

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

子計畫二：難過濾生物污泥之結構與脫水性(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC90-2214-E-002-004-

執行期間：90年08月01日至91年10月31日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：李篤中

計畫參與人員：朱敬平

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 22 日

難過濾粒子之固液分離

總計劃主持人：呂維明

子計畫三：難過濾生物污泥之結構與脫水性 (2/2)

計畫編號：90-2214-E-002-004

子計畫主持人：李篤中

執行期間：民國九十年八月至民國九十一年七月

一、摘要

本研究為兩年期整合計劃之第一年計劃，利用共軛焦掃描式雷射顯微攝影 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 測量活性污泥膠羽顆粒內部之質量分佈。CLSM 可以獲得螢光染色後之膠羽顆粒各截面影像；結果顯示出不同程序或不同處理所產生的膠羽顆粒具有不同的結構以及內部質量分佈。

二、簡介

許多研究中均提出污泥膠羽是由基本粒子構成之碎形結構物 (Li and Ganczarczyk, 1989)。其中碎形維度 (FD) 為描述碎形結構物的重要參數，一具有碎形維度 FD 之碎形結構物，其質量 M 與粒徑 d_f 之關係式如下所示：

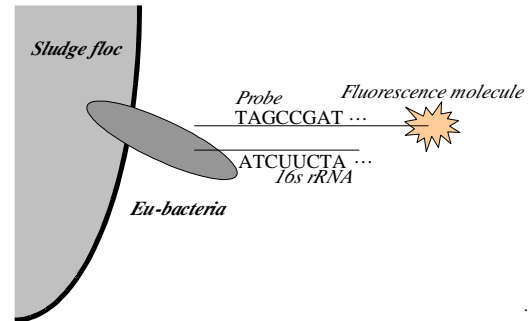
$$M \propto d_f^{FD} \quad [1]$$

其中 $1 \leq FD \leq 3$ 。對於碎形結構物之碎形維度的測量有許多種方法，包括自由沉降測試、光散射法、顯微切片等等方式 (Jorand *et al.*, 1995)。但是隨著不同測定方法的不同，所得的碎形維度也會有所差異，許多研究已經發現以單一方法所決定的單一碎形維度並不足以描述其碎形體之結構，甚至需要以雙層到多層結構方能描述許多自然存在之聚集體，包括膠羽 (Sanin and Vesilind, 1996)。

在各種顯微切面技術中，共軛焦掃描式雷射顯微攝影 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 為一近來獲得廣泛應用的特殊顯微觀察技術；它採取雷射作為光源，並將一聚光鏡與點狀光電探測器置於顯微鏡反方向，此時物鏡的的像點與點光源經透鏡聚焦在樣品面上的點相重合，兩者有同樣的焦點，達到一「共焦」的效果；再透過特殊的運算，使得像的中心點解析度可以大大地增加，外圍的環狀光環呈像會被減少，因此整個解析度可達 $0.1 \mu\text{m}$ 。

以 CLSM 研究生物樣品時，通常會配合螢光雜交技術 (Fluorescence in situ Hybridization, FISH) 去將樣品內部的細胞加以染色。對於污泥膠羽而言，可先透過適當

的基因定序鑑定出污泥主要組成細菌之 16s rRNA 特徵區之核苷酸序列，然後合成相對應之核酸，在末端接上一螢光分子，形成一去氧核糖核酸探針 (DNA probe)，將之加入污泥之中，在適當的溫度與緩衝液之下，探針會與細菌內的 16s rRNA 相結合，細菌因此被螢光標定，如圖一所示。



圖一 螢光雜交示意圖

在螢光標定之後，再以 CLSM 進行觀察，用適當的雷射光可以激發螢光分子放出特定波長之螢光，藉此可看到膠羽樣品中細菌之分佈。在一般的生物污泥系統中，膠羽主要組成非生物性懸浮顆粒、細菌、以及細胞分泌物等細胞間有機高分子物質。一般細菌佔整個膠羽固體質量的 70~80%，若假設各種細菌在膠羽間的分佈十分平均，則觀察到細菌部份即可得知膠羽內大致的質量分佈。CLSM 更可進一步改變雷射之焦距與功率，深入膠羽樣品之內作非破壞性之掃描，因此獲得各個切面之膠羽。在進行相當多次的掃描之後，可以得到污泥膠羽內的立體結構。

本研究即於第一年的研究之中先行應用 CLSM 研究膠羽內之質量分佈，包括好氧狀態與厭氧狀態下所產生的膠羽，以及經各種污泥前處理之後之膠羽，初步探得不同膠羽內的質量分佈情形。

三、實驗方法

共軛焦掃描式雷射顯微鏡

共軛焦掃描式雷射顯微鏡 (CLSM, OLYMPUS BX50) 為本次用於觀察污泥膠羽顆粒內質量分佈的設備，其配有一影像處理器 (OLYMPUS FV5 PSU) 與氬氣雷射 (488

nm) 以激發螢光。所採用的目鏡與物鏡均為 10x。實驗中我們在一固定的深度之內對膠羽進行反覆掃描，並獲得許多截面的影像。

螢光雜交

污泥樣品在進行 CLSM 之觀察之前，先行置於一固定液之中 (3% paraformaldehyde in PBS) 一天以上，由於其中的蛋白質與固定液中之成份相結合，因此膠羽在型態就已「固定」。之後再將這些固定後之樣品置於一低融點藻膠之中 (melting point: 75°C ; gelling point: 38°C)。隨後使用了數種的 DNA 探針，主要的有兩種：(1) Eub 338，帶有螢光分子 rhodamine，可標定各種真細菌 (eubacteria)；(2) Arc 915，帶有螢光分子 tetrachlorofluorescein，可標定各種甲烷菌 (methanogenic bacteria，古細菌的一種)。置於藻膠中之樣品先行浸在一雜交緩衝液之中，滴入定量的 DNA 探針，置入恆溫槽中一小時，雜交溫度設為 50°C，之後取出，以緩衝液洗去多餘的探針，然後再置入恆溫箱中，如此重覆二到三次，則可進行 CLSM 觀察。

四、結果與討論

在這份報告將舉例展示部份測試結果。自圖二至圖七為經過各種前處理與程序之後的污泥膠羽，可以從中觀察到污泥膠羽之內的細菌分佈情形。另外由 CLSM 所得到的截面影像可以透過「體積組合表現」(volume rendering, 如圖八與圖九) 與「表面組合表現」(surface rendering, 如圖十與圖十一) 將之轉換成立體圖像；前者可以獲知結構體中之每一細部訊息，在下一階段中的工作，將進一步依此建構膠羽內的孔隙分佈與碎形維度。

五、結論

本研究利用共軛焦掃描式雷射顯微攝影 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 測量活性污泥膠羽顆粒內部之質量分佈。CLSM 可以獲得螢光染色後之膠羽顆粒各截面影像。再以「體積組合表現」與「表面組合表現」兩種程序，可以將膠羽截面影像作一立體重組，得到三維影像。

六、參考資料

- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J. C., Bottero, J. Y., Villemin, G., Urbain, V., and Manem, J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Wat. Res.*, **29**, 1639-1647.
- Li, D. H. and Ganczarczyk, J. (1989) Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment process. *Envir. Sci. Tech.* **23**, 1385-1389.
- Sanin, F. D. and Vesilind, P. A. (1996) Synthetic Sludge: a Physical/Chemical Model in Understanding Bioflocculation. *Wat. Environ. Res.*, **68**, 927.

