

家禽屠宰場廢水處理活性污泥之細菌多樣性分析⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 吳明哲⁽²⁾ 陳水財⁽³⁾ 程梅萍⁽⁴⁾ 蕭庭訓⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：104 年 5 月 18 日；接受日期：104 年 7 月 24 日

摘 要

本研究之目的在於探討不同污泥齡處理家禽屠宰場廢水活性污泥中之細菌多樣性，藉以瞭解活性污泥中細菌群落之變化情形。使用商業核酸萃取套組直接分別萃取 7、14、21 及 28 d 污泥齡之活性污泥樣品中之微生物 DNA，其後以細菌 16S 核糖體核酸小單位基因專一性引子進行 PCR 增幅放大，並將增幅片段選殖於 TA 選殖套組，以建立 16S rRNA 基因庫，並進行 DNA 定序與細菌多樣性分析。由 4 種樣品所得幾乎完整的 16S rRNA 基因序列數目分別為 116、122、119 及 108 個，操作分類單位數目則分別為 73、86、80 及 41 個。結果顯示，不同污泥齡的樣品菌相分布有差異，而所屬菌門有 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Gemmatimonadetes*、*Chloroflexi*、*Candidatus Saccharibacteria*、*Planctomycetes*、*Proteobacteria*、*Verrucomicrobia* 及 unclassified bacteria，4 種樣品中皆以 *Proteobacteria* 佔最多數 (> 70%)。在株系操作分類單位百分比的分析中顯示，污泥齡 28 d 樣品的百分比最低 (38.0%)，表示活性污泥中的菌相組成漸趨單純，且以光合菌屬 *Rhodobacter* 最為豐富，COD 的去除率可達 96% 且出流水之微生物濃度亦較低，僅 8 mg VSS/L，期能將此結果應用於較大規模家禽屠宰場廢水之處理。

關鍵詞：活性污泥、微生物、細菌多樣性。

緒 言

家禽屠宰場之污染物主要為羽毛與廢水，固體羽毛可委託廠商處理，但大量的廢水則需設置廢水處理設施以進行處理，使排放水能夠符合環保法令規定之排放標準。屠宰場廢水放流水之標準，其化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD)、生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD)、懸浮固體 (suspended solid, SS) 及真色色度 (American dye manufacturers institute, ADMI)，必須分別不大於 150、80、80 mg/L 及 550 之數值，同時放流水之 pH 值亦須在 6—9 範圍內 (行政院環境保護署, 2014)。屠宰場廢水含有機物如脂肪、蛋白質、血液及可供微生物生長的氮、磷營養鹽。家禽屠宰場廢水之處理，一般採用生物程序與化學程序，生物程序基本上可分厭氧程序與好氧程序兩種，分別適用於高濃度廢水與低濃度廢水，且廣泛應用於業界。活性污泥法是以微生物為主體的生物處理技術，由細菌、原生動物、輪蟲及真菌等微生物組成，稱為活性污泥。在足夠的供氧環境中，一群好氧性微生物藉吸附與生化氧化作用，分解去除廢水中有機物以達淨化水質之目的。

以分子生物學技術探討不同廢水處理中活性污泥之微生物群落組成，已成研究的趨勢 (Rani *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2015)，畢竟自然界中絕大多數的微生物難以分離培養 (Amann *et al.*, 1995; Torsvik and Øvreås, 2002)。通常最多採用的分析標的為微生物的小次單位 rRNA，如針對細菌的 16S rRNA 基因與真菌的 18S rRNA 基因，其餘尚有針對特定的功能性基因如 *amoA* 與 *pfuM* 基因，進行相關基因庫的建構、DNA 序列解析及資料庫比對分析，進而瞭解樣品中微生物的組成與其多樣性程度。目前 DNA 定序技術與時俱進，序列資料處理快速，檢測成本急遽下降，故能分析複雜的生物樣本組成。

本研究藉由多源基因體學的方式，建構幾乎全長的 16S rRNA 基因庫，經由 DNA 定序與比對，以分析不同污泥齡操作之活性污泥系統中細菌的組成，探討細菌群落之分布及其差異，同時期能從中找出處理家禽屠宰場廢水中有機物之優勢細菌，以提供後續廢水處理之應用與探討。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2306 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

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

材料與方法

I. 活性污泥系統操作及樣品採集

本試驗之活性污泥微生物樣品取自活性污泥系統處理家禽屠宰場廢水之試驗。活性污泥系統有效容積為 19.8 L 之壓克力製懸浮生長反應器及 4.4 L 之沉澱池 (圖 1)，反應器底部設置曝氣石，以矽膠管連結單孔打氣機，提供基質降解反應及微生物生長與維持所需之溶氧，維持 3 mg/L 以上，污泥迴流比皆控制為 1，並使反應器內處於完全混合狀態。活性污泥系統之進流量及進流 COD 濃度都分別控制為 40 L/d 及 750 mg/L (有機負荷率為 1.52 kg COD/m³/d)，反應器內置有完全浸入式自動加熱棒 (Visi-Therm, Aquarium System, Italy) 控制水溫於 26 ± 1℃。活性污泥系統經污泥植種、馴化一段時間使其適應家禽屠宰廠廢水後，才開始陸續改變 7、14、21 及 28 d 等污泥齡試程操作，活性污泥系統污泥齡及生物量之控制則是每日自反應器內廢棄 2.86、1.43、0.95、0.71 L/d 之活性污泥混合液。

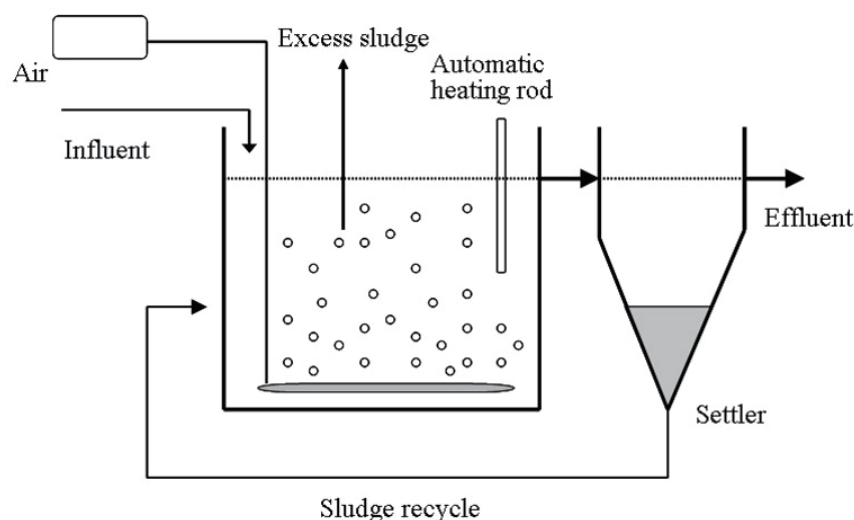


圖 1. 活性污泥反應系統示意圖。

Fig. 1. Illustration of activate sludge reactor system.

II. 活性污泥微生物 DNA 之快速萃取

利用商業化套組 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO, USA) 進行活性污泥中微生物 DNA 之萃取，些微修改廠商提供操作步驟後以進行 DNA 萃取，最後即可得到品質良好的較小分子量的 DNA 溶液。操作步驟簡述如下：取 2 mL 活性污泥溶液於微量離心管，在 15,000 × g 下，離心 2 min，倒掉上清液。將樣品置入含陶瓷珠緩衝液之微量管，加入 60 μL 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 × 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 μL DNA。

III. 細菌多樣性分析

以細菌 16S rRNA 基因通用之引子對 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG -3', Edwards *et al.*, 1989) 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3', Wilson *et al.*, 1990)，增幅放大多源基因體 DNA 之 16S rRNA 基因片段，並選殖於 TA 選殖載體上，所使用之定序引子包括 T7、SP6、27F、519F (5'-GTGCCSGCMGCCGCGGTAA-3', Lane *et al.*, 1985)、519R (5'-GWATTACCGC GGCKGCTG-3', Lane *et al.*, 1985) 及 1492R，再以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 進行定序反應，之後以 ABI3730 DNA 自動定序儀解序，並至 RDP (Ribosomal Database Project) 網頁 (<http://rdp.cme.msu.edu>) 利用線上程式 Classifier 分析細菌 16S rRNA 株系可能歸屬之菌門或菌綱 (Wang *et al.*, 2007)，並以線上程式 Libcompare 比較 4 個 16S RNA 基因庫 (Cole *et al.*, 2014)。以線上程式 Fastgroup II 程式 (<http://biome.sdsu.edu/fastgroup/>) (Yu *et al.*, 2006) 分析所得 DNA 序列彼此間之相似度，做為操作分類單位 (operational taxonomic unit, OTU) 計算之依據，並可獲知 Shannon-Wiener index (H)、Chao I、Evenness 及 Good's Coverage 等參數。

結果與討論

表 1 結果顯示，活性污泥系統 (有機負荷率為 1.52 kg COD/m³/d) 的食微比呈現隨污泥齡增加而降低的現象，污泥濃度隨污泥齡增加或食微比降低而增加趨勢，表示食微比低之活性污泥系統內保留較高的污泥濃度且具較長的污泥齡，COD 去除率亦隨提高污泥齡或降低食微比而增加，出流水之微生物濃度亦隨污泥齡之增加而降低，表示適當的程序控制污泥齡或食微比參數，使活性污泥系統中之微生物形成足夠高分子量蛋白質與脂肪酸聚合物質，增加微生物絮凝作用形成膠羽，使活性污泥系統出流水含低濃度的 VSS (volatile suspended solids) 含量。

表 1. 活性污泥系統處理家禽屠宰場廢水之操作條件及結果

Table 1. The results and conditions for treating poultry slaughterhouse wastewater with activated sludge reactor system

Test run	Organic	Biomass	F/M ^a (kg COD/ kg VSS/d)	Effluent		COD Removal rate (%)
	loading rate (kg COD/m ³ /d)	concentration (mg VSS/L)		COD ^b (mg/L)	VSS ^c (mg/L)	
SRT07	1.52	1,340	1.13	49	48	93.5
SRT14	1.52	1,690	0.90	43	30	94.3
SRT21	1.52	2,110	0.72	33	18	95.6
SRT28	1.52	2,670	0.57	30	8	96.0

^a F/M: food to microorganism ratio.

^b COD: chemical oxygen demand.

^c VSS: volatile suspended solids.

The influent COD concentration in all test runs was 750 mg/L.

使用商業化核酸萃取套組以陶瓷珠衝擊樣品的方式，可以有效地直接萃取污泥齡分別為 7、14、21 及 28 d 之活性污泥樣品中微生物之 DNA。以細菌 16S rRNA 基因專一性之引子，進行 4 種不同污泥齡 DNA 樣品之 PCR 增幅放大，並將增幅片段選殖於 TA 選殖載體，以建立 4 組 16S rRNA 基因庫，分別稱為 SRT07、SRT14、SRT21 及 SRT28 基因庫。從 4 組基因庫中，分別隨機挑選 144 個株系，進行培養並萃取其重組質體，完成約 1.5 kb 長 DNA 定序。4 組基因庫株系定序成功而得到近乎全長者，數目分別為 116、122、119 及 108 個 (表 2)，而在各組株系 OTU 的分析中顯示，各組的 OTU 數目分別為 73、86、80 及 41 個 (表 2)，其中以污泥齡 28 d 樣品的 OTU 百分比最低僅約 38%，表示活性污泥中的菌相漸趨單純化，進一步經 DNA 序列的比較分析得知，其中以菌屬 *Rhodobacter* 最為豐富，而 *Rhodobacter* 屬於光合細菌的一種。各個 16S rRNA 基因庫的多樣性指標包括 Shannon-Wiener index (H)、Chao I、Evenness 及 Good's Coverage，數值分別介於 2.94 – 4.19、140 – 410、0.77 – 0.94 及 41% – 74%，其中 SRT28 基因庫與 SRT07、SRT14 及 SRT21 基因庫之參數有明顯的差異 (表 2)。Al-Mutairi (2007) 利用 Biolog 技術探討以好氧選擇器系統與傳統系統處理屠宰場廢水之微生物多樣性，結果顯示好氧選擇器系統維持較高多樣性，其 H 值介於 3.8 – 4.6，但傳統系統之 H 值僅介於 1.8 – 2.8。

表 2. 四種活性污泥樣品 16S rRNA 基因庫之多樣性指標

Table 2. Diversity indices of 16S rRNA gene libraries from 4 activated sludge samples

Library	No. of sequences	No. of OTUs ^a	H ^b	Chao I ^c	Evenness ^d	Good's coverage (%)
SRT07	116	73	3.99	353	0.93	50
SRT14	122	86	4.19	410	0.94	41
SRT21	119	80	4.13	336	0.94	46
SRT28	108	41	2.94	140	0.77	74

^a OTU: Operation taxonomic unit.

^b H: Shannon-Wiener index.

^c Chao I: Estimation of abundance.

^d Evenness: Estimation of richness.

各基因庫株系於細菌門種類的分布分別有 7 – 8 種，而總共菌門的種類則有 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Gemmatimonadetes*、*Candidatus Saccharibacteria*、*Planctomycetes*、*Proteobacteria*、*Verrucomicrobia* 及 *Unclassified bacteria*。各組樣品基因庫細菌門分布頻率最高者為 *Proteobacteria*，其數值介於 76.5 – 87.8% (表 3)，其餘較多者為 *Bacteroidetes* 與 *Unclassified bacteria*。許多有關活性污泥細菌多樣性分析的結果顯示，*Proteobacteria* 是最具優勢的菌門，其次為 *Bacteroidetes* (Hai *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015)。各組基因庫於 *Proteobacteria* 分布頻率比較，結果顯示，在 SRT07 基因庫中， α -*Proteobacteria* 為多數占 22.4%， γ -*Proteobacteria* 在 SRT14 與 SRT21 基因庫中為多數，分別占 31.1 與 21.8%，而 SRT28 基因庫中，則以 α -*Proteobacteria* 為最多數占 49.1%。Da Silva *et al.* (2015) 以 16S rRNA 基因片段為標的，分析養豬廢水中細菌組成，結果顯示優勢的菌門包括 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 及 *Actinobacteria*。以批式活性污泥法廢水處理技術 (sequencing batch reactor, SBR) 處理抗生素工業廢水，並以 PCR-DGGE 法分析其中曝氣、沉澱、靜置三個階段樣品中 16S rRNA 基因 V3 區域，發現在曝氣階段的樣品中細菌多樣性最高，且細菌菌落組成最為複雜，很多屬於未能培養者 (Han *et al.*, 2013)。

表 3. 活性污泥 16S rRNA 基因株系於菌門之分布

Table 3. Phylum distribution of bacterial 16S rRNA gene clones derived from activated sludge

Phylum	SRT07	SRT14	SRT21	SRT28
-----No. (%) of clones within the respective division-----				
<i>Proteobacteria</i>	99 (85.3)	91 (74.6)	92 (77.3)	87 (80.6)
α	26 (22.4)	10 (8.2)	18 (15.1)	53 (49.1)
β	19 (16.4)	22 (18.0)	21 (17.6)	14 (13.0)
γ	22 (19.0)	38 (31.1)	26 (21.8)	15 (13.9)
δ	18 (15.5)	9 (7.4)	18 (15.1)	3 (2.8)
Unclassified	14 (12.1)	12 (9.8)	9 (7.6)	3 (2.8)
<i>Bacteroidetes</i>	8 (6.9)	18 (14.8)	9 (7.6)	3 (2.8)
<i>Planctomycetes</i>	1 (0.9)	2 (1.6)	6 (5.0)	2 (1.9)
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	1 (0.9)	1 (0.8)	1 (0.8)	7 (6.5)
<i>Gemmatimonadetes</i>	1 (0.9)	—	—	—
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.9)	—	—	—
<i>Verrucomicrobia</i>	—	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.9)
<i>Actinobacteria</i>	—	1 (0.8)	1 (0.8)	—
<i>Hydrogenedentes</i>	—	1 (0.8)	—	1 (0.9)
<i>Acidobacteria</i>	—	—	1 (0.8)	2 (1.9)
Unclassified bacteria	5 (4.3)	6 (4.9)	8 (6.7)	5 (4.6)

表 4 顯示 4 個基因庫於菌屬層次分布頻率的比較，由結果發現 SRT07 與 SRT14 和 SRT28 有顯著性差異的部分，皆為 *Rhodobacter* 出現次數，分別為 SRT07 vs. SRT14 = 9 vs. 0 ($P = 1.51E - 3$) 與 SRT07 vs. SRT28 = 9 vs. 43 ($P = 2.15E - 8$)；SRT14 與 SRT28 顯著性差異在菌屬 *Rhodobacter* 與 *Dokdonella*，出現次數分別為 0 vs. 43 ($P = 7.17E - 15$) 與 11 vs. 1 ($P = 6.58E - 3$)；而 SRT21 與 SRT28 的顯著性差異則在菌屬 *Rhodobacter* 與 *Nannocystis* 出現次數，分別為 2 vs. 43 ($P = 3.78E - 12$) 與 11 vs. 0 ($P = 8.62E - 4$)。*Rhodobacter* 於家禽屠宰場廢水連續操作模型槽中的變化由少數變成最終的大多數，而成優勢菌株。由表 1 得知，在 SRT28 操作條件下，COD 的去除率高達 96% 且出流水之 VSS 含量亦較低，亦可推測 *Rhodobacter* 在廢水有機物的降解，扮演重要的角色。Do *et al.* (2003) 從養豬廢水厭氣塘中分離出一株光合菌 *Rhodobacter* sp. Strain PS9，用以處理異味成分，同時發現此菌在明尼蘇達、愛荷華、密蘇里及北卡羅萊納等地養豬廢水厭氣塘的試驗中均為優勢菌種。Huang *et al.* (2001) 在傳統的活性污泥反應槽中添加 *Rhodobacter* sp.，處理養豬廢水經厭氧處理的排出水，結果顯示處理效果更佳。Li *et al.* (2013) 自除草劑丁草胺製造工廠廢水處理設施中之活性污泥樣品，分離出一種菌屬為 *Dokdonella* 的格蘭氏陰性、好氧、不產生孢子的桿菌，此菌最適合生長的溫度與 pH 分別為 30°C 與 7.0。Gao *et al.* (2012) 則以 *amoA* 基因探討 10 個廢水處理系統之氨氧化古細菌與細菌豐富性與多樣性，發現氨氧化細菌比氨氧化古細菌更多樣，而 *Nitrosomonas* 屬是 10 個廢水處理系統中最具優勢的細菌。

表 4. 不同污泥齡樣品 16S rRNA 基因庫於菌屬層次之比較^a

Table 4. Comparison of four bacterial 16S rRNA gene libraries derived from activated sludge samples with different sludge retention time on genus level

Library	SRT07	SRT14	SRT21	SRT28
SRT07	—	—	—	—
SRT14	<i>Rhodobacter</i> (9/0/1.51E-3) ^b	—	—	—
SRT21	NS ^c	NS	—	—
SRT28	<i>Rhodobacter</i> (9/43/2.15E-8)	<i>Rhodobacter</i> (0/43/7.17E-15) <i>Dokdonella</i> (11/1/6.58E-3)	<i>Rhodobacter</i> (2/43/3.78E-12) <i>Nannocystis</i> (11/0/8.62E-4)	—

^a: $P < 0.01$.^b: The numbers in the parentheses are number of clones in the upper library, in the right-handed library and significance, respectively.^c: No significance.

以分子生物技術與多源基因體學分析的方式，可以瞭解以活性污泥法處理屠宰場廢水時，在不同的污泥齡中細菌的族群分布情形，並與實際廢水處理結果連結分析，以找到主要負責降低廢水中有機物含量的細菌種類，而在本研究中即已發現光合菌 *Rhodobacter* 在 ASR 系統可能扮演重要降解有機物的主角，期能將此研究結果應用於實際較大規模家禽屠宰場廢水之處理。

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。
- Al-Mutairi, N. Z. 2007. Functional biodiversity of microbial communities in aerobic selector slaughterhouse wastewater. *Water Environ. Res.* 79: 660-666.
- 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.
- Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske and J. M. Tiedje. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue): D633-D642.
- 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.
- Do, Y. S., T. M. Schmidt, J. A. Zahn, E. S. Boyd, A. de la Mora and A. A. DiSpirito. 2003. Role of *Rhodobacter* sp. strain PS9, a purple non-sulfur photosynthetic bacterium isolated from an anaerobic swine waste lagoon, in odor remediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1710-1720.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete determination of entire genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-7853.
- Gao, J., X. Luo, G. Wu, T. Li and Y. Peng. 2014. Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 3339-3354.
- Hai, R., Y. Wang, X. Wang, Y. Li and Z. Du. 2014. Bacterial community dynamics and taxa-time relationships within two activated sludge bioreactors. *PLoS One* 9: e90175.
- Han, J., L. Y. Wang and B. Y. Cai. Bacterial diversity in antibiotic wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 68: 2676-2782.
- Huang, J. S., C. S. Wu, C. G. Jih and C. T. Chen. 2001. Effect of addition of *Rhodobacter* sp. to activated-sludge reactors treating piggy wastewater. *Water Res.* 35: 3867-3875.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6955-6959.

- Lee, S. H., H. J. Kang and H. D. Park. 2015. Influence of influent wastewater communities on temporal variation of activated sludge communities. *Water Res.* 73: 132-144.
- Li, Y., J. Zhang, Q. Chen, G. Yang, S. Cai, J. He, S. Zhou and S. P. Li. 2013. *Dokdonella kunshanensis* sp. nov., isolated from activated sludge and emended description of the genus *Dokdonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 1519-1523.
- Ma, Q., Y. Y. Qu, X. W. Zhang, W. L. Shen, Z. Y. Liu, J. W. Wang, Z. J. Zhang and J. T. Zhou. 2015. Identification of the microbial community composition and structure of coal-mine wastewater treatment plants. *Microbiol. Res.* 175: 1-5.
- Rani, A., S. Porwal, R. Sharma, A. Kapley, H. J. Purohit and V. C. Kalia. 2008. Assessment of microbial diversity in effluent treatment plants by culture dependent and culture independent approaches. *Bioresour. Technol.* 99: 7098-7107.
- Torsvik, V. and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Wan, C. Y., H. De Wever, L. Diels, C. Thoeve, J. B. Liang and L. N. Huang. 2011. Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res.* 45: 1129-1138.
- Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje and J. R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- Wang, X., M. Hu, Y. Xia, X. Wen and K. Ding. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 7042-7047.
- Yu, Y., M. Breitbart, P. McNairnie and F. Rohwer. 2006. FastGroupII: A web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC Bioinformatics* 7: 57.

Bacterial diversity of activated sludge treating slaughterhouse wastewater ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Ming-Che Wu ⁽²⁾ Shui-Tsai Chen ⁽³⁾
Mei-Ping Cheng ⁽⁴⁾ and Ting-Hsun Hsiao ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: May 18, 2015; Accepted: Jul. 24, 2015

The objective of this study was to investigate the bacterial diversity of activated sludge with different sludge retention time (SRT) to treat slaughterhouse wastewater. The microbial DNA of activated sludge samples from those with SRTs of 7, 14, 21 and 28 days were extracted directly using a commercial kit and bead-beating protocol, respectively. The 16S ribosomal RNA genes of bacteria from 4 activated sludge samples were amplified with bacterial specific sets of primers by PCR. The amplicons were ligated into TA cloning vectors to construct 16S rRNA gene libraries for DNA sequencing and bacterial diversity analyses. A total of 312 almost full-length 16S rRNA gene clones from 4 activated sludge samples were obtained. The results indicated that the bacterial profiles comprising of *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and unclassified bacteria differed in SRT samples. The most of these communities belonged to *Proteobacteria* phylum (> 70%). In OTU analysis, the OTU percentage of 28-day SRT sample was the lowest (38.0%) which revealed that the bacterial profile tended towards simplicity and photosynthetic bacterium *Rhodobacter* was the majority. However, the COD removal rate under SRT28 test run was still as high as 96% and the concentration of microorganisms in effluent waster was very low as 8 mg VSS/L. The study is expected to apply for the treatment of lager scale wastewater from poultry slaughterhouse.

Key words: Activated sludge, Microorganism, Bacterial diversity.

(1) Contribution No. 2306 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Technical Service Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

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

(5) Corresponding author, E-mail: hsiaosir@mail.tlri.gov.tw.