

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

可同時硝化及脫硝之自營性薄膜生物反應槽之研發及其菌
群結構分析(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2211-E-002-069-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學環境工程學研究所

計畫主持人：曾四恭

報告類型：完整報告

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 93 年 9 月 24 日

行政院國家科學委員會專題研究成果報告

計畫編號：92-2211-E-002-069

執行期限：2003/08/01 ~ 2004/07/31

主持人：曾四恭教授 台大環境工程研究所教授

一、 中文摘要

經本研究之結果證實，利用 PVA-褐藻膠共聚包埋法將硝化菌及脫硝菌固定於矽膠管表面之自營性生物脫硝反應槽確實具有同時硝化、脫硝之能力，可於單槽內去除水源中之氮及硝酸鹽，除可解決殘留有機碳源之問題外，亦可減少建廠之空間需求並簡化操作程序，深具應用之潛力。反應槽中之溶氧對反應槽之硝化作用有明顯影響，當溶氧降至 2 mg/l 時，硝化作用明顯下降。當溶氧分別為 8 mg/l、4 mg/l 時兩者硝化速率相差不大。經過包埋後之生物膜對溶氧對脫硝所產生之抑制作用有較佳之抵抗力，且生物膜外層之硝化菌可作為屏障並消耗氧氣，減小反應槽中之溶氧對脫硝產生之影響。鹼度之添加量對反應槽之脫氮速率有明顯之影響，理想之鹼度添加量約為 8.32 mg CaCO₃/mg NH₄-N。磷酸鹽之添加量對反應槽之脫氮速率有些許之影響，然而，即使添加低濃度之磷酸鹽（1 mg/l），反應槽亦具有脫氮之能力。利用分子生物技術進行反應槽之菌相鑑定不只好避免反應槽係黑箱之質疑，亦可提供有用之資訊作為後續反應槽改善之參考，為一強而有力之工具。經長時間之馴養及操作後，反應槽中之生物確實有分層之現象產生，內側生物膜之主要菌屬為 *Xanthomonas*、*Thauera* 等脫硝菌，其中 *Thauera aromatica*、*Xanthomonas vesicatoria* 為可能之菌種，而外側生物膜之主要菌屬為 *Nitrospira* 及 *Uncultured Bacteroidetes bacterium* 等與硝化有關之菌屬，而最優勢之菌種為 *Nitrospira sp.*。

關鍵詞：硝化、脫硝、自營性、薄膜生物反應槽、菌相分析

Abstract

To develop a laboratory-scale autotrophic membrane-immobilized biofilm reactor to remove nitrogen from drinking water. A PVA-immobilized biofilm, attached to the surface of a silicone tube, was used as the basis of a bioreactor for simultaneous nitrification and denitrification of

water. The bioreactor was aerated with air to supply oxygen for nitrification and pure hydrogen was supplied to the silicone tube and diffused through the membrane wall to feed the biofilm for autotrophic denitrification. The bioreactor was effective for the simultaneous nitrification and denitrification of water after a short period of acclimation, while the biofilm exhibited good resistance to the inhibition of denitrification by dissolved oxygen; the denitrification rate decreased by only 8% as the dissolved oxygen increased from 2 mg/l to saturation. By using PVA crosslinked with sodium nitrate to entrap nitrifying and denitrifying sludge on the surface of a silicone tube, a novel bioreactor for simultaneous nitrification and denitrification was developed. In addition to performing as an immobilizing agent to strengthen the biofilm, PVA protected the denitrifying microorganisms to reduce the inhibition by dissolved oxygen under aerobic condition. Therefore, nitrification and denitrification occurred simultaneously within the biofilm. Furthermore, the immobilization technique shortened the acclimation period of the bioreactor. In addition, the genera *Xanthomonas* and *Thauera* dominated the inner layer of the biofilm, while *Nitrospira* dominated the outer layer of the biofilm. Keywords: Nitrification, Denitrification, Membrane bioreactor, Autotrophic, Bacterial community analysis

二、 緣由與目的

傳統上利用廢水生物處理系統去除水中氮之方式，大致上需包括好氧硝化及無氧脫硝兩個步驟，參與此二反應之菌相不同，且操作之條件亦相互抵觸。好氧硝化菌需在高溶氧、低有機碳的環境下進行硝化作用，將氨氮氧化成硝

酸鹽或亞硝酸鹽。而無氧脫硝菌則需在低溶氧、以有機碳為碳源下之條件下進行脫硝作用，以硝酸鹽或亞硝酸鹽為最終電子接受者，將其還原成氮氣。為避免溶氧干擾脫硝作用或有機碳干擾硝化作用，一般生物除氮系統之設計大多分設硝化及脫硝兩個反應槽。然而，分設兩個反應槽，需要較大之土地面積，且操作上亦較複雜。同時，硝化作用會消耗鹼度，因此，往往必須在原水中額外添加鹼度。而脫硝反應則會產生鹼度，如果硝化槽添加過多的鹼度，很容易使脫硝槽的 pH 值過高，影響脫硝槽之脫硝速率。本研究嘗試利用本研究室先前開發之 PVA 褐藻膠-共聚包埋法將自營性硝化及脫硝菌同時包埋於矽膠管表面，發展一可同時硝化、脫硝之自營性薄膜生物反應槽。其原理為於矽膠管中通入氫氣進行自營性脫硝作用，並於反應槽中則進行曝氣作用供應氧氣進行脫硝作用。經過一段時間之馴養後，生物膜應會自動分層，外側為硝化層進行硝化作用而內側則為脫硝層進行脫硝作用。硝化過程產生之酸度可中和脫硝過程產生之鹼度，減少反應槽鹼度之添加量。此外，生物膜外側為硝化層進行硝化作用會消耗氧氣，可避免溶氧對內側生物膜之脫硝造成干擾，而生物膜內側則進行自營性脫硝作用，亦可避免有機碳對硝化作用造成之影響，達到同時硝化、脫硝之目的。此外，本研究亦嘗試利用分子生物技術進行反應槽中之菌群結構分析，除可免去反應槽黑箱之質疑外，並可了解反應槽中生物膜菌相之分層情形，作為後續改善之參考。

三、 結果與討論

(一) 反應槽硝化、脫硝能力之評估

為了解反應槽中之生物膜硝化、脫硝之能力，分別加入含氮及硝酸鹽之人工合成廢水(其成分如前面所述)進行批次試驗，反應槽中氮、亞硝酸鹽及硝酸鹽氮隨時間之變化情形如圖 1 所示。由實驗之結果可以發現，當反應槽加入含氮之人工合成廢水後，氮濃度因氮被氧化成硝酸鹽氮而逐漸減少，並於 12 小時內由 100 mg/L 降至偵測極限 (< 0.05 mg/L) 以下，而硝酸鹽氮則因硝化速率大於脫硝速率而於前 12 小時逐漸累積至 30 mg/L，後 12 小時因反應槽已無氮可供硝化，因此硝酸鹽氮之濃度因脫硝作用而逐漸降低偵測極限 (< 0.01 mg/L) 以下 (如圖 5-4 (a))。當反應槽加入含硝

酸鹽之人工合成廢水後，硝酸鹽氮濃度因脫硝作用而逐漸減少，12 小時內由 100 mg/L 降至 43.4 mg/L 並於 24 小時內由 100 mg/L 降至偵測極限以下，反應槽中僅有少量之亞硝酸鹽累積，如圖 5-4 (b) 所示。此批次實驗證明，當反應槽加入含氮之廢水後，生物膜中之硝化菌會將氮氧化成硝酸鹽或亞硝酸鹽，而生物膜中之脫硝菌則可將硝酸鹽還原成氮氣。且反應槽之硝化速率明顯較脫硝速率為快，使硝酸鹽在前半段實驗時有累積之現象。當反應槽加入含硝酸鹽之廢水後，此時，反應槽只進行脫硝作用 (因無氮可供硝化)，使硝酸鹽逐漸降解。此試驗證明反應槽中之生物膜確實同時具有硝化及脫硝之能力。若以批次試驗前 12 小時氮及硝酸鹽氮減少之濃度加以計算，反應槽之硝化及脫硝速率分別為 5.1 g-N/m²/d 及 2.88 g-N/m²/d。上述結果說明，反應槽硝化速率遠較脫硝速率快，此可由批次試驗時氮完全降解之時間 (12 小時) 遠少於硝酸鹽 (24 小時) 及反應槽中有硝酸鹽累積之情形獲得證實。硝化作用為生物除氮之第一步驟，廢水中之氮須先被硝化成為亞硝酸鹽或硝酸鹽才能被進一步脫硝還原成氮氣。一般而言，硝化菌為自營菌，生長速率較慢，因此在生物除氮之程序中硝化作用常成為脫氮之限制因子。然而，對本反應槽而言，為有效解決殘餘外加有機碳源之問題，故利用氫氣自營脫硝菌進行脫硝，而氮自營菌因同樣屬自營菌，其脫硝速率不及異營菌，因此，脫硝作用反而成為本反應槽脫氮速率之限制因子，值得注意。

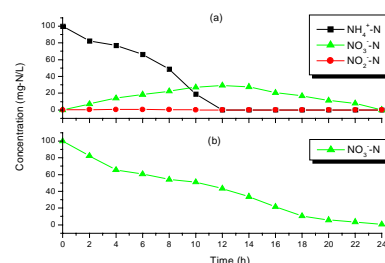


圖 1 加入含氮及硝酸鹽之人工合成廢水進行批次試驗，反應槽中氮、亞硝酸鹽及硝酸鹽氮之變化情形

(二) 溶氧對反應槽硝化、脫硝作用之影響

圖 2 為反應槽之溶氧分別控制於飽和、4 mg/L 及 2 mg/L 時，加入含 100 mg/L 氨氮之人工合成廢水，氨氮濃度之變化情形。結果顯示，當反應槽之溶氧維持於飽和、4 mg/L 及 2 mg/L 時，氨氮濃度於 12 小時內分別降至偵測極限以下，3.3 及 54.6 mg/L，依前述方法計算，其硝化速率分別為 5.1 g-N/m²/d、4.9 g-N/m²/d 及 2.31 g-N/m²/d。上述結果顯示，反應槽中之溶氧對生物膜之硝化速率有明顯之影響，尤其當反應槽中之溶氧太低時，會因氧氣供應不足而嚴重影響硝化之速率。圖 3 為加入含 100mg/L 硝酸鹽之人工合成廢水，硝酸鹽氮濃度之變化情形。結果顯示，當反應槽之溶氧分別維持於飽和、4 mg/L 及 2 mg/L 時，硝酸鹽氮之濃度於 12 小時內分別降至 47.0、42.5 和 38.5 mg/L，依前述方法計算，其脫硝速率分別為 2.7 g-N/m²/d、2.9 g-N/m²/d 及 3.1 g-N/m²/d。上述結果顯示，反應槽中之溶氧對生物膜脫硝速率有些許之抑制，惟並不嚴重。生物膜中之脫硝菌對溶氧有較佳之忍受力，即使反應槽中之溶氧維持於飽和，生物膜仍具有不錯之脫硝能力。推測其結果，可能因包埋後氧氣自營脫硝菌得到較佳之保護，且經過馴養後，生物膜出現分層，外層多為硝化菌而內層則多為脫硝菌，外層硝化菌可作為內層脫硝菌之屏障並消耗氧氣，降低溶氧對脫硝菌產生之抑制。

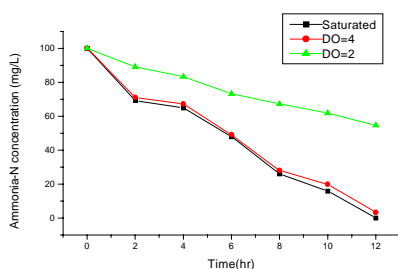


圖 2 為反應槽之溶氧分別控制於飽和、4 mg/L 及 2 mg/L 時，加入含氨氮之人工合成廢水，氨氮濃度之變化情形

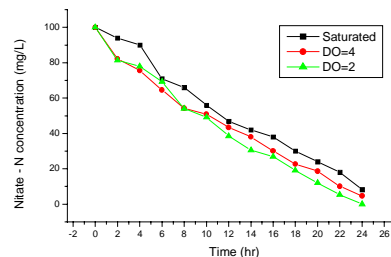


圖 3 為反應槽之溶氧分別控制於飽和、4 mg/L 及 2 mg/L 時，加入含硝酸鹽之人工合成廢水，硝酸鹽氮濃度之變化情形

(三) 不同鹼度添加量對反應槽之影響

先前批次式實驗中顯示反應槽中硝化速率較脫硝速率為快，且理論上每克 NH₄⁺-N 經硝化作用轉化成 NO₃⁻-N 的同時要消耗 7.14 克鹼度 (as CaCO₃)，而每克 NO₃⁻-N 經完全脫硝則產生 3.57 克鹼度 (as CaCO₃)，因此進流廢水中需添加足夠之鹼度，避免反應槽因消耗過多之鹼度使反應槽之 pH 值下降而影響脫氮速率，因此本實驗分別於進流水中加入不同量之鹼度，期能找出反應槽之最佳鹼度添加量，作為反應槽實際操作之參考。圖 4 為於進流水中添加不同量之鹼度對反應槽脫硝速率之影響，由實驗結果可以發現當鹼度添加量較少時，反應槽中之 pH 值會因鹼度不足而逐漸下降至 4 左右，進而影響反應槽之硝化及脫硝速率，其中硝化菌對 pH 值之下降極為敏感，因此造成出流水中氨氮之濃度增加。而添加過量之鹼度，除造成浪費外，對反應槽之硝化及脫硝速率無幫助。經計算後，進流水中理想之鹼度添加量約為 8.32 g CaCO₃/g NH₄-N。此添加量大於硝化過程所需之理論添加量，其原因可能有一部分之 HCO₃⁻ 係作為自營性硝化菌及脫硝菌所需之碳源。

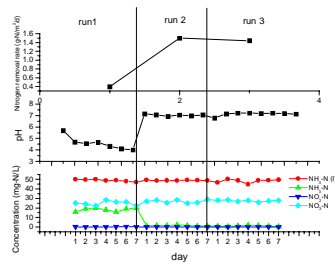


圖 4 不同鹼度添加量對反應槽之影響

(四) 反應槽菌相分析結果

圖 5 與圖 6 分別為生物膜內層及外層菌相之親源樹分析途，經由菌相分析可以發現，經長期之馴養及操作後，反應槽中之生物膜確實有分層之現象產生，內層之生物膜主要以脫硝菌屬為主，而外層之生物膜則以硝化菌佔絕大多數，此為反應槽具有同時硝化及脫硝之有力證據。惟分析之結果亦發現外層分層之現象似乎較內層好，因外層生物膜之菌相與硝化有關之菌屬高達 95 % 以上，而內層與脫硝有關之菌屬則約佔 75 %，仍有 25 % 左右為硝化菌，推測其原因可能因反應槽持續曝氧氣，導致生物膜內層仍有部分之氧氣存在，使硝化菌於生物膜內層亦能存活。此外，就整體生物膜之菌相而言，生物膜中與硝化有關之菌屬 (Nitrospira 及 Uncultured Bacteroidetes bacterium) 在整體生物膜中所佔之比率約 60 %，而與脫硝有關之菌屬 (Xanthomonas 及 Thauera) 約佔 40 %，此亦可有效輔助解釋為何反應槽之硝化速率較脫硝速率為快。上述實驗之結果顯示，經過長時間之馴養及操作後，生物膜之菌相與其他異營性生物脫硝反應槽或活性污泥槽相比相對單純許多，推測其原因可能為反應槽係自營性，未添加任何有機物，且污泥經過長時間之馴養及操作後，許多異營菌在反應槽中無法存活，因而使得菌相便得較為單純。此外，本研究亦證實利用分子生物技術進行反應槽之菌相鑑定不只可避免反應槽係黑箱之質疑，亦可提供有用之資訊作為後續反應槽改善之參考，為一非常有有用之工具。

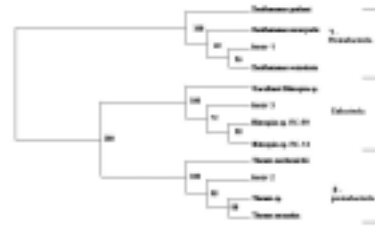


圖 5 生物膜內側菌相之親源樹

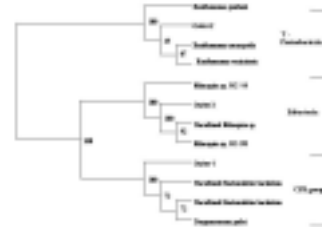


圖 6 生物膜外側菌相之親源樹

四、計畫成果自評

本計畫成功開發出一可同時硝化及脫硝之自營性薄膜生物反應槽，並對影響反應槽之因子進行探討，找出理想之操作條件。對去除水源中之氮氮深具潛力。此外，本計畫亦成功應用利用分子生物技術進行反應槽生物菌相之鑑定，提供反應槽改善之進一步資訊。研究結果並發表於國際期刊中。綜合言之，本研究成果已充分達成預期目標。

五、參考文獻

Altmann, D. Stief, P. Amann, R. de Beer, D. and Schramm, A. (2003) In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment *Environmental Microbiology* 5 (9): 798-803

Biesterfeld, S. Figueroa, L. Hernandez, M. and Russell, P. (2001) Quantification of nitrifying bacterial populations in a full-scale nitrifying trickling filter using fluorescent in situ hybridization. *Water environment research*, 73,329-338.

Brindle, K. Stephensen, T. and Semen, M. J. (1998). Nitrification and oxygen utilization in a membrane aeration bioreactor. *Journal of membrane science*, 144, 197-209.

- Briones, A.M. Okabe, S. Umeyiya, Y. Ramsing, N.B. Reichardt, W. and Okuyama, H. (2003) Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars *Plant and Soil* 250 (2): 335-348
- Cantafio, A.W. Hagen K.D. Lewis, G.E. Bledsoe, T.L. Nunan, K.M. and Macy, J.M. (1996) Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis* *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (9): 3298-3303
- Chang, C.C. Tseng, S.K. and Huang, S.K. (1999). Hydrogenotrophic denitrification with immobilized *Alcaligenes eutrophus* for drinking water treatment. *Bioresource Technology*, 69, 53-58.
- Chang, Y.J. and Tseng, S.K. (1998) A new method for carbon addition in an anoxic denitrification bioreactor. *Biotechnology Techniques*, 12, 367-371.
- Chang, Y.J. and Tseng, S.K. (1999) A novel double-membrane system for simultaneous nitrification and denitrification in a single tank. *Letters in Applied Microbiology*. 28, 453-456.
- Clapp, L.W., Regan, J. M., Ali, F., Newman, J. D., Park, J. K. and Noguera, D.R. (1999) Activity, structure, and stratification of membrane-attached methanotrophic biofilms cometabolically degradation trichloroethylene., *Water Science and Technology*. 39(7), 153-161.
- Dries, D. Liessens, J. Verstraete, W. Stevens, P. de Vos, P. and de Ley, J. (1988). Nitrate removal from drinking water by means of hydrogenotrophic denitrifiers in a polyurethane carrier reactor, *Water Supply*, 6, 181-192.
- Droic A. Koncan J.Z. and Cotman M. (2001) Evaluation of total nitrogen pollution reduction strategies in a river basin: a case study, *Water Science and Technology*, 44 (6): 55-62
- Etchebehere, C. Errazquin M.I. Dabert, P. Moletta, R. and Muxi, L. (2001) *Comamonas nitrativorans* sp nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 977-983
- Fang, H.H.P, Zhang, T. and Liu, Y. (2002) Characterization of an acetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen *Water Research* 36 (13): 3211-3218
- Finkmann, W. Altendorf, K. Stackebrandt, E. Lipski, A (2000) Characterization of N₂O-producing Xanthomonas-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp nov and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 273-282
- Gayle, B.P. Boardman, G.D. Sherrard, J.H. and Benoit, R. E. (1989). Biological denitrification of water, *Journal of Environmental Engineering. ASCE*, 115, 930-943.
- Gros, H., Schnoor, G. and Rutten, P. (1988). Biological denitrification process with Hydrogen-Oxidizing bacteria for drinking water treatment, *Water Supply*, 6, 193-198.
- Hu, T.L. and Kung, K.T. (2000) Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater *Water science and Technology* 42 (3-4): 315-321
- Juretschko, S. Timmermann, G. Schmid, M. Schleifer,

- K.-H. Pommerening-Roser, A. Koops, H.-P. and Wagner, M. (1998) Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *nitrospira-like bacteria* as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology.*, 64, 3042
- Kalmbach, S. Manz, W. and Szewzyk, U. (1997) Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes *Applied and Environmental Microbiology.* 63 (11): 4164-4170
- Schramm, A. Debeer, D. Wagner, M. and Amann, R. (1998) Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and environmental microbiology.*, 64, 3840.