

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

PVA 固定化硫酸還原菌體顆粒處理含銅廢水之
研究



Immobilization of SRB on PVA (Polyvinyl Alcohol)
for the Removal of Copper in Wastewater

研究生：卓裕盛
指導教授：林志高 博士

中華民國九十七年十月

Immobilization of SRB on PVA (Polyvinyl Alcohol)
for the Removal of Copper in Wastewater

Student : Yu-Sheng Jhuo

Advisor : Dr. Jih-Gaw Lin

A Thesis

Submitted to Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For a Degree of

Master of Science

In

Environmental Engineering

October 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

PVA 固定化硫酸還原菌體顆粒處理含銅廢水之研究

研究生：卓裕盛

指導教授：林志高

國立交通大學環境工程研究所

摘要

近數十年來，生物沉澱 (bio-precipitation) 技術利用硫酸還原菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 處理含高硫酸鹽及高重金屬濃度的酸礦廢水，為一具相當發展潛力的生物處理技術。但在實際應用上仍有多方面需改進之處，如降低添加碳源成本、增加 SRB 活性或減少對 SRB 毒性及抑制作用以增加重金屬處理效率等。

本研究以聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 包覆馴養 SRB 製成 PVA 固定化菌體顆粒，探討在含不同銅離子濃度及微生物含量 (PVA 包覆微生物量) 的條件下，對 SRB 生長抑制的影響，及探討生物沉澱處理含銅廢水的效率，並藉由中央合成設計法 (central composite design, CCD) 規劃實驗組數及實驗條件進行實驗。PVA 包覆微生物量以測定 PVA 固定化菌體顆粒之蛋白質含量為參數，實驗規劃 SRB 含量介於 19-235 mg VSS/L，即 PVA 之蛋白質添加量介於 0.16-1.94 mg，設計銅離子濃度範圍介於 10-100 mg/L。以批次實驗比較 PVA 固定化菌體顆粒及 PVA 空白顆粒之差異，於固定時間分析各試驗組之 pH、ORP、硫酸鹽、硫離子及銅離子濃度之變化。以反應曲面法 (response surface method, RSM) 分析找出最適的評估指標及最佳的操作條件。

實驗結果顯示所有 PVA 固定化菌體顆粒試驗組在第 168 小時，硫酸鹽還原率在 99% 以上，而銅離子濃度則小於 1 mg/L，與 PVA 空白顆粒之對照組實驗結果有明顯差異。以 PVA 固定化菌體顆粒進行生物沉澱實驗，其去除重金屬機制包括物理化學沉澱 (含吸附作用) 及生物沉澱兩大部分。結果顯示銅離子之物理化學沉澱 (含吸附作用) 量介於 17.0-64.6%，而生物沉澱量介於 35.4-83%，由此可知重金屬銅離子去除途徑除了生物沉澱之外還包括物化作用的影響。針對試

驗組之硫質量平衡計算得知，其回收率介於 59.4-79.9%，推測可能原因有 (1) 硫離子與培養基內鐵離子形成硫化鐵沉澱，(2) 形成硫化氫揮發及 (3) 在採樣時硫離子暴露在空氣而造成損失有關。

由 CCD 實驗結果經 ANOVA 分析結果顯示 R_4 評估指標為顯著。而 RSM 分析結果顯示其反應曲面呈收斂之趨勢，有最佳值存在，即當微生物濃度 136 mg VSS/L (相當蛋白質添加量 1.12 mg)，銅離子濃度 57.9 mg/L，且反應溫度 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 時，有最高硫酸鹽還原之反應速率常數 0.0423 h^{-1} 。經由迴歸係數分析得知硫酸鹽還原之反應速率常數配適二階反應模型，其 R^2 值為 85.1%。

關鍵字：生物沉澱、PVA 固定化菌體顆粒、硫酸還原菌、中央合成設計、反應曲面法、重金屬。



Immobilization of SRB on PVA (Polyvinyl Alcohol) for the Removal Copper in Wastewater

Student: Yu-Sheng Jhuo

Advisor: Dr. Jih-Gaw Lin

Institute of Environmental Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

Heavy metals are present in wastewaters released from battery, paint and chemical manufacturing industries. Also, considerable portion of heavy metal containing wastewater is discharged from mining industry i.e. acid mine drainage. Heavy metal disposal problems require urgent solution to avoid serious environmental contamination. The activity of sulfate reducing bacteria (SRB) offers interesting potentials for metal removal and recovery. In the present work, utilization of PVA as a gel matrix for immobilization of SRB was investigated. This study was also focused on the optimization of bio-precipitation process using a statistical method to provide information concerning the effect of amount of SRB immobilized on PVA and copper concentration in biotic experiments. A central composite (CCD) was used to develop a model for the responses. Response surface methodology (RSM) was used to optimize the amount of SRB immobilized (19-235 mg VSS/L), and copper concentrations (10-100 mg/L).

The objective of this research consists of two parts. In the first part, the amount of SRB immobilized on PVA and the copper concentration are considered study their effect on SRB during bioprecipitation experiments as designed by CCD. In the second part, the four responses such as biological copper removal (R_1), chemical precipitation and adsorption (R_2), specific sulfate reduction (R_3) and reaction rate constant (R_4) are considered to optimize the amount of SRB immobilized on PVA and copper concentration using RSM.

The bioprecipitation experimental results showed that the sulfate removal was more than 99% and residual copper concentration was less than 1 mg/L in all experimental runs within 7 days. The results demonstrated that the copper removal was by bioprecipitation and adsorption on PVA beads. The blank PVA adsorption experiments indicated that the blank PVA and SRB immobilized PVA have copper adsorption capacities of 0.355 and 0.363 mg-Cu²⁺/g PVA beads, respectively. According to the results of RSM, R₁ and R₂ responses were not significant but R₃ and R₄ responses were significant. Result of R₄ showed better convergence in the contour plot. The optimal quantity of SRB immobilized on PVA and copper concentration were observed these as 136 mg VSS/L (equivalent to 1.12 mg protein) and 57.9 mg/L, respectively. At these conditions the highest sulfate reaction rate constant (k) as per first-order kinetic was observed as 0.0423 h⁻¹ in 30±2°C.

Keywords: Bioprecipitation, Immobilization, SRB, Central composite design, Response surface method, Heavy metal

目錄

中文摘要	II
英文摘要	IV
目錄.....	VI
圖目錄	IX
表目錄	X
第一章 緒論	1
1.1 研究緣起	1
1.2 研究目的	2
第二章 文獻回顧	3
2.1 重金屬廢水來源及特性	3
2.1.1 重金屬污染源	3
2.1.2 重金屬處理程序	3
2.2 生物沉澱法去除重金屬之機制	9
2.3 硫酸還原菌之簡介及應用	10
2.4 固定化生物顆粒技術	12
2.4.1 固定化方法種類	12
2.4.2 人工固定化之優點	15
2.4.3 人工固定化之材料	16
2.4.4 PVA 固定化技術應用於廢水處理之研究.....	16
2.5 實驗設計法	19
2.5.1 中央合成設計 (Central composite design, CCD).....	19
2.5.2 反應曲面法 (Response surface method, RSM).....	20
第三章 實驗材料與方法	21
3.1 實驗流程與架構	21

3.2 藥品.....	23
3.3 植種污泥來源及馴養	23
3.3.1 培養基成分	23
3.3.2 厭氧污泥之批次馴養	24
3.4 PVA 固定化菌體顆粒製備方法.....	24
3.5 PVA 固定化菌體顆粒量及銅離子濃度對硫酸還原效率之實驗.....	25
3.5.1 以中央合成設計法建立實驗組數	25
3.5.2 實驗條件.....	27
3.6 分析項目及方法	28
3.6.1 pH 及 ORP.....	28
3.6.2 硫酸鹽離子、硫離子及銅離子	28
3.6.3 PVA 固定化菌體顆粒菌體量測定.....	28
第四章 結果與討論	31
4.1 中央合成設計實驗結果	31
4.1.1 pH 及 ORP 變化.....	31
4.1.2 硫酸鹽濃度變化	34
4.1.3 PVA 固定化菌體顆粒之菌體量變化.....	37
4.1.4 銅離子濃度變化	39
4.1.5 吸附作用與沉澱作用的探討	41
4.1.6 硫離子濃度變化及硫質量平衡計算	42
4.2 中央合成設計實驗最佳化分析	50
4.2.1 評估指標.....	50
4.2.2 配適二階模型之設計	56
4.2.3 模型適當性與常態性假設檢驗	58
第五章 結論與建議	60
5-1 結論	60

5-2 建議	60
第六章 參考文獻	61



圖目錄

Figure 2-1 General diagram of a CCD for two factors.....	20
Figure 3-1 Flowchart of experiment.....	22
Figure 3-2 Preparation of immobilized SRB by phosphorylated PVA method....	25
Figure 3-3 Relationship of protein concentration and absorbance at 600 nm	29
Figure 3-4 Relationship of protein and VSS.....	30
Figure 4-1 Variation of pH in CCD experiment.....	32
Figure 4-2 Variation of ORP in CCD experiment.....	33
Figure 4-3 Variation of sulfate concentration in CCD experiment.....	35
Figure 4-4 Variation of sulfate reduction efficiency in CCD experiment.....	36
Figure 4-5 Variation of total VSS calculated from the protein concentration in CCD experiment.....	38
Figure 4-6 Variation of specific sulfate reduction rate in CCD experiment.....	39
Figure 4-7 Variation of copper concentration in CCD experiment.....	40
Figure 4-8 Variation of biological copper removal in CCD experiment.....	44
Figure 4-9 Comparisons of variation of copper concentration with adsorption study and bioprecipitation study (Run 5).....	45
Figure 4-10 Variation of sulfide production in CCD experiment.....	48
Figure 4-11 Response surface for specific sulfate reduction rate using RSM	54
Figure 4-12 Contour plots for specific sulfate reduction rate using RSM.....	55
Figure 4-13 Response surface for reaction rate constant using RSM.....	55
Figure 4-15 Residuals versus the fitted values for reaction rate constant	58
Figure 4-16 Normal probability plot of the residuals for reaction rate constant.....	59

表目錄

Table 2-1 Characteristics of some passive bioreactors reported in the literature..	7
Table 2-1 Metal removal in some passive bioreactors reported in the literature (Continued).....	8
Table 2-2 Heavy metal toxicity to SRB.....	11
Table 2-3 A comparison between the different methods for the artificial immobilization of microorganisms to bedding material	14
Table 2-4 Cell immobilizations within PVA carriers.....	18
Table 3-1 Composition of SRB1 medium.....	23
Table 3-3 Sequence of runs for the central composite design	26
Table 3-4 Composition of modified SRB1 medium for CCD runs	27
Table 3-5 Samples analysis and instruments.....	28
Table 4-1 Experimental and theoretical (stoichiometric) comparisons of sulfate reduction concentration in CCD experiments	46
Table 4-2 Experimental and theoretical comparisons of theoretical sulfide and measured sulfide in experiments.....	49
Table 4-3 experimental results of the central composite design	53
Table 4-4 Results of ANOVA analysis in CCD experiment	54
Table 4-5 Coefficient estimates by the regression for optimization study	57
Table 4-6 Estimated Regression Coefficients for reaction rate constant	57

第一章 緒論

1.1 研究緣起

重金屬對生物毒性及環境的公害，使得廢水中重金屬對環境污染一直廣受大眾重視，重金屬離子主要的污染來源為電鍍、電池、半導體、冶金、印刷電路板及化學工業製造所產生之廢水 (Azabou *et al.*, 2007)，以往對重金屬廢水之處理包括物理化學等眾多方式，常用之處理技術主要有：氧化還原、化學混凝沉澱、離子交換、電解、吸附及薄膜分離等 (Malik, 2004)，這些技術各有其優缺點，不過具回收價值之高濃度重金屬廢水處理方法大部分以電化學回收，其成效較佳；對中低濃度之重金屬廢水則大都以傳統化學混凝沉澱為主要處理方式，除高處理成本外，產生大量有害化學污泥，在現今最終處理場址有限及民眾環保意識抬頭下，難以成效，其處理處置成為重要研究課題。

生物沉澱 (bio-precipitation) 技術是近十年來利用硫酸還原菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 處理含高硫酸鹽及高重金屬濃度的酸礦廢水 (acid mine drainage, AMD)，為一具相當發展潛力的生物處理技術 (White *et al.*, 1997; El Bayoumy *et al.*, 1999; Chuichulcherm *et al.*, 2001; Diels *et al.*, 2003)。研究結果顯示，此技術對於水中銅、鋅、鎳的去除率均高達 97.5%，砷及鐵的去除率則分別為 77.5% 及 82% (Jong and Parry, 2003)。然而利用 SRB 進行各項重金屬處理時，仍有多處需改進，例如：添加各種不同單一或混合之工業或農業有機廢棄物做為 SRB 之碳源，降低添加碳源成本；改變操作因子 (pH、水力停留時間) 或條件 (重金屬濃度)，增加 SRB 活性或減少對硫酸還原菌毒性及抑制作用等，以增進重金屬處理效率。

Cohen *et al.* (2001) 指出固定化生物顆粒技術 (immobilization technology) 提供解決增加廢水生物處理效率的重要替代方案，包括人為提供的適當環境下，微生物細胞自然附著之自然固定化 (self-attachment immobilization) 及利用人工

方式將具活性之微生物細胞固定於擔體材料之人工固定化 (artificial immobilization) 兩種方法。其具有固液分離容易、微生物菌群不易流失，使得處理系統內可維持較高的菌群濃度，可以大幅減少反應器體積提高效率，同時對於處理系統中水質條件之變化，具有較高的忍受負荷能力等優點 (林，1993)。

多位學者研究以無毒及低成本之聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 為固定主要材料並採用不同固定化方法 (Chang *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Chen and Lin, 1994; Long *et al.*, 2004; Rostron *et al.*, 2001)，其固定方法包括將 PVA 加入至硼酸、磷酸鹽或硝酸鹽固定液或冷凍回溫等方式。Chen and Lin (1994) 研究以 PVA 包覆脫硝菌處理合成硝酸鹽廢水，結果顯示硝酸鹽去除率可達 99%。此法不僅固定化程序簡單且固定化菌體活性高，強度佳，因此本研究以 PVA 磷酸酯化法製作 PVA 固定化菌體顆粒。

1.2 研究目的

本研究係以 PVA 磷酸酯化法 (Chen and Lin, 1994) 包覆硫酸還原菌製成 PVA 固定化菌體顆粒。為瞭解 PVA 固定化菌體顆粒應用在生物沉澱技術之操作條件，探討在含不同濃度銅離子及微生物含量 (PVA 固定化菌體顆粒量) 的條件下，對硫酸還原菌生長抑制的影響，及探討生物沉澱處理含銅廢水的效率，並藉由中央合成設計 (central composite designs, CCD)，及搭配反應曲面法 (response surface method, RSM)，分析其對 SRB 產生毒性及抑制效應最小的操作條件。

第二章 文獻回顧

2.1 重金屬廢水來源及特性

2.1.1 重金屬污染源

現今常見的重金屬污染源，包括工業廢水及酸礦廢水 (acid mine drainage, AMD)，工業廢水包括有電子電鍍、製革業、冶金、研磨廢水及金屬表面處理工廠之廢水等，其製程中所產生含高濃度之重金屬廢液，若未經處理擅自加以排放，對於人體健康及自然環境造成極大的危害 (Azabou *et al.*, 2007)。

AMD 是指在礦業活動發展的過程中，常會製造出大量無法再提煉或利用之廢礦堆，由於廢礦石中通常富含許多如黃鐵礦等硫化鐵礦物，這些硫化鐵礦物暴露於空氣及有地下水流的環境中，經化學及生物氧化作用而產生亞鐵離子、硫酸鹽離子及氫離子，同時此種作用更因鐵氧化菌的催化作用而加速反應的進行，進而產生高酸度及高濁度之廢水，其中亦含有高濃度的重金屬及硫酸鹽 (Neculita *et al.*, 2007)，直接與間接引起環境問題值得加以重視。

2.1.2 重金屬處理程序

對於重金屬廢水處理的方法包括：化學混凝沉澱、離子交換、擴散透析、電解沈積、薄膜過濾、生物吸附及生物沉澱等處理技術，其主要敘述如下：

(1) 化學混凝沉澱

化學混凝沉澱法主要利用金屬氫氧化物低溶解性的性質，配合適當的酸鹼值控制以沉澱或浮除方式將重金屬去除；有時也添加助凝劑，強化膠羽強度提昇固液分離的效能。但此處理方法在過程中必須加入大量的藥劑，如：鹼劑、酸劑、混凝劑、助凝劑甚至重金屬捕捉劑，不但耗費藥劑成本，並產生大量有害性的重金屬污泥，也因處理過程中添加多量的藥劑，使得處理後放流水中的總溶解固體物 (total dissolved solids, TDS) 及鹽類濃度增高，使得大量放流水無法回收再利用。

用，而須直接排放至承受水體，造成水資源浪費（朱，2000）。

(2) 離子交換

離子交換技術應用於重金屬廢水處理日益普遍，主要係利用樹脂顆粒具有超大面積的陰離子、陽離子接觸面之特性，使溶液中的離子與樹脂顆粒上帶相同電荷之離子達到交換效果，且於進行離子交換後不會改變樹脂之結構，乃是一個可逆化學反應。傳統離子交換的缺點是，大部分樹脂不具選擇性，所以應用的樹脂會吸收相同電荷的金屬離子，以致於某些雜質無法利用離子交換樹脂去除；而且樹脂再生所得的再生液，有時候不足以直接回收供製程使用，更增加一道處理程序，提高處理成本（侯，2003）。

(3) 擴散透析

擴散透析乃是結合離子交換膜的處理技術，主要利用溶質之濃度差使其由高濃度往低濃度方向移動，且藉由離子交換膜對不同溶質之選透性而使其穿透薄膜。此技術通常用於廢酸液中回收金屬及酸液，由於陰離子交換膜只能允許陰離子通過，故會將重金屬離子截留在溶液的另一邊。一般擴散透析法於廢酸液中的重金屬回收約可達 60-85%，主要缺點為薄膜會堵塞 (fouling) 及結垢 (scaling)，需定期更換（侯，2003）。

(4) 電解沈積

電解沈積乃是一種電化學處理程序，藉由直流電將重金屬離子沈積於陰極板上，且反應極板通常由惰性材所做成，為了達到較高回收率一般都用於高濃度的重金屬廢水處理，其回收效率可達 90-95%。此技術之主要缺點在於控制處理液之酸鹼值，以防止過低酸鹼值之酸溶液將沈積於陰極之重金屬又重新溶出（侯，2003）。

(5) 薄膜過濾

薄膜過濾在重金屬廢水處理的主要功能為：替代傳統沉澱或浮除單元，提昇固液分離效率，可濃縮水中固體物含量達 2-5%；或做為排放水的修飾單元去除懸浮固體與有機物，使處理後水質符合直接排放或回收再利用的標準。通常薄膜

過濾的設置與操作成本都較傳統方式為高，因此多用於含高量重金屬螯合劑廢水；唯需注意廢水中不可含有油脂，造成薄膜阻塞。通常薄膜單元每週須進行一次化學清洗，每次兩小時；且需特別注意避免薄膜破裂，造成放流水質超出排放標準（王，2004）。

(6) 生物吸附

生物吸附法是利用生物體的代謝產物去除胞內或胞外的重金屬，這些代謝產物可為細胞內的酵素或蛋白。但由於過量的重金屬常對生物體造成負面的影響，生物吸附對高濃度重金屬廢水的處理效果不易提昇；另一方面由於生物體對特定重金屬具專一性與高親和性的特質，且生成污泥毒性低、易於處理，因此相較於物化方法，生物吸附法對於特殊重金屬廢水如含螯合劑廢水或低濃度 (10 mg/L) 廢水的處理，或特殊貴重金屬如鉑，金、銀等回收大有利基。Vargas *et al.* (2004) 使用 *D. desulfuricans*、*D. fructosivorans* 及 *D. vulgaris* 三株不同族群的 SRB 在不同的 pH 下進行鈾和鉑的吸附實驗，研究結果顯示，當使用 *D. desulfuricans* 且反應條件控制在 pH = 3，在 5-15 分鐘內鈾和鉑的最佳去除率可達 90%，且鈾和鉑的最大單位吸附量分別為 190 mg/g dry biomass 和 90 mg/g dry biomass。

(7) 生物沉澱

最廣泛被使用於 AMD 之處理，由於 AMD 中存在高濃度硫酸鹽，符合 SRB 生長環境之要求，其還原作用產生之硫離子亦可與廢水中溶解性重金屬生成金屬硫化物沉澱，可藉此特性去除廢水中之重金屬，故此部份之議題早在多年前即有多位學者進行相關研究。然而利用 SRB 進行各項重金屬處理作業時，碳源的選擇亦扮演重要的角色，使用不同的碳源對 SRB 也有不同的效果，且若水溶液中同時存在多種碳源時，相較於單一碳源之使用，多種碳源可促進 SRB 進行硫酸鹽還原作用之活性，在過去曾有多位學者針對 SRB 碳源之使用做過許多研究，其使用之碳源種類及處理的重金屬如 Table 2-1 所示。Christensen *et al.* (1996) 和 Zagury *et al.* (2006) 研究結果顯示他們所使用的單一碳源（如乳漿、木屑、肥料等）對增進 SRB 活性沒有顯著的效果。Waybrant *et al.* (1998) 則發現，當水溶

液中含有高濃度的硫酸鹽 (5000 mg/L) 且同時存在五種有機物質時 (下水污泥、腐植質、木屑、羊糞及鋸木屑), 在反應時間 20 天內硫酸鹽去除率將近 100%; 而 Chang *et al.* (2000) 研究也顯示出類似的結果。至於去除之重金屬種類包括 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 及 As^{3+} 等, 去除率依各實驗條件不同, 介於 60-100%。



Table 2-1 Characteristics of some passive bioreactors reported in the literature

Reactor scale	Total volume (L)	Organic matter source	pH		SO ₄ ²⁻ (mg/L)		References
			Influent	Effluent	Influent	Effluent	
Batch	0.5-1	Single source or mixture of sewage sludge, leaf mulch, wood chips, sheep manure, sawdust, and cellulose	2.5-6	6.5-7	1200-4800	<35	Waybrant <i>et al.</i> (1998)
Laboratory bioreactor	4.8	Lactate	4.52	7.2	2280-2315	<400	Jong and Parry (2003)
Column	0.25	Spent mushroom compost, oak chips, spent oak sludge, and organic-rich soil	6.8	7-8.5	2580	200-650	Chang <i>et al.</i> (2000)
Batch	31	Whey	3.0-4.4	3.5-6.0	857-936	715-960	Christensen <i>et al.</i> (1996)
Batch	2	Single source or mixture of maple wood chips, sphagnum peat moss, leaf compost, conifer compost poultry manure, and conifer sawdust	4	6.5-8.5	4244	163-2354	Zagury <i>et al.</i> (2006)



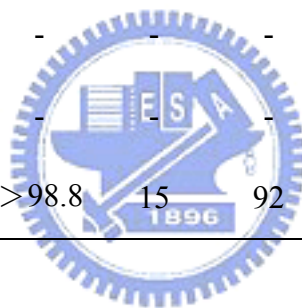
Table 2-1 Metal removal in some passive bioreactors reported in the literature (Continued)

Fe ²⁺		Mn ²⁺		Cu ²⁺		Cd ²⁺		Ni ²⁺		Zn ²⁺		Total As ³		References
Inf. ¹	Removal ²	Inf.	Removal	Inf.	Removal	Inf.	Removal	Inf.	Removal	Inf.	Removal	Inf.	Removal	
1080	>99	-	-	-	-	135	>99	480	>99	0.81	100	-	-	Waybrant <i>et al.</i> (1998)
50.8	82	-	-	50.3	>97.8	-	-	49.9	>97.5	50.4	>97.8	50.6	>77.7	Jong and Parry (2003)
500	>60	-	-	50	>90	-	-	-	-	100	>99	-	-	Chang <i>et al.</i> , (2000)
29.0	89	1.89	88.6	9.88	>82.8	-	-	-	-	10.8	>67.2	-	-	Christensen <i>et al.</i> , (1996)
1683	>92.6	14	>97.1	-	-	8.3	>98.8	15	92	15	>93.9	-	-	Zagury <i>et al.</i> , (2006)

¹Inf.: influent, unit: mg/L

²Removal, unit: %

³Total As including As³⁺ and As⁵⁺



2.2 生物沉澱法去除重金屬之機制

生物沉澱法去除重金屬乃利用 SRB 為一絕對厭氧菌，以硫酸鹽作為電子接受者，並廣泛利用多種含碳有機物作為生長所需的碳源。在厭氧狀態下以異營的方式將硫酸鹽還原成硫離子，與重金屬結合形成金屬硫化物，由於金屬硫化物的溶解度極低容易沉澱，可藉此特性去除水中的重金屬離子 (Liamleam and Annachatre, 2007)。

根據文獻指出以生物沉澱去除重金屬， Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 等重金屬的主要去除機制為與硫離子形成金屬硫化物沈澱，而 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 和 Al^{3+} 則與氫氧根離子形成金屬氫氧化物沉澱，最後 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 則與碳酸鹽離子結合而沉澱 (Neculita *et al.*, 2007)。然而除了生物沉澱之外，重金屬離子可能伴隨著吸附機制（如微生物吸附作用、表面沈澱和無機物之聚合反應）的發生而去除。

Chen *et al.* (2000) 研究顯示硫酸還原菌之生物吸附 (biosorption) 可分成：

(1) 與代謝無關

無論是活或是死的細菌，其細胞壁或細胞膜通常具有帶陰電性的羧基 (carboxyl)、羥基 (hydroxyl)、磷酸基 (phosphoryl)、硫醇基 (sulfhydryl) 等官能基，可與金屬陽離子鍵結，因此微生物會將金屬鍵結在細胞壁或細胞膜上。

(2) 與代謝相關

與代謝相關的機制有生物轉換 (transport) 及胞外 (extracellular) 累積。生物轉換乃因自然界在某些含有高濃度重金屬離子的環境下，仍存有微生物，由此可見某些微生物具有精巧的抵抗重金屬的能力。對某些重金屬如 Ag^+ 、 As^{5+} 、 Cd^{2+} 等，細菌的金屬抵抗系統，只在於吸附和傳送金屬。但對另外的重金屬如 Hg^{2+} 、 As^{2+} 、 Cr^{6+} 等而言，則會被菌體的酵素起生化作用（如還原、氧化、甲基化、去甲基化等）而轉換成毒性較輕或較易揮發的另一種化學型態。胞外累積主要是由於重金屬與菌體生成的體外高分子聚合物之帶電部分結合成複合物所致。另外，重金屬亦能與微生物排出體外之代謝物 (metabolism) 鍵結成沉澱物，而達到同樣的效果。

2.3 硫酸還原菌之簡介及應用

硫酸還原菌外型因年齡及存在環境不同而不同，文獻中大部分描述的族群有屬於中溫菌的 *Desulfovibrio*、*Desulfobacterium*、*Desulfobacter* 及 *Desulfobulbus* 其適合生長之溫度範圍在 25-37°C，最適溫度為 33°C，而最適適合生長之 pH 為中性，其次為屬於嗜熱菌的 *Thermodesulfovibrio* 其生長溫度範圍在 30-70°C，最適溫度為 55°C，其它菌屬如：*Desulfotomaculum* 和 *Archaeoglobus* 等 (Thauer *et al.*, 2007)，這些菌廣泛的分布在各種厭氧環境中，例如：湖泊沈積物、海洋沈積物、地下水、沼澤等厭氧環境中，除前述天然環境外，也可在工業消化槽、礦業廢水、儲油槽及廢水處理場中發現硫酸還原菌 (楊，2005)。

硫酸還原菌是一種異營菌 (heterotrophy) 需在嚴格的厭氧條件 ($E_h < -200$ mV) 下才能生存，且需利用低分子量有機化合物如乙酸、甲醇、乙醇或乳酸等為主要之電子提供者，於厭氧環境下將有機碳分解過程產生的電子，進入電子傳遞鏈，以硫酸鹽離子為電子接受者，產生能量 ATP 和生成硫離子，經由硫離子與重金屬形成金屬硫化物沉澱，可藉此去除水中重金屬 (White *et al.*, 1997)。

然而利用硫酸還原菌處理重金屬必須考量到重金屬對硫酸還原菌造成的毒性效應，因為重金屬的毒性若超過硫酸還原菌的忍受程度，對硫酸還原菌造成抑制甚至死亡，降低硫酸還原效率，使得重金屬處理效果不彰。

因此，有多位學者研究硫酸還原菌對各種常見的重金屬可容忍之毒性效應濃度 (Hao *et al.*, 1994; Karnachuk *et al.*, 2003; Karri *et al.*, 2006; Loka Bharathi *et al.*, 1990; Poulson *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1998; Utgikar *et al.*, 2001)，以利各種反應槽之設計，並提昇處理效率，其可容忍毒性效應濃度如 Table 2-2 所示，不同重金屬對不同族群的硫酸還原菌毒性效應濃度各不同。Utgikar *et al.* (2001) 研究銅離子對混合培養之硫酸還原菌產生毒性效應濃度為 12 mg/L，此與 Song *et al.* (1998) 研究結果有差異，Song *et al.* (1998) 研究銅離子對混合硫酸還原菌產生毒性效應濃度高達 100 mg/L，其他學者研究銅離子對硫酸還原菌產生毒性效應濃度則介於 4-32.2 mg/L。Karnachuk *et al.* (2003) 研究銅離子對純菌 *Desulfovibrio* strain R2 產生毒性效應濃度則介於 50-70 mg/L。因此本研究根據文獻資料選擇實驗之銅離子濃度範圍介於 10-100 mg/L。

Table 2-2 Heavy metal toxicity to SRB

Metal	SRB strain	Toxic concentration, mg/L	Reference
	Mixed culture	12	Utigikar <i>et al.</i> (2001)
	Mixed culture	100	Song <i>et al.</i> (1998)
Cu	<i>Desulfovibrion</i> strain R2	50-70	Karnachuk <i>et al.</i> (2003)
	Mixed culture	4-20	Hao <i>et al.</i> (1994)
	Mixed culture	32.2	Karri <i>et al.</i> (2006)
	Mixed culture	20	Utigikar <i>et al.</i> (2001)
Zn	Mixed culture	25-40	Hao <i>et al.</i> (1994)
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	13	Poulson <i>et al.</i> (1997)
	Mixed culture	75-80	Hao <i>et al.</i> (1994)
Pb	Strain L-60	125	Loka Bharathi <i>et al.</i> (1990)
	Mixed culture	80	Song <i>et al.</i> (1998)
Cr	Mixed culture	60	Hao <i>et al.</i> (1994)
	Mixed culture	>4-20	Hao <i>et al.</i> (1994)
Cd	Strain L-60	54	Loka Bharathi <i>et al.</i> (1990)
	Mixed culture	10-20	Hao <i>et al.</i> (1994)
Ni	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	10	Poulson <i>et al.</i> (1997)
Hg	Strain L-60	74	Loka Bharathi <i>et al.</i> (1990)

2.4 固定化生物顆粒技術

近年來，國內環境污染日益嚴重，對於一些難分解性的工業廢水，例如高分子化合物、農藥、芳香族化合物以及染料等製造業所產生的難分解性物質；或家庭污水及地下水中的氨氮、硝酸鹽之去除等等，利用傳統生物處理法仍有不少困難點及效率不彰等問題。因此，利用生物技術開發新型廢水處理程序來有效解決環保問題已成為一項熱門的研究課題。固定化生物顆粒技術 (immobilization technology) 提供解決增加廢水生物處理效率的重要替代方案，主要原因為固定化生物顆粒具有維持處理系統高微生物濃度的特點，提升處理效率，因此近年來已被積極應用至各種廢水生物處理系統。

微生物或酵素固定化之應用，早在 80 年代即已普遍應用於生物技術之相關產業上，如 L-胺基酸、L-門冬胺酸及果糖等不少生化產品的大規模生產上，皆有固定化技術應用之實例 (吳等，1996)。80 年代後，固定化技術應用於廢水處理方面的研究已開始萌芽，歐、美及日本等國家認為固定化生物顆粒技術為廢水生物處理程序中頗具發展潛力的重要技術之一。

2.4.1 固定化方法種類

固定化微生物細胞生長系統是將微生物細胞限制在固定的空間，使微生物細胞附著於擔體表面形成生物膜 (biofilm) 或將微生物包埋於擔體內而成的生化觸媒 (biocatalysts)。固定化微生物系統大致可分為自然固定化 (self-attachment immobilization) 及人工固定化 (artificial immobilization) 兩種不同型態 (Cohen *et al.*, 2001)。

(1) 自然固定化 (self-attachment immobilization)

自然固定化法是指在人為提供的適當環境之下，微生物細胞自然附著 (attachment) 或凝集 (aggregation) 於支持物或擔體表面或多孔性擔體內部成長而形成的生物膜。

(2) 人工固定化 (artificial immobilization)

人工固定化係指利用人工方式將具活性之微生物細胞固定於擔體材料之表面或內部而形成的生化觸媒。目前已被廣泛應用的固定化方法有：微膠囊包覆法 (microencapsulation)、共價鍵結法 (covalent bonding)、交聯法 (covalent crosslinking) 及包埋法 (entrapment)。其中又以包埋法最為常見。Table 2-3 為不

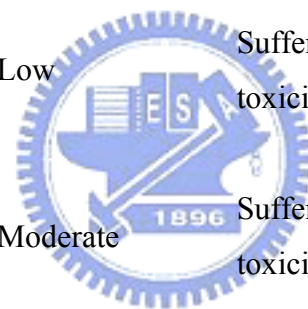
同人工固定化法之比較 (Cohen *et al.*, 2001)，並分述如下。

- (A) 微膠囊包覆法是以殼材將微生物包覆起來，所製成微小囊狀容器的一種技術，微膠囊直徑約為 10-100 μm 。而該微生物可在微膠囊內自由移動，並利用透過殼材滲透進來的基質進行生長。此方法雖然有高微生物濃度及低擴散限制的優點，但其製作過程手續繁雜且某些殼材對微生物會造成毒性，使菌體活性降低，其次所製成之微膠囊機械強度低，當微生物生長、細胞分裂或產生氣體時可能導致微膠囊破裂。
- (B) 共價鍵結法是利用載體本身所具有不同的特殊官能基，或鍵結於其上之化合物所提供的特殊官能基，與生化物質形成共價鍵結，進而固定生化物質。此法所獲得的固定化菌體顆粒雖然機械强度高，但在共價鍵結時牽涉到劇烈的化學反應，導致菌體的活性降低。
- (C) 交聯法是透過雙或三官能基反應劑之協助，將個別生物觸媒單元 (酵素或細胞) 相結合在一起，以形成不溶狀高分子量凝聚物。其中一種便是以 UV 光照射，利用苯甲酸作為感光劑，進行載體的光交聯反應，以製備膜狀的固定化菌體顆粒，此法雖可獲得高強度之固定化菌體顆粒，但卻不易形成顆粒形狀，且在數小時 UV 光照射下，會導致微生物之死滅。
- (D) 包埋法是將生化物質與膠體原料均勻混合後再製成薄膜或粒狀膠體，大分子的生化物質被包埋在膠體內不易流失，而小分子的待測物仍可進入膠體內與生化物質反應。且膠體的包埋屬於溫和的固定化方法，不但製作程序簡單且固定化菌體顆粒活性高、機械強度佳，使其成為最常見的固定化方法之一。因此本研究選擇包埋法進行菌體固定化之方法。

Table 2-3 A comparison between the different methods for the artificial immobilization of microorganisms to bedding material

Method	Diffusion restriction	Biomass concentration	Toxicity problems	Mechanical stability	Complexity of the application
Microencapsulation	Relatively low	High	Suffer from severe toxicity problems	Low – the capsules tend to rupture	Complex
Covalent bonding	No	Low	Suffer from severe toxicity problems	High	Simple
Covalent cross-linking	No	Moderate	Suffer from severe toxicity problems	High	Simple
Entrapment within polymers	Relatively high – varies with the polymer material kind and construction	High	Moderate toxicity problems	Varies greatly with the kind of polymer	Simple

Reference: Cohen *et al.*, 2001.



2.4.2 人工固定化之優點

人工固定化技術應用於廢水處理的領域已多年，在歐美、日本等國家，認為人工固定化技術，為廢水處理程序中，頗具發展潛力之重要技術，其優點如下(陳，2000)：

- (1) 人工固定化技術，主要將濃縮微生物，藉由聚合物材料包覆，將微生物截留在反應槽中，以維持處理系統之高微生物濃度。
- (2) 處理系統之高微生物濃度，可提高反應槽之系統容積負荷，縮短水力停留時間，減少反應槽容積，而大幅減少用地面積及建設之成本。
- (3) 處理系統之高微生物濃度，對水力停留時間或有機負荷之突增或遽變，具有較高的忍受能力，使操作具有緩衝水質、水量變化之彈性。
- (4) 可藉由加大擔體顆粒外型尺寸及比重，容易與廢水分離，微生物不易流失，提高微生物利用價值。
- (5) 擔體具保護作用，可增加菌體抵抗外來毒性物質傷害之能力，有利於系統之穩定操作。
- (6) 可大幅減少污泥產量，理論上僅有傳統活性污泥法剩餘污泥產量之 20-30%，利於程序減廢之目標。
- (7) 不必如同自然固定化生物膜系統必須實施週期性逆洗 (back-washing)，且不易發生生物膜剝落，進而影響系統操作之問題。
- (8) 被固定的微生物種類，可根據廢水性質而選擇不同的優勢菌群或特殊菌株來分解特定的廢水成分，以提高處理效率。

雖然人工固定化技術具上述多項優點，但在實際應用上仍有些缺點及限制必須加以慎重考量：

- (1) 微生物經過人工固定化後，可能造成代謝、生理狀況之改變。
- (2) 擔體內微生物老化後，孔洞易阻塞，菌體再活化不易。
- (3) 擔體內屬於大型生物的原生動物不易存活，可能影響整體淨化機能。
- (4) 固定化擔體材料之機械強度，微生物相容性、成本及固定化方法等，宜作長期性觀察及大量生產可行性之研究。
- (5) 長期使用後，廢棄菌體顆粒之處理問題。

2.4.3 人工固定化之材料

人工固定化材料為微生物固定化技術成敗之重要關鍵，因此在選擇材料時，應考慮下列之條件，以做為選擇最佳固定化材質時，重要的參考依據(林，1993；吳等，1996)。

- (1) 擔體材料可配製成水溶性溶液，並能在室溫下固化膠凝。
- (2) 價格低廉。
- (3) 固定化方法簡單，容易量產。
- (4) 結構性質強韌，耐久性佳。
- (5) 需對微生物不具毒性。
- (6) 具擔體內部質傳阻力小之特性。
- (7) 可有效截留微生物於擔體內。

以一般最常見人工固定化方法包埋法而言，其固定化材料可分為天然和人工合成的高分子聚合物兩類。天然的材料如褐藻膠鈣 (Ca-alginate)、瓊脂 (agar) 及鹿角藻膠 (carrageenan)，其機械強度脆弱，膠體顆粒易破裂，在使用上一一直被限制；人工合成的高分子聚合物材料以聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)、脲酯聚合物 (urethane prepolymer)、三醋酸纖維 (cellulose triacetate)、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等高分子聚合物質為主，其中聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 及脲酯聚合物 (urethane prepolymer) 對微生物之毒性較大，而三醋酸纖維 (cellulose triacetate) 則不易成形顆粒，亦是無法普遍用於固定化之主因。而 PVA 則是價格便宜，無生物毒性，固定化菌體活性高，強度佳及固定化程序簡單、為目前固定化微生物擔體最常被應用的種類(林，1993；吳等，1996)。因此本研究選擇 PVA 為固定化微生物擔體之材料。

2.4.4 PVA 固定化技術應用於廢水處理之研究

固定化技術應用於廢水處理方面，以 PVA 為固定化主要材料之相關國內外研究頗為豐富 (Chang and Tseng, 1998; Chen *et al.*, 1998; Chen and Lin, 1994; Long *et al.*, 2004; Rostron *et al.*, 2001)，其固定化方式可分為四種：主要將 PVA 浸漬於不同溶液中固定，如硼酸、磷酸鹽、硝酸鹽固定液及冷凍回溫之固定化方式，Table 2-4 整理，4 種固定化方法及應用分述如下。

- (1) PVA 硼酸固定化法：Long *et al.* (2004) 研究以 8% (w/v) PVA 溶液，滴入含有

3% 硼酸及 2% 氯化鈣溶液，在 4°C 下維持 24 小時，主要包覆硫氧化菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*，並使用固定床反應槽 (packed-bed reactor) 處理含亞鐵離子廢水，結果發現當稀釋率達 0.38 h⁻¹，亞鐵離子氧化速率增加至 1.89 g/L/h，有效增加其處理效率。但由於此固定化方法在硼酸溶液中浸泡長達 24 小時，對微生物傷害頗大。

(2) PVA 磷酸酯化法：Chen *et al.* (1994) 研究以 4-22% (w/v) PVA 溶液，滴入飽和硼酸溶液 0.5 小時，以形成顆粒，再置入 0.5 M 磷酸鹽溶液硬化 1 小時，主要包覆脫硝菌處理合成硝酸鹽廢水，結果顯示實驗進行 32 天後，硝酸鹽去除率達 99%。此法不僅固定化程序簡單且固定化菌體顆粒活性高，強度佳，因此本研究以 PVA 磷酸酯化法製作 PVA 固定化菌體顆粒。

(3) PVA 硝酸固定化法：Chang and Tseng (1998) 研究以 8% (w/v) PVA 溶液，滴入含有 50% (w/v) 硝酸鈉及 1% 氯化鈣溶液 1 小時，包覆脫硝菌處理合成硝酸鹽廢水，結果顯示實驗運行 3 天後，硝酸鹽去除率達 90% 以上。

(4) PVA 冷凍回溫固定化法：Rostron *et al.* (2001) 研究以 20% (w/v) PVA 溶液，包覆硝化菌 (2.5 g VSS/L)，置入 -20°C 之冷凍庫 39 小時，然後取出於室溫下回溫 24 小時，並切成 0.8 公分的小立方體顆粒，處理合成氨氮廢水，結果顯示硝化作用之容積負荷率由 0.36 提升至 0.70 Kg/Nm³/d。但此固定方法在製作過程需連續地冷凍回溫，不僅費時甚久，手續繁雜，且耗費能源較不具經濟效益。

Table 2-4 Cell immobilizations within PVA carriers

Reactor	Cell culture	PVA carriers	Wastewater	Efficiency	Reference
Packed-bed reactor	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	PVA-boric acid beads	Synthetic ferrous iron wastewater	Fe ²⁺ oxidation rate of 1.89 g/L/h was achieved at dilution rate 0.38 h ⁻¹	Long <i>et al.</i> , 2004
CSTR ¹	Denitrifying bacteria	Phosphorylated PVA beads	Synthetic nitrate wastewater	Run for 32 days, nitrate removal of more than 99%	Chen and Lin, 1994
CSTR ¹	Sludge	Phosphorylated PVA beads	Synthetic municipal wastewater	More than 90% COD removal in COD loading rate lower 2.0 g COD/L/d	Chen <i>et al.</i> , 1998
Batch reactor	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	PVA-sodium nitrate beads	Synthetic nitrate wastewater	Run for 32 days, nitrate removal over 90%	Chang and Tseng, 1998
CSTR ¹	Nitrifying bacteria	PVA-freeze-thawing beads	Synthetic ammonia wastewater	Volumetric nitrification rates added from 0.36 to 0.70 Kg/Nm ³ /d	Rostron <i>et al.</i> , 2001

¹CSTR: continuously stirred tank reactor

2.5 實驗設計法

2.5.1 中央合成設計 (Central composite design, CCD)

為了要聯繫相關和獨立變數 (dependent and independent) 並使用最少實驗組數，採用二因子的中央合成設計，這種實驗設計方法可以建構獨立變數的二階多項式並判定變數的顯著性。

二因子的中央合成設計概念如 Figure 2-1 所示，CCD 包含了一個 2^K 因子設計 (實心點)， 2^K 個軸點實驗 (星形點)，和 N_c 個中心點實驗使得可以估計出曲率。如果對於每個因子來說，中心點到各因子頂點的距離是 ± 1 個單位，則中心點到星形點的距離是 $\pm \alpha$ ，在此 $|\alpha| > 1$ 。CCD 通常含有因數兩倍的星形點，星形點代表設計中每個因子的極限值 (高和低)。為了維持旋轉性， α 值與 CCD 因子部分的實驗組數有關，如果此因子是全因子設計則 α 值一般定義為 $\alpha = (2^K)^{1/4}$ 。以二因子設計為例， $K = 2$ 則 $\alpha = 1.414$ (Techapun *et al.*, 2002)。

CCD 實驗所需組數為 $N = 2^K + 2K + 1$ ，其中 K 代表獨立因子變數個數，以兩個獨立因子變數為例， $K = 2$ 故所需的實驗組數為九組 (Diaz *et al.*, 2003)，再加上中心點取三重覆，則實驗組數共為 11 組。

為了促進比較係數和形象化 (visualization) 獨立變數在反映變數上，獨立因子變數的水準範圍經由式 2-1 正規化 (normalized) 從 -1.414 到 1.414，此正規化過程更能精準估計回歸係數且降低線性和二次項之間的交換關係。

$$X_n = \frac{X - \bar{X}}{(X \max - X \min)/2} \quad (\text{式 2-1})$$

X : 獨立變數的絕對值

\bar{X} : 變數平均值

$X \max$: 變數最大值

$X \min$: 變數最小值

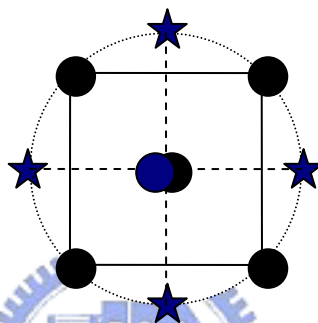
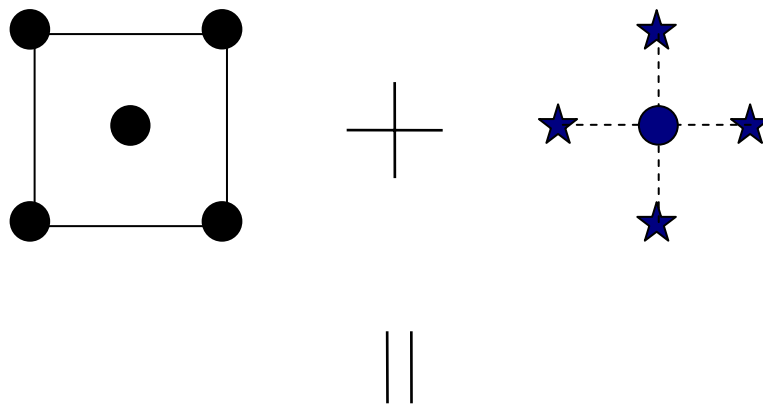


Figure 2-1 General diagram of a CCD for two factors.

2.5.2 反應曲面法 (Response surface method, RSM)

反應曲面法 (RSM) 搭配著中央合成設計，可更有效對於我們有興趣的反應及變數之影響達到最佳化的目標。假設反應槽中硫酸鹽還原之反應速率常數為 (Y)，操作因子為 PVA 固定化菌體顆粒量 (蛋白質添加量) (X_1) 及銅離子濃度 (X_2)，則反應槽中硫酸鹽還原之反應速率常數為 PVA 固定化菌體顆粒量 (蛋白質添加量) 及銅離子濃度的函數，如式 2-2 所示：

$$Y = f(X_1, X_2) + \varepsilon \quad (\text{式 2-2})$$

其中 ε 代表硫酸鹽還原之反應速率常數 Y 中所觀察到的誤差。如果將上式簡化成 $Y = f(X_1, X_2)$ ，則此方程式所代表的曲面就稱為反應曲面。利用 RSM 以及等高線圖可以決定因子最佳操作條件或範圍。

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗流程與架構

本實驗之流程架構如 Figure 3-1 所示，首先利用 PVA 磷酸酯化法 (Chen and Lin, 1994) 包覆硫酸還原菌製成 PVA 固定化菌體顆粒，為了解 PVA 固定化菌體顆粒之包覆微生物受廢水重金屬銅離子濃度對其微生物活性 (硫酸鹽還原率) 之影響，依文獻資料選定銅離子濃度及 PVA 固定化菌體顆粒量 (蛋白質添加量) 兩個實驗因子，以實驗設計之中央合成設計 (central composite design, CCD) 進行實驗，於不同反應時間採樣分析各項水質參數，以瞭解生物沉澱過程銅離子去除效率及微生物生長狀況。最後將實驗結果以反應曲面法 (response surface method, RSM) 分析，並藉由 Minitab 統計軟體回歸分析找出最適合用於 PVA 固定化菌體顆粒受廢水重金屬銅離子濃度對其微生物活性之影響的評估指標，並找出最佳 PVA 固定化菌體顆粒量 (蛋白質添加量) 與銅離子濃度的操作條件。



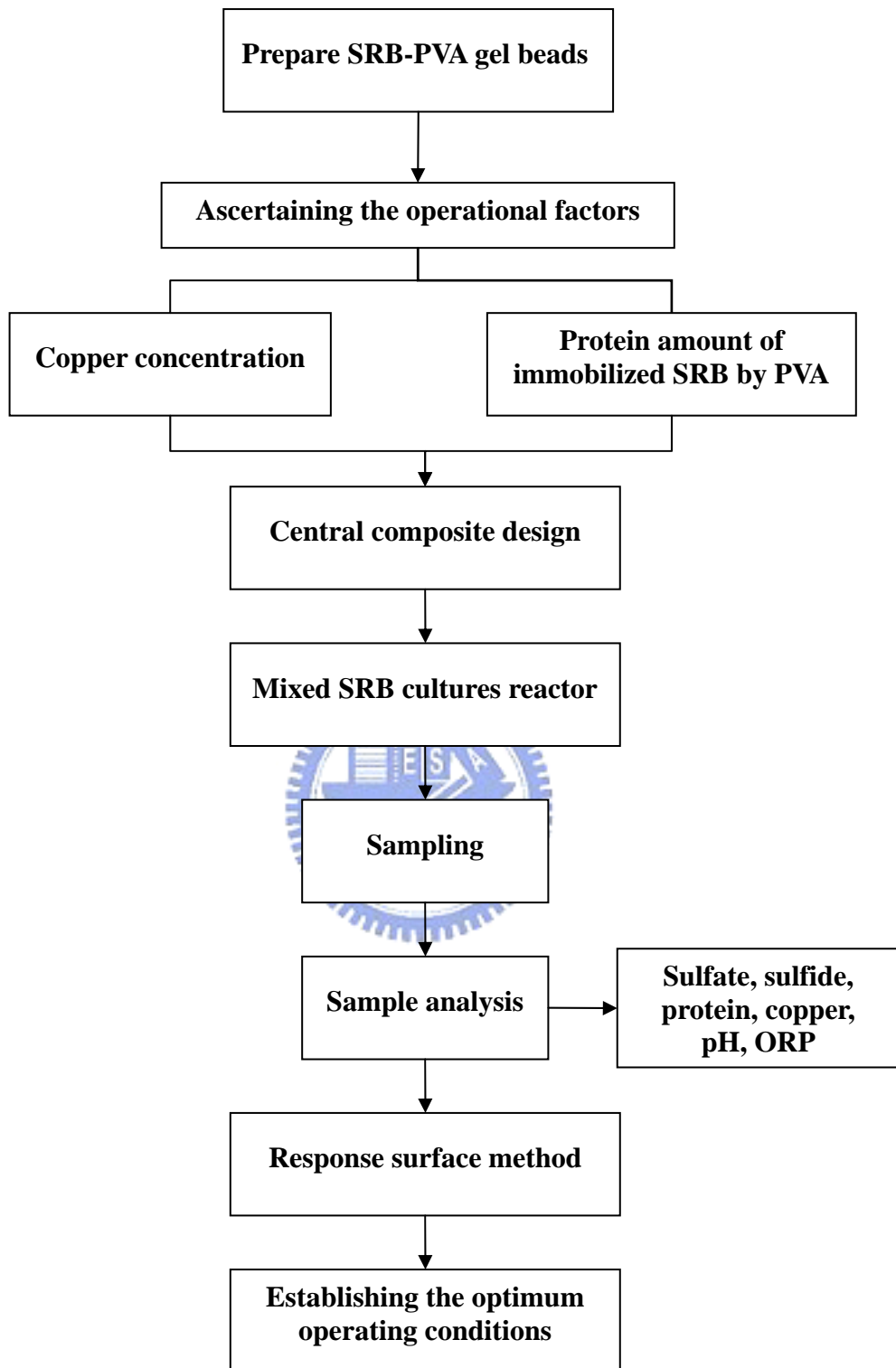


Figure 3-1 Flowchart of experiment

3.2 藥品

本研究以聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 為固定化材料包覆硫酸還原菌製成 PVA 固定化菌體顆粒, PVA 是由長春石化公司所提供, 其鹼化度 (hydrolysis) 在 99.4-99.8 mole%; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 皆購自德國的 Merk 公司; HBO_3 則購自美國 Panreac 公司, 而其它藥品規格皆為試藥級以上。

3.3 植種污泥來源及馴養

3.3.1 培養基成分

污泥馴養所使用之培養基為文獻中提到利於硫酸還原菌生長之 SRB1 medium (White and Gadd, 1996), 其主要組成為: 乳酸鈉 (Lactate)、Yeast extract、 Na_2SO_4 、 NaHCO_3 、 KH_2PO_4 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 其中乳酸鈉為其生長所需之碳源, 其成分濃度如 Table 3-1 所示。培養基需以滅菌釜 (EA-635, EASTERN MEDICAL) 121°C , 1.5 Kg/cm^2 滅菌 15 分鐘後, 以供馴養硫酸還原菌使用。



Table 3-1 Composition of SRB1 medium

Composition	Concentration (g/L)
Lactate (70%)	3.5
Yeast extract	0.1
Na_2SO_4	2.66
NaHCO_3	2.52
NH_4Cl	1.0
KH_2PO_4	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04

3.3.2 厭氧污泥之批次馴養

本研究所使用硫酸還原菌菌種來源採自新竹市養豬廢水的厭氧污泥，經由調配利於硫酸還原菌生長之培養基 SRB1 medium 進行長期批次馴養，每批次馴養 14 天，利用水浴循環將溫度控制在 30°C，以進行下一批次培養。首先需將滅完菌之培養基以 HCl 調整 pH 至 7.5 ± 0.1 ，接著曝氣約 30 分鐘再倒入反應槽中，並以磁石攪拌的方式進行培養，培養其間亦進行 pH 及 ORP 之即時監控，以確保 pH 介於 7.0-7.5 及 ORP 低於 -350 mV。

3.4 PVA 固定化菌體顆粒製備方法

本研究依循 Chen and Lin (1994) PVA 磷酸酯化法製作固定化菌體顆粒，其製備流程如 Figure 3-2 所示。首先將 PVA 加熱溶於水中，製成 PVA 溶液 (20%, w/v)；待其冷卻至 30-40°C 後，再與濃縮的硫酸還原菌污泥液 (20 g VSS/L) 以體積比 1:1 混合，並攪拌均勻。以注射針筒將此 PVA-菌體混合液，在室溫下緩緩滴入飽和硼酸溶液中，以形成顆粒。經 30 分鐘後將 PVA 顆粒以篩網過濾取出，用去離子水洗去殘餘硼酸。隨後，再將顆粒浸漬於 pH 值約 5 的磷酸鹽溶液 (0.5 M Na_2HPO_3 : 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_3 = 1 : 1$) 中 1 小時，進行 PVA 磷酸酯化之凝膠作用。最後將顆粒取出以去離子水沖洗，製成粒徑約為 3-4 mm 的 PVA 固定化菌體顆粒。備製好之 PVA 固定化菌體顆粒置於新鮮培養基內，並保持厭氧狀態，並於 8 小時內進行試驗。

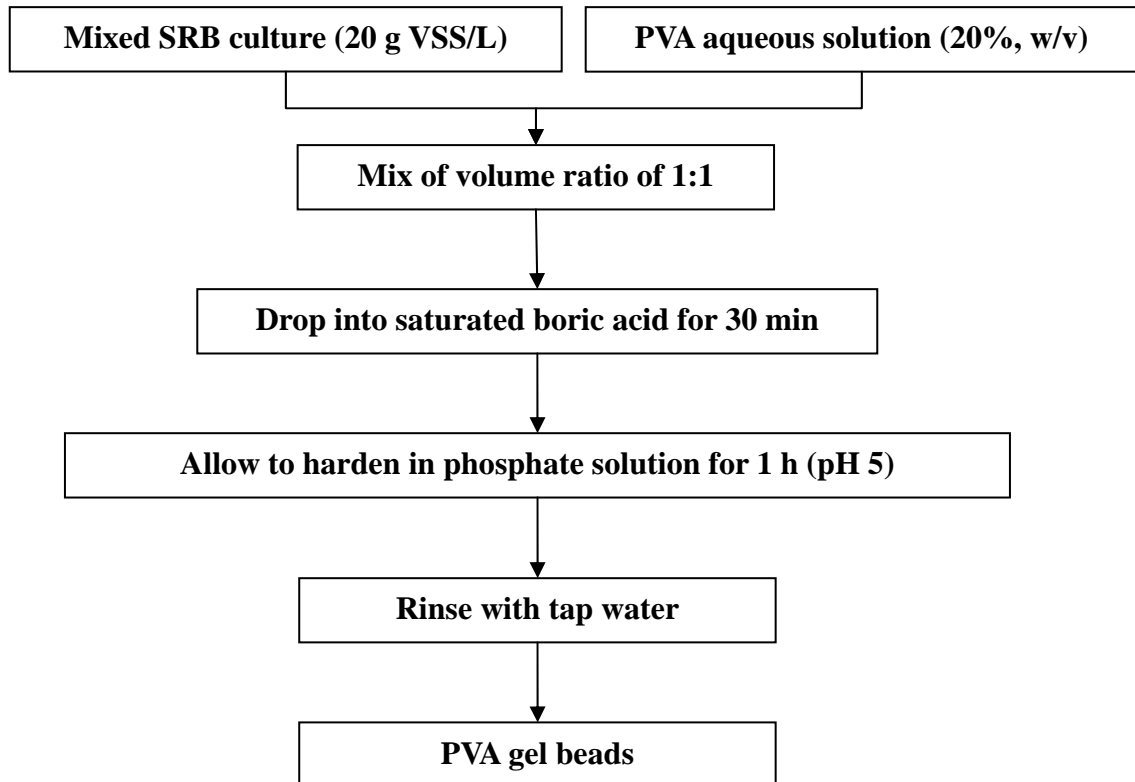


Figure 3-2 Preparation of immobilized SRB by phosphorylated PVA method

3.5 PVA 固定化菌體顆粒量及銅離子濃度對硫酸還原效率之實驗

3.5.1 以中央合成設計法建立實驗組數

Utgikar *et al.* (2001) 研究重金屬濃度對硫酸還原菌有明顯抑制作用，從數 mg/L 至數百 mg/L 不等，不同重金屬對硫酸還原菌毒性不同，其中以銅離子的毒性最強，依據研究重金屬銅離子對硫酸還原菌產生毒性的濃度介於 10-100 mg/L。以 PVA 固定硫酸還原菌主要增加反應槽中微生物量，並增加硫酸還原的效率，且 PVA 固定化菌體顆粒具保護作用，可增加硫酸還原菌抵抗重金屬之毒性影響，並提升重金屬的去除率。為瞭解重金屬銅離子濃度及 PVA 固定化菌體顆粒量對生物沉澱系統中硫酸還原效率及重金屬去除之影響，本研究選用 2^k 因子 ($k=2$) 之中央合成設計法 (CCD) 規劃設計實驗組數。

每個獨立因子變數具有 5 個水準範圍，並依文獻資料，設計 PVA 固定化菌體顆粒包覆硫酸還原菌，設計硫酸還原菌菌體量介於 19-235 mg VSS/L，即試驗中蛋白質添加量 (X_1) 介於 0.16-1.94 mg；銅離子濃度 (X_2) 介於 10-100 mg/L。

其所對應的自然變數 (natural levels) 及編碼變數 (coded levels) 如 Table 3-2 所示。經由統計軟體 Minitab 的中央合成設計亂數執行出來的組數及順序，中心點取三重覆共 11 組實驗，其批次實驗序列如 Table 3-3 所示。

Table 3-2 The CCD experimental range and levels of the independent variables

Variables	Code levels				
	$-\alpha$ (-1.414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1.414)
X_1 , protein amount of immobilized SRB by PVA (mg)	0.16	0.42	1.05	1.68	1.94
X_2 , copper concnetration (mg/L)	10	23.2	55	86.8	100

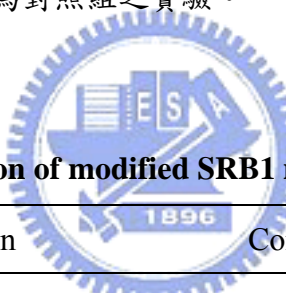
Table 3-3 Sequence of runs for the central composite design

Experiment run	Coded variable		Operated condition	
	X_1	X_2	Protein amount of immobilized SRB by PVA (mg)	Copper concnetration (mg/L)
1	-1	-1	0.42	23.2
2	0	-1.414	1.05	10
3	-1	1	0.42	86.8
4	-1.414	0	0.16	55
5	1	1	1.68	86.8
6	0	0	1.05	55
7	0	1.414	1.05	100
8	0	0	1.05	55
9	1.414	0	1.94	55
10	0	0	1.05	55
11	1	-1	1.68	23.2

3.5.2 實驗條件

本實驗使用 250 mL 之磨口三角燒瓶為反應槽，在每組實驗依 Table 3-4 濃度配製 8 瓶 SRB1 medium，經滅菌釜滅菌後配製相同條件的混合液，並將 pH 值調整至 7.5 ± 0.1 ，添加不同重金屬銅離子（濃度如 Table 3-3 所示）配製 150 mL 之人工合成廢水。實驗前測定單位重 PVA 固定化菌體顆粒中蛋白質之含量，依 Table 3-3 設計蛋白質添加量計算每瓶需加入之 PVA 固定化菌體顆粒的重量，加入 PVA 固定化菌體顆粒後以氮氣曝氣 10 分鐘將燒瓶維持在厭氧狀態。隨後，將瓶口密封，置於恆溫震盪培養箱進行反應，反應溫度控制在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ，反應震盪速率為 100 rpm。然後分別於反應時間 0、2、6、12、24、48、96 及 168 小時，各拿一瓶進行分析，為避免空氣中氧氣的影響，瓶口開啟後立即進行 pH、ORP 測定，水樣以 0.2 μm 濾膜過濾後依硫酸鹽離子、硫離子、銅離子濃度分析之保存方法保存水樣，PVA 固定化菌體顆粒則進行蛋白質濃度分析。每組實驗同時以 PVA 空白顆粒以相同實驗條件作為對照組之實驗。

Table 3-4 Composition of modified SRB1 medium for CCD runs



Composition	Concentration (g/L)
Lactate (70%)	3.5
Yeast extract	0.1
Na ₂ SO ₄	0.44
NaHCO ₃	2.52
NH ₄ Cl	1.0
KH ₂ PO ₄	0.25
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.06
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.04

3.6 分析項目及方法

3.6.1 pH 及 ORP

pH 及 ORP 的測定分別使用 pH 電極 (SUNREX, 台灣) 及 ORP 電極 (SUNTEX, 台灣) 在瓶口開啟後立即進行測量。

3.6.2 硫酸鹽離子、硫離子及銅離子

本實驗的硫酸鹽離子、硫離子及銅離子分析方法皆為 Standard Methods (APHA *et al.*, 2005) 及環檢所公告之標準方法，其各項分析方法及使用儀器如 Table 3-5 所示。而所有的樣品在分析前均使用 0.2 μm 的濾膜 (Advantec, Japan) 過濾後才進行分析。

Table 3-5 Samples analysis and instruments

Items	Unit	Methodology	Instruments
Sulfate	mg/L	Trubidimetric method	Spectrophotometer (HITACHI, U3210)
Sulfide	mg/L	Methylene blue method	Spectrophotometer (HITACHI, U3210)
Copper	mg/L	Flame Atomic Absorption Spectrometric Method	Flame atomic absorption spectrophotometer (HITACHI, Z-8100)

3.6.3 PVA 固定化菌體顆粒菌體量測定

PVA 固定化菌體顆粒菌體量之測定係利用蛋白質測定法，藉由蛋白質與菌體量之檢量線得知菌體量大小值。

(1) 蛋白質測定方法

本試驗蛋白質測定採 Bradford 測定法 (Bradford Protein Assay) (Bradford, 1976)。其藥品與分析方法如下所述：

(A) 藥品：蛋白質染劑 (protein assay dye) 及蛋白質標準品 (bovine serum albumin standard；蛋白質濃度 10 mg/mL)，購自美國 Bio-Rad 公司。

(B) 分析方法：以二次水 (distilled, deionized water) 將蛋白質染劑稀釋五倍，取 10 μL 的蛋白質標準試劑或樣品，加入 200 μL 蛋白質染劑稀釋液均勻混合

後，於室溫下靜置 5 分鐘再以分光光度計 (Packard SpectraCount, BS 1000) 於波長 600 nm 下測其吸光度。以蛋白質濃度對吸光度作圖，線性迴歸即得蛋白質濃度對吸光度之檢量線 (如 Figure 3-3 所示)。

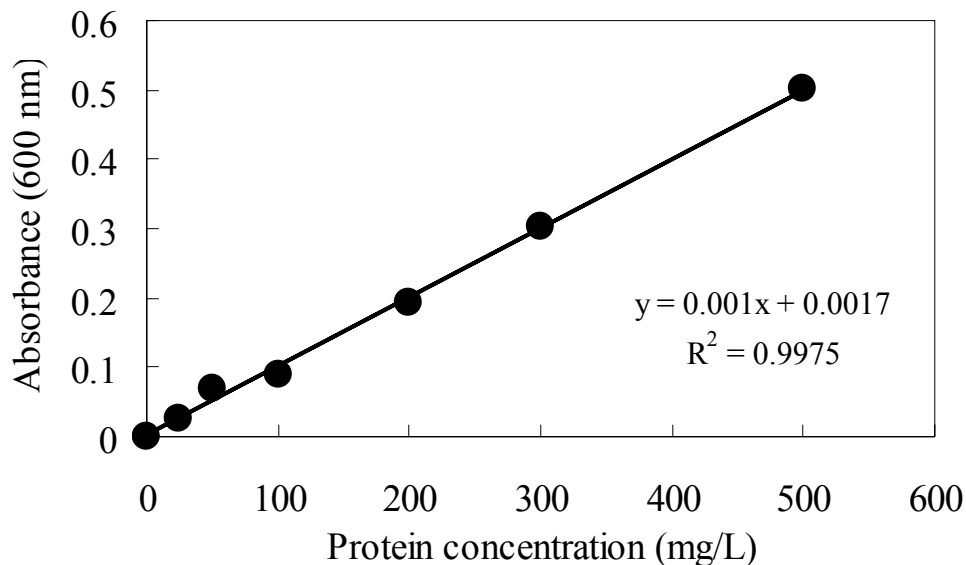


Figure 3-3 Relationship of protein concentration and absorbance at 600 nm

(2) 懸浮菌體之測定及檢量線之制定

配製不同濃度之馴養污泥並測其 VSS 濃度後，取 1.5 mL 的菌體溶液，以 $12470 \times g$, $4^{\circ}C$ ，離心 10 分鐘，除去上澄液；再加入無菌水清洗後，再度離心倒出上澄液，如此反覆進行清洗 3 次後，加入適量 sodium dodecyl sulfate (SDS)，再加入二次水使其體積與離心前相同，並保持最終濃度為含有 1% 的 SDS，將此樣品置於超音波震盪 2 小時，藉由 SDS 溶解細胞壁及細胞膜，以萃取出細胞內蛋白質。其次以 $12470 \times g$, $4^{\circ}C$ ，離心 20 分鐘，取上澄液並將體積定量至 1.5 mL，再利用上述 Bradford 法決定上澄液中蛋白質的濃度，而上澄液中蛋白質總量為上澄液體積乘以上澄液中蛋白質濃度，以 mg protein 表示。另外，將菌體濃度乘以菌體樣本體積 (1.5 mL) 即為實驗樣本中的菌體量。取不同濃度的污泥溶液重覆此實驗，可得不同污泥量 (mg VSS) 與所含蛋白質量 (mg protein) 之檢量線，如 Figure 3-4 所示。

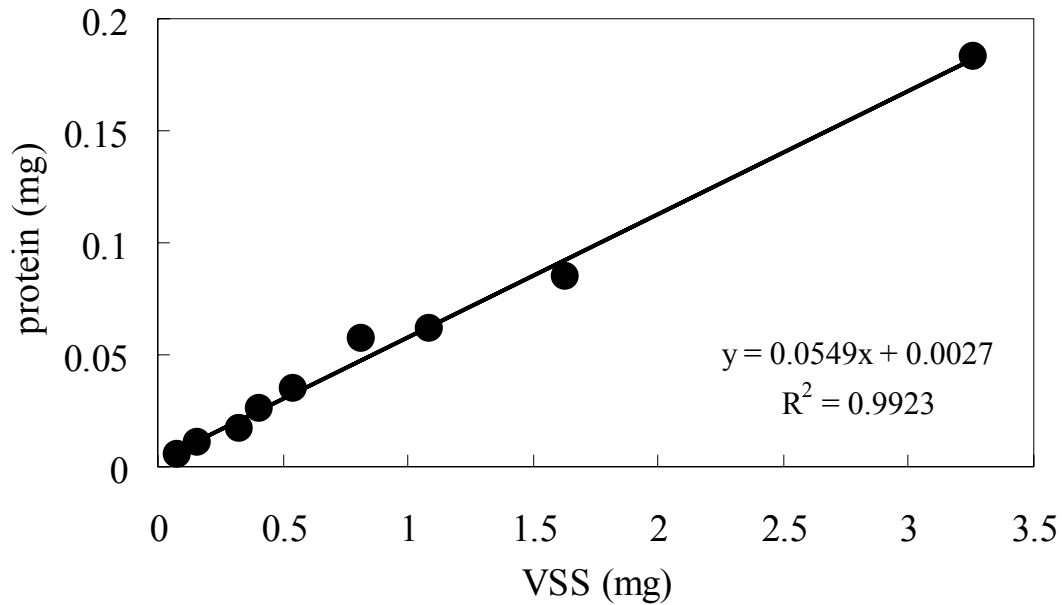


Figure 3-4 Relationship of protein and VSS

(3) PVA 固定化菌體顆粒蛋白質測定方法

取約 0.3 g 的 PVA 固定化菌體顆粒，以少量的二次水輕輕沖掉表面之培養基後，置放於玻璃皿上，以刀片將顆粒切碎，把顆粒碎片放入 1.5 mL 的試管中。以少量的二次水清洗刀片及玻璃皿，並將此洗液一併加入試管中。另添加二次水及 SDS 溶液，使最後試管中之液體體積約為 1.5 mL，且含 1% SDS。依前述方法測定其蛋白質濃度。最後將上澄液體積乘以上澄液之蛋白質濃度即為 0.3 g 的 PVA 固定化菌體顆粒所含的蛋白質量 (mg protein)，由此可得單位重 PVA 固定化菌體顆粒中的蛋白質含量 (mg protein/g PVA beads)。

(4) PVA 固定化菌體顆粒菌體量之估算

由計算所得之單位重 PVA 固定化菌體顆粒中的蛋白質含量 (mg protein/g PVA beads) 乘以添加 PVA 固定化菌體顆粒的重量可得蛋白質總量 (mg protein)，再以 Figure 3-4 不同污泥量 (mg VSS) 與蛋白質量 (mg protein) 之關係式，計算 PVA 固定化菌體顆粒之菌體含量 (mg VSS/g PVA beads)。

第四章 結果與討論

4.1 中央合成設計實驗結果

本實驗主要探討 PVA 固定化菌體顆粒之添加量及銅離子濃度對硫酸還原效率之影響，其實驗結果之 pH、ORP、硫酸鹽、硫離子、銅離子及蛋白質濃度各參數變化情形描述如下。

4.1.1 pH 及 ORP 變化

各組實驗 pH 之變化如 Figure 4-1 所示，實驗初始的 pH 均調整至 7.5 ± 0.1 ，由結果顯示各組 pH 都有先升後降的趨勢，pH 值上升可能原因為維持厭氧條件以氮氣進行曝氣 10 分鐘，使得因添加作為緩衝溶液的 HCO_3^- ，產生 CO_2 逸散而導致 pH 上升至 8.0 左右，但隨著硫酸還原菌的生長產生 HS^- ，之後 pH 便逐漸下降並因緩衝作用而維持穩定。除了最低 PVA 固定化菌體顆粒量（第 4 組，protein: 0.16 mg）和最高銅離子濃度（第 7 組，Cu: 100 mg/L）兩組試驗組之 pH，分別因添加 PVA 固定化菌體顆粒量少及高濃度銅離子的抑制作用，其生物生長有較長的遲滯期 (lag phase)，pH 下降趨勢緩慢外，其餘各試驗組之 pH 分別於反應 12-24 小時間後隨即開始下降並因緩衝作用而維持在 7.5-6.8，這與文獻指出一般適宜硫酸還原菌生長的 pH 約介於 5-9 的範圍一致 (Zagury *et al.*, 2006)。而對 PVA 空白顆粒之對照組之 pH，也因曝氮氣後，導致 pH 上升至 8.0 左右，但所添加之 PVA 空白顆粒因沒有包覆硫酸還原菌亦沒有生物還原反應發生，故反應期間 pH 均維持在 7.8-8.0 之間。

Figure 4-2 為各組之 ORP 變化情形，所有試驗組（除了第 4 組及第 7 組之外）之 ORP，最晚在反應第 48 小時內下降至 -400 mV 左右，之後便維持在 -370 至 -450 mV 之間至反應結束，顯示硫酸還原菌快速地生長及沉澱銅離子，並維持在絕對厭氧狀態。而第 4 組及第 7 組之 ORP 分別於 168 及 96 小時才下降至 -399 及 -403 mV，推測原因亦為因添加的 PVA 固定化菌體顆粒量少及高銅離子濃度的抑制作用而延遲生長。其他試驗組隨著操作條件不同，ORP 變化亦有不同的遲滯期，但所有組別的 ORP 均下降超過 -200 mV，之後便維持在 -370 mV 至 -450 mV 之間至實驗結束，這與文獻報告的 ORP 範圍一致 (Jong and Parry, 2003;

Radhika *et al.*, 2006)。而 PVA 空白顆粒之對照組因所添加 PVA 空白顆粒沒有包
覆硫酸還原菌亦沒有生化反應，所以在整個實驗中 ORP 均介於 121-136 mV，沒
有顯著的變化。

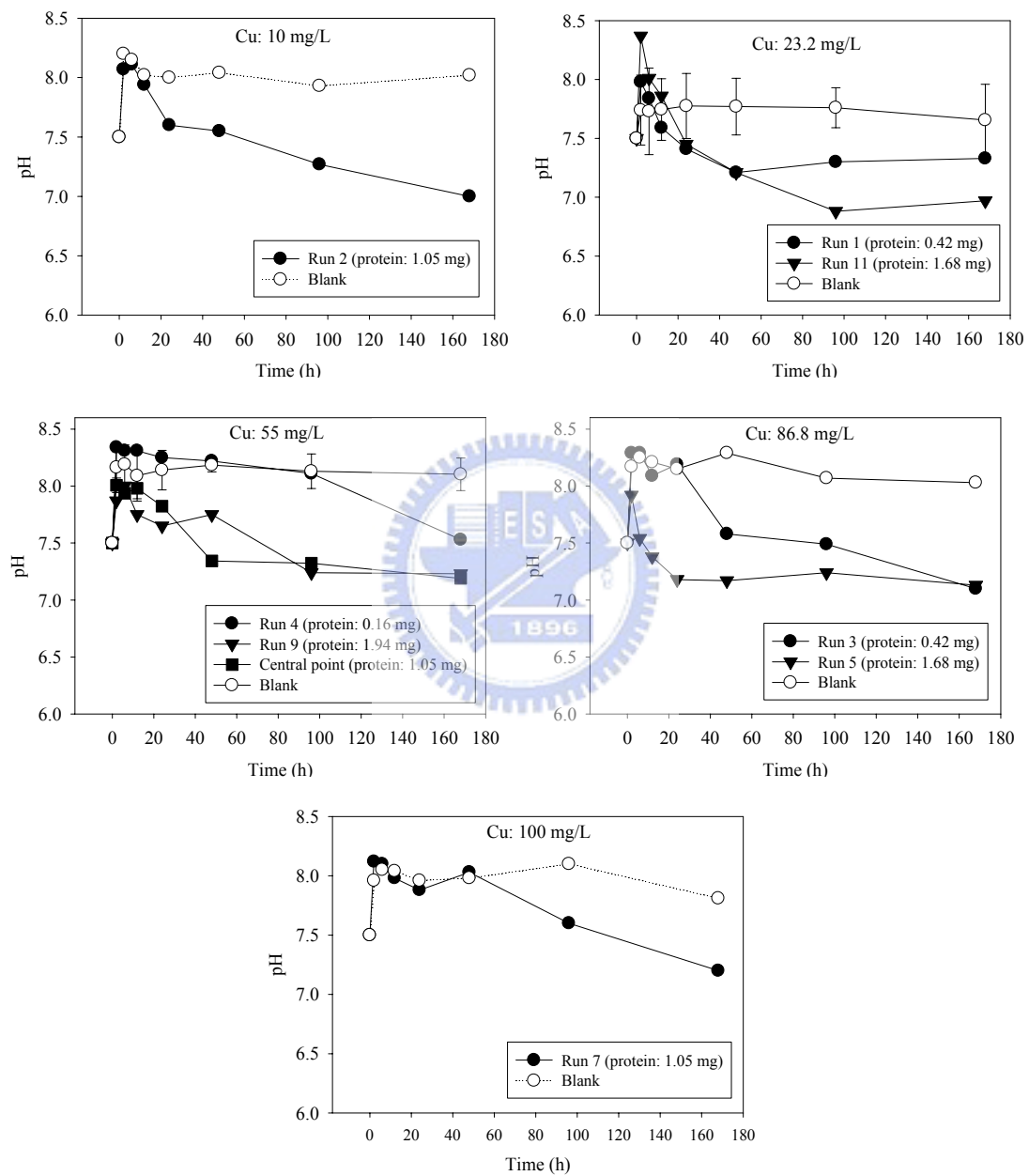


Figure 4-1 Variation of pH in CCD experiment.

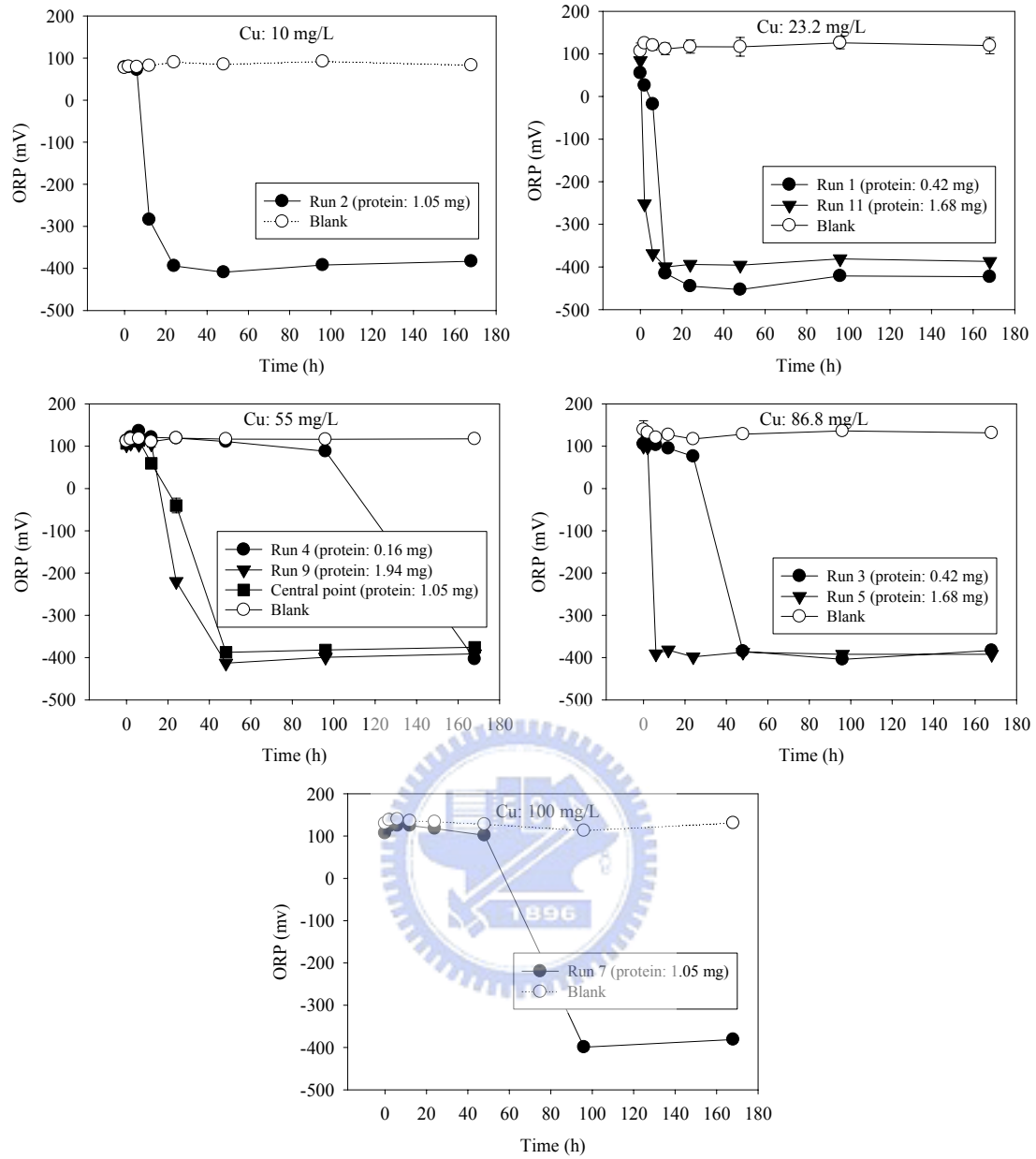


Figure 4-2 Variation of ORP in CCD experiment.

4.1.2 硫酸鹽濃度變化

硫酸鹽還原率 (sulfate reduction efficiency, SRE) 對於評估硫酸還原菌活性是相當重要的指標，Utgikar *et al.* (2001) 曾提出溶液中之溶解性重金屬對於硫酸還原菌之毒性效應可間接藉由分析硫酸還原率加以得知。Figure 4-3 及 Figure 4-4 分別為各實驗之硫酸鹽濃度及硫酸還原率變化之情形，結果顯示除了第 4 第 7 組之外之其他各試驗組在反應 48 小時內，硫酸鹽濃度從 304.2 ± 2.8 mg/L 下降至 1.3-23.4 mg/L，硫酸還原率介於 92.3-99.6%。並在第 168 小時，所有試驗組硫酸鹽還原率在 99% 以上。其中第 4 組硫酸鹽濃度於 48 小時後才緩慢從 289.6 mg/L 下降，於第 96 小時下降至 264.6 mg/L，惟一旦硫酸還原菌開始生長產生硫離子，與廢水中銅離子作用後，其硫酸還原作用即不再受抑制而急速增加，第 168 小時之硫酸還原率達 99.6%；而第 7 組其硫酸鹽濃度亦於 48 小時後才緩慢從 276.2 mg/L 下降，於第 96 小時下降至 72.1 mg/L，相同地只要硫酸還原菌開始生長產生硫離子與銅離子作用後，其硫酸還原作用即不再受抑制而急速增加，第 168 小時之硫酸還原率達 98.7%。這與 Utgikar *et al.* (2002) 的研究結果一致，Utgikar *et al.* (2002) 指出利用硫酸還原菌處理含重金屬之酸礦廢水，水中溶解性重金屬可和生物作用產生的硫離子結合形成金屬硫化物沉澱，當溶液中含微量之重金屬時有助於硫酸還原菌促進生物還原作用，反之高濃度重金屬則會對硫酸還原菌產生抑制甚至毒性效應。

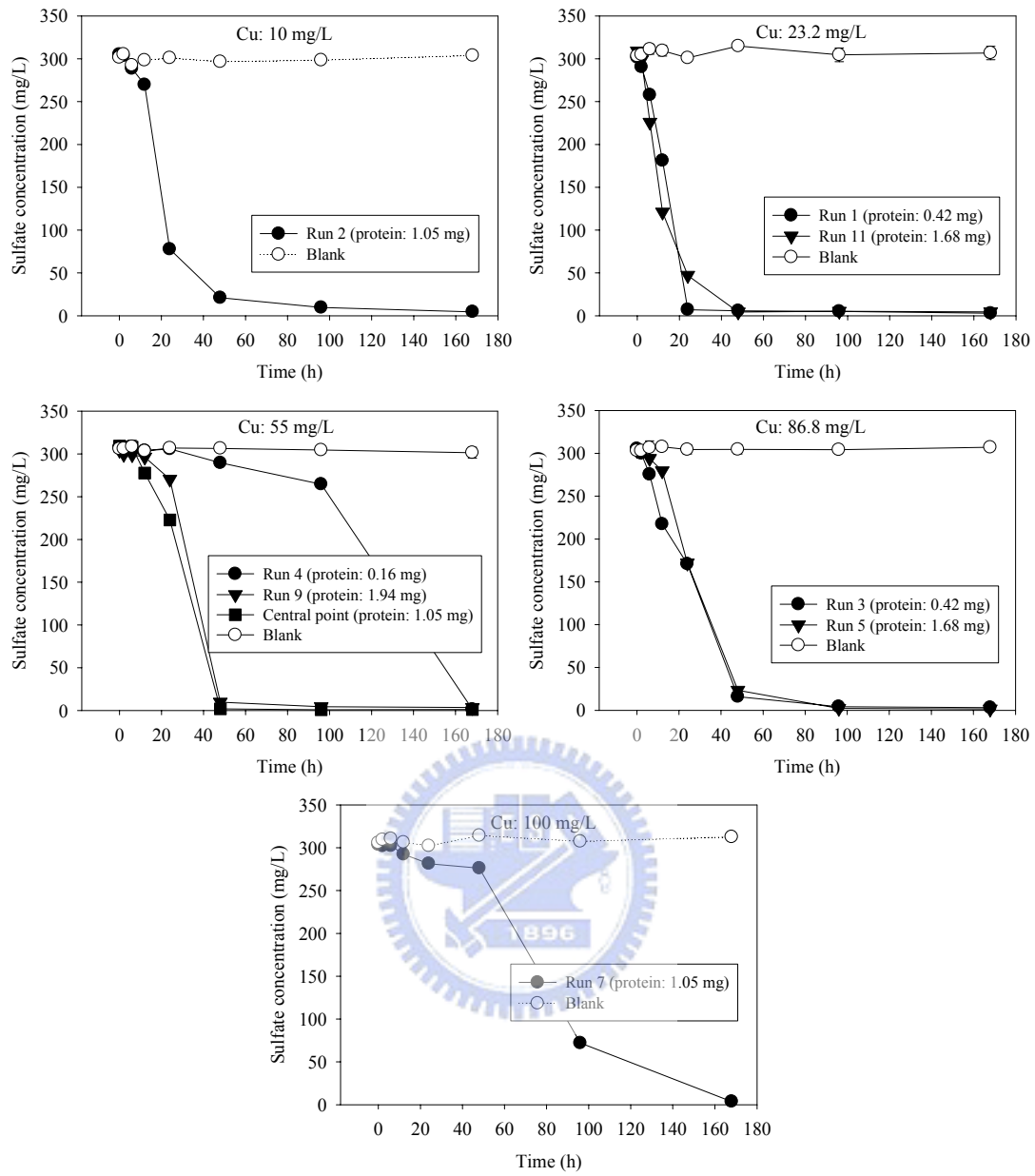


Figure 4-3 Variation of sulfate concentration in CCD experiment.

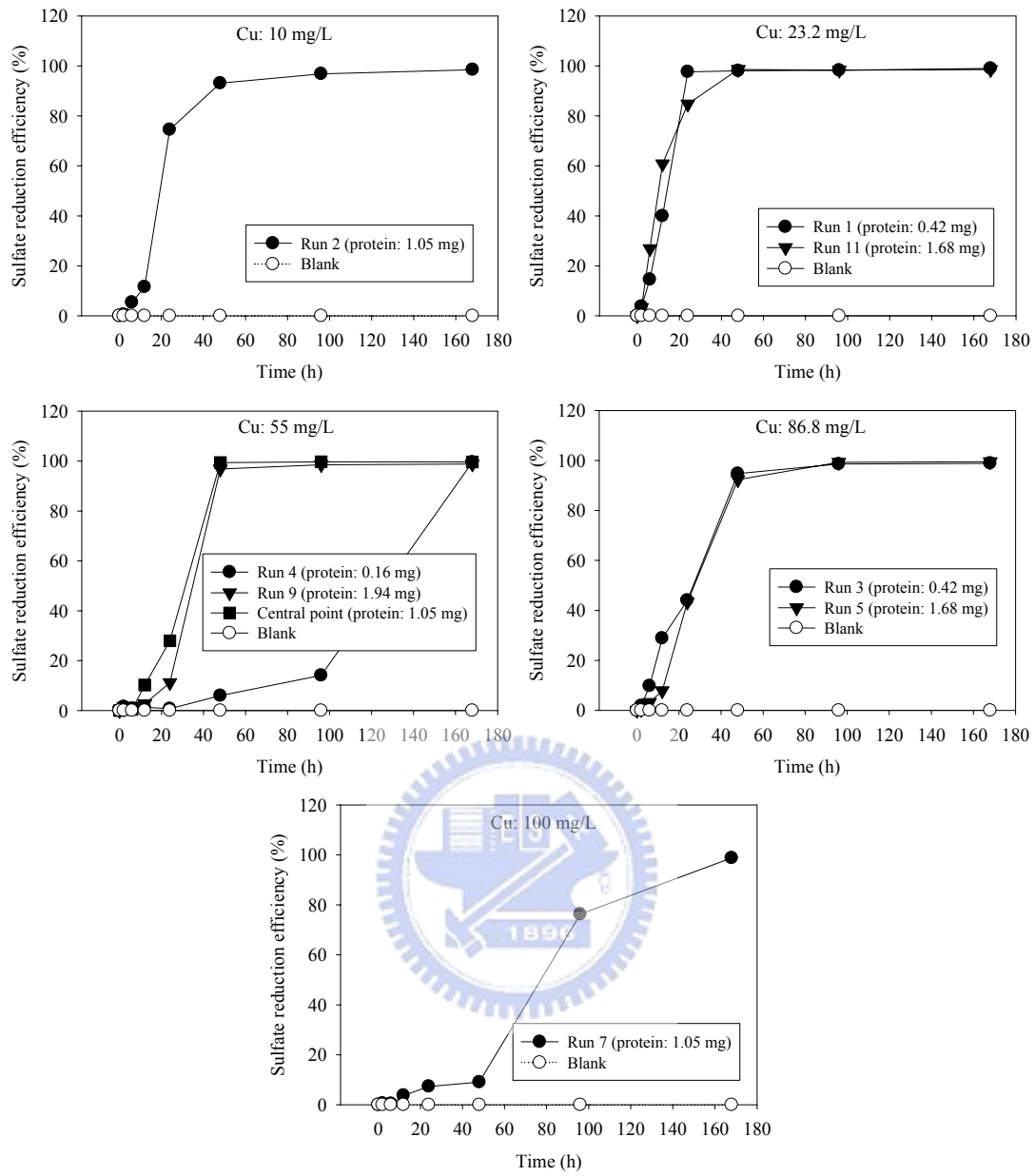



Figure 4-4 Variation of sulfate reduction efficiency in CCD experiment.

4.1.3 PVA 固定化菌體顆粒之菌體量變化

Figure 4-5 為測定各組之蛋白質含量換算成揮發性固體物 (volatile suspended solids, VSS) 之變化，綜觀 11 組結果顯示，隨著硫酸還原菌利用硫酸鹽為電子接受者進行生長，反應槽內的 VSS 都有增加的趨勢，不過由第 1、2、3、4、7 及中心點的組別來看，在密閉系統內，硫酸還原菌在反應槽中生長至硫酸鹽或碳源用盡後，便趨緩而維持穩定；但第 5、9 組由於添加的 PVA 固定化菌體顆粒量較多 (protein: 1.68 mg)，總 VSS 在實驗最後結束時，有略呈下降之趨勢，這是因為此實驗為密閉系統，硫酸還原菌生長所需的營養鹽無法維持較多 PVA 固定化菌體顆粒量的生長，而導致略呈下降之結果。

比硫酸鹽還原率 (specific sulfate reduction rate) 定義為單位時間內硫酸鹽消耗的總質量與微生物總質量之比值，其類似活性污泥之食微比，主要用於控制微生物生長狀況及基質的利用。適當的食微比可使微生物生長代謝指數達到最大；另一方面，較低的食微比讓微生物處於飢餓的狀態，使微生物處於內呼吸期及代謝不活潑的狀態。其計算方式如式 4-1：



比硫酸鹽還原率 (mg SO₄²⁻/mg VSS/h)

$$= \frac{\Delta CV}{\Delta t X_C} = \frac{(C_t - C_{t+\Delta t})V}{(t_{t+\Delta t} - t_t)(VS_t + VS_{t+\Delta t})/2} \quad (\text{式 4-1})$$

ΔC ：在 Δt 時段內硫酸鹽濃度之變化 (mg/L)。

V ：反應槽體積 (L)。

Δt ：時間的變化量 (h)。

X_C ：在 Δt 時段內平均微生物量 (mg VSS)。

Figure 4-6 為各組之比硫酸還原率之比較，結果顯示在相同的銅離子濃度條件下，微生物量 (蛋白質添加量) 會對比硫酸還原率造成影響，如第 1 組及第 11 組之銅離子濃度同為 23.2 mg/L，而蛋白質添加量分別為 0.42 及 1.68 mg，其比硫酸還原率最高分別達到 0.171 及 0.065 mg SO₄²⁻/mg VSS/h，意即微生物量愈大，則比硫酸還原率愈小，其它各組亦然；另一方面，在相同的微生物量下，銅離子濃度的高低亦會對比硫酸還原率造成影響，如第 1 組及第 3 組之蛋白質添加量同為 0.42 mg，而銅離子濃度分別為 23.2 及 86.8 mg/L，其比硫酸還原率最高

分別達到 0.171 及 0.142 mg SO₄²⁻/mg VSS/h，這表示重金屬銅離子會對硫酸還原菌產生不利生長之影響，意即重金屬銅離子濃度愈高，則比硫酸還原率愈小，其它各組也有上述之現象。

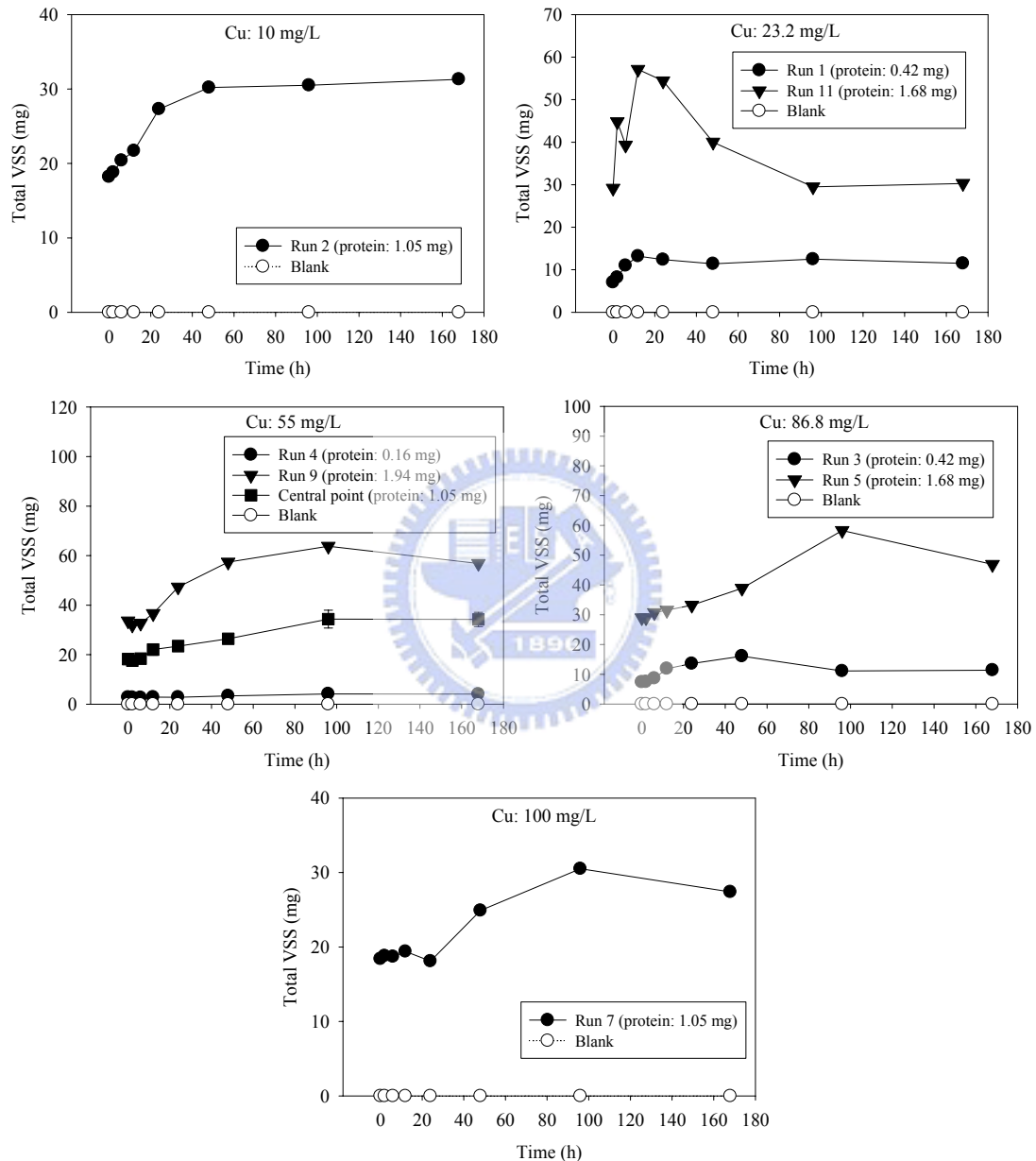


Figure 4-5 Variation of total VSS calculated from the protein concentration in CCD experimen.

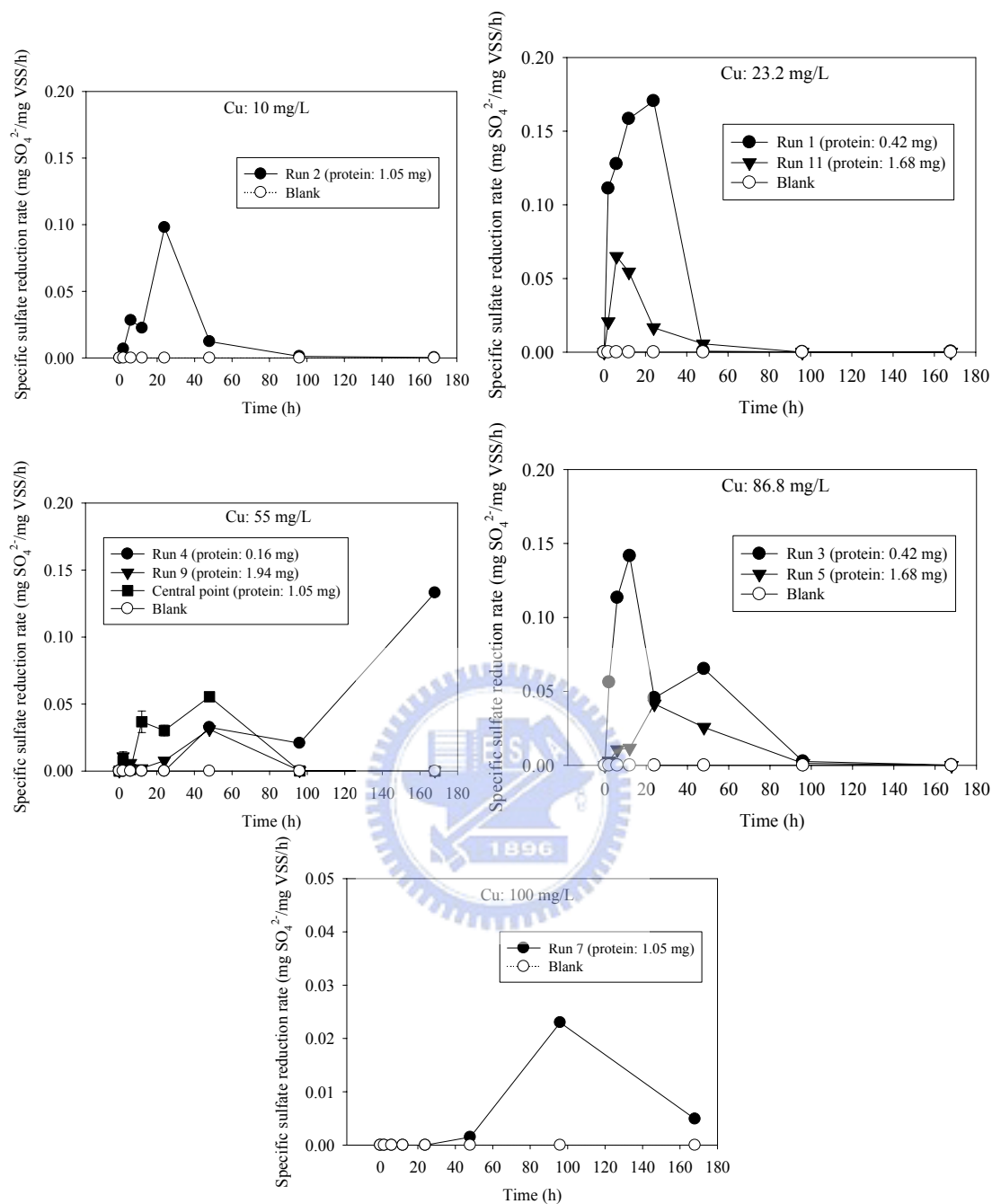


Figure 4-6 Variation of specific sulfate reduction rate in CCD experiment.

4.1.4 銅離子濃度變化

重金屬對於硫酸還原菌的生長具有毒性及抑制效應，其造成的影響舉凡如降低或阻斷硫酸還原菌的生物活性，此結果會對利用硫酸還原菌進行重金屬之生物處理造成不利的影響，因此，研究重金屬對硫酸還原菌生長的抑制及衝擊是絕對

必要的。

Figure 4-7 為各試驗組銅離子濃度變化，結果顯示除了第 4 組及第 7 組之外，其它試驗組在 48 小時內銅離子濃度均小於 1 mg/L 以下，可見硫酸還原菌在這些試驗組中能迅速地適應環境而生長。而第 4 組及第 7 組在反應 48 小時內銅離子濃度變化較為平緩，而在第 48 小時後銅離子濃度迅速減少，推測在此階段硫酸還原菌開始生長大幅產生硫離子，與廢水中銅離子發生反應形成不溶性金屬硫化物沉澱而導致此現象。其結果與硫酸鹽濃度變化趨勢亦同。

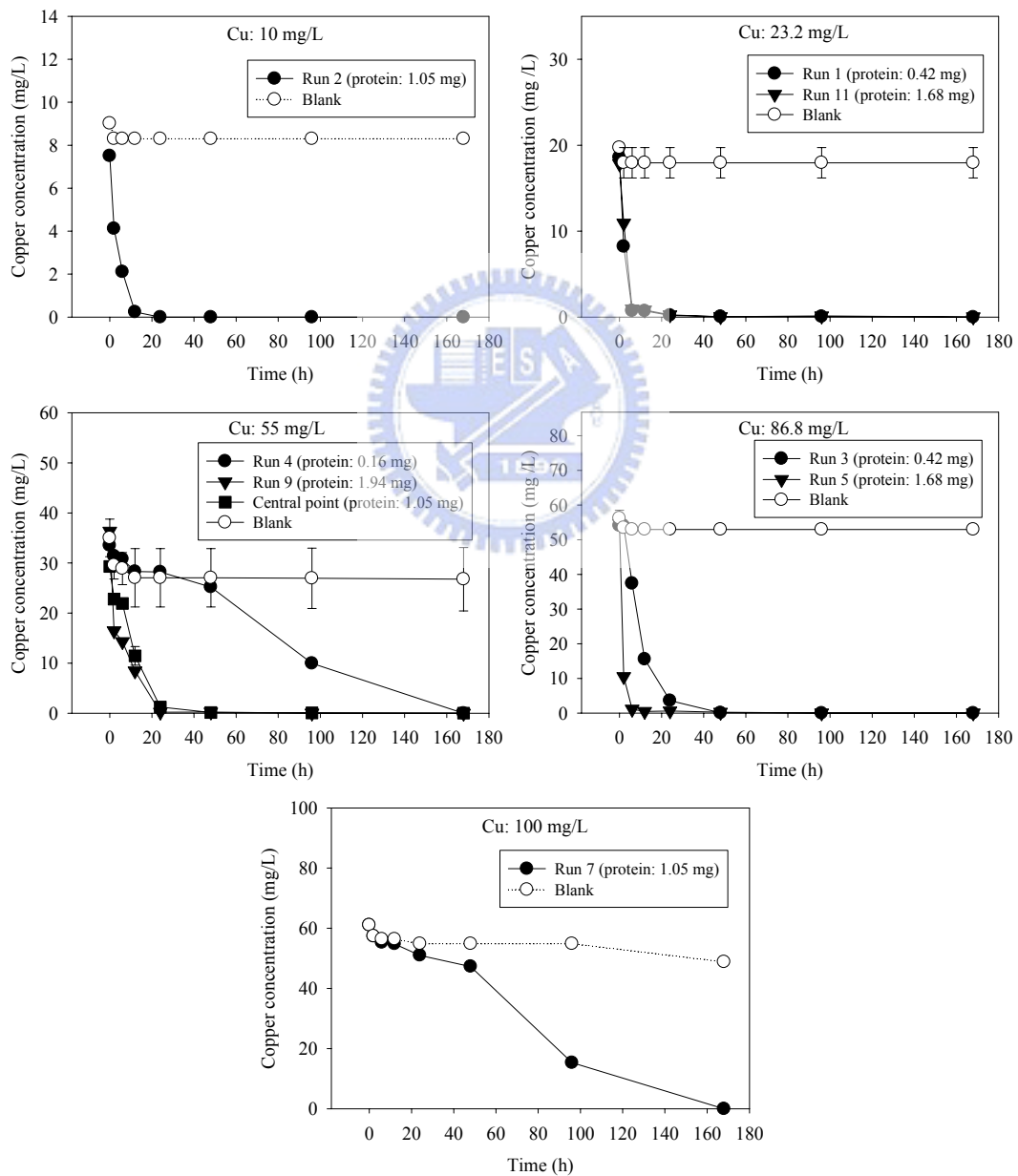


Figure 4-7 Variation of copper concentration in CCD experiment.

4.1.5 吸附作用與沉澱作用的探討

PVA 固定化菌體顆粒去除重金屬銅離子之交互作用相當複雜，其作用機制主要可分為物理化學作用及生物作用二類，物理化學作用包括化學沉澱及 PVA 固定化菌體顆粒的吸附作用；而生物作用則包括生物沉澱作用等。本研究以對照組之銅離子去除率為物理化學沉澱（含吸附作用）量，計算各試驗組扣除物理化學沉澱（含吸附作用）量之銅離子去除量為生物沉澱量，其相關計算如下：

$$\text{物理化學沉澱 (含吸附作用) 量 (\%)} = \frac{Cu_i - Cu_b}{Cu_i} \times 100 \quad (\text{式 4-2})$$

$$\text{生物沉澱量 (\%)} = \frac{Cu_b - Cu_{PVA}}{Cu_i} \times 100 \quad (\text{式 4-3})$$

Cu_i ：各試驗組初始之銅離子濃度 (mg/L)

Cu_b ：PVA 空白顆粒對照組各反應時間之銅離子濃度 (mg/L)

Cu_{PVA} ：PVA 固定化菌體顆粒試驗組各反應時間之銅離子濃度 (mg/L)

根據式 4-2、式 4-3 可計算出各組之銅離子的物理化學沉澱及生物沉澱量，如 Figure 4-8 所示，結果顯示各組銅離子之物理化學沉澱在反應開始 12 小時內便全部達到平衡，之後至第 168 小時實驗結束前一直維持穩定沒有明顯的變化，各組之銅離子物理化學沉澱量依不同初始之銅離子濃度而有不同，其物理化學沉澱量介於 17.0-64.6%。而各組（除了第 4 組及第 7 組之外）之銅離子生物沈澱量，在反應 24 小時內便全部達到平衡，之後至第 168 小時實驗結束前一直維持穩定沒有明顯的變化，其生物沉澱量介於 35.4-83%。至於第 4 組於反應第 168 小時才達到最高的生物沉澱量 55.6%；而第 7 組亦於反應第 168 小時才達到最高的生物沉澱量 48.9%，此 2 組之生物沉澱量不高及生物沉澱時間延後之現象，推測原因為銅離子因 PVA 固定化菌體顆粒之吸附作用及對硫酸還原菌產生毒性抑制作用所致。

對於 PVA 固定化菌體顆粒對銅離子之吸附作用，本研究曾經進行相關的吸附實驗，選擇第 5 組在同樣條件下來進行吸附實驗，但對於此吸附實驗則不添加硫酸鹽以阻斷硫酸還原菌之生長，吸附實驗之銅離子濃度變化如 Figure 4-9 (a) 所示。由圖可明顯看出，在反應時間第 2 小時，銅離子濃度有明顯的下降，濃度從 50 mg/L 迅速降為 37 mg/L，之後第 2 至 48 小時中銅離子濃度變化較為平緩，其濃度從 37 mg/L 降為 29 mg/L；而 PVA 空白顆粒對照組之結果與試驗組之銅濃

度變化趨勢亦同。比較吸附實驗與生物沉澱實驗對照組之結果 (Figure 4-9 (a) 及 (b))，生物沉澱實驗第 5 組之對照組其銅離子濃度約維持於 53 mg/L，吸附實驗對照組之銅離子濃度下降較多維持在 31 mg/L，顯示改變硫酸鹽濃度會影響系統之物理化學沉澱 (含吸附作用) 量。綜合實驗結果顯示，當只添加 PVA 空白顆粒之對照組，在 48 小時對重金屬銅離子的吸附量為 0.355 mg-Cu²⁺/g PVA beads，而添加 PVA 固定化菌體顆粒之試驗組，在 48 小時對重金屬銅離子的吸附量為 0.363 mg-Cu²⁺/g PVA beads。

楊 (2005) 也曾經進行過懸浮態硫酸還原菌對重金屬銅離子的吸附實驗，其結果顯示，經高溫高壓 (121°C, 1.5 Kg/cm²) 15 分鐘處理後的硫酸還原菌污泥對重金屬銅離子的吸附量為 1.2 mg-Cu²⁺/mg-MLVSS，而未經高溫高壓處理之硫酸還原菌污泥對重金屬銅離子的吸附量則為 1.28 mg-Cu²⁺/mg-MLVSS，由此可知在同時提供兩種去除重金屬途徑的情況下，當硫酸鹽尚未還原成硫離子與銅離子結合沉澱時，有些銅離子便被微生物所吸附，造成部份銅離子已被去除。

4.1.6 硫離子濃度變化及硫質量平衡計算

為確認硫酸還原菌消耗硫酸鹽濃度而產生的硫離子是否足夠與銅離子結合成金屬硫化物沉澱，本研究係採用化學當量 (stoichiometric) 的計算方式，計算理論上生物沉澱與試驗組等量的銅離子濃度時所消耗之硫酸鹽濃度，並與試驗組之結果做比較，其化學關係式 (式 4-4) 及計算方式如下：

以第 11 組為例：

初始硫酸鹽濃度 = 309 mg/L，初始銅離子濃度 = 23.2 mg/L，

第 0 小時實驗之硫酸還原率 = 0%，銅離子之生物沉澱量 = 6.55%；

第 2 小時實驗之硫酸還原率 = 3.31%，銅離子之生物沉澱量 = 24.91%

在第 2 小時實際消耗之硫酸鹽濃度 = (3.31-0)% × 309 mg/L = 10.2 mg/L

在第 2 小時實際沉澱之銅離子濃度 = (24.91-6.55)% × 23.2 mg/L = 4.26 mg/L

因銅離子之去除乃因生物沉澱作用，其反應方程式如式 4-4 所示 (Cabrera *et al.*, 2006)：



所以沉澱 4.26 mg/L 銅離子所需要的硫離子濃度 = (4.26 mg/L/63.5 g/mole) × 32 g/mole = 2.14 mg/L

理論上消耗硫酸鹽之濃度 = $(2.14 \text{ mg/L}/32 \text{ g/mole}) \times 96 \text{ g/mole} = 6.42 \text{ mg/L}$

第 11 組在 2 小時實驗消耗之硫酸鹽濃度為 10.2 mg/L 與理論值 6.42 mg/L 做比較，証實實驗所消耗之硫酸鹽濃度能產生足夠的硫離子與銅離子結合形成金屬硫化物，其它各組在各反應時間點之實驗及理論消耗硫酸鹽濃度，如 Table 4-1 所示。結果顯示除了在第 1、2、5、9 和中心點之試驗組的第 2 小時及第 5、9 和中心點之試驗組的第 6 小時，其消耗硫酸鹽濃度比理論計算值來的小之外，其它試驗組在各反應時間點之實驗消耗硫酸鹽濃度比理論計算值來的大。至於實驗消耗硫酸鹽濃度比理論計算值來的小的原因，可能是以硫酸鹽被還原量換算成硫離子產量之誤差，及 PVA 固定化菌體顆粒對銅離子吸附作用的影響所造成的。



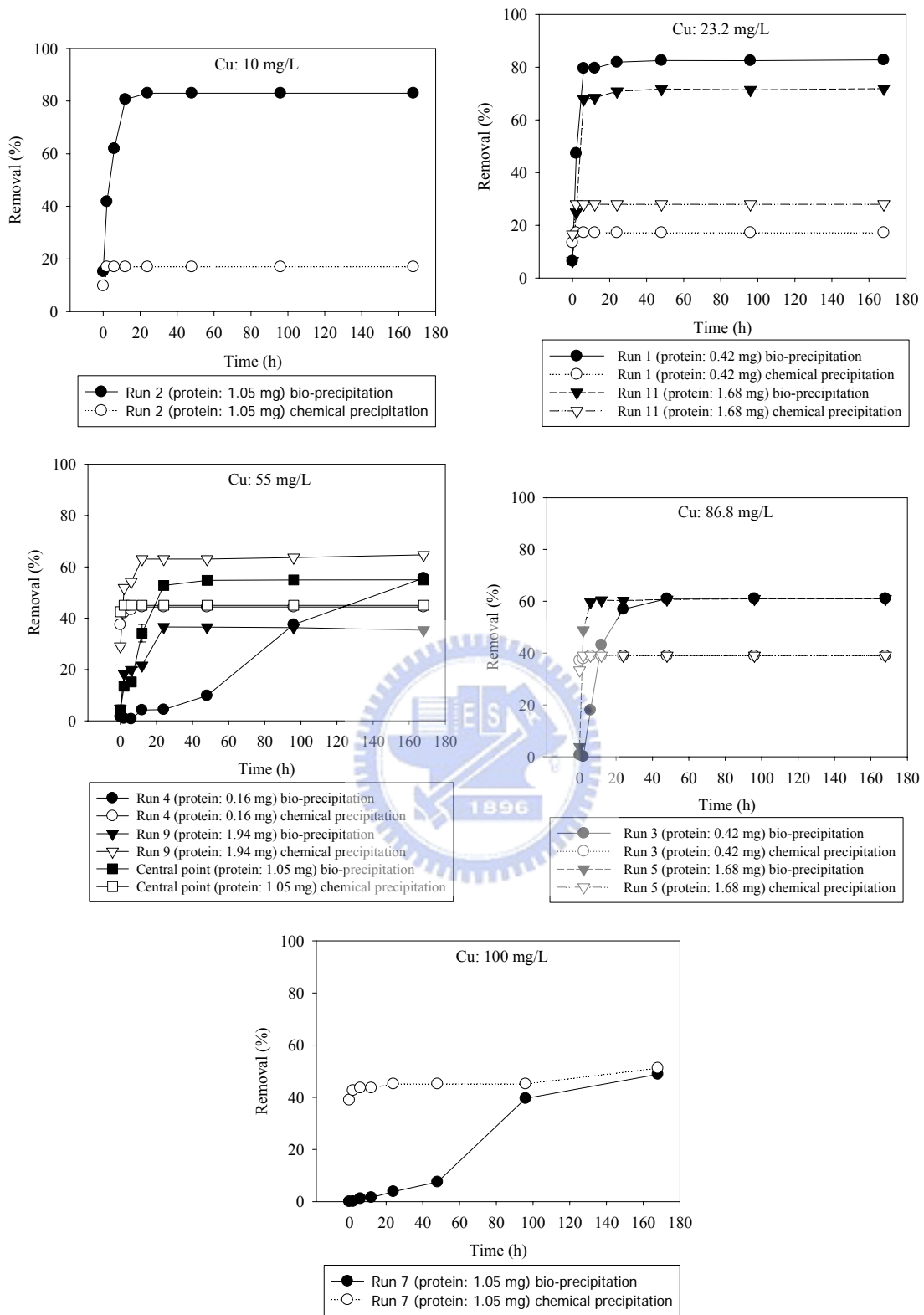
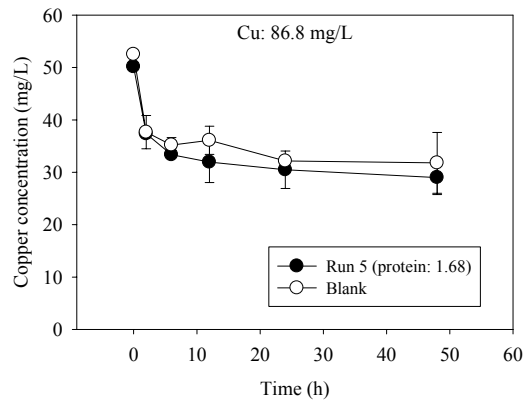
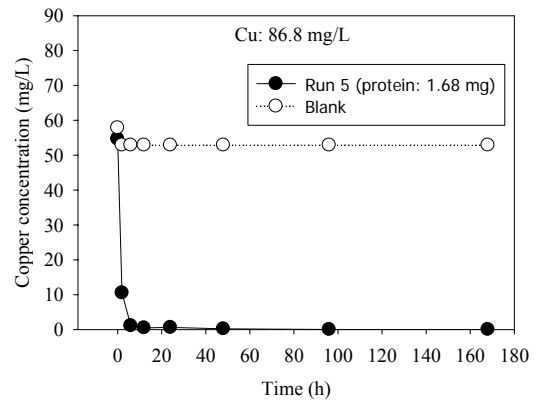


Figure 4-8 Variation of biological copper removal in CCD experiment.



(a) adsorption study (without sulfate)



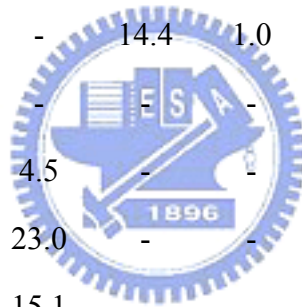
(b) bioprecipitation study (with sulfate)

Figure 4-9 Comparisons of variation of copper concentration with adsorption study and bioprecipitation study (Run 5).



Table 4-1 Experimental and theoretical (stoichiometric) comparisons of sulfate reduction concentration in CCD experiments

T (h)	Run 1		Run 2		Run 3		Run 4		Run 5		Run 7		Run 9		Run 11		Central point	
	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²	Exp. ¹	Theo. ²
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	11.3	14.35	1.7	4.0	-	-	-	-	1.1	59.2	-	-	4.8	11.2	10.2	6.4	1.8	7.7
6	32.7	11.30	14.8	3.0	24.3	23.5	-	-	8.4	14.2	-	-	0.5	1.3	72.9	15.0	0.5	1.3
12	76.7	0.03	18.9	2.8	58.1	33.0	-	-	14.4	1.0	-	-	2.8	1.4	104.8	0.2	29.3	15.8
24	174.0	0.79	192.0	0.4	46.5	18.1	-	-	-	-	10.9	3.4	25.8	12.5	73.9	0.8	54.9	16.2
48	-	-	-	-	154.8	5.3	16.2	4.5	-	-	5.2	5.6	-	-	42.9	0.3	220.9	1.7
96	-	-	-	-	-	-	25.0	23.0	-	-	204.1	48.4	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-	263.2	15.1	-	-	68.3	14.1	-	-	-	-	-	-



All concentrations are in mg/L

¹Exp.: experimental sulfate reduction concentration.

²Theo.: theoretical required sulfate concentration for bio-precipitation of copper.

Figure 4-10 為各組的硫離子濃度變化，由圖可知各試驗組之硫離子的變化隨著硫酸還原作用的進行而增加，其中第 2、4、5 及 7 試驗組硫離子濃度隨著反應時間增加而呈上升趨勢，其最高硫離子濃度介於 34.8-57.2 mg/L，而第 3、9、11 及中心點各試驗組之最高硫離子濃度介於 42.4-55.6 mg/L，但隨著反應時間增加而呈先上升後下降之趨勢，這乃是因為當硫酸還原率達極限時，硫離子的產生濃度亦達最高，隨後開始降低，推測硫離子損失的原因乃是原本吸附在微生物表面的銅離子與後續產生的硫離子結合產生沉澱作用而造成硫離子的減少 (楊，2005)，或者是硫離子與重金屬產生的金屬硫化物質亦會阻礙碳源及硫酸鹽進入微生物體內與作用酵素結合的途徑 (Utigter *et al.*,2003)，其結果亦使後續硫酸還原作用受到抑制。

然而在所有試驗組中，以第 2 組在第 168 小時所產生的硫離子濃度最高，達 57.2 mg/L。反應槽中產生硫離子之理論濃度可藉由初始及最終之硫酸鹽濃度差加以計算得知，其化學關係式如式 4-5 所示 (Cabrera *et al.*, 2006)：



理論上消耗 1 莫耳硫酸鹽產生 1 莫耳硫離子，若換算成 mg/L 之單位則關係式如下所示：

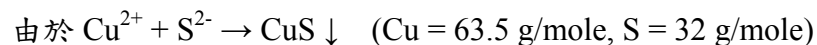
$$\text{硫離子理論濃度 (mg/L)} = 1/3 (\text{SO}_4^{2-}{}_i - \text{SO}_4^{2-}{}_f)$$

其中 $\text{SO}_4^{2-}{}_i$ 表初始之硫酸鹽濃度 (mg/L)； $\text{SO}_4^{2-}{}_f$ 表最終硫酸鹽濃度 (mg/L)。

由第 2 組第 168 小時之理論硫離子濃度 = $1/3 (305.1-4.7) = 100.1 \text{ mg/L}$

與分析之硫離子濃度 57.2 mg/L 仍有些差距。若考慮與銅離子結合成金屬硫化物沉澱而損失的硫離子濃度 (假設銅離子生物沉澱的部份皆與硫離子結合形成金屬硫化物有關)，其相關計算如下：

第 2 組初始銅離子濃度 = 10 mg/L，其中因生物沉澱去除的銅離子為 83%



可知生物沉澱去除銅離子之毫莫耳數 = $10 \text{ mg/L} / 63.5 \text{ g/mole} \times 83\% = 0.1307 \text{ mmole}$

損失掉的硫離子濃度 = $0.1307 \text{ mmole} \times 32 \text{ g/mole} = 4.18 \text{ mg/L}$

即使考慮因銅離子而損失的硫離子濃度，加總後硫離子濃度為 61.38 mg/L，其回收率 (recovery) 為 61.3%，其它各試驗組之硫質量平衡計算如 Table 4-2 所示，由表可知各試驗組硫質量平衡計算之回收率介於 59.4-79.9%，推測可能原因是硫

離子與培養基內鐵離子形成硫化鐵沉澱，以及形成硫化氫揮發和在採樣時硫離子暴露在空氣而造成損失有關 (Jong and Parry, 2003)。

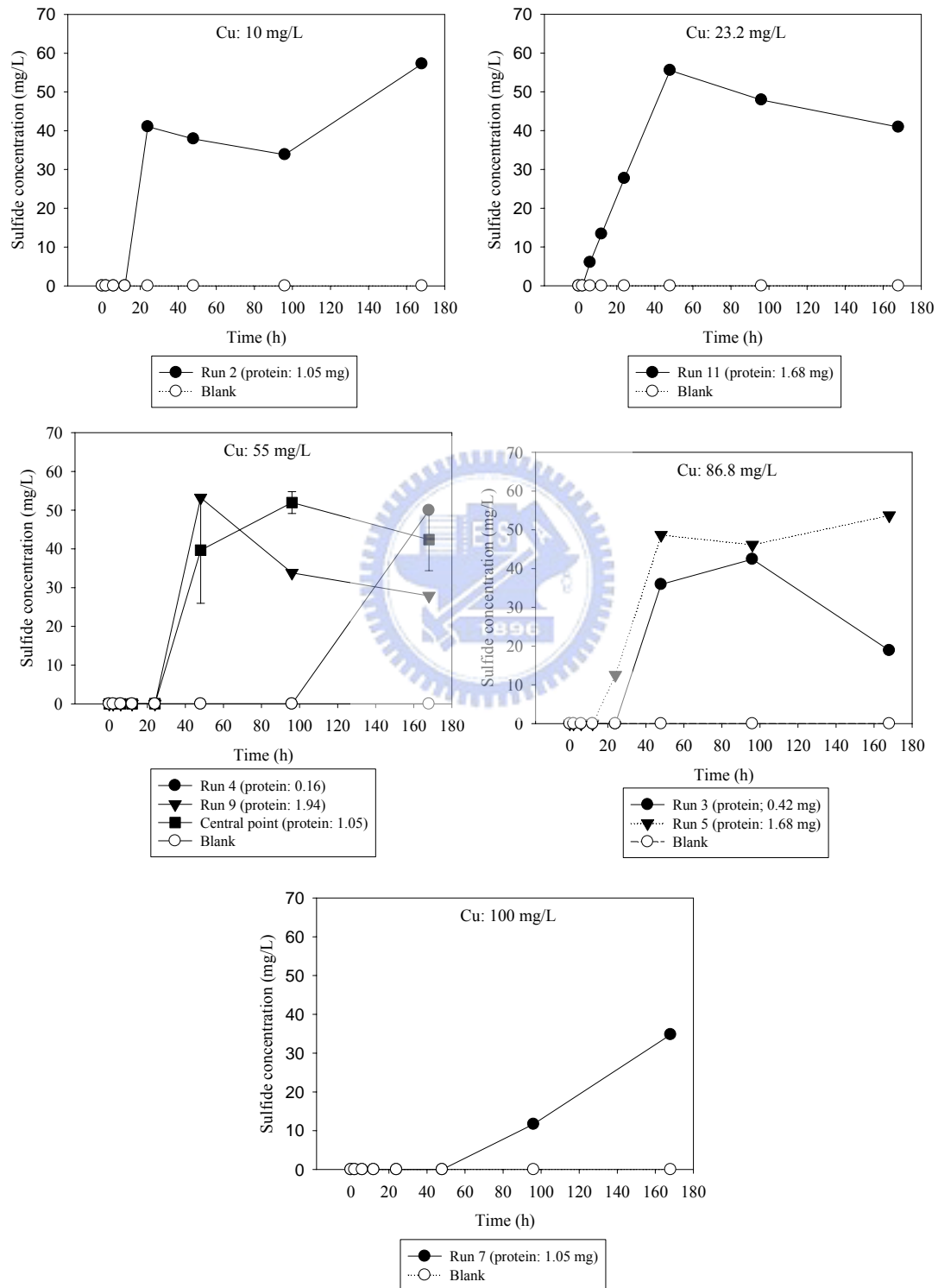


Figure 4-10 Variation of sulfide production in CCD experiment.

Table 4-2 Experimental and theoretical comparisons of theoretical sulfide and measured sulfide in experiments

Run	Sulfate concentration (mg/L)		Theory sulfide production (mg/L)	Max. sulfide production (mg/L)	Initial copper concentration (mg/L)	Bio. Copper removal ¹ (%)	S _{metal} ² (mg/L)	Recovery (%)
	Initial	Final						
2	305.1	4.7	100.1	57.2	10	83.0	4.2	61.3
3	305.4	3.2	100.7	42.4	86.8	61.1	26.7	68.6
4	307.9	1.3	102.2	50.0	55	55.6	15.4	64.0
5	303.4	1.6	100.6	53.7	86.8	60.9	26.6	79.9
7	303.7	3.8	100.0	34.8	100	48.9	24.6	59.4
9	304.3	3.6	100.2	53.2	55	35.4	9.8	62.9
11	309	4.6	101.5	55.6	23.2	71.9	8.4	63.0
Central point	309.3	1.1	102.7	52.0	55	54.9	15.2	65.4

¹Bio. copper removal (%) = $\frac{Cu_{b(f)} - Cu_{PVA(f)}}{Cu_i} \times 100$, Cu_i : Initial copper concentration (mg/L), $Cu_{b(f)}$: Final blank copper concentration (mg/L),

$Cu_{PVA(f)}$: Final copper concentration (mg/L)

²S_{metal} = Sulfide used in precipitating copper from solution.



4.2 中央合成設計實驗最佳化分析

4.2.1 評估指標

在本研究中選擇銅離子生物沉澱量 (R_1)、銅離子物理化學沉澱 (含吸附作用) 量 (R_2)、比硫酸還原率 (R_3) 及硫酸鹽還原之反應速率常數 (R_4) 四個評估指標, 並以這些指標之實驗結果搭配反應曲面法分析找出最佳的評估指標及最佳的操作條件。而各指標的計算結果如下:

(1) 銅離子生物沉澱量 (R_1):

計算每一試驗組之最終的銅離子生物沉澱量 (%)

$$R_1 = \frac{Cu_{b(f)} - Cu_{PVA(f)}}{Cu_i} \times 100\% \quad (\text{式 4-6})$$

Cu_i : 各試驗組初始之銅離子濃度 (mg/L)

$Cu_{b(f)}$: PVA 空白顆粒對照組之最終的銅離子濃度 (mg/L)

$Cu_{PVA(f)}$: PVA 固定化菌體顆粒試驗組之最終的銅離子濃度 (mg/L)

(2) 銅離子的物理化學沉澱 (含吸附作用) 量 (R_2):

計算每一試驗組之最終的銅離子物理化學沉澱 (含吸附作用) 量 (mg Cu/g bead)

$$R_2 = \frac{(Cu_i - Cu_{b(f)}) \times V}{W} \quad (\text{式 4-7})$$

Cu_i : 各試驗組初始之銅離子濃度 (mg/L)

$Cu_{b(f)}$: PVA 空白顆粒對照組之最終的銅離子濃度 (mg/L)

V : 反應槽之體積 (L)

W : 各試驗組 PVA 固定化菌體顆粒量 (g)

(3) 比硫酸還原率 (R_3):

計算每一試驗組之最終的比硫酸還原率 (mg SO_4^{2-} /mg VSS/d)

$$R_3 = \frac{(SO_4^{2-}_i - SO_4^{2-}_f) \times V}{[(X_i + X_f) / 2] \times T} \quad (\text{式 4-8})$$

$SO_4^{2-}_i$: 各試驗組初始硫酸鹽濃度 (mg/L)

$SO_4^{2-}_f$: 各試驗組最終硫酸鹽濃度 (mg/L)

X_i : 各試驗組初始微生物量 (mg)

X_f : 各試驗組最終微生物量 (mg)

V ：反應槽之體積 (L)

T ：反應時間 (d)

(4) 反應速率常數 (R_4)：

計算每一試驗組之硫酸鹽還原的反應速率常數 (h^{-1})

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (\text{式 4-9})$$

將式 4-9 積分之後可得式 4-10

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{式 4-10})$$

然後每一試驗組取 $\ln C$ 對反應時間 t 作圖，可得斜率 k 值，為此試驗組之反應速率常數，意即：

$$R_4 = k \quad (\text{式 4-11})$$

其中 C 為試驗組之硫酸鹽濃度 (mg/L)、 k 為試驗組之反應速率常數 (h^{-1}) 及 t 為反應時間 (h)。

按照統計軟體 Minitab 所排列的實驗組數及實驗結果如 Table 4-3 所列，經 ANOVA 分析結果如 Table 4-4 所示，當 α 為 0.05 時定義 P 值小於 0.05 為顯著性影響因子，信賴水準為 95%，而由 Table 4-4 可看出，銅離子生物沉澱量 (R_1) 及物理化學沉澱 (含吸附作用) 量 (R_2) 的 P 值均大於 0.05，在統計意義上表示 PVA 固定化菌體顆粒量及銅離子濃度兩項操作因子之交互作用對於 R_1 及 R_2 兩評估指標並不顯著；至於比硫酸還原率 (R_3) 及硫酸還原之反應速率常數 (R_4) 的 P 值均小於 0.05，在統計意義上表示 PVA 固定化菌體顆粒量及銅離子濃度兩項操作因子之交互作用對於 R_3 及 R_4 兩評估指標則為顯著。

經反應曲面分析後結果顯示， R_3 評估指標之反應曲面及等高線圖如 Figure 4-11 及 Figure 4-12 所示，由反應曲面圖之曲面的趨勢可知，曲面沒有收斂，所以沒有最佳值的存在，而等高線圖亦成同樣之趨勢，曲線沒有收斂，所以也沒有最佳值的存在，由此可知當以 R_3 為評估指標時，在本研究中所設定的操作因子無法找出最佳之操作條件。由 R_4 評估指標之反應曲面及等高線圖如 Figure 4-13 及 Figure 4-14 所示，反應曲面圖圖形彎曲的趨勢，可看出有最大值的存在，而從圖型彎曲的幅度歸納出 PVA 固定化菌體顆粒量 (蛋白質添加量) 及銅離子濃度兩項操作參數對 R_4 評估指標的影響，隨著蛋白質添加量增加也就是微生物量的增加，此時反應速率常數呈現先升後降的趨勢，當蛋白質添加量大於 1.4 mg

之後，反應速率常數開始下降；而隨著銅離子濃度的增加，反應速率常數呈現先升後降的趨勢，當銅離子濃度大於 60 mg/L 之後，反應速率常數也明顯開始下降。至於等高線圖亦為收斂之曲線，這也意味著由等高線圖即可找出最佳之操作條件，當以 R_4 為評估指標時，即蛋白質添加量 1.12 mg (微生物濃度 136 mg VSS/L)，銅離子濃度 57.9 mg/L，且反應溫度在 $30\pm 2^\circ\text{C}$ 時，有最高硫酸鹽還原之反應速率常數 0.0423 h^{-1} 。故以下章節乃針對以 R_4 為評估指標時，對其統計分析結果做更進一步的探討。



Table 4-3 experimental results of the central composite design

StdOrder	Coded value		Natural value		Dependent variables			
	X ₁	X ₂	Protein amount of immobilized SRB by PVA (mg)	Copper concentration (mg/L)	R ₁ (%)	R ₂ (mg Cu/g bead)	R ₃ (mg SO ₄ ²⁻ /mg VS d ⁻¹)	R ₄ (h ⁻¹)
1	-1	-1	0.42	23.2	82.8	0.211	0.69	0.0280
2	0	-1.414	1.05	10.0	83.0	0.054	0.26	0.0271
3	-1	1	0.42	86.8	61.1	3.054	0.69	0.0310
4	-1.414	0	0.16	55.0	55.6	5.810	1.91	0.0276
5	1	1	1.68	86.8	60.9	0.581	0.17	0.0363
6	0	0	1.05	55.0	55.0	0.694	0.25	0.0420
7	0	1.414	1.05	100.0	48.9	1.849	0.28	0.0248
8	0	0	1.05	55.0	54.9	0.694	0.24	0.0459
9	1.414	0	1.94	55.0	35.4	0.607	0.14	0.0314
10	0	0	1.05	55.0	55.0	0.694	0.27	0.0387
11	1	-1	1.68	23.2	71.9	0.116	0.22	0.0268

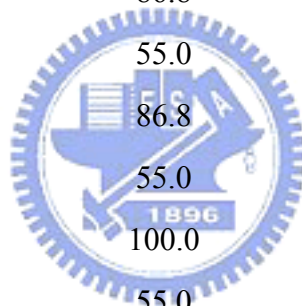


Table 4-4 Results of ANOVA analysis in CCD experiment

Responses	R-Sq (%)	P-value	Significant ¹
Biological copper removal, R ₁	78.6	0.0898	No
Chemical precipitation and adsorption, R ₂	82.21	0.0592	No
Specific sulfate reduction rate, R ₃	85.95	0.0343	Yes
Reaction rate constant, R ₄	85.13	0.0392	Yes

¹P-value < 0.05 is significant at $\alpha = 0.05$

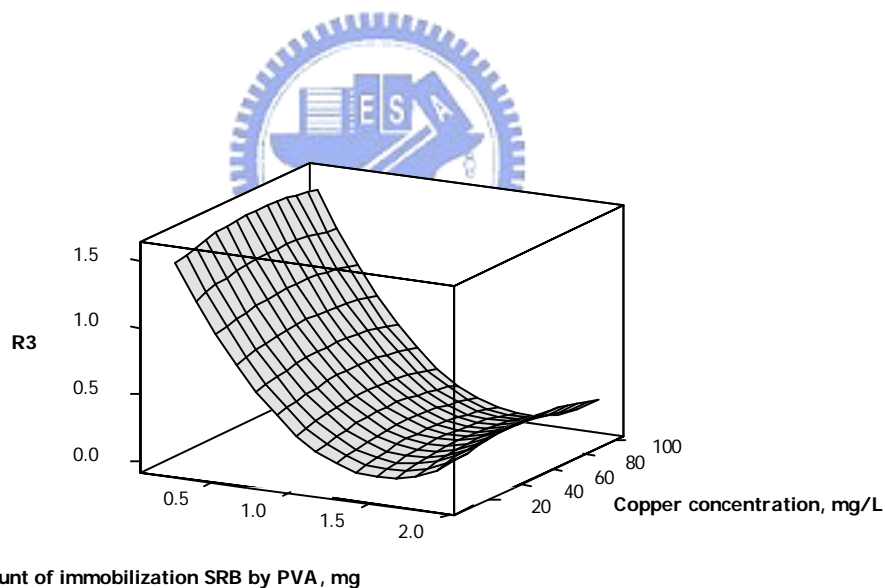


Figure 4-11 Response surface for specific sulfate reduction rate using RSM.

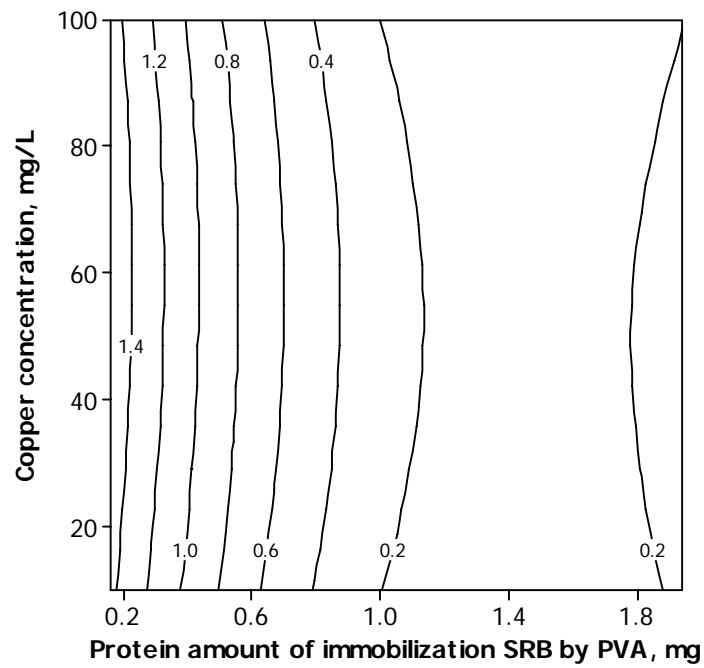


Figure 4-12 Contour plots for specific sulfate reduction rate using RSM.

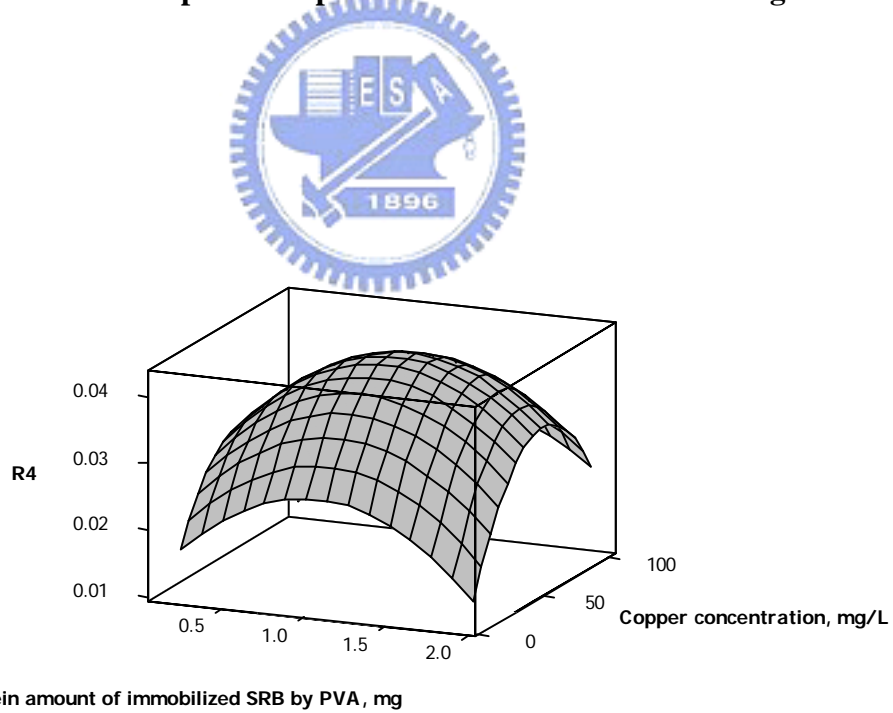


Figure 4-13 Response surface for reaction rate constant using RSM.

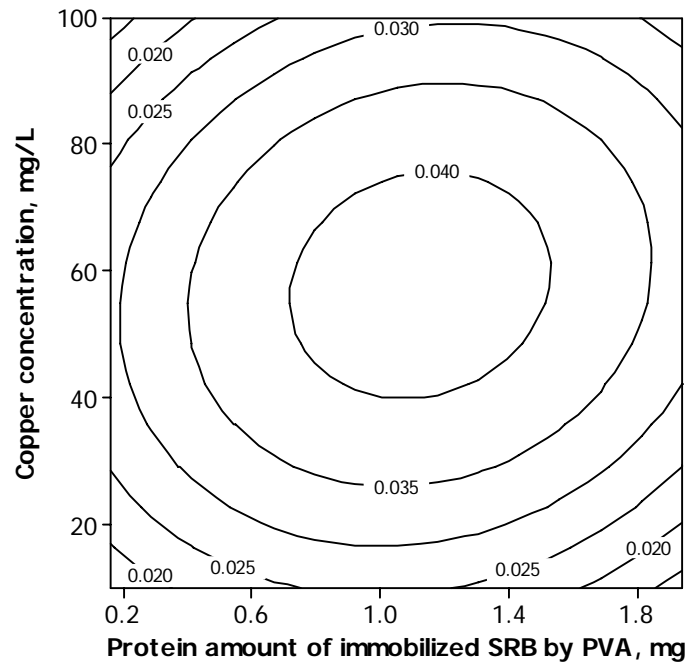


Figure 4-14 Contour plot for reaction rate constant using RSM.

4.2.2 配適二階模型之設計

硫酸鹽還原之反應速率常數 (R_4) 之變異數分析結果如 Table 4-5 所示，利用 P 值來判斷其顯著性，P 值定義上是以前有的樣本資料而言，能棄卻 (reject) 虛無假說 H_0 的最小顯著水準。當 α 為 0.05 時定義 P 值小於 0.05 為顯著性影響因子，信賴水準為 95%。因為兩次項的 P 值很小 (<0.05)，故可預測硫酸鹽還原之反應速率常數實驗結果適合配適二階反應曲面。而從回歸係數 Table 4-6 中可知反應速率常數的 R^2 為 85.1%，而修正後的 R^2 只有 70.3%，這通常是其中含過多非顯著因子使得 R^2 值降低，並造成 R^2 值與修正過後 R^2 值差異很大。此時一般會將非顯著因子篩除後，重新得到更佳的總變異比率，但在階層原理的限制下 (hierarchy principle，係指當模型中包含一高階項時必須保留組成高階項的所有低階項)，以致於無法將非顯著因子刪除，得到更佳的 R^2 值。不過反應速率常數的 R^2 值將近 85%，這表示由二階反應曲面設計所得的預測值與實際實驗值很接近。本次實驗設計結果所得之二階反應模型如式 4-12 所示。

$$Y = 5.021 \times 10^{-3} + 2.735 \times 10^{-2} X_1 + 7.57 \times 10^{-4} X_2 - 1.425 \times 10^{-2} X_1^2 - 7 \times 10^{-6} X_2^2 + 8.1 \times 10^{-5} X_1 X_2 \quad (\text{式 4-12})$$

Y : 反應速率常數 (h^{-1})

X₁ : PVA 固定化菌體顆粒量 (protein amount of immobilized SRB by PVA, mg)

X₂ : 銅離子濃度 (mg/L)

Table 4-5 Coefficient estimates by the regression for optimization study

Source	DF	Seq SS	Adi SS	Adj MS	F	P
Regression	5	0.000418	0.000418	0.000084	5.72	0.039
Linear	2	0.000022	0.000216	0.000108	4.70	0.032
Square	2	0.000385	0.000385	0.000193	13.20	0.010
Interaction	1	0.000011	0.000011	0.000011	0.72	0.414
Residual	5	0.000073	0.000073	0.000015		
Lack-of-Fit	3	0.000047	0.000047	0.000016	1.21	0.483
Pure Error	2	0.000026	0.000026	0.000013		
Total	10	0.000491				

Table 4-6 Estimated Regression Coefficients for reaction rate constant

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.005021	0.008564	0.586	0.583
X ₁ ¹	0.027353	0.010233	2.673	0.044
X ₂ ²	0.000757	0.000206	3.682	0.014
X ₁ * X ₁	-0.014253	0.004058	-3.512	0.017
X ₂ * X ₂	-0.000007	0.000002	-4.616	0.006
X ₁ * X ₂	0.000081	0.000095	0.850	0.434

R-Sq = 85.1%

¹X₁: Protein amount of immobilized SRB by PVA (mg)

²X₂: Copper concentration (mg/L)

4.2.3 模型適當性與常態性假設檢驗

如果模型正確且所有的假定都滿足，則其殘差配適值應該是無結構的，特別的是它們應該與任何其他變數包括所預測的反應是無相關的。一種簡易的檢驗就是畫出殘差對配適值的圖形如Figure 4-15所示，圖中並沒有不尋常的結構出現(如像漏斗型或麥克風型)，表示模型為正確且滿足所有的假定。但卻由左而右有逐漸分散的趨勢，不過搭配殘差的常態分佈圖來看，其結果仍然是滿足所有的假定。通常畫出殘差的直方圖可以檢驗常態假定，如果誤差項的假定被滿足，則這個直方圖應該看起來像一組來自中心為零的常態分配樣本。不幸的是當樣本小時經常發生相當的波動，使得溫和偏離常態的圖形並非一定意謂著嚴重違反假定，但大幅偏離常態卻是相當嚴重的事而需要進一步分析。建構一個殘差的常態機率圖如 Figure 4-16 所示，是一種非常有用的方法，結果顯示圖形皆成一條線，表示誤差分配的確是常態，亦即該實驗數據符合常態分佈性的假設。

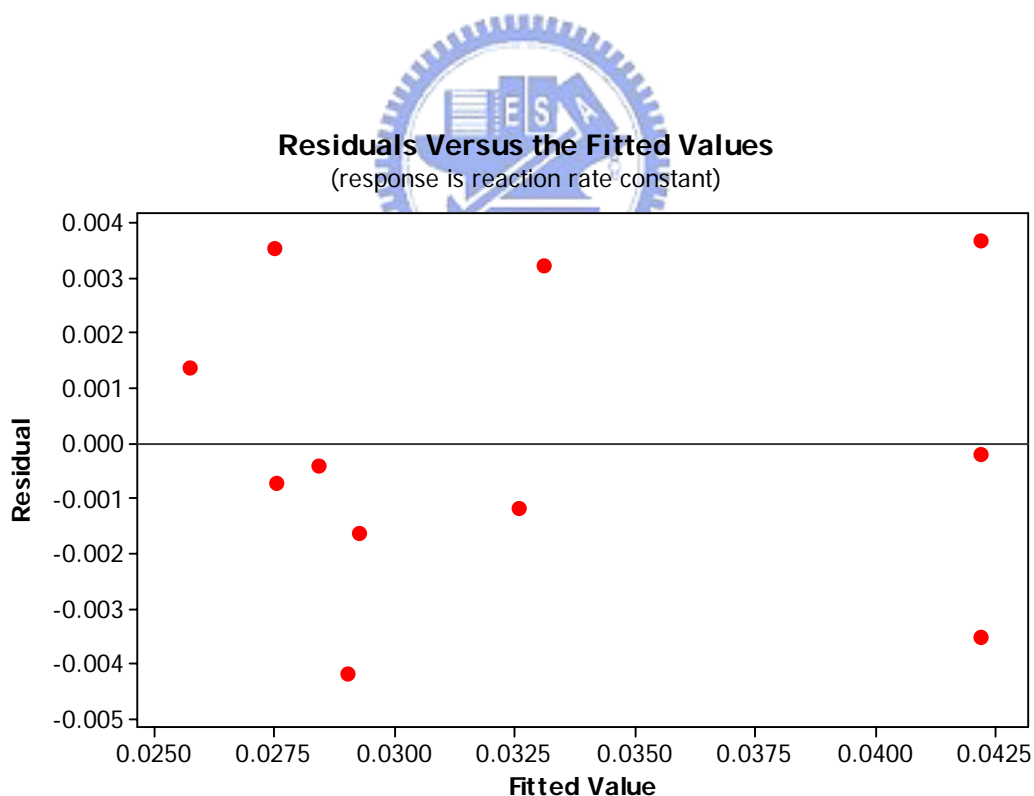


Figure 4-15 Residuals versus the fitted values for reaction rate constant

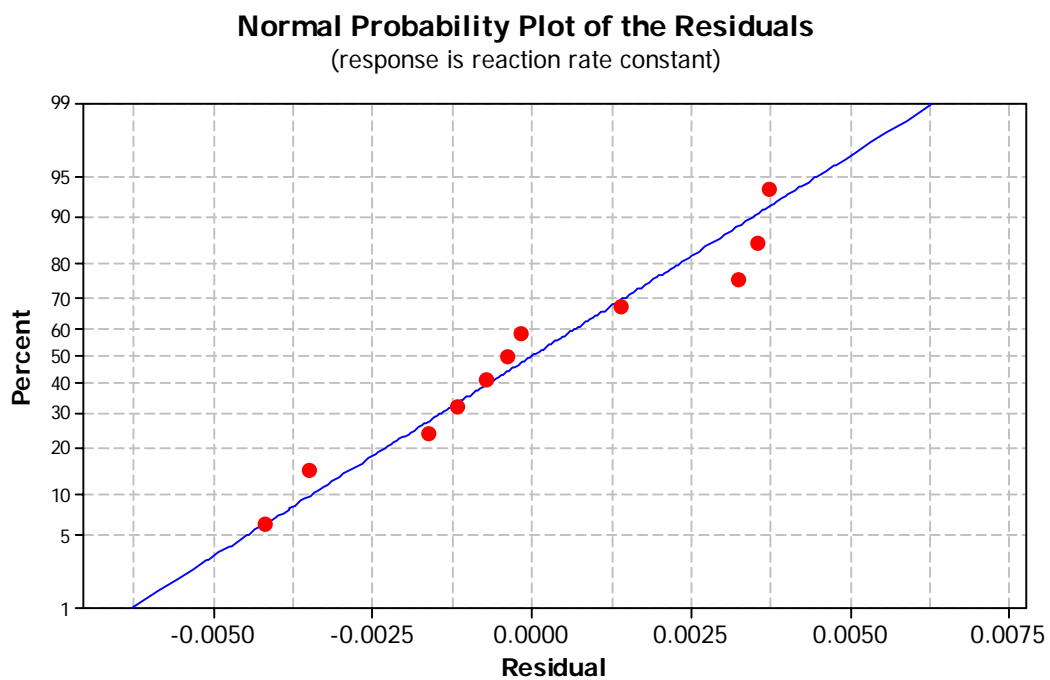


Figure 4-16 Normal probability plot of the residuals for reaction rate constant



第五章 結論與建議

本研究主要探討利用 PVA 包覆微生物量及銅離子濃度對生物沉澱系統硫酸還原效率之影響，並搭配反應曲面法分析找出最佳的評估指標及最佳的操作條件。本章節根據以上之實驗結果可歸納出幾點結論及建議。

5-1 結論

1. 在中央合成設計實驗中，所有 PVA 固定化菌體顆粒試驗組在第 168 小時，硫酸鹽還原率在 99% 以上，而銅離子濃度則小於 1 mg/L，與 PVA 空白顆粒之對照組實驗結果有明顯差異。
2. 在中央合成設計實驗中，結果顯示銅離子之物理化學沉澱（含吸附作用）量介於 17.0-64.6%，而生物沉澱量介於 35.4-83%，由此可知重金屬銅離子去除途徑除了生物沉澱之外還包括物化作用的影響。
3. 實驗結果顯示各組最高硫離子濃度介於 34.8-57.2 mg/L，並由硫質量平衡計算得知，其回收率介於 59.4-79.9%。
4. 經 ANOVA 分析結果顯示， R_4 評估指標為顯著。而 RSM 分析結果顯示其反應曲面呈收斂之趨勢，有最佳值存在，當微生物濃度 136 mg VSS/L（相當蛋白質添加量 1.12 mg），銅離子濃度 57.9 mg/L，且反應溫度 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 時，有最高硫酸鹽還原之反應速率常數 0.0423 h^{-1} 。經由迴歸係數分析得知硫酸鹽還原之反應速率常數配適二階反應模型，其 R^2 值為 85.1%。

5-2 建議

1. 可嘗試不同 PVA 固定化之條件，如固定化材料及固定化方法對 PVA 固定化菌體顆粒之生物活性及機械強度的影響，可進一步試驗分析。
2. 可嘗試以連續反應槽試驗不同操作條件，如 PVA 固定化菌體顆粒添加量、HRT 及不同重金屬種類和濃度，對其硫酸還原效率及重金屬去除率之影響做更深入之研究。
3. 可嘗試 PVA 固定化菌體顆粒對不同重金屬之吸附研究，並區分出生物沉澱、化學沉澱及顆粒表面吸附作用之差異性。

第六章 參考文獻

1. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, 2005.
2. Azabou, S., Mechichi, T. and Sayadi, S. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Minerals Engineering*, 20, pp. 173-178, 2007.
3. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254, 1976.
4. Cabrera, G., Perez, R., Gomez, J. M., Abalos, A. and Cantero, D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* Strains. *Journal of Hazardous Materials*, 135, pp. 40-46, 2006.
5. Chang, C. C. and Tseng, S. K. Immobilization of *Alcaligense eutrophus* using PVA crosslinked with sodium nitrate. *Biotechnology techniques*, 12, pp. 865-868, 1998.
6. Chang, I.S., Shin, P. K. and Kim, B. H. Biological treatment of acid mine drainage under sulfate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. *Water Research*, 34, pp. 1269-1277, 2000.
7. Chen, B. Y., Utgikar, V. P., Stephen, M. H., Tabak, H. H., Bishop, F. D. and Govind, R. Studies on biosorption of zinc (II) and copper (II) on *Desulfovibrio desulfuricans*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, pp. 11-18, 2000.
8. Chen, K. C., Lee, S. C., Chin, S. C. and Houn, J. Y. Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated PVA-immobilized microorganisms. *Enzyme Microbiology Technology*, 23, pp. 311-320, 1998.
9. Cheng, K. C. and Lin, Y. F. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Enzyme Microbiology Technology*, 16, pp. 79-83, 1994.
10. Cohen, Y. Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, 77, pp. 257-274, 2001.
11. Christensen, B., Laake, M. and Lien, T. Treatment of acid mine water by

- sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Research*, 30, pp. 1617-1624, 1996.
12. Chuichulcherm, S., Nagpal, S., Peeva, L. and Livingston, A. Treatment of metal-containing wastewaters with a novel extractive membrane reactor using sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, pp. 61-68, 2001.
 13. Diaz, M. J., Eugenio, M. E., Timenez, L., Madejon, E. and Cabrera, F. Modelling vinasse/cotton waste ratio incubation for optimum composting. *Chemical Engineering Journal*, 93, pp. 233-240, 2003.
 14. Diels, L., Spaans, P. H., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Ryngaert, A., Wouters, H., Walter, E., Winters, J., Macaskie, L., Finlay, J., Pernfuss, B., Woebking, H., Pümpel, T. and Tsezos, M. Heavy metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. *Hydrometallurgy*, 71, pp. 235-241, 2003.
 15. El Bayoumy, M., Bewtra, J. K., Ali, H. I. and Biswas, N. Removal of heavy metal and COD by SRB in UAFF reactor. *Journal of Environmental Engineering*, 125, pp. 532-539, 1999.
 16. Hao, O. J., Huang, L., Chen, J. M. and Buglass, R. L. Effects of metal additions on sulfate reduction activity in wastewater. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 46, pp. 197-212, 1994.
 17. Jong, T. and Parry, D. L. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37, pp 3379-3389, 2003.
 18. Karnachuk, O. V., Kurochkina, S. Y., Nicomrat, D., Frank, Y. A., Ivasenko, D. A., Phyllipenko, E. A. and Tuovinen, O. H. Copper resistance in *Desulfovibrion* strain R2. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, pp. 99-106, 2003.
 19. Karri, S., Reyes, S. A. and Field, J. A. Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere*, 62, pp. 121-127, 2006.
 20. Liamleam, W. and Annachhatre, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25, pp. 452-463, 2007.
 21. Loka Bharathi, P. A., Sathe, V. and Chandramohan, D. Effect of lead, mercury and cadmium on sulfate-reducing bacteria. *Environmental Pollution*, 67, pp. 361-374, 1990.
 22. Long, Z., Huang, Y., Cai, Z., Cong, W. and Ouyang, F. Immobilization of

- Acidithiobacillus ferrooxidans* by a PVA-boric acid method for ferrous sulphate oxidation. *Process Biochemistry*, 39, pp. 2129-2133, 2004.
23. Malik, .A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30, pp. 261-278, 2004.
 24. Neculita, C. M., Zagury, G. J., and Bussiere, B. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *Journal of Environmental Quality*, 36, pp. 1-16, 2007.
 25. Radhika, V., Subramanian, S. and Natarajan, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: Bioprecipitation and characterization studies. *Water Research*, 40, pp. 3628-3636, 2006.
 26. Poulson, S. R., Colberg, P. J. S. and Drever, J. I. Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Geomicrobiology Journal*, 14, pp. 14-49, 1997.
 27. Rostron, W. M., Stuckey, D. C. and Young, A. A. Nitrification of high strength ammonia wastewater: comparative study of immobilization media. *Water Research*, 35, pp. 1169-1178, 2001.
 28. Song, Y. C., Piak, B. C., Shin, H. S. and La, S. J. Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater. *Water Science and Technology*, 38, pp. 187-194, 1998.
 29. Techapun, C., Charoenrate, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulose-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant streptomyces sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochemical Engineering Journal*, 12, pp. 99-105, 2002.
 30. Thauer, R. K., Stackebrandt, E. and Hamilton, W. A. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. In: *Sulphate-reducing Bacteria* (Edited by Barton L.L. and Hamilton W. A.). Cambridge University Press, New York, pp. 1-37, 2007.
 31. Utgikar, V. P., Chen, B. Y. Chaudhary, H., Tabak, H. H., Haines, J. R. and Govind, R. Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfate-reducing bacteria: EC100 and EC50. *Environmental Toxicological and Chemistry*, 20, pp. 2662-2669, 2001.
 32. Utgikar, V. P., Stephen, M. H., Chaudnary, N., Tabak, H. H., Govind, R. and Haines, R. J. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology*, 17 pp. 40-48,

- 2002.
33. Utgikar, V. P., Tabak, H. H., Haines, J. R. and Govind, R. Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, pp. 306-312, 2003.
 34. Vargas, de I., Macaskie, E L. and Guibal, E. Biosorption of palladium and platinum by sulfate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, pp. 49-56, 2004.
 35. Waybrant, K. P., Blowers, D. W. and Ptacek, C. J. Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of acid mine drainage. *Environmental Science technology*, 32, pp. 1972-1979, 1998.
 36. White, C. and Gadd, G. M. Mixed sulphate-reducing bacterial cultures for bioprecipitation of toxic metals: factorial and response-surface analysis of effects of dilution rates, sulfate and substrate concentration. *Microbiology*, 142, pp. 2197-2205, 1996.
 37. White, C., Sayer, J. A. and Gadd, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical process for treatment of contamination. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, pp. 503-516, 1997.
 38. Zagury, G. J., Kulnieks, V. and Neculita, C. M. Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulfate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, 64, pp. 944-954, 2006.
 39. 王姮娟，蔡士昌，「重金屬廢水處理技術 (下)」，台灣環保產業雙月刊，第二十七期，17~19 頁，民國九十三年。
 40. 朱昱學，「節水善其事必先利其器」，節約用水季刊，Vol. 19，民國八十九年。
 41. 吳美惠，張芳賓，朱昱學，「固定化微生物廢水處理技術評估」，工業污染防治，第五十九期，81~109 頁，民國八十五年。
 42. 林瑩峰，「微生物固定化技術應用於脫硝程序之研究」，國立清華大學化學工程研究所博士論文，民國八十二年。
 43. 陳國誠，「生物固定化技術與產業應用」，茂昌，臺北市，民國八十九年。
 44. 侯萬善，「廢水金屬處理回收技簡介」，中技社通訊，第四十八期，4-7 頁，民國九十二年。
 45. 楊佳紘，「生物沈澱程序中重金屬對硫酸還原效率的影響」，國立交通大學環境工程研究所碩士論文，民國九十四年。