研究經過分析所有污泥樣品 OTUs，占比前 10 名的菌屬有 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、DMER64、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B*、*Smithella*、*Limnobacter*、*Ignavibacterium*、*Nitrosomonas*、*Christensenellaceae R7 group* 及 *Arcobacter* (圖 7)，涼季活性污泥 AS1 的優勢菌屬有 *Denitratisoma*、*Arcobacter*、*Ignavibacterium*、*Limnobacter* 及 *Ferruginibacter*，熱季活性污泥 AS2 與 AS3 優勢菌屬為 *Ferruginibacter*、*Limnobacter*、*Denitratisoma*、*Nitrosomonas* 及 *Bacterium enrichment culture clone R4-41B*，熱季之厭氧污泥優勢菌屬則為 DMER64、*Smithella*、*Bacterium enrichment culture clone R4-41B* 及 *Christensenellaceae R7 group*。活性污泥樣品中之優勢菌屬大部分與氮代謝相關，如硝化菌或脫硝菌，其中 *Denitratisoma*、*Ferruginibacter*、*Limnobacter*、*Arcobacter* 及 *Ignavibacterium* 為好氧脫硝菌，*Nitrosomonas* 為硝化菌。另在厭氧污泥中之 *Smithella* 則為硫化物氧化菌，DMER64 推估為優越之木質素分解者，在甲烷化過程中扮演重要的角色 (Arthur *et al.*, 2022)。當以屬階層所注釋到的物種資訊進行線性組合降維分析時，可觀察貢獻度較大的關鍵物種，如 AS1 之關鍵菌屬為 *Arcobacter* 與 *Denitratisoma*；AS2 與 AS3 關鍵菌屬為 *Ferruginibacter*；AS4 關鍵菌屬則為 *Smithella* 與 DMER64 (圖 8)。另外，尚有其他為數眾多特性不明的菌株。因此，畜牧場三段式廢水處理設施利用多種微生物降解有機污染物，並可減少廢水中的氮素。另藉由高通量 DNA 定序技術與生物資訊分析，可發現廢水處理中重要之微生物種類。此外，養豬廢水處理之活性污泥經過相關的研究指出，可跨域應用於不同產業廢水的處理，如石化業廢水經過畜牧污泥的植種應用，可降低廢水中之 COD，並俾益於減少工業廢水處理時間與維持處理系統微生物穩定性 (鄭等, 2020)。另有研究指出，活性污泥亦為探勘新穎酵素的重要生物資源之一 (Liaw *et al.*, 2010; Kimura and Kamagata, 2016)。

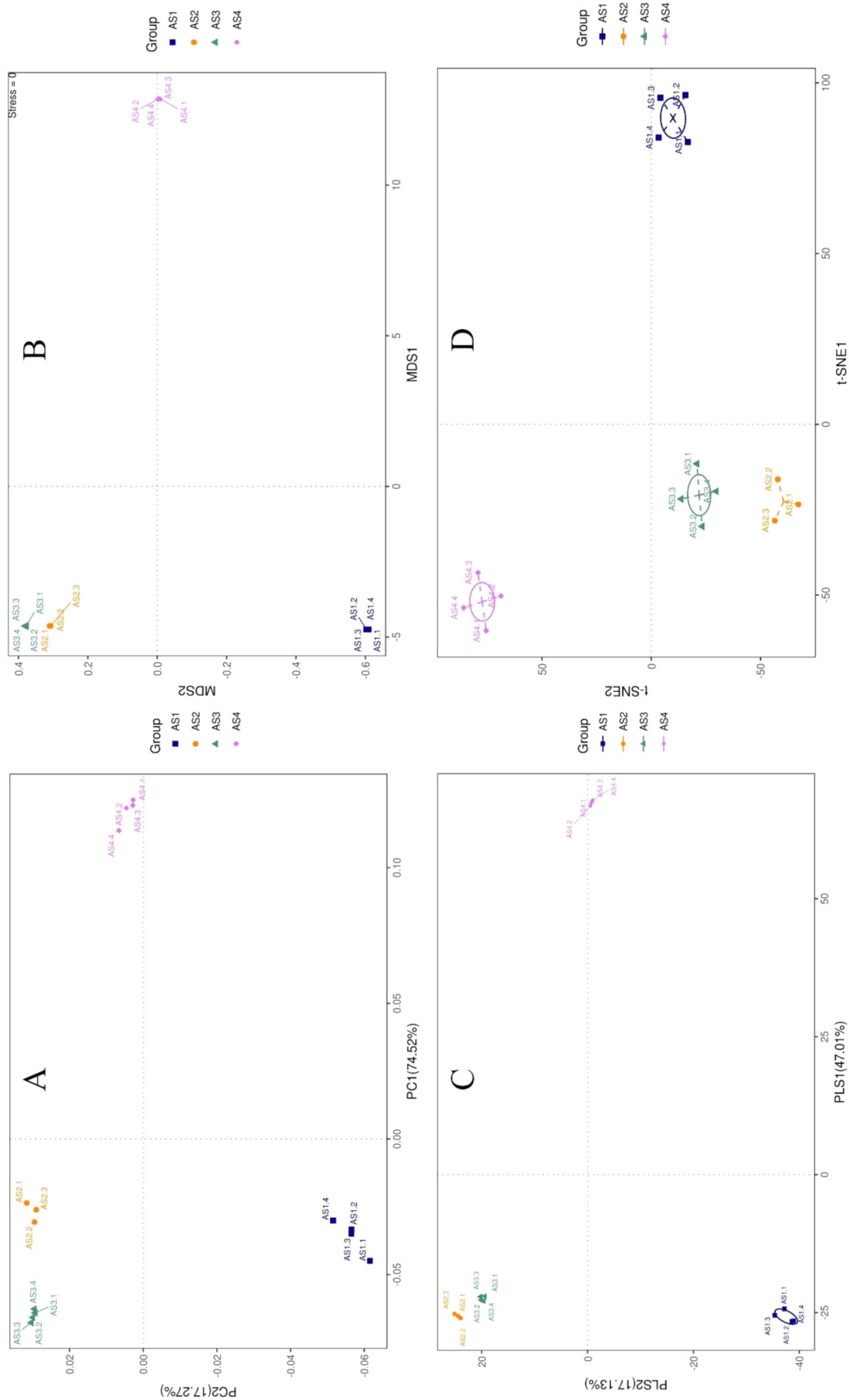


圖 3. 以 PCoA、NMDS、PLD-SA 及 t-SNE 分析樣品組間與組內之差異性。  
Fig. 3. Difference between and within groups by PCoA, NMDS, PLD-SA, and t-SNE analyses.  
a: PCoA; b: NMDS; c: PLD-SA; d: t-SNE.

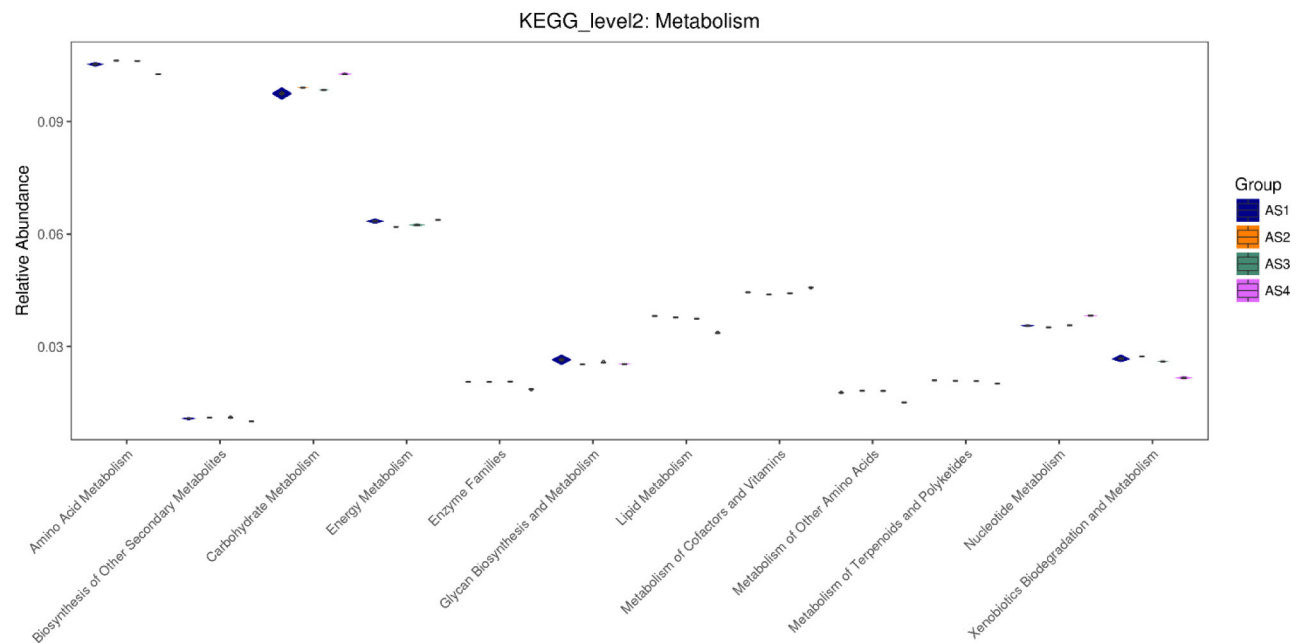


圖 4. 以 KEGG 資料庫預測污泥中微生物之功能。

Fig. 4. Function prediction of microorganisms in the sludge samples by PICRUSt based on KEGG database.

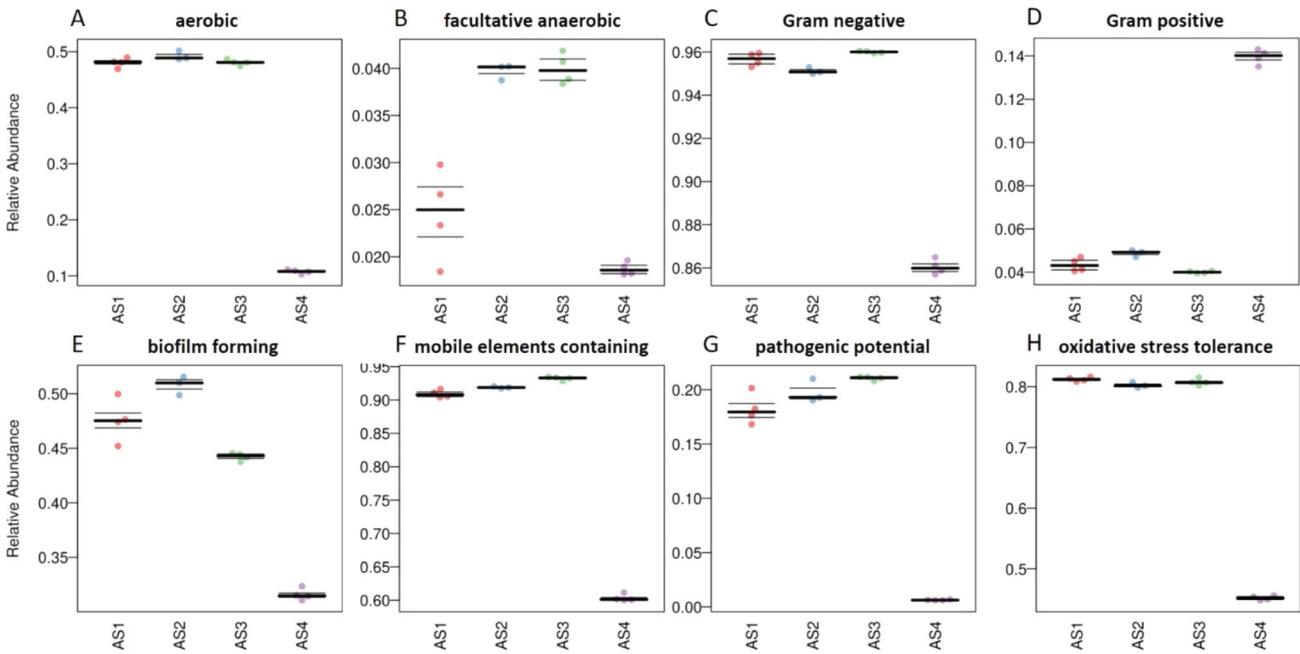


圖 5. 污泥微生物表型預測。

Fig. 5. Phenotype prediction of microorganisms in the sludge samples.

A: aerobic; B: facultative anaerobic; C: Gram negative; D: Gram positive; E: biofilm forming; F: mobile elements containing; G: pathogenic potential; H: oxidative stress tolerance.

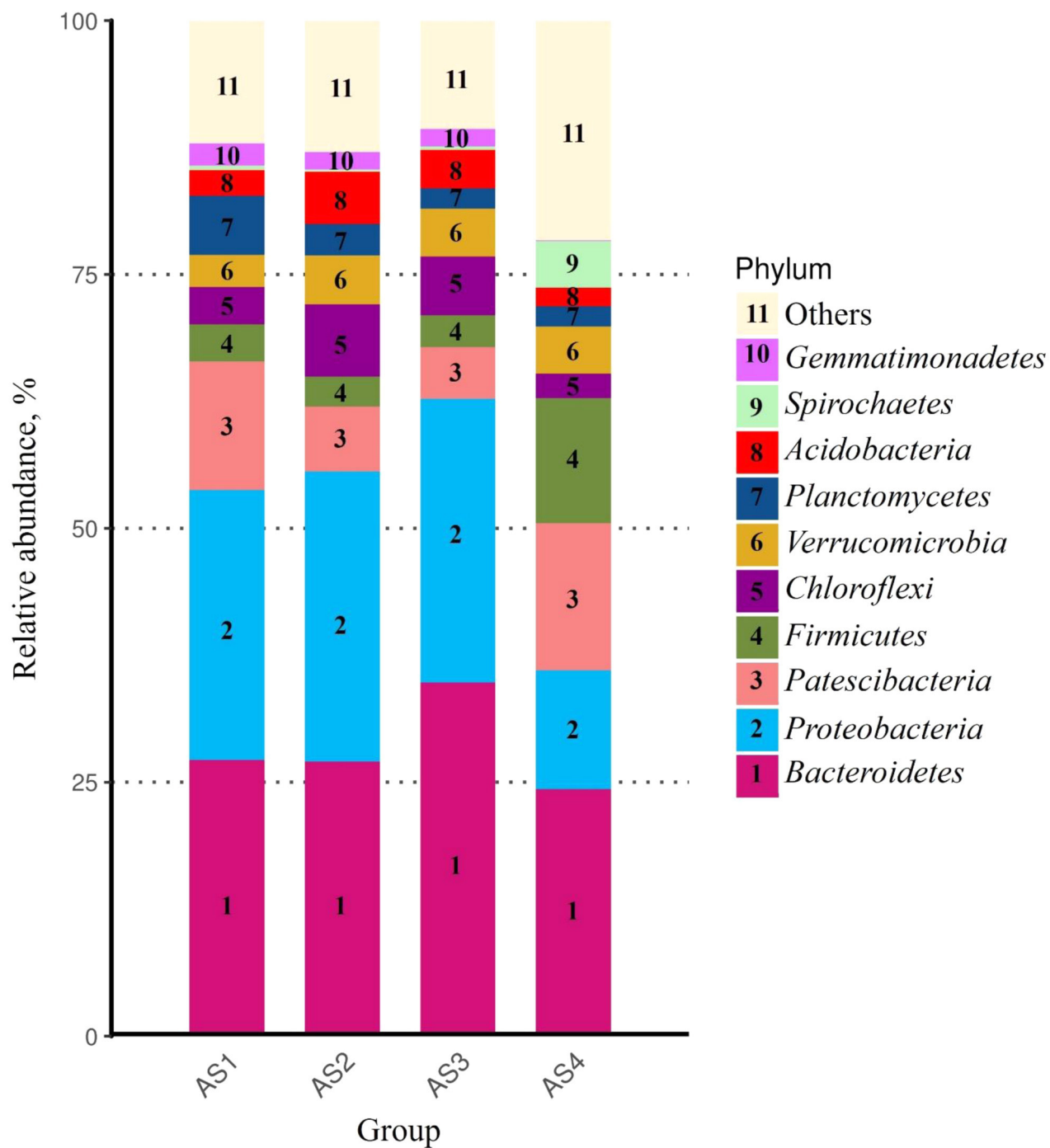


圖 6. 污泥樣品菌門之分布。

Fig. 6. Distribution of taxonomic affiliation at phylum level of sludge samples.



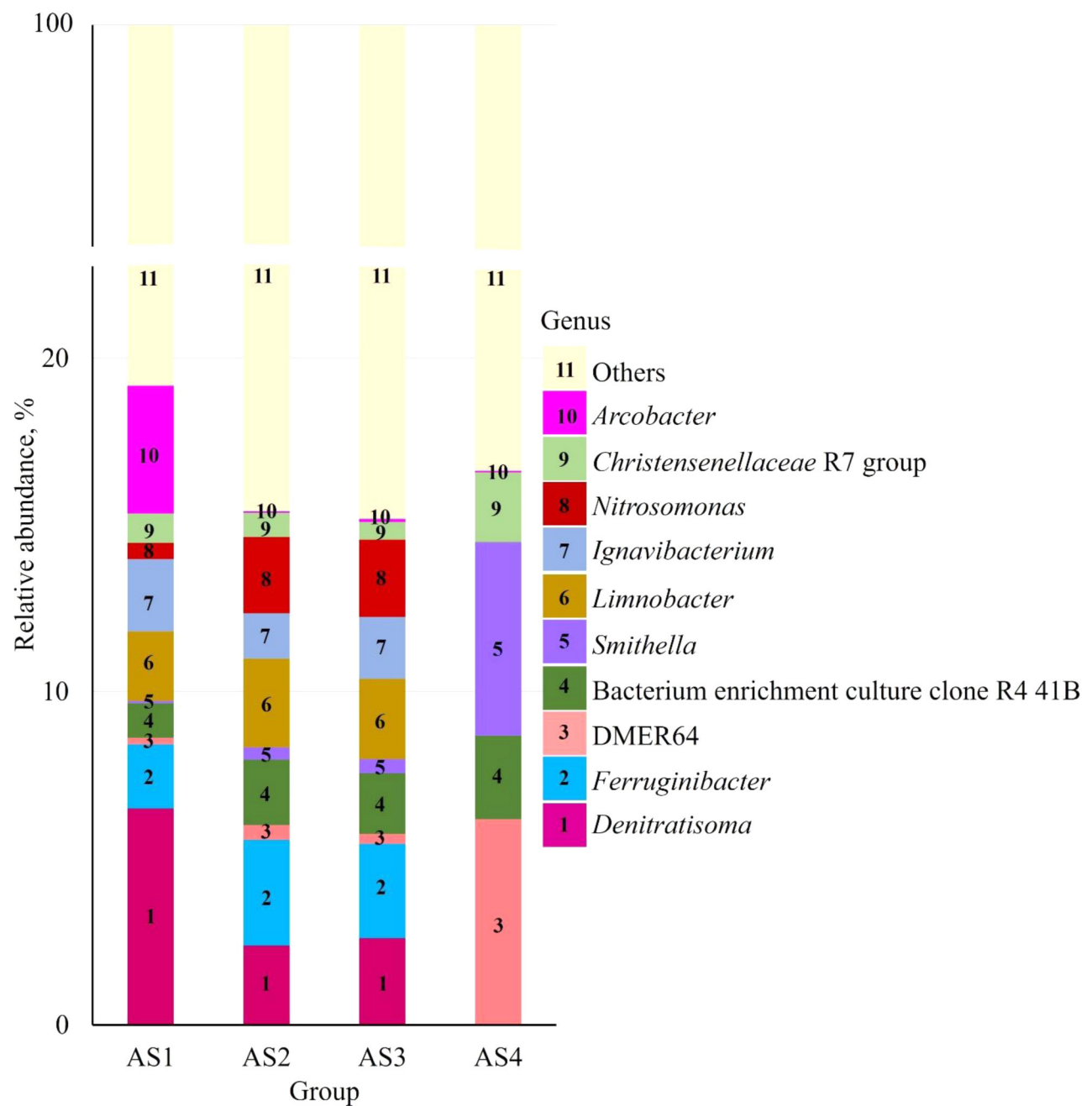


圖 7. 污泥樣品優勢菌屬之分布。

Fig. 7. Distribution of dominant genus in the sludge samples.

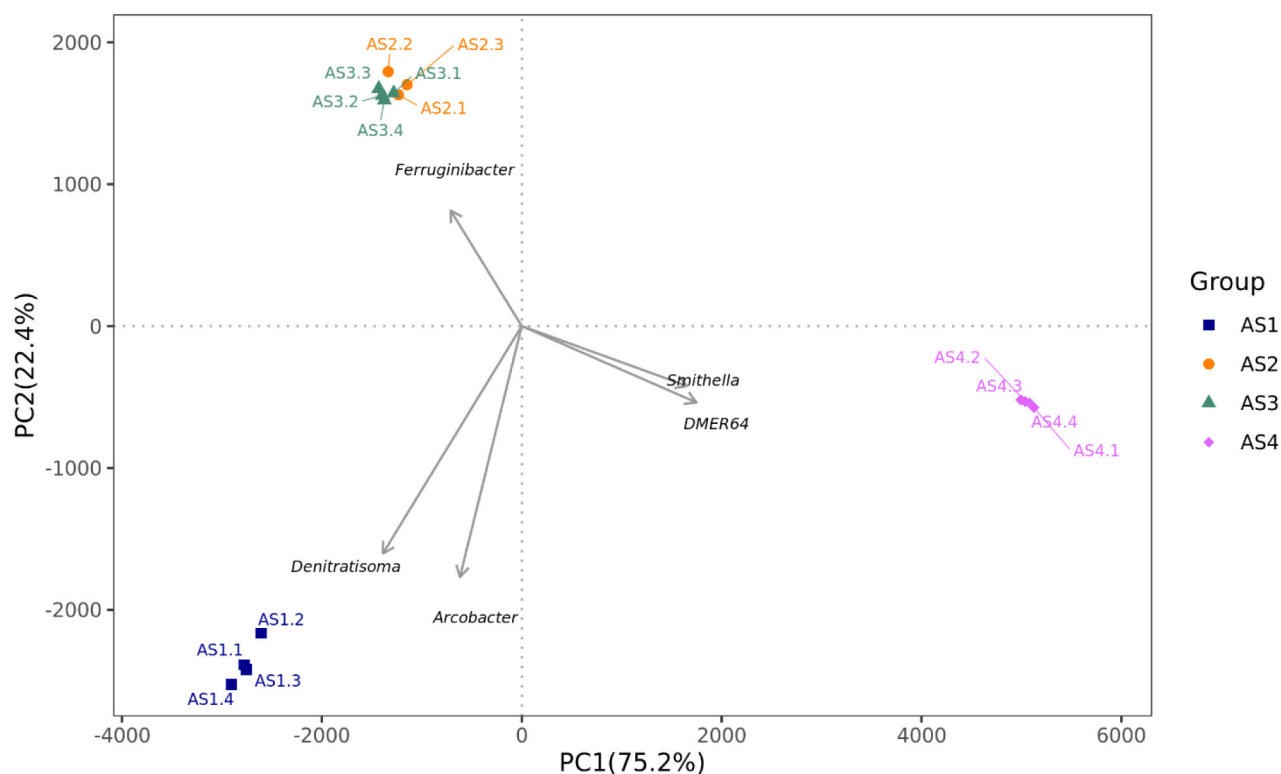


圖 8. 污泥樣品之屬階層 PCA 分析圖。

Fig. 8. Principal component analysis based on the operational taxonomic unit abundance at genus level in different sludge samples.

## 結 論

維持活性污泥微生物的穩定性，常為廢水處理成功的關鍵。本研究藉先進的 DNA 解析技術與資料分析功能，探討活性污泥的細菌多樣性，瞭解其中關鍵的優勢菌種，期可提供畜牧廢水處理設施之廢水處理狀態的診斷參考之一，進而改進廢水處理之效能，俾利生態環境與畜牧產業之永續發展。

## 參考文獻

- 行政院環境保護署。2014。放流水標準。中華民國 103 年 1 月 22 日。行政院環境保護署環署水字第 1030005842 號令修正發布第二條條文。
- 郭猛德、蕭庭訓、王政騰。2008。養豬三段式廢水與污泥處理技術。畜牧半月刊 81(5)：29-38。
- 程梅萍、蕭庭訓、廖仁寶。2009。豬糞尿厭氣處理污泥中之甲烷菌分布探討。畜產研究 42(3)：255-264。
- 廖仁寶、陳若菁、吳明哲、陳水財、程梅萍、蕭庭訓。2015。家禽屠宰場廢水處理活性污泥之細菌多樣性分析。畜產研究 48(4)：265-271。
- 鄭羽展、李志杰、林依杏、林振益。2020。植種養豬場厭氧污泥對一石化廢水厭氧單元化學需氧量降解之初探。中畜會誌 49(3)：253-266。
- Amanatidou, E., G. Samiotis, and D. Bellos. 2015. Net biomass production under complete solids retention in high organic load activated sludge process. *Bioresour. Technol.* 182: 193-199.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arthur, R., S. Antonczyk, S. Off, and P. A. Scherer. 2022. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of wheat straw in a CSTR system with 'Synthetic Manure': Impact of nickel and tungsten on methane yields, cell count, and microbiome. *Bioengineering (Basel)*. 9: 13.
- Chen, H. J. Y. Z. Lin, J. M. Fanjiang, and C. Fan. 2013. Microbial community and treatment ability investigation in AOA

- process for the optoelectronic wastewater treatment using PCR-DGGE biotechnology. *Biodegradation* 24: 227-243.
- Da Silva, M. L., M. E. Cantão, M. P. Mezzari, J. Ma, and C. W. Nossa. 2015. Assessment of bacterial and archaeal community structure in swine wastewater treatment processes. *Microb. Ecol.* 70: 77-87.
- Good, I. J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237-264.
- Ijoma, G. N., R. Nkuna, A. Mutungwazi, C. Rashama, and T. S. Matambo. 2021. Applying PICRUSt and 16S rRNA functional characterisation to predicting co-digestion strategies of various animal manures for biogas production. *Sci Rep.* 11: 19913.
- Isazadeh, S., S. Jauffur, and D. Frigon. 2016. Bacterial community assembly in activated sludge: mapping beta diversity across environmental variables. *Microbiologyopen* 5: 1050-1060.
- Liaw, R. B., M. P. Cheng, M. C. Wu, and C. Y. Lee. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 101: 8323-8329.
- Kimura, N. and Y. Kamagata. 2016. A thermostable bilirubin-oxidizing enzyme from activated sludge isolated by a metagenomic approach. *Microbes Environ.* 31: 435-441.
- Kumar, H., Y. N. Jang, K. Kim, J. Park, M. W. Jung, and J. E. Park. 2020. Compositional and functional characteristics of swine slurry microbes through 16S rRNA metagenomic sequencing approach. *Animals (Basel)*. 10: 1372.
- Painter, H. A. and J. E. Loveless. 1983. Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated-sludge process. *Water Res.* 17: 237-248.
- Qin, H., B. Ji, S. Zhang, and Z. Kong. 2018. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Mar. Pollut. Bull.* 135: 801-807.
- Rajasulochana, P. and V. Preethy. 2016. Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water-A comprehensive review. *Resource-Efficient Technologies* 2: 175-184.
- Shi, L., N. Liu, G. Liu G, and J. Fang. 2021. Bacterial community structure and dynamic changes in different functional areas of a piggery wastewater treatment system. *Microorganisms* 9: 2134.
- Singleton, D. R., M. A. Furlong, S. L. Rathbun, and W. B. Whitman. 2001. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4374-4376.
- van Veen, W. L. 1973. Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 189-205.
- Wagner, M. and A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 218-227.
- Xu, W., V. R. Brand, S. Suresh, M. A. Jensen, R. W. Davis, C. S. Criddle, R. P. St Onge, and R. W. Hyman. 2020. Community members in activated sludge as determined by molecular probe technology. *Water Res.* 168: 115104.
- Yan, W., N. Wang, D. Wei, C. Liang, X. Chen, L. Liu, and J. Shi. 2021. Bacterial community compositions and nitrogen metabolism function in a cattle farm wastewater treatment plant revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* 28: 40895-40907.
- Yang, Y., L. Wang, F. Xiang, L. Zhao, and Z. Qiao. 2020. Activated sludge microbial community and treatment performance of wastewater treatment plants in industrial and municipal zones. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17: 436.
- Yavuz, H. and S. S. Çelebi. 2000. Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 22-27.
- Zhang, B., X. Xu, and L. Zhu. 2018. Activated sludge bacterial communities of typical wastewater treatment plants: distinct genera identification and metabolic potential differential analysis. *AMB Express* 8: 184.
- Zhang, L., Z. Shen, W. Fang, and G. Gao. 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689:1181-1191.
- Zhang, X., Z. Song, Q. Tang, M. Wu, H. Zhou, L. Liu, and Y. Qu. 2021. Performance and microbial community analysis of bioaugmented activated sludge for nitrogen-containing organic pollutants removal. *J. Environ. Sci. (China)* 101: 373-381.
- Zhou, S., C. Wei, L. Ke, and H. Wu. 2010. PCR-DGGE as a supplemental method verifying dominance of culturable microorganisms from activated sludge. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1592-1596.

# Analysis of bacterial diversity in activated sludge from livestock wastewater treatment by next-generation sequencing technology <sup>(1)</sup>

Ren-Bao Liaw <sup>(2)</sup> Ya-Ling Huang <sup>(3)</sup> Tzu-Hsuan Huang <sup>(3)</sup>  
Jo-Ching Chen <sup>(4)</sup> and Mei-Ping Cheng <sup>(5)(6)</sup>

Received: Aug. 8, 2022; Accepted: Jan. 13, 2023

## Abstract

The purpose of this study was to explore the bacterial diversity in activated and anaerobic sludge in livestock wastewater treatment facilities by next-generation sequencing, so as to understand the differences in bacterial community composition in different activated sludges, and to extend the utilization. Four sludge samples were collected, including 2 aerobic and 1 anaerobic samples collected in the hot season and 1 aerobic sample collected in the cool season. The microbial DNA in the four sludge samples was directly extracted by the method of ceramic bead shaking, and then the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene sequence was revealed by the next-generation sequencing method, and the bacterial diversity in the samples was analyzed by bioinformatics tools. The analysis results showed that the anaerobic sludge samples had the highest species abundance, with an average of 2,205 species, and the activated sludge samples ranged from 1,682 to 1,854 species. The bacteria in the activated sludge samples were *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* with a higher proportion; the anaerobic sludge samples were *Bacteroidetes* and *Patescibacteria*. Based on the OTU analysis of 4 sludge samples, top 10 genera with higher frequency included *Denitratisoma*, *Ferruginibacter*, DMER64, *Bacterium* enrichment culture clone R4-41B, *Smithella*, *Limnobacter*, *Ignavibacterium*, *Nitrosomonas*, *Christensenellaceae* R7 group, and *Arcobacter*. Besides, the results of PCoA (principal component analysis), NMDS (non-metric multidimensional scaling), PLS-DA (partial least squares discriminant analysis), and t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) analyses showed that the 4 samples could be divided into 3 groups, namely 2 aerobic samples collected in the hot season as the same group, the other one group of anaerobic sample, and another group of an aerobic sample collected in the cool season. In summary, revealing the microbial composition of sludge samples collected from the hot and cool seasons by next-generation sequencing analysis is an important approach, and the important information of dominant bacteria obtained in this study can be a reference for further research or applications.

Key words: Activated sludge, Bacterial diversity, Wastewater treatment.

---

(1) Contribution No. 2730 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Deputy Director General Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(6) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw.