

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

硝酸鹽對生物除磷系統及其菌相結構之影響(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2211-E-002-065-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 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

計畫參與人員：莊雅雲

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 27 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

硝酸鹽對生物除磷系統及其菌相結構之影響 (2/2)

The influence of nitrate on enhanced biological phosphate removal system and the microbial structure

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91－2211－E－002－041

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：曾四恭 台灣大學環境工程學研究所

執行單位：國立台灣大學環境工程學研究所

中 華 民 國 九 十 二 年 十 月 二 十 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

硝酸鹽對生物除磷系統及其菌相結構之影響 (2/2)

The influence of nitrate on enhanced biological phosphate removal system and the microbial structure

計畫編號：NSC 91-2211-E-002-065

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：曾四恭 台灣大學環境工程學研究所

計畫參與人員：莊雅雲 台灣大學環境工程學研究所

一、摘要

本研究進行硝酸鹽對生物除磷系統的影響，本年度重點在於進行厭氧-無氧 SBR 脫硝除磷菌的馴養，了解脫硝除磷菌對碳、氮、磷之去除特性、PHAs 及醣原之變化特性，並利用變性梯度凝膠電泳 (DGGE) 與 16S rDNA 純系選殖 (cloning) 技術分析菌相變化，嘗試解析除磷污泥菌相結構。

研究中之除磷反應槽為連續式批次反應槽，以醋酸鹽為唯一碳源，在長期馴養下除磷效果可達 90% 以上。研究結果顯示，硝酸鹽的添加會對除磷反應槽有立即影響，使厭氧段污泥釋磷量降低，但卻有明顯脫硝現象，顯示即使進流基質中從未添加硝酸鹽，除磷效果良好的污泥中已有一定數量的脫硝菌存在。以硝酸鹽持續馴養後，污泥釋磷攝磷現象消失，應是外部碳源（醋酸鹽）持續不足使菌體內部碳源（PHB、glycogen）儲存量不足所致，提高基質碳源後污泥可恢復釋磷/攝磷現象。

在菌相方面，硝酸鹽的添加會造成部份菌群消失，使菌相較簡化，配合水質分析與菌相分析結果顯示，同樣具有除磷效果的不同反應槽，菌群僅有少部份相同且優勢菌種皆不同；16S-rDNA 分析結果顯示除磷污泥中有親源近於 *Nitrosococcus* spp.、*Azospirillum* spp.、*Rhodospirillum* spp.、*Dechlorosoma* spp. 等菌群存在。

關鍵詞：硝酸鹽、磷酸鹽、厭氧-好氧 SBR、厭氧-無氧 SBR、脫硝除磷菌。

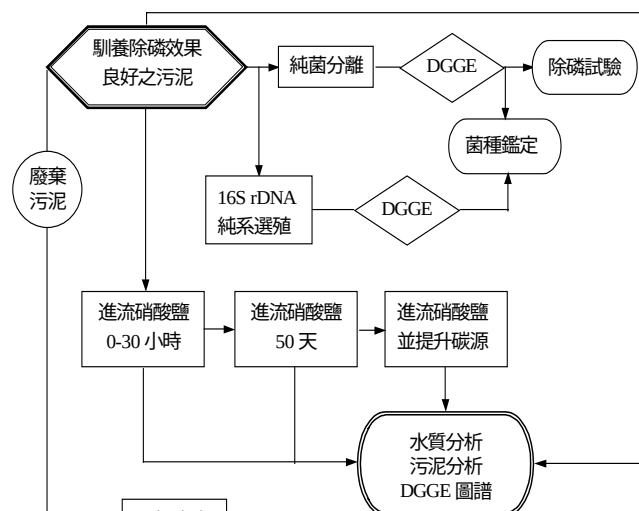
二、緣由與目的

造成生物除磷程序效能低落因素很多，例如：大量降雨進入處理廠、進流碳源種類、溫度、pH 值、硝酸鹽對厭氧段或好氧段之影響。而硝酸鹽對 EBPR 厭氧槽或 SBR 厭氧段及無氧段之影響，以及脫硝除磷菌 (Denitrifying phosphorus removing) 於無氧相 (Kuba, 1997) 之除磷特性乃是目前研究之重心；根據文獻回顧，目前探討進流廢水含硝酸鹽對厭氧槽之影響時多採以批次實驗之方式 (Malnou et al., 1984; Hascoet and Florentz, 1985; Iwema and Meunier, 1985; Gerber et al., 1987; Comeau et al., 1986; Wentzel et al., 1989; Kern-Jespersen and Henze, 1993)，而推測經含硝酸鹽之人工合成廢水長期馴養下，EBPR 系統中之活性污泥其釋磷行為及其菌相結構應與批次實驗結果有所出入，其成果應較能解析實際 EBPR 污水處理廠所遭遇的問題，如 A/O 處理系統，及 A2O 無氧槽中釋磷與攝磷的矛盾之處。

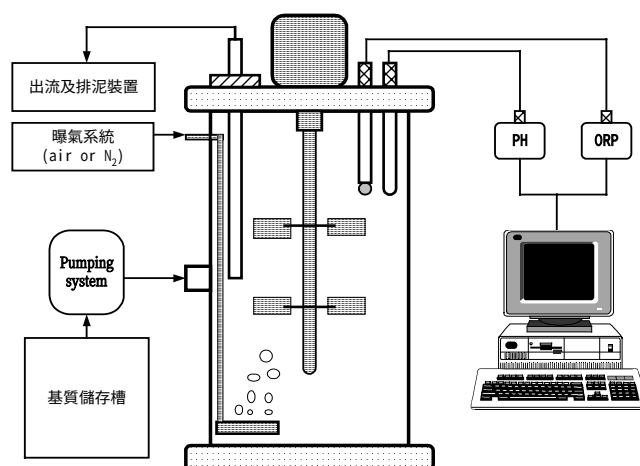
三、研究方法

- (一) 實驗架構：本研究為探討硝酸鹽對生物除磷系統及其菌相結構之影響，首先需建立一除磷效果良好之反應槽，收集其水質分析、污泥分析及 DGGE 圖譜等資料，同時嘗試純菌分離、16S rDNA 純系選殖等方式以進一步分析除磷菌相，之後進流硝酸鹽至反應槽並收集各項分析資料進行比較，實驗架構如圖一所示。

- (二) 反應槽基質組成：本實驗中連續批次式反應槽使用之基質組成以 Smolders et al. 所使用者為參考 (Smolders et al., 1994)，添加之硝酸鹽是以硝酸鈉 (NaNO_3) 配製。
- (三) 反應槽構造：如圖二所示，反應槽主體以透明壓克力製成，內徑 15cm、高 30cm，有效體積為 5.3L，操作體積 5L；設有電動攪拌器、氮氣及空氣進氣裝置、進流及出流裝置、ORP 及 pH 連續監測及紀錄系統。每日 4 循環 (6hr/cycle)，每循環細分為基質進流段 15 mins (進流速率 167 ml/min)、厭氧段 2 hrs、好氧/無氧段 3 hrs、沉澱段 0.5 hrs、上澄液出流段 15 mins。
- (四) 水質及污泥分析：以連續監測及自動紀錄系統，進行水質 DO、ORP、pH 等水質參數之監測紀錄，並分析 MLSS、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、COD、HAC (除 $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$ 以 IC 分析，其餘參照 standard method)。實驗之水質分析均於採樣後立即以針筒過濾頭 ($0.22\ \mu\text{m}$) 過濾後進行，以杜絕微生物之影響。另亦分析污泥內 PHB、醣原 (glycogen) 含量。
- (五) 污泥菌相分析：以 Phenol-Chloroform 萃取法萃取污泥 DNA，配合 PCR (引子序列見表一)、變性梯度凝交電泳 (DGGE)、16S rDNA cloning 及 DNA 定序分析污泥菌相
- (六) 觀察初始硝酸鹽影響及系統穩定後，各系統 (包括厭氧-好氧 SBR 及好氧-無氧 SBR) 中脫氮釋磷/攝磷之特性。
- (七) 實驗數據整理、分析及研討。



圖一：實驗架構圖



圖二、反應槽架構

表一：菌相分析使用之 PCR 引子序列

Use for	Name	Sequence (5'-3')
DGGE-PCR	gc341f	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG
	534r	ATT ACC GCG GCT GCT GG
16S rDNA PCR	8f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
	1510r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
16S rDNA cloning	M13f	GTAAA CGA CGG CCA G
	M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC

四、實驗結果

(一) 無氧-好氧系統

無氧-好氧系統為一開始即進流硝酸鹽，結果可發現污泥釋磷攝磷反應立即受影響(圖三)，同時有明顯無氧脫硝及好氧硝化反應(圖四)，但有亞硝酸鹽累積現象(圖五)，長期馴養下醣原之生成消耗狀況與一般除磷反應槽呈相反狀態(圖六)；若提升進流碳源量可發現污泥釋磷攝磷反應逐漸回復(圖七)，污泥醣原含量仍偏低但消長狀況逐漸趨向一般除磷反應(圖八)即厭氧段醣原消耗，好氧段合成醣原。

(二) 厭氧-無氧系統

厭氧-無氧系統以添加 40mgN/L 的硝酸鹽代替曝氣。圖九為碳源利用情形，原除磷反應槽(厭氧-好氧系統)之 TOC 去除率達 97%，厭氧-無氧系統為 70%，且主要為脫硝反應所消耗。圖十顯示水中磷含量變化，其中厭氧-好氧系統磷去除率約 80%，厭氧-無氧系統中無釋磷攝磷現象。圖十一為兩系統中醣原含量變化圖，可發現厭氧-好氧系統在厭氧段利用醣原，在好氧段合成醣原，而厭氧-無氧系統中醣原含量極少幾近於零。

(三) 菌相分析

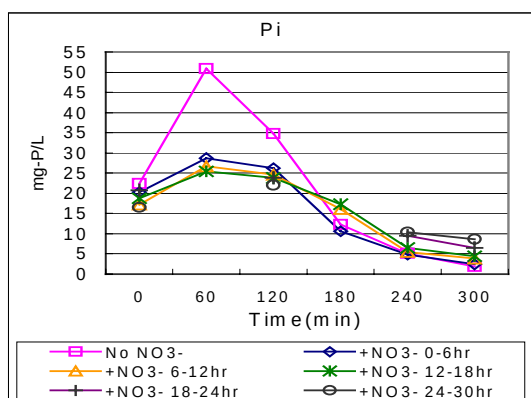
圖十二為污泥菌相分析結果，由左至右為未添加硝酸鹽之除磷污泥、添加硝酸鹽短期、長期馴養及厭氧-無氧 SBR (以 A2 表示) 之污泥 DGGE 圖譜。一般除磷污泥中大致可分為 A 至 I 共 9 菌群，其中較優勢者為 G 群；添加硝酸鹽後第一循環 (0-6 小時) 菌相未改變，添加硝酸鹽 24 小時後 I 菌群稍微增加，在 E-F 間、J、K 等位置有新菌群出現，菌相變得較為繁複；在添加硝酸鹽 10 天與 20 天後菌相趨向單純化，優勢種為 A、C 與 E 菌群；添加硝酸鹽 50 天後，菌相更為簡化，原除磷污泥中之菌群僅剩 C 及 E 存在且為優勢菌，在 M 位置有新菌群出現。而厭氧-無氧 SBR 中之菌群為 K、M、N、C，其中 N 菌群較為優勢，與原除磷污泥相同的僅有 C 菌群。經由 16S rDNA 序列比對發現菌群 C 親源接近於 *Dechlorosoma*, *Dechlorosoma* spp. 為 2001 年定名之新菌屬 (Achenbach et al. 2001)，此類菌除了 O_2 外還可使用 ClO_3^- 、 ClO_4^- 與 NO_3^- 做為電子接受者，使用硝酸鹽可轉變為氮氣，*Dechlorosoma* spp. 與 *Rhodocycles* spp.

親源十分相近，目前已有數篇文獻提及 *Rhodocycles* spp. 或 *Rhodocycles*-related 菌群在生物除磷系統中佔有極高比例 (Bond et al., 1995; Hesselmann et al., 1999; Crocetti et al., 2000)。菌群 E 則近似於 *Nitrosococcus* spp.，是一種氨氧化菌，可將 NH_3 轉變為 NO_3^- (Black J. G., 1996)。菌群 F 親源與 *Rhodospirillum* spp. 相近，此屬菌為可在化學異營狀態下生長良好的紫色非硫細菌 (purple nonsulfur bacteria) (Black J. G., 1996)。

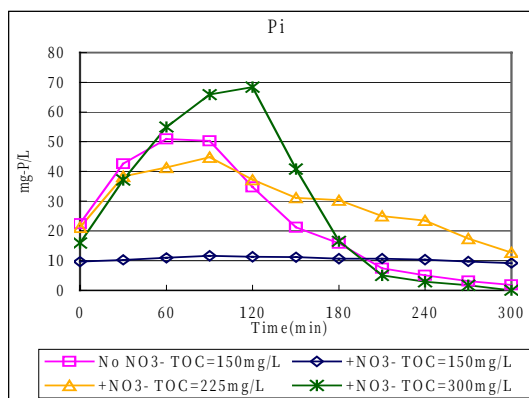
五、結果與討論

本研究主要目的在探討硝酸鹽對生物除磷系統之影響，並利用 DGGE 與 16S rDNA 純系選殖 (cloning) 技術分析菌相變化，並解析除磷污泥菌相結構。實驗結果獲致結論如下。

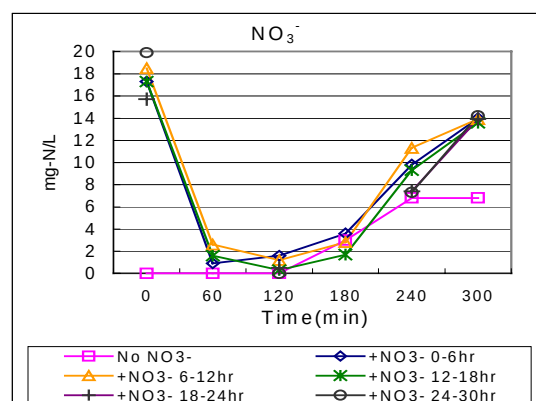
1. 硝酸鹽的添加會對除磷反應槽釋磷現象有立即影響，但有明顯脫硝效果，顯示即使進流基質中從未添加硝酸鹽，除磷效果良好的污泥中已有一定數量的脫硝菌存在，但較缺乏使用亞硝酸鹽為電子接受者的能力。
2. 進流硝酸鹽持續馴養後，污泥釋磷攝磷現象消失，應是外部碳源（醋酸鹽）持續不足使菌體內部碳源（PHB、glycogen）儲存量不足所致，提高基質碳源後可回復。
3. 反應槽在添加硝酸鹽並提高碳源至 TKN/COD 值 0.1 左右時可保有完全除磷能力。
4. 在菌相方面，硝酸鹽的添加會造成部份菌群消失，使菌相較簡化，其中與 *Dechlorosoma* spp.（脫硝菌）、*Nitrosococcus* spp.（硝化菌）親源相近的菌群存在除磷污泥中，添加硝酸鹽後成為優勢菌群。
5. 反應槽除磷效果受碳源量含量是否充足影響大，即使污泥中有除磷菌存在但在碳源不足時亦無法顯現除磷效果。
6. 近來許多文獻提及 *Rhodocycles*-related 菌群在除磷反應槽中佔有很高比例，本研究的 16S rDNA 分析結果亦顯示除磷污泥中有多數 *Rhodocycles*-related 菌群存在。



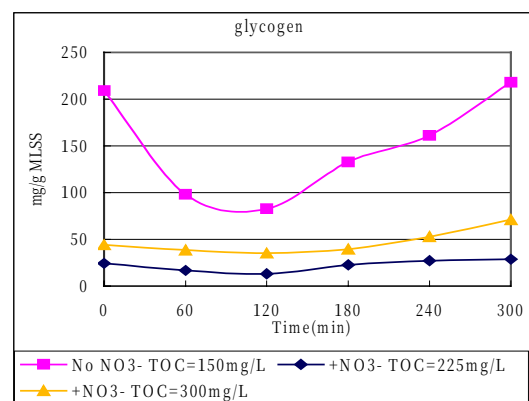
圖三 無氧-好氧系統，進流硝酸鹽 30 小時內水中磷酸鹽濃度變化



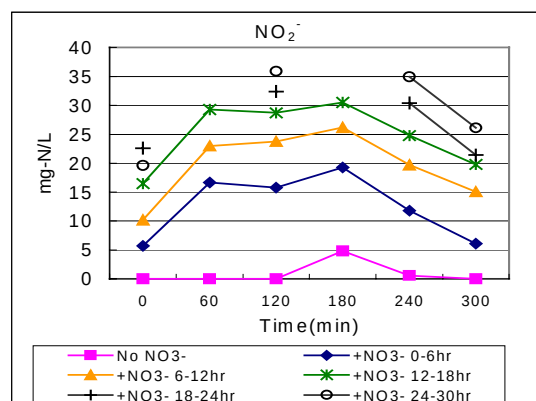
圖七 無氧-好氧系統，提升進流碳源量水中磷酸鹽濃度變化



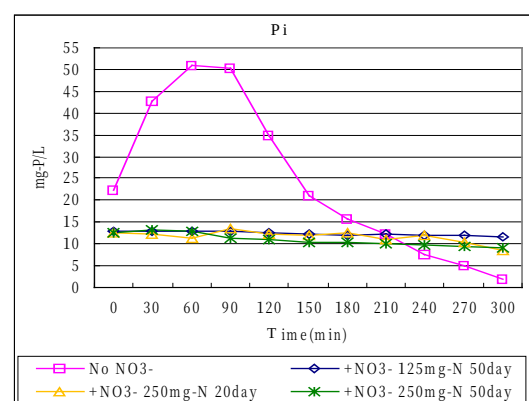
圖四 無氧-好氧系統，進流硝酸鹽 30 小時內水中硝酸鹽濃度變化



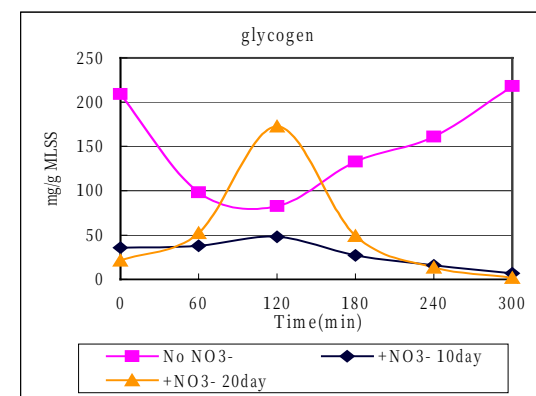
圖八 無氧-好氧系統，提升進流碳源量污泥醣原含量變化



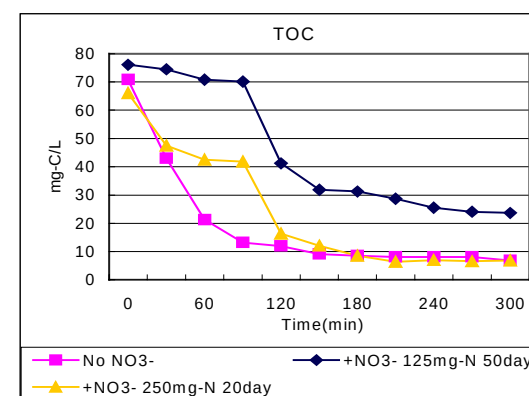
圖五 無氧-好氧系統，進流硝酸鹽 30 小時內水中亞硝酸鹽濃度變化



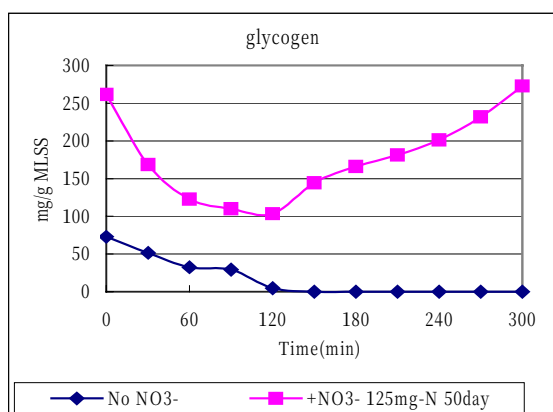
圖九 厭氧-無氧系統水中磷酸鹽濃度變化



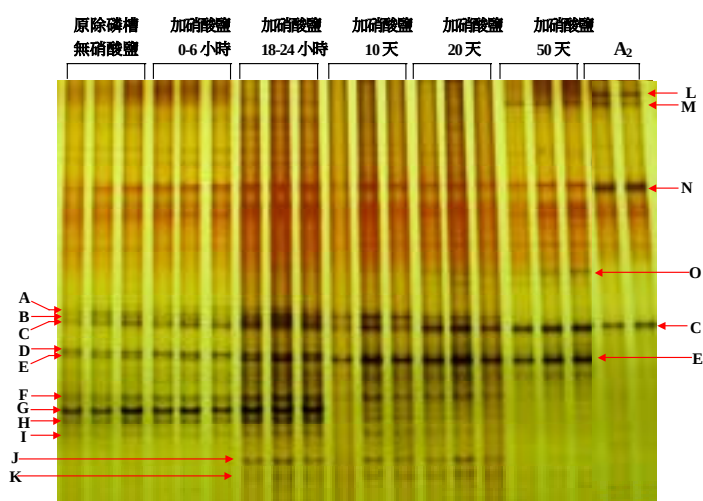
圖六 無氧-好氧系統，進流硝酸鹽 20 天污泥中醣原含量變化



圖十 厭氧-無氧系統水中有機碳濃度變化



圖十一 厭氧-無氧系統污泥中醣原含量變化



圖十二 一般除磷污泥 添加硝酸鹽之無氧-好氧系統及厭氧-無氧系統(以 A2 表示)污泥 DGGE 圖譜

Biological Phosphorus Removal from Wastewaters, 27-28(1987).

4. Hascoet, M. C. and Florentz, M. Influence of nitrate on biological phosphorus removal from wastewater. *Water S. A.*, 11(1), 1-8 (1985) .
5. Gerber A., de Villiers R. H., Mostert E. S. and van Riet C. J. The phenomenon of simultaneous phosphate uptake and release, and its importance in biological nutrient removal. In *Biological Phosphate Removal from Wastewater*, Edited by Ramadori R., Pergamon Press, Oxford (1987) .
6. Kerrn-Jespersen J. P. And Henze M. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Wat. Res.* 27, 617-624 (1993) .
7. Comeau Y., K. J. Hall, K. J., Hancock R. E. W. and Oldham W. K. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Res.*, 20, 1511-1521 (1986) .
8. Arun V, Mino T, Matsuo T Biological mechanisms of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems. *Water Res* 22: 565-570(1988).

六、參考文獻

1. Liu WT, Mino T, Matsuo T, Nakamura K Biological phosphorus removal processes-effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Wat Sci Tech* 34: 25-32(1996).
2. Smolders GJF, Van der Meij J, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal processes: stoichiometry and pH influence. *Biotechnol Bioeng* 43: 461-471(1994).
3. Mino T, Arun V, Tsuzuki Y, and Matsuo T Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: Ramadori R (ed.), *Advances in Water Pollution Control*: