

行政院原子能委員會核能研究所

委託研究計畫研究報告

沼液循環回收淨化研究

Study on recycling and purification of biogas slurry

計畫編號：108B010

受委託機關(構)：財團法人食品工業發展研究所

計畫主持人：郭楊正

聯絡電話：03-5223191 ext 523

E-mail address：yck24@firdi.org.tw

研究期程：中華民國 108 年 5 月至 108 年 12 月

研究經費：新臺幣 101 萬元

核研所聯絡人員：王蔚

報告日期：108 年 12 月 05 日

目 錄

目 錄.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
壹、計畫緣起與目的.....	5
貳、研究方法與過程.....	8
一、廢水分析.....	8
二、藻株來源及培養基.....	9
三、藻種鑑定.....	9
四、微藻耐受稀釋沼液的能力測試.....	10
五、1L 光反應器培養測試.....	11
參、主要發現與結論.....	12
一、沼液基本性質分析.....	12
二、微藻耐受稀釋沼液的能力測試.....	12
三、藻種鑑定.....	13
四、1L 光反應器培養測試.....	13
肆、參考文獻.....	16
表附錄.....	17
圖附錄.....	21

中文摘要

隨著人口的增加，對於食品及日常用品的需求也增加，工業和畜牧業因此隨著蓬勃發展，產生大量的廢水若未經適當處理，將導致嚴重的環境污染。目前多數採用一級與二級處理程序來降低廢水中的有機物，然而二級程序處理後的水體中仍含有無機氮、磷，會導致水體優養化的問題。目前有研究利用微藻進行三級生物處理，因為微藻能夠利用無機氮和磷進行生長，並具有去除重金屬及部分毒素的能力。利用廢水培養微藻不僅可保護環境，微藻可產生具有價值的產物-生質燃油及高價副產物。然而，廢水種類眾多，汙染物成分是影響微藻存活的重要因素之一。本研究主要目的即針對纖維解聚與畜牧廢水共消化後產生的沼液進行微藻培養技術的開發，由本中心的潛力微藻中進行篩選，以實驗室級之光反應器進行批次培養，並分析微藻對於廢水中氮氮及磷的去除效率，建立最適當微藻培養參數。

本計畫共進行 12 株微藻的篩選，其中 5 株微藻可耐受 30% 稀釋沼液，P5 藻株更可耐受至 50%。將上述 5 株潛力藻株進行分子鑑定，結果有 3 株為 *Chlorella sorokiniana*，1 株 *Micractinium* sp. 及 1 株 *Chlorellaceae* sp.。我們選擇 4 株於稀釋沼液中生長最佳的微藻，以 1L 光反應器進行培養測試。結果顯示 4 株微藻皆生長良好，其中以 C3 及 P5 藻株生長最佳。後續將 C3 及 P5 藻株進行培養參數的優化，培養 7 天後氮氮去除率分別為 100 % 及 99 %，總磷的去除率皆為 100%。

英文摘要

As the human population grows, the demand of meat and dairy products also increases. Wastewaters, including which form industry and animal husbandry grows as well and becoming a more and more serious problem if disposed inappropriately. Currently, the primary and secondary treatments processes have been used to reduce organic matter in wastewater. However, the effluent water of the secondary process still contains inorganic nitrogen and phosphorus, which will lead to the problem of eutrophication.

Use of microalgae as tertiary biological treatment process is an elegant step because microalgae can use solar energy and nutrients such as nitrogen and phosphorus to produce biomass by photosynthesis. Furthermore, microalgae have the capacity to remove heavy metals, as well as some toxic organic compounds. Using wastewater as source of nutrients to cultivate microalgae is benefit for environmental protection, and can produce renewable bioresources such as biofuel and high-value by-products. The composition of wastewater is one of the factors affecting the growth of microalgae. In this project, we focus on isolate microalgae strains that could tolerant the biogas slurry from the co-digestion of swine wastewater and depolymerized-lignocellulose, then cultivate the microalgae in photobioreactor with dilute slurry and analyze the removal efficiency of ammonia nitrogen and phosphorus.

In this study, twelve strains of microalgae have been tested and five of which can grow well in the 30% dilute biogas slurry, among which the P5 strain can grow in 50% dilute biogas slurry. Molecular identification of the above five potential microalgae has been completed, and the results showed that there are 3 strains of *Chlorella sorokiniana*, 1 strain of *Micractinium* sp and 1 strain of *Chlorellaceae* sp. After that, we culture the best four strains of microalgae by using 1-L photobioreactor. The results showed that all the four microalgae grew well. Next, we optimize the culture parameters of C3 and P5 strain, after 7 days of culture, the removal rates of ammonia nitrogen were 100 % and 99 %, respectively; both removal rates of phosphorus were 100%.

壹、計畫緣起與目的

隨著都市、農業和工業的迅速發展，產生大量的廢水若未經適當處理，將導致環境受到有機和無機物的污染，對於健康及經濟產生重大影響。目前廢水處理的技術與程序很多種，通常包括三個階段，稱為一級、二級和三級處理。一級處理主要是將廢水中的固體、油脂、沙粒或硬質顆粒，透過過濾或浮除技術去除，水體經過再經過厭氧階段進行發酵，產生沼氣(甲烷)為可燃氣體，可做為發電或燃燒加熱使用，一級處理可去除廢水中多數的有機物。二級處理則進一步透過曝氣增加水中含氧量，使好氧性微生物活躍，幫助分解污水中的有機化合物。三級處理的目標則是進一步分解剩餘有機物、無機氮、磷及重金屬，此部分可透過物理、化學及生物程序達成。與化學程序相比，生物法較具經濟效益，且較不易產生二次污染。一般生活廢水多數採用一級與二級處理程序來降低廢水中的有機物，然而對於畜牧廢水而言，因含有較高濃度的氨氮、硝酸氮、磷等污染物，長期累積下來會導致河川、湖泊優養化的問題，因此需透過三級處理方能淨化廢水。常用的三級生物處理法是微藻，因為微藻能夠利用無機氮和磷進行生長(Oswald, 1988b;

Richmond, 1986)，可降低水中無機物染物的濃度，並具有去除重金屬的能力 (Rai *et al.*, 1981)。同時，因微藻藻體富含油脂及色素，具有生質柴油、健康油脂及食用色素等應用價值。

Palmer (1974)調查分布在廢水中的微藻，數量最多且最常見的微藻是 *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium* 及 *Golenkinia*。根據文獻，利用微藻處理禽畜廢水的微藻，已知有 *Chlorella*、*Scenedesmus*、*Desmodesmus* 及 *Neochloris* 等藻屬，其中 COD 的去除率最高達 75.3%，氨氮、磷酸根及總磷的去除率最高可達 100%，而總氮的去除率最高亦可達 88.7% (Zhu *et al.*, 2013)。豬糞尿廢水經過厭氣池處理後，pH 在 6.1~9.18、COD 值 (162~928mg/L)、氨氮含量(708~824 mg/L)、硝酸氮含量(70~84 mg/L)，總磷含量(45~209 mg/L)(表一)。Lau 等人(1996)的研究發現 *Chlorella vulgaris* 對於廢水中無機氮及無機磷的去除率分別達 86%及 78%。Wang 等人(2015)利用不同稀釋比例的畜牧廢水養殖 *Chlorella vulgaris* JSC-6，可去除水中 60–70% 的 COD 及 40–90%的氨氮。De Godos 等人(2009)使用 10 倍及 20 倍稀釋的養豬廢水進行混和微藻 (*Chlamydomonas*, *Chlorella* 及

Nitzschia)的培養，COD 及總氮(TKN)的去除率分別為 76%及 88%。另外，由於微藻廢水處理系統需要占用很大的土地空間，因此各研究單位也致力於開發高密度的微藻培養技術，能在短時間內降解氮及磷，加速廢水處理效率(Lavoie and De la Nouë, 1985)。然而，廢水種類眾多，污染物成分是影響微生物種存活的重要因素之一，因此針對特定廢水選擇適當微生物種進行處理，是研究開發的首要工作。本研究主要目的即針對纖維解聚與畜牧廢水共發酵後產生的沼液進行微藻培養技術的開發，由本中心的潛力微藻中進行篩選，以實驗室級之光反應器進行批次培養，並分析微藻對於廢水中氮氮及磷的去除效率，建立最適當微藻培養參數，達到淨化廢水，提高水資源再利用效率的目的。

貳、研究方法與過程

一、廢水分析

水中 COD 依照 Hach Oxygen Demand, Chemical kit (20-1500 mg/ml COD, High Range, Hach Company, Loveland, CO, USA)使用方法偵測，其方法依照美國環境保護署所規範(Eaton & Franson, 2005)

水中 TOC 依照 Hach Total Organic Carbon (TOC) kit(100 - 700 mg/L TOC , High Range, Hach Company, Loveland, CO, USA)使用方法偵測。

水中氨氮依照 Hach nitrogen, ammonia kit (Test' N tube 0.4-50.0 mg/ml $\text{NH}_3\text{-N}$, Hach Company, Loveland, CO, USA)使用方法偵測。

水中硝酸氮依照 Hach Nitrate High Range, Test' N Tube (0 to 30.0 mg/L $\text{NO}_3^-\text{-N}$, Hach Company, Loveland, CO, USA) 使用方法偵測。

水中總磷依照 Hach Phosphorus (Total) TNT Reagent Set(Test' N tube 1.0 - 100.0 mg/L PO_4 Hach Company, Loveland, CO, USA) 使用方法偵測。

水中 SS 之检测方法則參考環保署公告检测方法(NIEA W210.58A)。將攪拌均勻之水樣以一已知重量之玻璃纖維濾片過濾，濾片移入

103~105℃ 烘箱中乾燥至恆重，其所增加之重量即為懸浮固體重(SS)。

二、藻株來源及培養基

本實驗微藻來源為 BCRC 藻種庫或環境廢水中篩選之潛力藻株。本實驗使用 BG-11 培養基(BCRC 培養基編號為 647)，依序加入 1,500 mg 的 NaNO_3 、40 mg 的 K_2HPO_4 、75 mg 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、27.18 mg 的 CaCl_2 、6 mg 的 Citric Acid、6 mg 的 Ferric Ammonium Citrate、1 mg 的 $\text{Na}_2\text{MgEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20 mg 的 Na_2CO_3 、2.86 mg 的 HBO_3 、1.181mg 的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.222 mg 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 mg 的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.0718 mg 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 與 0.049 mg 的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 隨後將其體積補水至 1,000 mL，調 pH 至 8.0 後進行高壓滅菌。若為 1.5% 洋菜固體培養基則需加入 15 g 的洋菜膠一同滅菌。

三、藻種鑑定

3.1 藻體染色體之萃取

自平板刮取下新鮮培養的藻體，將其收集在 2 mL 微量離心管，取適量藻體加入 0.5 mL 無菌水，振盪使藻體均勻分散後，以 genomic DNA 萃取套組 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (ZYMO

RESEARCH) kit 進行萃取。萃取完成之 genomic DNA 以 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer) 確認 DNA 濃度備用。

3.2 18S rDNA 與 ITS 定序分析與比對

將藻體 genomic DNA 作為 PCR 模板，以 18S rRNA 與 ITS 全長區域(Ferrer *et al.*, 2001)的引子對(NS1/ITS4)(表二)增幅其基因片段，PCR 反應條件如表三。PCR 反應完成後，以膠體電泳確認是否有增幅之產物。確認有增幅之產物後，進行 PCR 產物純化，再分別以 13 條定序引子(表二)進行定序反應，反應條件如表四。定序完成後，將序列結果以 Vector NTI Suite 9 軟體(VNTI) 與 NCBI/Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 資料庫進行序列重組與序列相似性比對分析。

四、微藻耐受稀釋沼液的能力測試

本實驗以 150 ml 錐形瓶進行培養，操作體積為 50 ml。將不同藻株以 TSA 平板培養基活化，刮取藻體回溶至無菌水中，並個別接種於 10~100% 稀釋之沼液，使初始藻體濃度為 0.5~1.0 (OD_{682nm})，置於 30℃，以 150 rpm 震盪培養。定時採樣測量 OD_{682nm} 讀值或分析氨氮濃度，篩選出潛力微藻及最佳稀釋沼液比例。

五、1L 光反應器培養測試

本實驗以 1L 光反應器(圖一)進行微藻放大培養，並以稀釋沼液作為培養液。將篩選後的潛力藻株以 TSA 平板培養基活化，刮取藻體回溶至無菌水中，使藻體濃度為 10.0 (OD_{682nm})。接著取 300 ml 沼液倒進 1L 光反應器，並接種 100 ml 微藻，最後加入 RO 水至總體積 1,000 mL，此時微藻濃度約為 1.0 (OD_{682nm})，沼液濃度為 30 %。將光反應器置於人工光源層架上，調整光照強度($350\sim450\mu mol/m^2/sec$)，以 0.5 vvm 通氣培養(5 %二氧化碳或空氣)，定時採樣分析 pH、 OD_{682nm} 、氨氮、總磷、COD 及生物質產率。

生物質產率計算公式如下：

生物質產率 (mg/L/d) = 藻體乾重 WA (mg) / 培養體積 V (L) / 培養時間 T (d)

參、主要發現與結論

一、沼液基本性質分析

本次實驗使用之沼液為核研所 4 月 30 日提供之沼液，其基本性質分析結果如表五。此批沼液 pH 為 7.89，COD 為 9,940 mg/L，但 sCOD 僅 510 mg/L，且 SS 高達 2,940mg/L，顯示沼液中含有大量不可溶物質；氨氮濃度為 362 mg/L，水中總磷濃度 99.6 mg/L。另外為了排除沼液中其他微生物及固體的影響，將沼液離心後並以高溫高壓滅菌，再進行微藻的培養測試。相較於原始沼液，離心滅菌後的沼液 pH 上升至 9.5，sCOD 上升至 1,390 mg/L (COD 部分因已經過離心，故僅以 sCOD 表示)，SS 為 109 mg/L，氨氮略降至 284 mg/L，總磷濃度為 84 mg/L(表五)。

二、微藻耐受稀釋沼液的能力測試

如前所述，為排除其他微生物的干擾，後續實驗皆使用滅過菌的沼液進行測試。本次使用的微藻藻株共 12 株，首先使用 10 %稀釋沼液進行微藻培養，結果顯示 12 株皆可生長(圖二)。使用 30~50%稀釋沼液進行微藻培養時，因沼液的固體懸浮物濃度過高，影響吸光度讀值的判讀，無法判斷微藻生長與否。因此先將沼液進行離心，去除固體後滅菌，再進行 30~50%稀釋沼液的測試，結果如圖三，在

30%沼液實驗中，藻株 C2、C3、C4、Y2-8 及 P5 的生長曲線有上升，其中以 P5 最佳，培養 6 天後的 OD_{682nm} 讀值可達 1.6；在 50%沼液實驗中，僅有 P5 藻株的生長曲線有微幅增加，其餘皆呈現下降。經由上述結果，具有潛力的藻株為 C2、C3、C4、Y2-8 及 P5，且最佳稀釋沼液的濃度為 30%。

三、藻種鑑定

將上述具有潛力的五株微藻(C2、C3、C4、Y2-8 及 P5)進行 18S DNA 與 ITS 全長區域的定序，將其序列於 NCBI 網站進行相似性比對分析後，初步鑑定 3 株為 *Chlorella sorokiniana*，1 株為 *Micractinium* sp.，一株為 *Chlorellaceae* sp.(表六)。

四、1L 光反應器培養測試

經由上述實驗，挑選 C2、C3、Y2-8 及 P5 等 4 株生長最佳的微藻進行 1L 光反應器培養測試，沼液濃度為 30%(離心滅菌)，光照強度為 400 μ mol/m²/sec，以 5% CO₂ 進行通氣培養，通氣量為 0.5VVM，NC 為對照組(未接種微藻)。實驗結果如圖四，在藻體濃度方面，C2、C3、Y2-8 及 P5 在培養 8 天後的 OD_{682nm} 讀值分別為 5.13、8.99、7.12 及 11.28。在氨氮濃度部分，4 株微藻在第 5 天皆可將氨氮降解至 1.0

mg/L 以下，降解率達 98%以上。對照組之 OD_{682nm} 讀值及氨氮濃度則無明顯變化。綜合上述結果，挑選 C3 及 P5 藻株進行培養參數最佳化測試。

將 C3 及 P5 藻株進行三重複培養測試，沼液濃度為 30%(離心滅菌)，光照強度為 $400\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ，以 5% CO_2 進行通氣培養，通氣量為 0.5VVM。實驗結果如圖五，從生長曲線(OD_{682nm})來看，P5 藻株生長較 C3 藻株快速，在第 7 天的 OD_{682nm} 讀值分別為 9.66 ± 0.57 及 6.83 ± 0.52 ，整體而言 P5 生長略優於 C3(圖五 A)；但從藻體乾重來看，P5 及 C3 的生長並無顯著差異(圖五 B)。從顯微鏡觀察發現，C3 藻體有聚集的現象(圖六)，推測是造成其 OD_{682nm} 讀值被低估之原因。

在氨氮濃度部分，C3 藻株在培養 3 天後氨氮濃度僅剩 0.4 ± 0.4 mg/L，降解率達 99.49%；P5 藻株在培養 5 天後氨氮濃度為 7.67 ± 3.25 mg/L，降解率達 91.27%(圖七 A)。在總磷濃度方面，C3 藻株培養 3 天後總磷濃度為 0，降解率為 100%；P5 藻株在培養 3 天及 5 天後的降解率分別為 42.86 %及 100%(圖七 B)。從上述氨氮及總磷的降解效率來看，C3 比 P5 藻株有較優異的沼液淨化效率。在 sCOD 濃度方面，兩株藻株以光照自營培養方式培養，並未具有降低 COD 的功效，

C3 及 P5 藻株培養 7 天後之 sCOD 濃度分別為 450.67 mg/L 及 581.33 mg/L(圖七 C)，仍在畜牧排放廢水的標準之內。

C3 藻株的最佳生物質產率在培養 3 天後為 569.33 ± 25.07 mg/L/d (圖八)；P5 藻株的最佳生物質產率在培養 7 天時為 505.29 ± 11.02 mg/L/d (圖八)。

本實驗篩選出 C3 及 P5 兩株潛力微藻，以 30%離心滅菌之稀釋沼液進行培養，淨化後之沼液性質分析如表七。在氨氮降解率皆可達到 99 %以上，總磷的降解率皆為 100%。sCOD 部分因以自營培養，未有降解之效果，但其濃度低於 600 mg/L 的畜牧排放廢水的標準，可再配合微生物曝氣處理進一步降解。在 SS 部分，因原始沼液的固體濃度過高，並不適合直接培養微藻，因此先以離心方式處理，未來在應用上可先經由曝氣、沉澱或稀釋等方式處理，再以微藻進行淨化水質。

肆、參考文獻

- De Godos, I., Blanco, S., García-Encina, P. A., Becares, E., & Muñoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100(19), 4332-4339.
- Ferrer, C., Colom, F., Frases, S., Mulet, E., Abad, J. L., & Alió, J. L. (2001). Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2873-2879.
- Ji, F., Liu, Y., Hao, R., Li, G., Zhou, Y., & Dong, R. (2014). Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus sp.* in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource technology*, 161, 200-207.
- Kim, M. K., Park, J. W., Park, C. S., Kim, S. J., Jeune, K. H., Chang, M. U., & Acreman, J. (2007). Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource technology*, 98(11), 2220-2228.
- Lavoie, A., & De la Noüe, J. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water research*, 19(11), 1437-1442.
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1996). Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: optimization through acclimation. *Environmental technology*, 17(2), 183-189.
- Oswald, W. J. (1988). Micro-Algae and waste-water treatment. En Borowitzka, MA, & Borowitzka, LJ (Eds.), *Micro-algal Biotechnology* (305-328).
- Palmer, C. M. (1974). Algae in american sewage stabilization's ponds. *Rev Microbiol (S-Paulo)*, 5, 75-80.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., & Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews*, 56(2), 99-151.
- Richmond, A. (2017). *Handbook of microalgal mass culture* (1986). CRC Press. 528 pp.
- Wang, Y., Guo, W., Yen, H. W., Ho, S. H., Lo, Y. C., Cheng, C. L., & Chang, J. S. (2015). Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource technology*, 198, 619-625.
- Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., & Yuan, Z. (2013). Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water research*, 47(13), 4294-4302.

表附錄

表一、養豬場廢水經厭氧池處理後的水成分分析

Source	pH	COD (mg/ L)	TN (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	TP (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	Referance
Swine wastewater	6.1± 0.1	3700±51	162.0±8.0	-	-	209.0±5.5	-	Zhu <i>et al.</i> , 2013
Swine wastewater	9.18	6900 ± 53	928.46 ± 4.64	824.55 ± 4.20	84.46 ± 2.86	45.72 ± 0.55	39.68 ± 0.37	Ji <i>et al.</i> , 2014
Swine wastewater	6.2 ± 0.0	3500 ± 63	148.0 ± 4.0	-	-	156.0 ± 8.0	-	Zhu <i>et al.</i> , 2013
Swine wastewater	9.0	4,050 ± 319	774.47 ± 32.99	708.78 ± 17.17	70.12 ± 2.76	-	31.24 ± 0.56	Ji <i>et al.</i> , 2015
Swine wastewater	7.97 ± 0.4	153.5 ± 9	662.4 ± 39	-	-	120 ± 12	-	Kim <i>et al.</i> , 2007

表二、 18S rDNA -ITS 引子序列

Name	Sequence	Note
NS1	gta gtc ata tgc ttg tct c	ITS 與 18S rDNA 引子(擴增、定序)
ITS4	tcc tcc gct tat tga tat gc	
ITS1	tcc gta ggt gaa cct gcg g	ITS 引子(定序)
ITS2	gct gcg ttc ttc atc gat gc	
ITS3	gca tcg atg aag aac gca gc	
ITS5	gga agt aaa agt cgt aac aag g	
NS2	ggc tgc tgg cac cag act tgc	
NS3	gca agt ctg gtg cca gca gcc	18S rDNA 引子(定序)
NS4	ctt ccg tca att cct tta ag	
NS5	aac tta aag gaa ttg acg gaa g	
NS6	gca tca cag acc tgt tat tgc ctc	
NS7	gag gca ata aca ggt ctg tga tgc	
NS8	tcc gca ggt tca cct acg ga	

表三、 18S rDNA - ITS 增幅 PCR 反應條件

PCR mixture		PCR condition		
10X PCR Buffer	2 μ L	Temp.	Time	Cycle
2.5 mM dNTP Mix	2 μ L	95°C	5 min	1
Primer F 10 μ M	2 μ L	95°C	15 sec	30
Primer R 10 μ M	2 μ L	45-48°C	15 sec	
Template DNA	100~200 ng	72°C	3 min	
Taq polymerase	0.5 μ L	72°C	7 min	1
(Autoclaved, distilled water to total 20 μ L)		4°C	hold	

表四、 定序 PCR 反應條件

PCR mixture		PCR condition		
2.5X PCR Buffer	1μL	Temp.	Time	Cycle
BigDye 3.1	1μL	96°C	1 min	1
Primer 10 μM	1μL	96°C	10 sec	30
PCR Template DNA	100~200 ng	50°C	15 sec	
(Autoclaved, distilled water to total 10μL)		60°C	4 min	
		4°C	hold	

表五、核研所沼液基本性質分析

Sample	pH	COD (mg/L)	sCOD (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)	TP (mg/L)	TOC (mg/L)	SS (mg/L)
沼液	7.89	9,940	510	362	99.6	1,910	2,940
沼液離心 滅菌	9.5	- ¹	1,390	284	83.4	196	109

¹ 「-」 未測量。因此樣本已經過離心，故未測量 COD。

表六、潛力微藻之分子鑑定結果

編號	初步藻種鑑定	ITS 相似度(%)
Y2-8	<i>Chlorella sorokiniana</i>	99
P5	<i>Chlorellaceae</i> sp.	84
C2	<i>Chlorella sorokiniana</i>	100
C3	<i>Chlorella sorokiniana</i>	100
C4	<i>Micractinium</i> sp.	99

表七、以 C3 及 P5 藻株淨化後之沼液分析

Sample	pH	sCOD (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)	TP (mg/L)	TOC (mg/L)
C3	6.78	581.33	0	0	208
P5	6.64	450.67	1.27	0	296

*因以離心滅菌後之沼液培養，因此未測量 COD 及 SS。

圖附錄

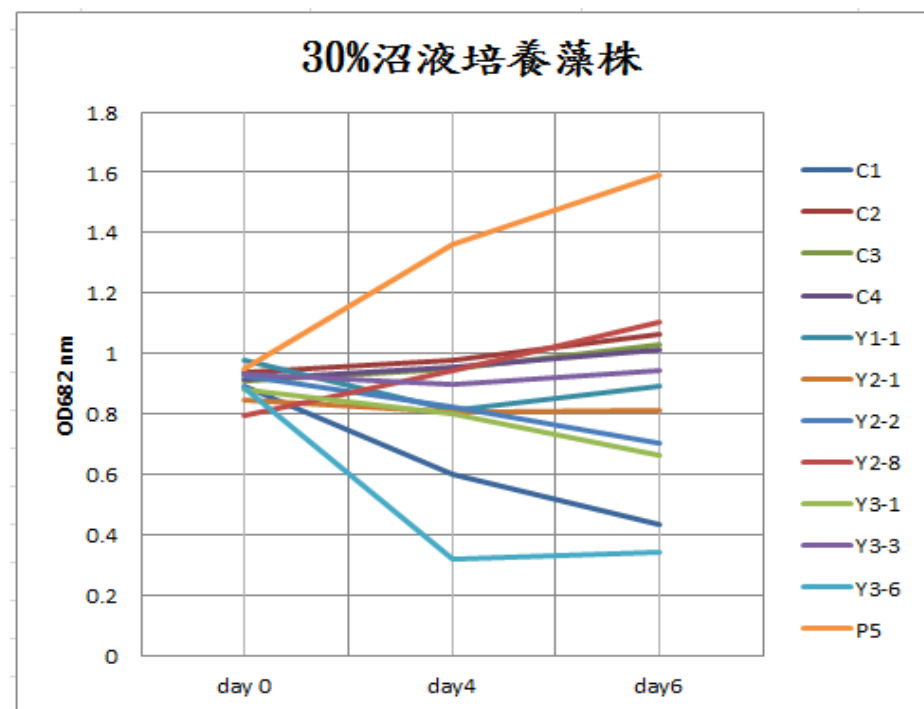


圖一、1L 光反應器-微藻培養裝置

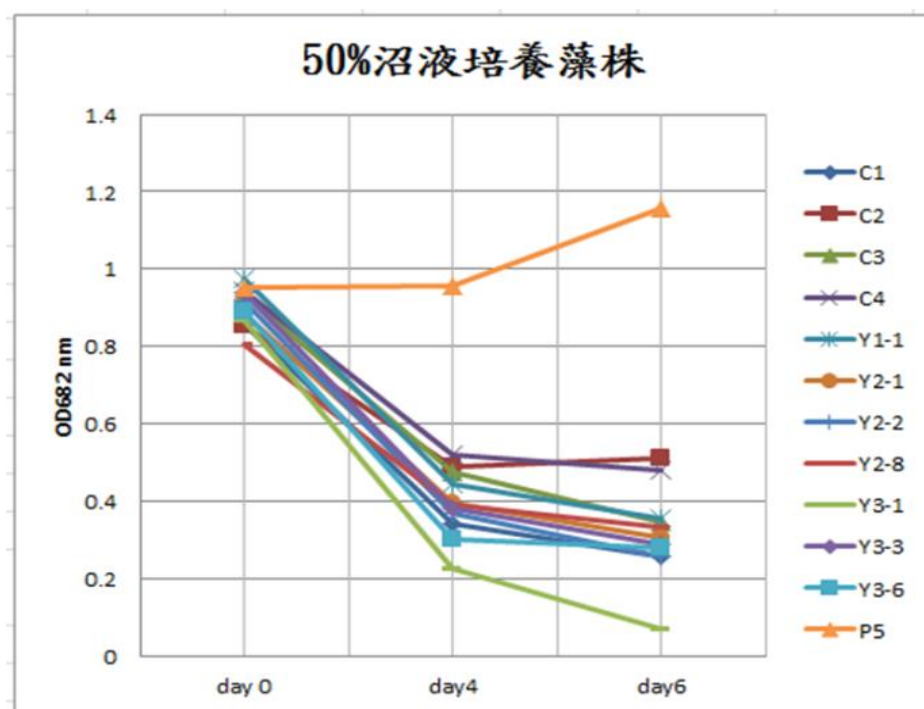


圖二、微藻於 10 %稀釋沼液中生長情形。對照組(左)，藻株 Y3-6(中)，
藻株 P5(右)

A

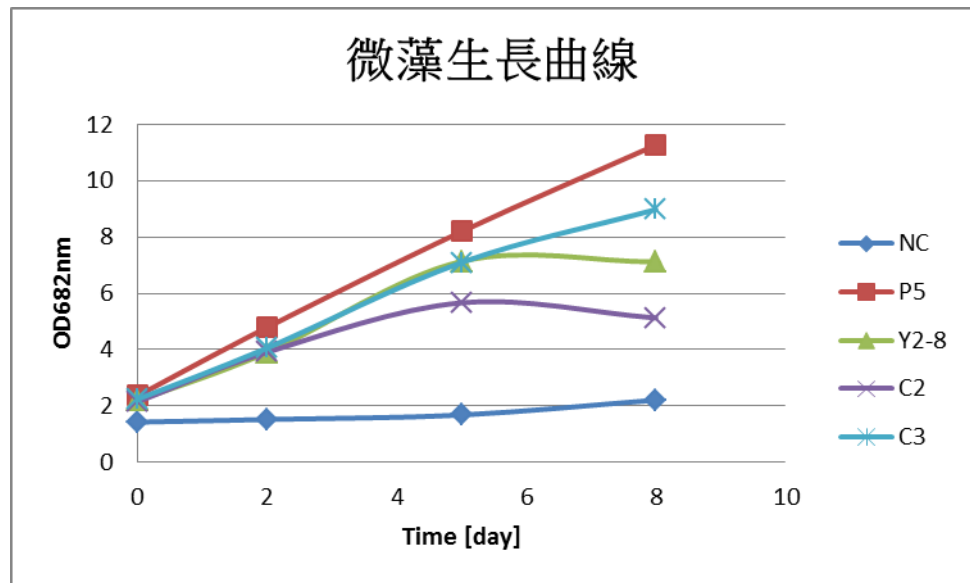


B

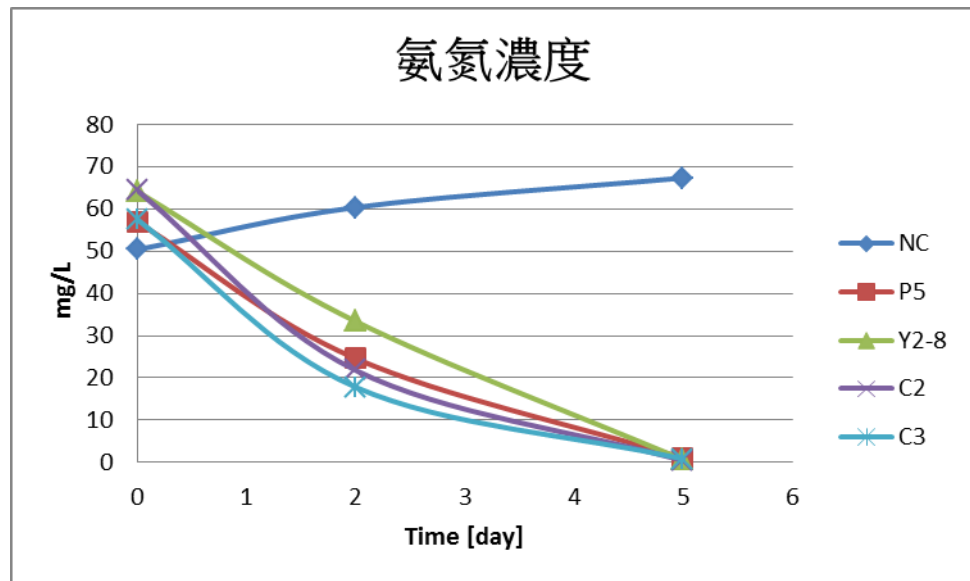


圖三、12 株微藻於 30 %(A)及 50 %(B)離心滅菌後之稀釋沼液中的生長情形。

A

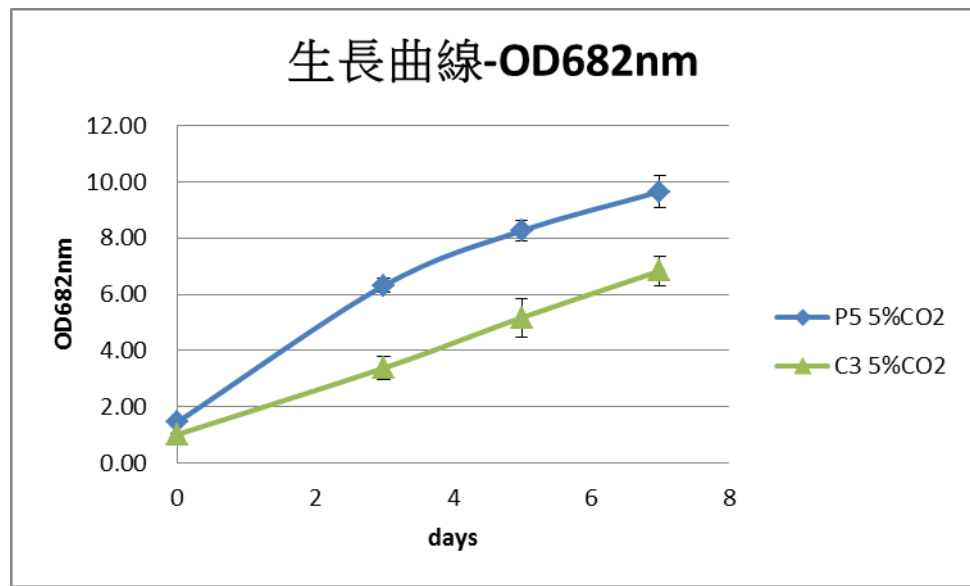


B

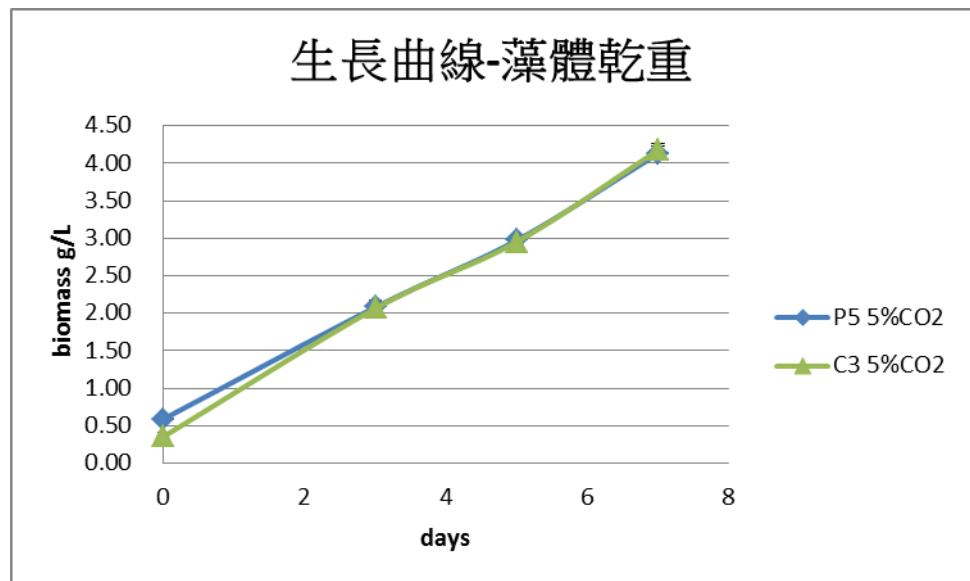


圖四、以 1L 光反應器進行 4 株微藻的培養測試。A、微藻生長曲線。B、氨氮濃度。 NC 為對照組，未添加微藻的 30%稀釋沼液。

A



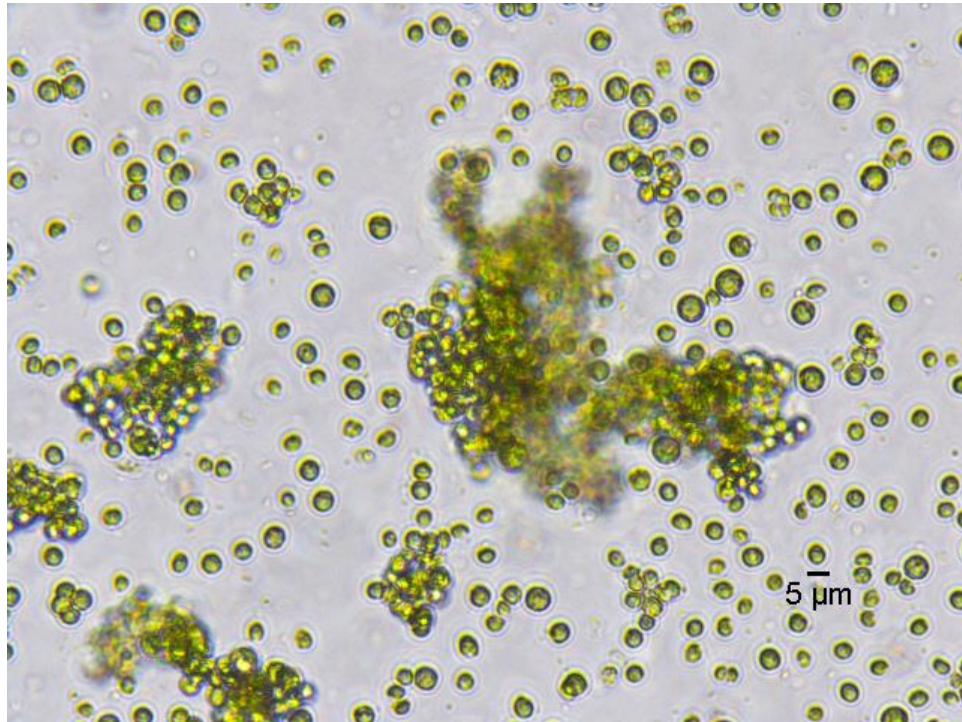
B



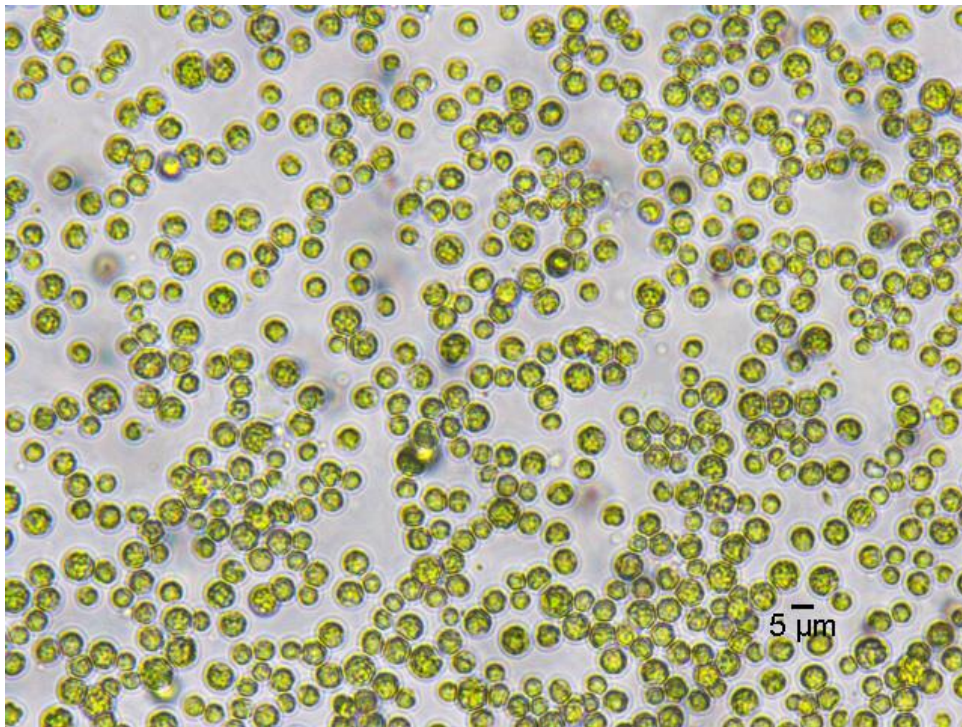
圖五、以 1L 光反應器進行 C3 及 P5 藻株的培養。 A、生長曲線-OD_{682nm}。

B、生長曲線-藻體乾重 。每組實驗為 3 重複。

A

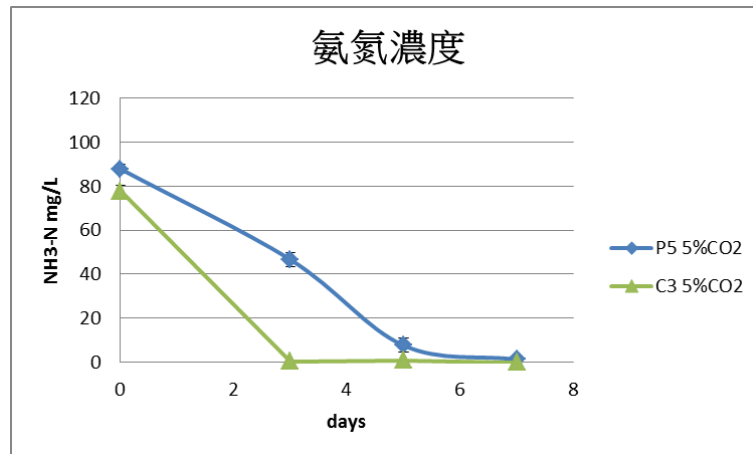


B

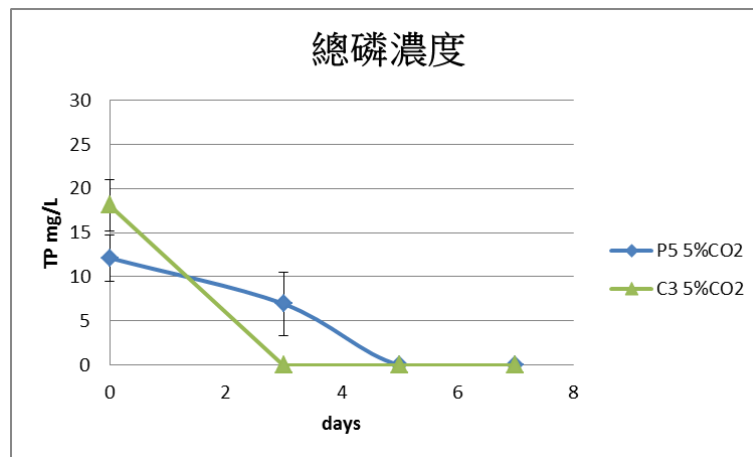


圖六、微藻以 1L 光反應器培養後的顯微鏡觀察圖。 A、C3 藻株；
B、P5 藻株。放大倍數為 400X。

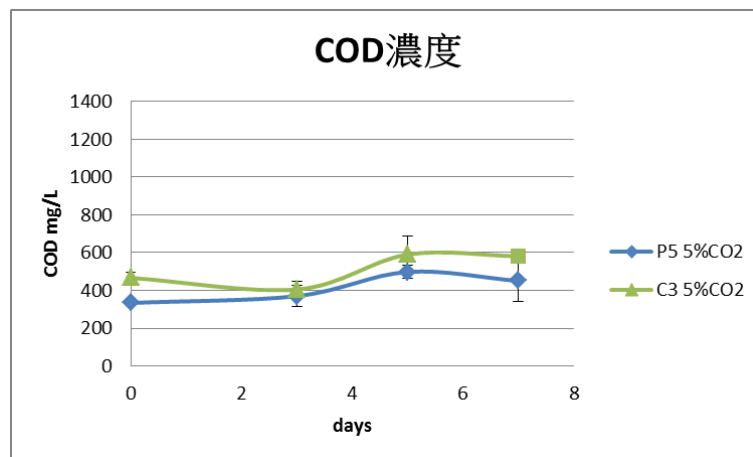
A



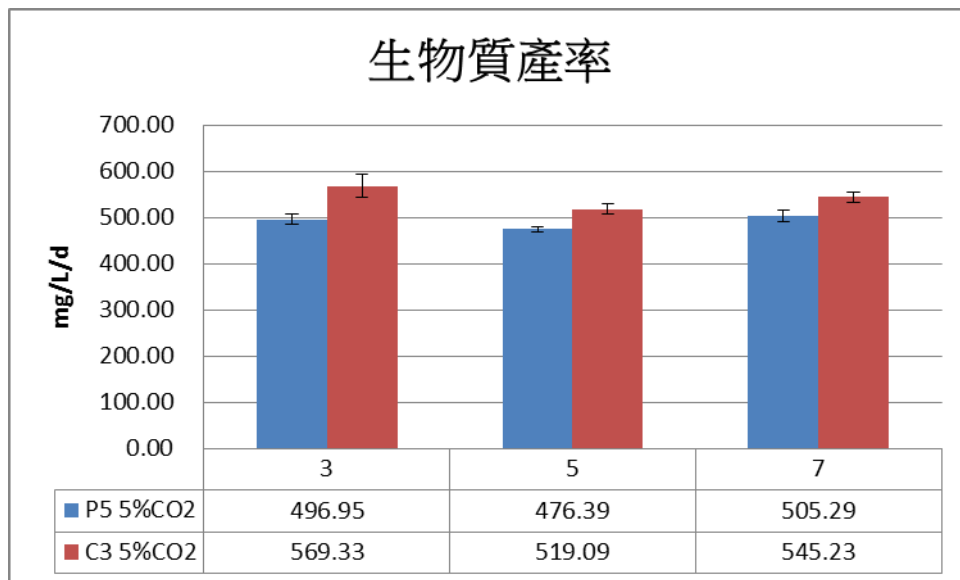
B



C



圖七、以 1L 光反應器進行 C3 及 P5 藻株的培養。A、氨氮濃度； B、總磷濃度； C、COD 濃度。每組實驗為 3 重複。



圖八、以 1L 光反應器進行 C3 及 P5 藻株的培養的生物質產率。每組實驗為 3 重複。