

自營性生物脫氮去除水源中硝酸鹽之研究

曾四恭、張志誠

國立台灣大學環境工程學研究所

摘要

本研究採用 *Alcaligenes eutrophus* 進行自營脫氮之探討，在細菌馴養過程中發現，馴養初期 *Alcaligenes eutrophus* 僅能將硝酸鹽轉化為亞硝酸鹽，反應速率很低且亞硝酸鹽累積頗為嚴重，經6個月馴養後，才可進行完全的脫氮作用，亞硝酸鹽累積的現象也逐漸獲得改善。本研究主要是探討影響 *Alcaligenes eutrophus* 自營脫氮之環境因子，包括溫度、pH、無機碳源、硝酸鹽濃度及氮氣等，並探討脫氮過程中硝酸鹽與亞硝酸鹽間之關係。研究結果發現，在20-35°C間溫度愈高反應速率愈快。pH對亞硝酸鹽之累積及硝酸鹽降解有重大的影響，適合 *Alcaligenes eutrophus* 進行脫氮之pH約為7.0~8.5。無機碳源在此研究中並無重大的影響，試驗菌種在進行自營脫氮時，並不需要有太多之無機碳 (CO_2 or HCO_3^-)，C/N比為1時已經足夠生長需求。在氮氣的影響方面，*Alcaligenes eutrophus* 在缺乏氮氣的狀況下，依然可維持約2小時之脫氮作用，推測其原因可能為其具有合成PHB之能力所致，在缺乏能源下，以體內儲存之PHB進行脫氮作用。本研究亦發現當亞硝酸鹽存在時對硝酸鹽降解並無明顯之受質抑制現象，硝酸鹽與亞硝酸鹽之脫氮反應，應為互相競爭電子之關係。

一、前言

硝酸鹽的去除原本是應用於廢水高級處理上，但最近十幾年來，由於水源中硝酸鹽濃度過高，已逐漸應用在淨水處理上。在歐洲及北美等地區，很多國家均面臨水源中硝酸鹽濃度過高的問題（Gayle et al., 1989; Matejuet al., 1992），尤其在歐洲地區其情況更為嚴重，比利時地下水中硝酸鹽濃度超過 $50 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$ （ $11.3 \text{ mg NO}_3^--\text{N}/\text{L}$ ）的比例高達 29%（Liessens et al., 1993），蓋其主要原因有下列幾點（Rott and Lamberth, 1992）：

1. 長期過量使用化學肥料。
2. 畜牧廢水、生活污水及工業廢水之污染。
3. 掩埋場或垃圾傾棄場之滲漏。
4. 表面水體之滲漏。
5. 土壤腐植層中微生物的礦化作用。
6. 雨水的沖刷。

攝取過量硝酸鹽不但會導致六個月以下之嬰兒產生藍嬰病，硝酸鹽在胃中還可能轉化為致癌性之亞硝胺，此外亦可能導致心臟及行為方面之疾病，因此世界衛生組織建議之飲用水最高容許濃度為 $50 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$ （ $11.3 \text{ mg NO}_3^--\text{N}/\text{L}$ ），我國標準則為 $10 \text{ mg NO}_3^--\text{N}/\text{L}$ 。根據 Rott and Lamberth（1992）之資料，在未開發之森林和草地上經雨水沖刷進入地下水之含氮量每年至少 $20 \text{ kg N}/\text{ha}$ ，在一般使用的農地則為 $50 \text{ kg N}/\text{ha}$ ，若以地下水每年補注 250 mm 計算，不考慮土壤及地下水層中之脫氮作用，則進入地下水之濃度高達 $35 \sim 88 \text{ mg N}/\text{L}$ ，由此可知在脫氮作用較低的土壤及地下水層中，其硝酸鹽累積的情形頗為嚴重。以我國目前的情況來看，在遭受污染的水源中，硝酸鹽濃度

已有超過飲用水標準的現象，再加上水源給水區不當開發，化學肥料過量使用，生活污水、工業廢水及畜牧廢水之污染，未來水源中硝酸鹽濃度過高的問題是可預期的，在水源尋覓及開發不易的情況下，研擬一套解決硝酸鹽問題的可行方法，實在有其必要性。傳統生物脫氮法是利用異營性微生物，因此在操作上必須供給足夠的碳源才能達到良好的處理效率，此方法應用在廢水處理上，不致造成太大的困擾，但應用在淨水處理上，因外加碳源與硝酸鹽比值必須超過其理論計量比，因此殘留碳源則成為一困擾的問題，目前最常用的外加碳源為甲醇，因其生成的污泥量最少且價格便宜，但甲醇對人體有危害性，因此亦有人研究以乙醇、甲酸、葡萄糖、乙酸等碳源取代甲醇，不過不論採用何種外加碳源都無法根本解決碳源殘留的問題。為避免殘留碳源造成微生物在管線中再生長，影響飲用水之安全性，本研究採用自營性微生物進行脫氮，解決異營脫氮碳源殘留的問題。

二、文獻回顧

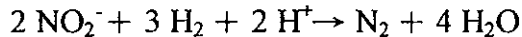
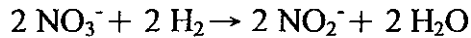
目前於文獻中發現之自營脫氮菌，若以能量來源區分可分成四種類（如表 1）：1. 以氫氣為能源的氫氧化菌；2. 以還原性硫化物為能源的硫氧化菌；3. 以二價鐵為能源的脫氮菌；4. 以含氮化合物為能源的脫氮菌（Mateju et al., 1992 Rott and Lamberth, 1992）。

在氫氧化菌方面，此類微生物在無氧或氧濃度較低的情況下，可利用二氧化碳或碳酸氫根離子為碳源，以氫氣為電子供給者及能量來源，硝酸鹽為電子接受者，將硝酸鹽轉化為氮氣進行脫氮作用。其脫氮主要途徑為 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ，一般將其簡化為二個步驟（Kurt et al., 1987; Dries et al., 1988; Germonpre et al., 1992; Gros et al., 1988）：

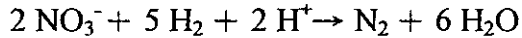
表 1 自營脫氮菌

菌株	能 源
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	H ₂
<i>Paracoccus denitrificans</i>	H ₂
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	H ₂
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	硫化物
<i>Thiobacillus thioparus</i>	硫化物
<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	硫化物
<i>Thiosphera pantotrapha</i>	硫化物
<i>Ferrobacillus spec.</i>	二價鐵
<i>Gallionella spec.</i>	二價鐵
<i>Leptothrix spec.</i>	二價鐵
<i>Sphaerotillus spec.</i>	二價鐵
<i>Alcaligenes spec.</i>	氯化物
<i>Achromobacter spec.</i>	氯化物
<i>Bacillus spec.</i>	氯化物
<i>Pseudomonas spec.</i>	氯化物

資料來源：（ Mateju et al., 1992; Rott and Lamberth, 1992 ）



總反應式為：



由方程式中可發現，反應的第二步驟將 1 莫耳 NO_2^- 轉化為氮氣時需消耗 1 莫耳的 H^+ ，因此反應完成後 pH 值會有升高的現象，理論上每去除 1 mole NO_3^- -N 約需消耗 0.35 mg/L 的氫氣。另外由總反應式中可看出，在此脫氮過程中除了需消耗 H^+ 外，並不會產生對人體有害的副產物，且殘留之氫氣亦不會對人體造成危害，因此採用自營性的氫氣化菌進行脫氮，具有以下之優點（Gros et al., 1986; Gros et al., 1988; Rutten and Schnoor, 1992）：

1. 此生物脫氮程序對於硝酸鹽具有高的選擇性，且反應的產物為氮氣及水，並無有害副產物的問題。
2. 反應的基質為氫氣，對人體並無危害，因此不必擔心氫氣過量的問題。
3. 採用無機碳（ CO_2 或 HCO_3^- ）為碳源，可避免有機碳殘留的問題。
4. 在此操作環境下，對於細菌具有很高的選擇性，其它的微生物可能很難生存或成為優勢種。
5. 自營菌繁殖的速率較低，所需廢棄的污泥量較少。

目前在文獻中發現之氫氣脫氮菌主要有 *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus* 及 *Pseudomonas pseudoflava*。大多數的研究均採用混合菌，以純菌進行研究者很少，本研究採用純菌進行試驗，找出適合此細菌脫氮之條件，以便在實際操作上能得到較高之脫氮效率，且在與其他細菌競爭方面能較佔優勢。

三、研究方法

菌種來源及馴養:

本研究之菌種 *Alcaligenes eutrophus* 購買自新竹食品工業發展研究所，其編號為 CCRC 13036。購得之細菌依其指定程序活化後，採用半批次方式進行培養，如圖 1。馴養初期每天取樣一次分析其 pH 及 NO_3^- 降解之情形，每天以曝 CO_2 的方式調整 pH 值 1~2 次，pH 變化範圍 6.5~9.5。培養基組成如下： KNO_3 (2 g/L)， KH_2PO_4 (2 g/L)， NaHCO_3 (2 g/L)， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.15 g/L)，trace element solution (1 ml/L)。trace element solution 組成如下： Na_2EDTA (50.0 g/L)， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.2 g/L)， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.3 g/L)， $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.5 g/L)， $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L)， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L)， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5.0 g/L)， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L)，pH = 7.0。

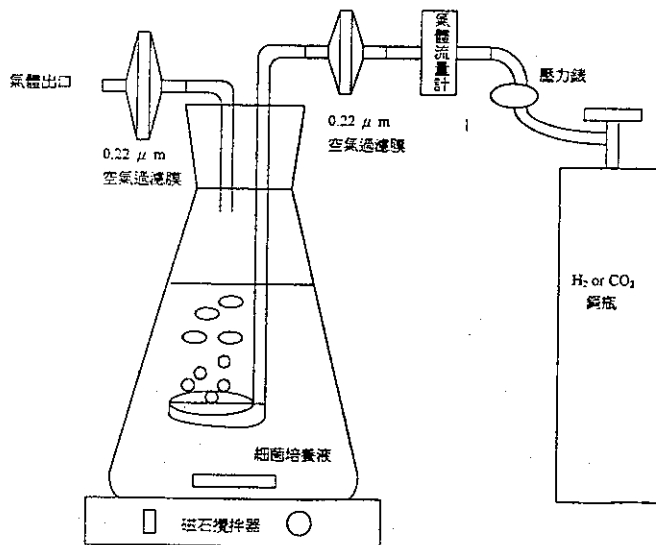


圖 1 細菌的馴養

實驗方法:

本研究之試驗以批次反應的方式進行，溫度控制在 30 ± 1 °C，pH 控制在 8.0 ± 0.5 ，硝酸鹽氮濃度為 40 mg-N/L。批次反應採用 125ml 血清瓶，加入 40ml 細菌液，實驗組以經 0.2 μ m 無菌過濾膜濾過之氮氣曝氣 2 分鐘，將照組則以氮氣曝氣 2 分鐘，曝氣後立即將瓶塞蓋上。將血清瓶放入 30 ± 1 °C 恆溫培養箱內，在轉速 120 rpm 之搖瓶器上進行試驗。每小時以無菌之注射針筒取樣一次。所有實驗所需之器材均以高壓滅菌釜在 121 °C，1.2 Kg/cm² 下，滅菌 30 分鐘，操作過程均在無菌操作台內進行。

分析方法:

本研究分析之項目包括：pH、菌液吸光度、硝酸鹽及亞硝酸鹽濃度等。pH 值以 pH meter 分析，其機型為 WTW pH537 型，菌液吸光度則以 Sequoia-Turner Model 390 型之分光光度計在 600 nm 波長下分析；硝酸鹽及亞硝酸鹽濃度則以 I.C. 分析，I.C. 之機型、Column 及操作條件如下：

機型：Dionex QIC

Column：Phenomenex Star-ion-A300 100 × 4.60 mm

流洗液：0.7642 Na₂CO₃ + 0.5712 NaHCO₃ 稀釋至 4L

再生液：2.8 ml 濃硫酸稀釋至 4L

流 速：2.0 ml/min

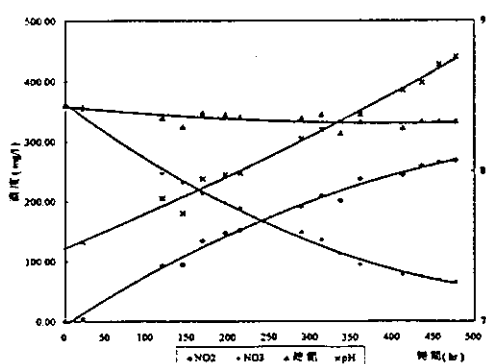
四、結果與討論

本研究採用 *Alcaligenes eutrophus*，在馴養過程中，前三個月未發現有反應發生，經過不斷再植種後，於三個月後發現具有反應現象

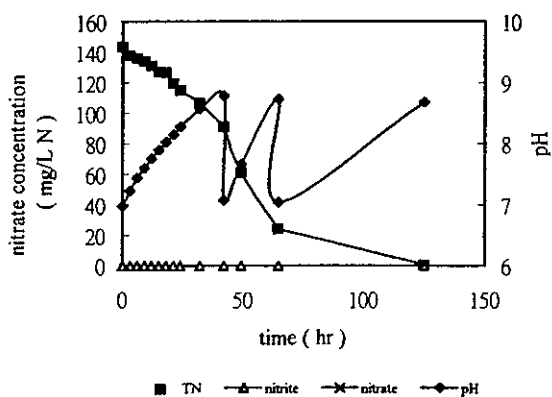
(如圖 2a)。由圖 2a 中可發現 *Alcaligenes eutrophus* 在此時已可將硝酸鹽逐漸轉化為亞硝酸鹽，因此在反應過程中硝酸鹽濃度逐漸降低，亞硝酸鹽逐漸升高，pH 也隨時間慢慢上升，但由總氮（硝酸鹽+亞硝酸鹽）的變化情形來看，硝酸鹽被轉化為氮氣之比例很小，被降解之硝酸鹽此時大多以亞硝酸鹽的形式存在。

經過 6 個月的馴養後，*Alcaligenes eutrophus* 有脫氮現象產生(如圖 2b)。若與馴養三個月時之情形比較，可看出此時硝酸鹽之降解速率較快，且亞硝酸鹽累積的現象消失，硝酸鹽大多被轉化為氮氣，另外 pH 上升的情況亦較為快速。

由以上之結果可看出，細菌在馴養初期，硝酸鹽還原酶先被活化，此時有亞硝酸鹽累積的情形出現，當亞硝酸鹽累積一段時間後，亞硝酸鹽還原酶亦被活化，因此馴養後期亞硝酸鹽累積的情況已獲得大幅改變。



2a 馴養 3 個月



2b 馴養 6 個月

圖 2 細菌馴養結果

pH 對 *Alcaligenes eutrophus* 脫氮作用之影響如圖 3 所示。由圖 3 中得知，當 pH 大於 5.0 以上時，硝酸鹽之平均降解速率受 pH 之影響不大，約維持在 15 mg N/L/hr 左右；亞硝酸鹽之平均降解速率受 pH 之影響較大，在 pH = 8 附近有最大值。由圖 4 中亦可看出當 pH ≤ 6.24 或 pH ≥ 8.72 以上時，會有亞硝酸鹽累積的情形出現，尤其在微酸性的狀況下 (pH = 5.05 及 pH = 6.24)，亞硝酸鹽累積的情形最為嚴重，由圖 3 及圖 4 之結果推測，其可能原因為此時硝酸鹽還原酶尚未受到抑制，而亞硝酸鹽還原酶已受到明顯的抑制所致。由以上之結果可知 pH 對脫氮作用之影響頗大，尤其在亞硝酸鹽的累積方面更具關鍵性之影響，以 *Alcaligenes eutrophus* 而言，適合進行反應之 pH 範圍為 7.0 ~ 8.5，最佳 pH 值為 8。

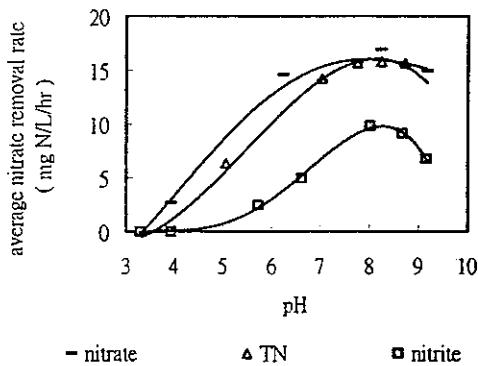


圖 3 pH 對脫氮速率之影響

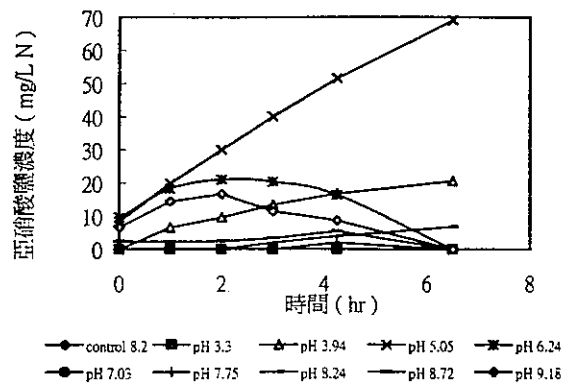


圖 4 pH 對亞硝酸鹽累積之影響

硝酸鹽濃度與脫氮速率之關係 (如圖 5)，由圖 5 中可看出，硝酸鹽濃度在 750 mg N/L 以下時，對 *Alcaligenes eutrophus* 並無抑制現象；此外硝酸鹽降解速率與硝酸鹽濃度之間似乎存在某種拋物線之關係，最高點約在 $\text{NO}_3^- \text{-N} = 500 \text{ mg N/L}$ 左右，但關係並不明顯 ($R^2 = 0.7378$)。無機碳源對此脫氮系統影響之程度，結果如圖 6，當 C/N 在 1.0 ~ 4.7 時，其硝酸鹽降解速率並不受 C/N 比之影響，推測其可能原因為，本研究所採用者為自營菌，對此試驗菌種而言，其能量來源為氫氣，無機碳僅提供為其細胞合成時所需之碳源，因此需要量並不大，當 C/N 比為 1 時即已足夠，故提供過量之無機碳對此系統並無幫助。

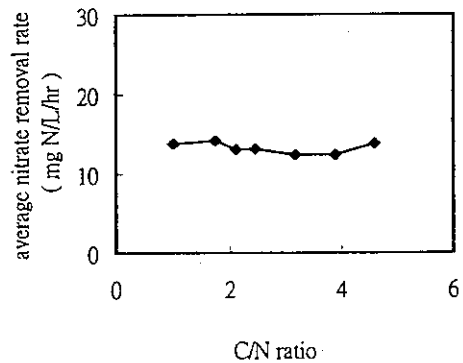
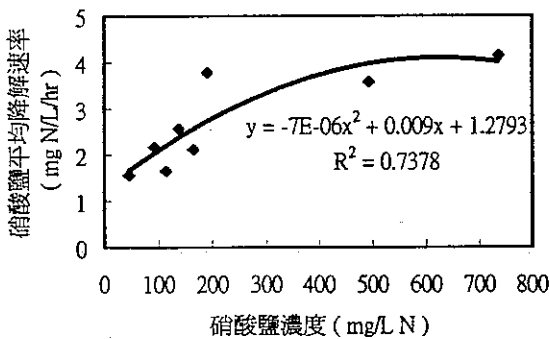


圖 5 硝酸鹽濃度對脫氮作用之影響

圖 6 無機碳對脫氮作用之影響

在氮氣的影響方面，以一組供應氮氣，另一組供應氮氣的方式進行研究，其結果如圖 7，由圖中得知，供應氮氣組其硝酸鹽的降解可維持穩定的速率，逐漸降解至 0，而供給氮氣組，在前 2 個小時硝酸鹽仍可迅速降解，但第 2 個小時後，硝酸鹽的降解即明顯停頓，根據 Bergey's manual (Tansil et al., 1984)，*Alcaligenes eutrophus* 具有合成 PHB 的能力，在環境不佳的時候可提供細菌能量，維持其生存，因此在缺乏能源的環境中可延長其生存的時間。在一些文獻中亦發現很多利用 *Alcaligenes eutrophus* 進行 PHAs (PHB 為 PHAs 之 1 種) 合成之研究 (Lee, 1996; Yoo and Kim, 1994; Ishizaki and Tanaka, 1991; Lee, et al., 1993; Shimizu, et al., 1993; Tanaka, et al., 1992)，因其合成 PHB 之能力最強，根據研究其 P(3HB) 在細胞內的累積量可達其乾重之 80% (Lee, 1996)，且 *Alcaligenes eutrophus* 不論在自營或異營狀況下均證實可合成此類物質 (Ishizaki and Tanaka, 1991)。因此在此推測供給氮氣組，前 2 個小時降解硝酸鹽之能量來源可能為 PHB，由於在此系統內主要的電子接受者為 NO_3^- ，因此在代謝 PHB 的同時亦會利用 NO_3^- 為電子接受者，造成硝酸鹽降解之現象。

關於亞硝酸鹽存在對硝酸鹽降解之影響，某些研究發現有明顯的抑制現象，有些則未有影響 (Knowles, 1982)。在 Kurt 等人 (1987) 的自營脫氮系統中則發現，當亞硝酸鹽加入時，硝酸鹽之降解會受到抑制。本研究亦希望了解亞硝酸鹽對此試驗菌種脫氮作用之影響，因此進行添加亞硝酸鹽之研究，在此試驗中 A 組試驗僅提供硝酸鹽；B 組則同時提供硝酸鹽及亞硝酸鹽，但其硝酸鹽濃度與 A 組相同，以便對照硝酸鹽降解之情形；C 組則提供相當於 B 組總氮量之硝酸鹽，藉以對照在相同氮負荷下總氮降解之情形。圖 8 為 *Alcaligenes eutrophus*

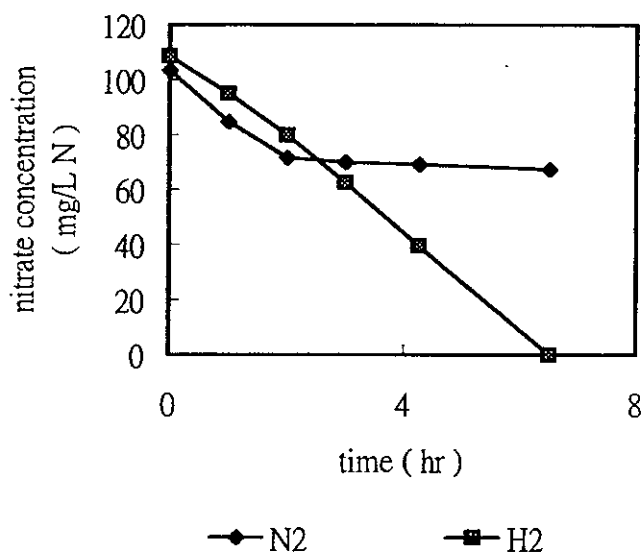


圖 7 氫氣對脫氮作用之影響

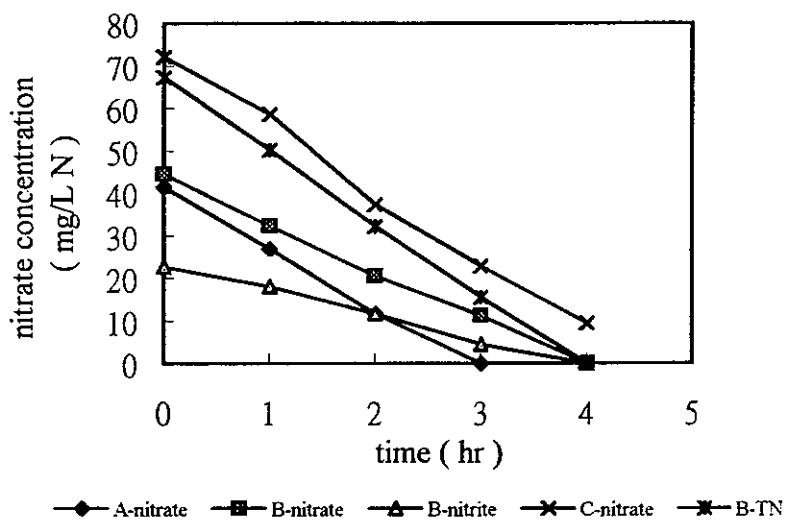


圖 8 添加亞硝酸鹽對亞硝酸鹽降解之影響

之實驗結果，由圖中 A 組硝酸鹽及 B 組硝酸鹽之降解情形來看，可明顯看出當此系統存在亞硝酸鹽時，硝酸鹽之降解速率會受到些微影響，降解速率會變慢，另外由 B 組硝酸鹽 + 亞硝酸鹽及 C 組硝酸鹽的比較中可發現，在相同之氮負荷下，總氮（包括亞硝酸鹽及硝酸鹽）之降解速率約為相同，由此可見硝酸鹽與亞硝酸鹽間應為競爭電子之關係。經由以上之結果推知，亞硝酸鹽及硝酸鹽間並無絕對之受質抑制關係，二者間應為互相競爭電子之關係。

若將本研究之結果整理成菌液吸光度與硝酸鹽降解速率之關係，其結果如圖 9，由圖中可看出 *Alcaligenes eutrophus* 吸光度愈高脫氮速率愈快。

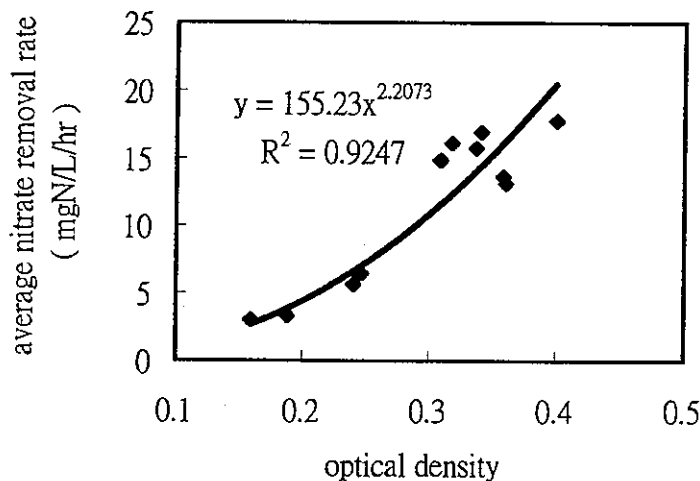


圖 9 菌液吸光度與脫氮速率之關係

五、結 論

綜合以上之討論後，本研究可得到以下之結果：

1. 影響脫氮作用的環境因子中，以 pH 值之影響較為重要，pH 對亞硝酸鹽之累積有重大的影響，適合 *Alcaligenes eutrophus* 進行脫氮之 pH 約為 7.0 ~ 8.5。
2. 此菌種在進行自營脫氮時，並不需要有太多之無機碳 (CO_2 or HCO_3^-)，C/N 比為 1 時已經足夠生長需求。
3. *Alcaligenes eutrophus* 在缺乏氮氣的狀況下，依然可維持約 2 小時之脫氮作用，推測其原因可能為其具有合成 PHB 之能力所致，在 0 缺乏能源下，以 PHB 進行脫氮作用。
4. 亞硝酸鹽及硝酸鹽間並無絕對之受質抑制關係，二者間應為互相競爭電子之關係。

六、參考文獻

1. Dries D., Liessens J., Verstraete W., Stevens P., de Vos P. and de Ley J., Nitrate Removal from Drinking Water by Means of Hydrogenotrophic Denitrifiers in a Polyurethane Carrier Reactor, *Water Supply*, 6:181-192, 1988.
2. Gayle B. P.; Boardman G. D.; Sherrard J. H. and Benoit R. E., Biological Denitrification of Water, *J. Environmental Engineering*, 115:5:930-943, 1989.
3. Germonpre R., Liessens J., Verstraete W. and Beernaert S., Methylotrophic and Hydrogenotrophic Denitrification at the Blankart Plant, *Water Supply*, 10:3:53-64, 1992.
4. Gros H., Schnoor G. and Rutten P., Biological Denitrification Process with Hydrogen-Oxidizing Bacteria for Drinking Water Treatment, *Water Supply*, 6:193-198, 1988.

5. Gros H., Schnoor G. and Rutten P., Nitrate Removal from Groundwater by Autotrophic Microorganisms, *Water Supply*, 4:11-21, 1986.
6. Ishizaki A. and Tanka K., Production of Poly- β -hydroxyutyric Acid from Carbon Dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697, *J. of Fermentation and bioengineering*, 71:4:254-257, 1991.
7. Knowles R., Denitrification, *Microbiological Reviews*, 46:1:43-70, 1982.
8. Kurt M., Dunn I.J. and Bourne J.R., Biological Denitrification of Drinking Water Using Autotrophic Organisms with H₂ in a Fluidized-Bed Biofilm Reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 29: March: 493-501, 1987.
9. Lee Y., Nam S. W., Choi E. S., Chang H. N. and Park Y. H., Production of Poly- β -Hydroxybutyrate and Measurement of Related Enzyme Activities in *Alcaligenes eutrophus*, *J. Fermentation and Bioengineering*, 76:5:416-418, 1993.
10. Lee S. Y., Review Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.*, 49:1:1-14, 1996.
11. Liessens J., Germonpre R., Kerster I., Beernaert S. and Verstraete W., Removing Nitrate With a Methylophilic Fluidized Bed: Microbiological Water Quality, *J. AWWA*, April 155-161, 1993.
12. Mateju V., Cizinska S., krejci J., and Janoch T., Biological water Denitrification - a Review., *Enzyme Microb. Technol.*, 14: March: 170-183, 1992.
13. Rott U. and Lamberth B., Subterranean Denitrification for the Treatment of Drinking Water, *Water Supply*, 10:3:111-120, 1992.
14. Rutten P. and Schnoor G., Five Years' Experience of Nitrate Removal from Drinking Water, *Water Supply*, 10:3:183-190, 1992.
15. Shimizu H., Tamura S., Shioya S. and Suga K. I., Kinetic Study of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyric Acid (PHB) Production and Its Molecular Weight Distribution Control in a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus*, *J. Fermentation and Bioengineering*, 76:6:465-469, 1993.
16. Tanaka K., Ishizaki A. and Stanbury P. E., Accumulation of Polyphosphate and Substrate Gas Utilization Efficiency in PHB Accumulation Phase of Autotrophic Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697, *J. Fermentation and Bioengineering*, 74:5:288-291, 1992.

17. Tansil B., Brown C.L., Nolley C.S., Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins; Baltimore, USA. , 1984.

18. Yoo S. and Kim W. S., Cybernetic Model for Synthesis of Poly- β -Hydroxybutyric Acid in *Alcaligenes eutrophus.*, Biotechnol. Bioeng., 43:11:1043-1051, 1994.