

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 重金屬污染源

國外常見的硫酸鹽污染問題普遍存在於採礦場的酸礦廢水 (acid mine drainage，簡稱AMD) 中，依據美國早期採礦單位估計約有 12,000 哩的河川和河流及超過 180,000 英畝的湖泊或水庫已受金屬礦或煤礦廢水所影響 (Shokes and Moller, 1999)。所謂的酸礦廢水 (AMD) 是指正在開挖或已廢棄的礦坑，因地層中的硫化鐵礦物，如黃鐵礦  $\text{FeS}_2$  (pyrite) 曝露於有氧及有地下水水流經的環境中，經化學及生物氧化作用而產生亞鐵離子及硫酸根，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和硫酸鹽，直接與間接引起明顯的環境問題值得加以重視。

國內水中重金屬污染源舉凡如製革業、電子電鍍業、積體電路業及印刷電路板業等，其製程中會產生含高濃度重金屬廢液，國內以往對於重金屬廢水處理的方法包括物理化學處理程序及生物處理程序二類，如：傳統加藥混凝法、離子交換樹脂法、電聚浮除法、電解法、流體化床結晶法、厭氧選種系統併除…等，相關研究整理如下：

## 2-1.1 物化處理程序

### (1) 傳統加藥混凝法

傳統加藥混凝法大多應用於國內的各電路板工廠重金屬廢水之處理，其處理過程中必須加入大量的鹼劑、酸劑、混凝劑、助凝劑甚至重金屬捕集劑等化學藥劑，不但耗費藥劑成本，並且會產生大量含有害性重金屬之污泥，且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) 及鹽類濃度增高，使得大量放流水無法回收再利用，而須直接排放至承受水體，造成水資源的浪費 (朱，2000)。

### (2) 離子交換樹脂法

蔡 (2000) 利用離子交換樹脂法處理重金屬廢水，其利用酸性離子交換劑含浸於大孔隙樹脂 (XAD-4) 中，成為溶液含浸樹脂 (solvent impregnated resin，簡稱SIR)，對水中重金屬 (鎘) 進行吸附與脫附，探討其在室溫下 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) 與硝酸鎘溶液的萃取平衡及管柱分離。其研究結果顯示，當 SIR 之修飾劑用量為  $1.5 \text{ mL}/5\text{g-resin}$  吸附量呈現最大值，且隨著反應 pH 值的增加，吸附分配比 (即每單位量 resin 所吸附的鎘離子濃度除以水相中殘留的鎘離子濃度) 亦隨之上升，由實驗結果亦證實其吸附模式符合 Freundlich 等溫吸附關係式 ( $X/M = 1.05 \times 10^{-2} C e^{0.37}$ )。

### (3) 電聚浮除法

電聚浮除法是近年才新發展出來的新技術，其原理乃是利用電場的產

生使水中污染物之電荷重新分佈行自凝作用，藉由鐵離子之釋出結成膠羽而加以分離。高等（2000）曾以電聚浮除法處理重金屬廢水，探討其對廢水中 Cu-EDTA 錯合物的去除作用及處理效應，由該研究結果得知，含 0.005 M Cu-EDTA 之廢水，當電壓控制在 200 V、電流 3.6 A、導電度 4.8 mmho/cm 時，銅離子的去除率可達 99% 以上，且銅離子的去除效率隨著水力停留時間的增加而上升；另外由溶液中銅離子之質量平衡可判斷，其機制不僅限於膠凝作用，當以鋁板為極版（或隔版）時，尚有銅離子被還原成金屬銅之作用。

#### （4）電解法

電解法 (Electrolytic process) 乃是一種電化學的處理程序，吳 (2000) 曾以此法之電鍍原理從高濃度的電鍍液中回收固體金屬，其套用高表面積的網狀陰極結構，並外加一直流電壓在此電極上，同時以耐酸 pump 進行回抽循環使電極在電鍍液槽內構成一組電化學電池，回收的銅金屬會以銅原子的方式在高表面積的陰極上沈積，研究結果顯示，當反應條件控制在 pH=4，可達最佳的銅去除效果 99.99%。

#### （5）流體化床結晶法

蕭等 (2001) 利用流體化床結晶法 (fluidized bed pellet reactors，簡稱 FBPRs)，藉由碳酸鈉的加入，使其和廢水中的鎳形成碳酸鎳或氫氧化鎳固體覆蓋於擔體（海砂）表面來進行反應槽之各項因子的探討，以找出最佳的

操作條件，再以 SEM 觀察晶體表面變化並對其組成成分作分析。由其研究結果可看出晶體的組成成分以氫氧化鎳為主，大多數的  $\text{CO}_3^{2-}$  都會被  $\text{OH}^-$  所取代而形成金屬氫氧化物，而由數據結果更可印證金屬氧化物的溶解度積遠小於金屬碳酸鹽，使得金屬氫氧化物較易沈澱；且當實驗參數控制在 pH=9、藥劑進料莫耳比為 0.125/1、上流表面流速在 103.23 m/hr 且進料廢水負荷量為 274 g/m<sup>2</sup>hr 時，晶體之結晶比例約達 80%，處理後之廢水可達放流水標準。

## 2-1.2 生物處理程序

### (1) 厥氧選種系統



厭氧選種系統 (anaerobic selector) 併除重金屬之方式，乃是因膠羽形成菌帶負電之胞外聚合物 (extracellular polymer substances，簡稱EPS) 有助於吸附各類重金屬，故被廣泛的運用於重金屬之去除；而廢水處理程序中之厭氧選種槽同時具備脫氮除磷及促進膠羽形成菌之生長與對絲狀菌有抑制之功能，故成為一具有發展潛力的重金屬處理方式。厭氧選種系統之污泥吸附重金屬甚為快速，故張 (1998) 利用此法針對含重金屬之廢水進行處理，由其研究結果可知，溶液中超過 80% 之重金屬可在反應前 20 分鐘內完成，且重金屬之吸附模式遵循 Freundlich isotherm model ( $X/M = 0.733C^{0.8812}$ )。

## (2) 生物吸附法

高 (1995) 由電鍍廢水污泥中篩選出兩株耐高濃度重金屬真菌：*Trichoderma sp.* 及 *Fusarium sp.*，發現兩株對銅、鎳離子分別去除率達 90% 以上，對鉻離子去除率較低僅 20-30%，且兩種離子同時存在時會產生相互抑制。各方法之優缺點如表 2-1 所列。

以上程序中，電解是最常被印刷電路板製造業、金屬表面處理業及電鍍業用來回收廢液中重金屬的技術。此一技術應用於處理電鍍廢液或離子交換樹脂再生液的處理，以回收低價但限制排放濃度的重金屬以減少廢水處理成本，如銅、鋅、鉛等金屬回收，或回收高價金屬如鎳、鎢、金、銀、鈀等 (王等，2004)。



表 2-1 國內各類重金屬廢水處理程序之優缺點

處理技術	優點	缺點	參考文獻
<b>1.物化處理程序</b>			
(1)傳統加藥混凝法	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 技術純熟</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 會產生大量有害污泥</li> <li>● 污泥處理不佳易造成二次污染</li> </ul>	朱，2000
(2)離子交換樹脂法	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 質傳速率快</li> <li>● 萃取吸附分配比高</li> <li>● 選擇性高</li> <li>● 設備與操作簡單</li> <li>● 相分離容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 需考慮成本與再生的問題</li> <li>● 再生廢液需處理</li> <li>● 樹脂再生不完全</li> </ul>	蔡，2000
(3)電聚浮除法	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 處理時間短</li> <li>● 佔用空間小</li> <li>● 效果顯著</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 設備成本高</li> <li>● 需做污泥處理</li> </ul>	高等，2000

表 2-1 國內各類重金屬廢水處理程序之優缺點（續）

處理技術	優點	缺點	參考文獻
(4)電解法	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 直接以金屬方式析出</li> <li>● 花費時間短</li> <li>● 設備簡單操作穩定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 低濃度狀況下質傳限制造成低</li> </ul>	吳，2000 回收金屬品質及電流效率
(5)流體化床結晶法	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 不會產生微小顆粒</li> <li>● 可提供大的結晶表面積</li> <li>● 結晶純度高可資源回收</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 無法對高負荷廢水做最佳的處</li> </ul>	蕭等，2001 理
2.生物處理程序			
(1)厭氧選種系統	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 吸附甚為快速</li> <li>● 可吸附各類重金屬</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 需處理含重金屬之污泥</li> </ul>	張，1998
(2)生物吸附床	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 吸附甚為快速</li> <li>● 可吸附各類重金屬</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 需處理含重金屬之污泥</li> </ul>	高，1995

## 2-2 硫循環

硫是組成蛋白質的元素之一，可隨蛋白質的同化、異化而循環。環境中硫元素從 -2 價 ( $S^{2-}$ ) 至 +6 價 ( $SO_4^{2-}$ ) 共九種不同氧化物之化合物或元素物質型態存在於環境中。硫大多存在海洋和湖泊的沈積層及陸地環境中，硫的沈積與鐵離子、鈣離子有關，當形成不溶性的  $FeS$ 、 $Fe_2S$ ，和硫酸鈣 ( $CaSO_4$ ) 時就會沈澱，其中以陸地之黃鐵礦 ( $FeS_2$ ) 及石膏 ( $CaSO_4$ ) 等型態之含量最高，約  $1.8 \times 10^{16}$  公噸均屬於較不易轉換之硫化合物；而在大氣中以  $H_2S/SO_2$  等型態存在，且其硫含量最低，約為  $1.4 \times 10^6$  公噸，同時亦屬於較易轉換之硫化合物。



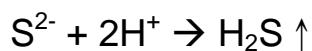
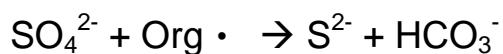
### 2-2.1 硫的同化還原作用 (assimilatory reduction)

所謂硫的同化作用是指綠色植物及許多微生物吸收硫酸鹽做為主要硫的來源，並且有一定量的  $SO_4^{2-}$  經還原作用而形成 -SH 之有機硫 (蛋白質)，如：半胱氨酸 (Cysteine)、腺核苷磷酸硫 (adenosine - 5' - phosphosulfate，簡稱 APS) 或 3' - 磷酸腺核苷 - 5' - 磷酸硫 (3' - phosphoadenosine - 5' - phosphosulfate，簡稱 PAPS) 化合物，由於該反應主要發生在細胞內，所生成之有機硫則流傳於食物鏈間，故稱之為生物合成硫還原作用。當動植物死亡後遺物經微生物的分解礦化作用，硫 ( $S^{2-}$ ) 又回到土壤中。由於微生物在此生化途徑中所需之硫量很少，且反應較緩

慢，故此一同化途徑在廢水處理程序中較少被用到。

## 2-2.2 硫的異化還原作用 (dissimilatory reduction)

對於一些受重金屬污染或受酸礦廢水污染土壤之生物整治 (bioremediation) 工作較常藉助於異化硫還原作用來進行，在此生化途徑中，微生物利用  $\text{SO}_4^{2-}$  當作電子接受者 (electron accepter)，利用代謝過程電子的轉移作用，將元素硫或硫酸根離子還原成硫離子或硫化氫，並將硫化氫 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) 及硫離子 ( $\text{S}^{2-}$ ) 釋放到環境中，其反應式如下：



上述之反應過程稱之為異化性硫酸鹽還原作用。此種硫酸鹽還原反應構成硫循環 (圖 2-1) 中主要的單向循環。

硫還原系統中若同時含有重金屬離子存在，則會因硫化物之溶解度積 ( $K_{\text{sp}}$ ) 值非常低，而易產生重金屬硫化物之沈澱，藉此將系統中的重金屬離子從水相中分離出來，依據此特性結合硫氧化系統，先將受重金屬污染之土壤或底泥中的重金屬離子進行生物溶出 (bioleaching) 後，再利用硫還原系統將重金屬進行生物沈降 (bioprecipitation) 作用後加以分離 (White et al., 1998)。此一技術在國外廣泛的被應用於處理酸礦廢水 (Elliott, et al., 1998; Kolmert and Johnson, 2001)，對於所含的重金屬如鐵、銅、鋅、鎳、

鎂等，都有高於 90% 的去除率 (Jong and Parry, 2003; Tsukamoto, et al., 2004)，亦可有效去除廢水中的硫酸鹽及 COD (Diels et al., 2003)。

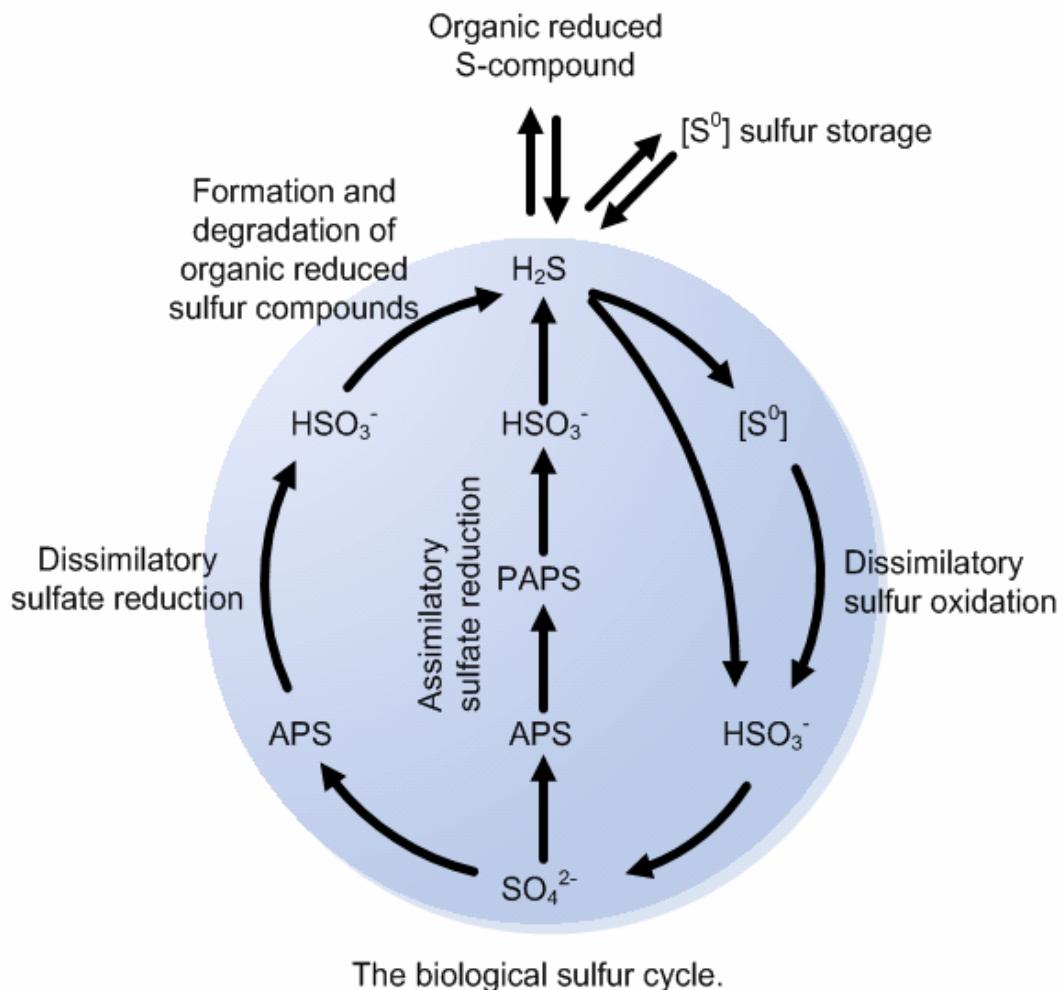


圖 2-1 硫循環 (資料來源：Lens et al., 2000)

## 2-3 硫酸還原菌 (sulfate-reducing bacteria, 簡稱 SRB) 簡介

硫酸還原菌為一絕對厭氧菌，不但在厭氧環境下到處可見得到，且其所造成之生物腐蝕作用對經濟的衝擊亦相當大 (White and Gadd, 1998)，如管蝕作用 (crown corrosion) 等。

SRB 外型因年齡及存在的環境不同而不同，利用硫酸鹽當作異化及其他有機物質之氧化劑 (電子接受者)，族群較大者有兩屬：*Desulfovibrio* 及 *Desulfotomaculum*。其他屬之 SRB 族群如：*Desulfobulbus* 則較小，這些菌幾乎在所有厭氧環境中如：地下、深海、下水、淡水及含鹽水之沈積物中皆可發現 (陳，1988)。其包含嗜熱菌 (Thermophilic)、中溫 (Methophilic) 及嗜冷 (Halophilic) 等菌種，因此各種溫度下均有 SRB 的存在；上述之 *Desulfovibrio spp.* 是屬於中溫菌種，適合生長之溫度範圍在 25~37°C，最適溫度為 33°C，而最適合生長之 pH 為中性，典型之菌種為 *Desulfovibrio desulfuricans*；而 *Desulfotomaculum* 則為中溫或嗜溫之桿狀產孢菌，其生長溫度範圍在 30~70°C，最適溫度為 55°C (張，1989)。

## 2-4 硫酸鹽還原作用之抑制與競爭

由於硫酸鹽還原作用必須於厭氧環境下進行，當 SRB 被用於處理特殊廢水如：酸礦廢水或煙道氣體脫硫廢水等有機物含量較少的廢水時，需額外添加電子提供者 (electron donor) 方能使硫酸鹽還原反應進行。如前面所提到，硫酸鹽還原反應是在厭氧條件下進行，當所加入的電子提供者為氫氣或低分子有機碳時，可以大大的提升硫酸鹽還原率，相對的在厭氧環境下提供氫氣有可能促使甲烷生成菌 (methanogenic archaea，簡稱 MA) 產生甲烷化作用而生成甲烷 (methane)，而甲烷的存在會降低 SRB 對氫氣的利用率。而除了甲烷菌以外，醋酸生成菌 (homoacetogenic bacteria，簡稱 HA) 在厭氧狀態下亦會利用氫氣為其能量源以產生醋酸為最終產物，所產生的醋酸又可當為 SRB 的碳源，間接促進硫酸鹽還原反應的進行。上述之反應方程式如表 2-2 所示。

Esposito et al. (2003) 曾對此三種菌對於氫氣的競爭能力進行研究探討，研究結果指出，當進流之  $H_2$  濃度為有限制而添加之硫酸鹽濃度為過量時 ( $H_2/SO_4$  ratio = 1.9-4.0)，可有效的抑制 MA 的生長並促進硫酸鹽還原作用的進行。且污泥停留時間 (sludge retention time，簡稱 SRT) 的長短 (2.6 及 19.8 天) 並不會影響 SRB 及 MA 對  $H_2$  的競爭結果；另外 SRB 所產生的硫化氫 ( $H_2S$ ) 亦會對 MA 造成毒性，有利於 SRB 競爭  $H_2$ 。該研究結果符合理論競爭氫氣能力：異營性 SRB > MA > HB。

此一理論競爭能力是由微生物生長動力學中推導出來，利用最大之比生長速率 (specific growth rate)、對基質的親合性等參數進行定量來預測 SRB、MA 及 HB 對  $H_2$  的競爭結果。

另外，硫酸還原菌亦會和甲烷生成菌競爭碳源，其對醋酸的競爭方程式如表 2-3 所示。當以醋酸為電子提供者時，就熱力學上而言，硫酸鹽之還原作用較甲烷化作用更具活性，但在純菌培養時 (pure culture)，SRB 無法單獨利用醋酸做為電子提供者而完成能量的代謝，但 *Desulfobacter postgatei* 例外，因其為 SRB 中極特殊之一種菌，只能利用醋酸當作唯一之碳源 (陳，1988)。

吳氏 (2003) 曾討論過有關硫酸還原菌與甲烷菌的競爭現象，其通常可從熱力學及反應動力學方面來解釋兩者的競爭情形。由熱力學觀點來探討厭養系統中硫酸鹽還原反應與甲烷生成反應的自由能變化亦符合表 2-3 所示，就乙酸的利用上，進行甲烷化反應時放出  $-31.0\text{ kJ/mol}$ ，而進行硫酸鹽還原時則可釋出  $-47.6\text{ kJ/mol}$  的能量；若是以氫氣做為電子提供者，甲烷化反應應可獲得  $-33.9\text{ kJ/mol}$ ，硫酸鹽還原反應則為  $-38.1\text{ kJ/mol}$  (吳，2003)，因此，硫酸還原菌在分解有機物的過程中可產生比甲烷菌高的自由能，雖然差距不是很大，但可用以解釋在硫酸鹽充足的環境下，甲烷菌較不容易與硫酸還原菌競爭碳源。

表 2-2 硫酸還原菌、甲烷菌及醋酸菌之生長反應方程式（資料來源：Esposito et al. 2003）

Bacteria	Reaction	$\Delta G^\circ$ (kJ/reaction)
硫酸還原菌	$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-152
甲烷菌	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-136
醋酸菌	$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-105

表 2-3 硫酸還原菌及甲烷菌對醋酸利用之反應方程式（資料來源：Esposito et al. 2003）

Bacteria	Reaction	$\Delta G^\circ$ (kJ/reaction)
硫酸還原菌	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}^- + 2\text{HCO}_3^-$	-47.3
甲烷菌	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31

## 2-5 硫酸還原菌之其他應用

### 2-5.1 應用硫酸還原菌降解難分解有機物質

硫酸還原細菌屬於異營細菌 (heterotrophy)，需利用低分子量有機化合物如甲酸、乙酸、乳酸或乙醇等為主要之電子提供者，於厭氧環境下有機碳分解過程產生的電子，進入電子傳遞鏈，則以  $\text{SO}_4^{2-}$  為電子接受者，產生能量 ATP；但研究發現環境底泥、污水處理廠污泥或油污染環境，某些硫酸還原菌不僅能存活，對於大分子量或難分解有機物如長鏈脂肪酸、3-氯苯、苯、酚等產生降解作用或共同代謝作用 (Ensley and Sufliita, 1995; White, et al., 1997)。



最早被發現可利用大分子量有機碳的硫還原菌包括 *Desulfovibrio* 及 *Desulfomaculum* 兩屬菌為主，直至近十幾年來才有更多的專家學者研究其他硫還原菌屬。Rabus et al. (1996) 利用 enrich medium 添加原油經八次馴養，以螢光原位雜交方法 (FISH) 鑑定微生物族群，發現主要 SRB 菌為 *Desulfovibrionaceae* 類 (SRB385Db probe)，對 Toluene、O-xylene、M-xylene、M-ethyl toluene 之去除率均達 90% 以上，且馴養次數越多，去除率增加。

### 2-5.2 硫酸還原菌結合薄膜技術處理含重金屬廢水

利用 SRB 來處理含重金屬之廢水最常使用的原理為生物沈澱法

(bioprecipitation)，利用硫酸鹽還原作用所產生的硫離子 ( $S^{2-}$ ) 和重金屬陽離子形成不溶或難溶性之金屬硫化物，再從水相中加以去除。Chuichulcherm et al. (2001) 等學者曾研究以硫酸還原菌結合萃取式薄膜反應槽 (extractive membrane bioreactor - sulfate-reducing bacteria，簡稱 EMB-SRB) 進行實驗探討，其原理如圖 2-2 所示，利用 silicone-based membrane 來隔離廢水及微生物避免兩者相接觸，且藉由 silicone-based membrane 只選擇性的讓微生物所產生的  $H_2S$  通過薄膜進到廢水端與重金屬陽離子接觸而形成金屬硫化物沈澱，而廢水端的離子無法通過 silicone-based membrane 而進到微生物端，此系統的好處為可避免廢水中所含的物質會影響到 SRB 的生長，又可達良好的處理效果。研究結果顯示，其對廢水中  $Zn^{2+}$  的去除率可達 92% (w/v)。

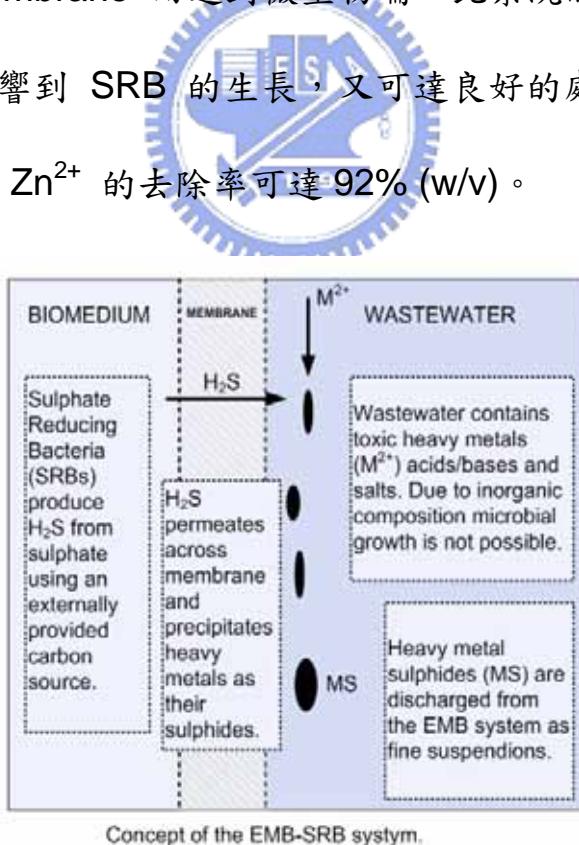


圖 2-2 硫酸還原菌結合萃取式薄膜反應槽 (資料來源：Chuichulcherm et al. 2001)

### 2-5.3 硫酸還原菌直接應用於含重金屬廢水之處理

對於 SRB 的應用，最廣泛被使用於酸礦廢水 (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去除廢水中溶解性之重金屬，故此部分之研究早在多年前即有許多學者進行相關研究 (Shokes and Moller, 1999; Kolmert and Johnson, 2001; Tsukamoto et al., 2004)。然而利用 SRB 處理重金屬必須考量到重金屬對 SRB 造成的毒性效應，因此，亦有多位學者研究 SRB 對各種常見的重金屬所能忍受之濃度範圍，以利於各式處理反應槽之設計，其毒性濃度限制如表 2-4 所示。

然而利用 SRB 進行各項重金屬處理作業時，碳源的選擇亦扮演著重要的角色，使用不同的有機物當作碳源對 SRB 也有不同的處理效果，且若水溶液中同時存在多種碳源時，相較於單一種碳源之使用，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，Waybrant et al. (1998) 發現，當水溶液中含有高濃度硫酸鹽 (3000 mg/L) 且同時存在有五種有機物質時 (下水污泥、腐植質、木屑、羊糞及鉅木屑)，在反應時間 20 天內硫酸鹽去除率可達 100%。其他 SRB 之有機物使用評估如表 2-5 所列。

表 2-4 重金屬對 SRB 造成毒性的濃度 (資料來源：Utgikar et al., 2003)

Metal	SRB strain	Toxic concentration (mg/L)
Cu	<i>Desulfovibrio</i> strains	20-50
	<i>Desulfovibrio</i> strains	3
	<i>Desulfovibrio</i> strains	2-20
	Mixed culture	4-20
	Mixed culture	12
Zn	Mixed culture	25-40
	Mixed culture	20
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	13
Pb	Mixed culture	75-80
	Strain L-60 Resembles <i>Desulfosarcina</i>	125

表 2-4 重金屬對 SRB 造成毒性的濃度 (資料來源：Utgikar et al., 2003) (續)

Metal	SRB strain	Toxic concentration (mg/L)
Cd	Mixed culture	>4-20
	Strain L-60 <sup>a</sup>	54
Ni	Mixed culture	10-20
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	10
Cr	Mixed culture	60
Hg	Strain L-60 <sup>a</sup>	74
Mixture (Cr, Ni, Cu, Cd, Zn, Pb)	Mixed culture	20

表 2-5 碳源種類對 SRB 之硫酸鹽還原效率之影響 (資料來源：Gibert et al., 2002)

Source of organic matter	System	Sulfate conc. (ppm)	$t_R$ (days)	Additional carbon source	Sulfate removal rate (mg/Ld)	Sulfate production rate (mg/Ld)
SRB culture, cow manure, whey	batch	100	—	none	3-4.4	1-1.5 (total produced)
Creek sediment, sewadge sludge, leaf						0-0.63 (effl. Content)
mulch, wood chip, sheep manure, sawdust, cellulose, sand, limestone	batch	1200-4600	—	none	4.6-109	n.a.

表 2-5 碳源種類對 SRB 之硫酸鹽還原效率之影響 (資料來源：Gibert et al., 2002) (續一)

Source of organic matter	System	Sulfate conc. (ppm)	$t_R$ (days)	Additional carbon source	Sulfate removal rate (mg/Ld)	Sulfate production rate (mg/Ld)
SRB culture, cow manure, whey	batch	n.a.	—	-/glycerol/ acetate/ lactate/ propionate	n.a.	200-500 (with glycerol)
Mushroom compost (composted straw, hay, horse and poultry manure ground corncobs, gypsum, limestone)	column	2000	0.5	no lactate lactate period (3500 mg/L)	0 30-100	n.a. n.a.

表 2-5 碳源種類對 SRB 之硫酸鹽還原效率之影響 (資料來源：Gibert et al., 2002) (續二)

Source of organic matter	System	Sulfate conc. (ppm)	$t_R$ (days)	Additional carbon source	Sulfate removal rate (mg/Ld)	Sulfate production rate (mg/Ld)
SRB culture	column	1920	2.1	glycerol/ lactate/ ethanol	250-300	250
	Continuous					
Mushroom compost	bioreactor sulfate recirculation	n.a.	4.1	lactate	n.a.	413
Municipal compost, leaf compost, wood chips, limestone, silica sand	full-scale barrier	2000-4000	90	none	15 (1st year) 10 (3rd year)	n.a.

表 2-5 碳源種類對 SRB 之硫酸鹽還原效率之影響 (資料來源：Gibert et al., 2002) (續三)

Source of organic matter	System	Sulfate conc. (ppm)	$t_R$ (days)	Additional carbon source	Sulfate removal rate (mg/Ld)	Sulfate production rate (mg/Ld)
Leaf compost, pea gravel, limestone	full-scale barrier	n.a.	6	none	n.a.	3.7

n. a.: not available.

$t_R$ : retention time



## 2-6 分子生物技術應用於 SRB 菌分析之簡介

### 2-6.1 螢光原位雜交法 (Fluorescence In-Situ Hybridization，簡稱 FISH)

環境中的微生物鮮少能被成功分離出單獨培養，其原因為大部分微生物生存的環境與族群間的交互關係難以釐清及掌握，導致大部分的微生物無法在人為條件下被分離出 (Amann et al., 1995)。現代分子生物學中之原位雜交技術從一創立就顯示出巨大的應用潛力，其應用微生物之核糖體 rRNA (ribosomal RNA) 作為親緣演化的標的基因，在正式細菌分類學上已成為主流 (Amann et al., 1995; Werner et al., 1997; Head et al., 1998)。

主要因為 rRNA 具有下列特點：

1. 其使單獨的細胞能同時被觀察、定性、計數與標示位置。
2. 可以偵測可培養的微生物，亦可觀察不易培養之微生物，因為其以 rRNA 為寡糖核酸探針雜合的技術對於特定微生物的定性或長期監測相當具有效用。
3. 所有生物體內均具有 rRNA，且具有同源性及安定性。
4. 其核酸序列具有保留區及變異區：變異區較為集中，其他大都為保留區，利用其變異區上的不同，即可判別微生物演化的差異與親緣關係。
5. rRNA 可分為 5S、16S、23S 等區域，其中以 16S rRNA 具 1,500 bp 長度，較適合分析龐大複雜的細菌種類。

6. 可在短時間（數小時）內完成分析工作。
7. 敏感度高，可分析環境中數量較少之微生物族群，混合菌之培養亦適用。

FISH 分析法即利用微生物 16S rRNA 特性，不同微生物具有不同序列，藉著 rRNA 序列資料庫比對，可設計不同屬、種、亞種的寡核酸探針，經雜交試驗後，探討環境中或活性污泥槽等生物處理系統中微生物族群的分佈 (Amann et al., 1995)，其分析步驟包括探針設計 (probe design)、固定樣品 (fixing)、雜交 (hybridization)、清洗 (washing)、及螢光顯微鏡觀察。

利用螢光原位雜交方法鑑定環境中生物族群分布之研究相當豐富，在 SRB 菌之相關研究方面，Stackebrandt 於 1995 年利用 16S rRNA 技術分析出 SRB 菌族群間之親源關係。

Ravenschlag (2000) 利用 FISH 技術調查北歐深海低溫底泥中之 SRB 菌族群結構，使用的探針包括兩種鑑定族群的探針 (SRB385 及 SRB385Db) 及三種鑑定菌種之探針 (DNMA657、660、DSV698)，顯示 SRB 菌主要族群分佈依序為 *Desulfosarcina-Desulfococcus* 菌、*Desulforhopalus sp.* 菌、*Desulfotalea spp.* 及 *Desulfofusus sp.* 菌含量，*Desulfovibrio spp.* 菌的量最少。其中 *Desulfosarcina spp. -Desulfococcus spp.* (DSS658 probe) 菌佔 49-73% 為最多。

Ito et al. 於 2002 年利用 FISH 結合微電極技術，調查微氧及無氧狀況之下水道生物膜 SRB 菌族群變化與環境因子之影響，使用的探針包括兩種不同族群的探針 (SRB385 及 SRB385Db) 及三種不同菌種探針 (DNMA657、660、DSV698)，結果顯示該生物膜中  $93.5\% \pm 34\%$  為細菌，SRB 菌僅佔 4.8%，SRB 菌中又以  $\delta$ -Proteobacteria (SRB385) 約佔 70% 較多，*Desulfobulbs spp.* (660 probe) 佔 23%，*Desulfovibrio sp.* 僅佔 9.4%，其餘約 38% 之菌種族群則非此兩種菌種族群，有待進一步確認。顯示利用 FISH 方法鑑定微生物族群之技術已趨於成熟，並廣泛應用，惟參與作用之微生物族群可能複雜且無絕對優勢菌存在時，如何判定應使用之專一探針，使能有效的鑑別族群分佈，為此技術應用之關鍵所在。



## 2-6.2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction，簡稱 PCR)

傳統分離 DNA 的方法，主要是靠基因重組或 cDNA 基因庫的建構與篩選的一個過程，此方法往往需進行相當多的步驟。於 1985 年間所發展出的一個方法，此法可使研究者快速分離到一個特定的 DNA，而不必進行建構與篩選基因庫的工作。此方法被稱為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction，簡稱 PCR)，乃是根據生物體內欲複製的 DNA 序列片段而設計，在實驗室中對特定 DNA 序列進行快速擴增的一項新技術 (蘇，1996)。

PCR 使科學家可以選擇性的增殖某段特定的 DNA 序列，任何的 DNA 序列都可以從生物體所含的所有 DNA 中被分離出來。然而，通常我們必須知道欲增殖的 DNA 端部序列，如此才可以合成出用於增殖反應的引子 (primer)。

所使用的兩條短的引子可以結合至欲增殖的 DNA 兩端。這些引子可以黏合 (anneal) 至目標序列上，每個引子各黏合至雙股 DNA 分子的每一股上。該引子決定了被增殖的區域範圍，同時 DNA 聚合酶可以利用試管中以添加的四種去氧核糖核苷酸 (dGTP、dATP、dCTP、dTTP) 來複製介於兩個引子之間的DNA。在一個循環加熱中，提升溫度至約 95°C 之高溫條件使 DNA 模版變性 (denature) 成單股 DNA，接著降低溫度至約 55°C 使引子可以黏合至模版上，再提升溫度至 72°C 使 DNA 聚合酶可以從引子處開始延長 DNA 片段。經過週期性變性，引子黏合與 DNA 合成的過程不斷的重複可以使 DNA 以對數般的速率增殖。而從聚合酶連鎖反應所得到的產物可以用瓊脂糖凝膠電泳法及變性梯度凝膠電泳法分析。

## 2-6.3 變性梯度凝膠電泳法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, 簡稱 DGGE)

電泳分析 (electrophoresis) 是一種可以用來純化與鑑定化合物的分析技術，通常欲分析的樣品是置於兩電極 (electrode) 間以緩衝溶液濕潤的薄片狀支撑物上，支撑材質可以是紙、醋酸纖維素、澱粉、瓊脂糖 (agarose)、聚醯胺或其他材質。當施加一電壓於兩電極間時，產生的電流驅動帶淨正電荷的化合物往負極 (陰極, anode) 移動，帶淨負電荷的化合物往正極 (陽極, cathode) 移動，不帶電荷或淨電荷為零的化合物則留在加入樣品的原點 (origin)。帶電荷化合物的電泳遷移速率受到分子本身之淨電荷、大小、形狀以及環境中的支撑材料、電流等因素的影響。

而變性梯度凝膠電泳法 (DGGE) 亦是電泳分析技術的一種，藉由 PCR 放大目標基因的量，並使雙股 DNA 一端帶有 GC clamp，結合 DGGE 的分離可進行族群分析的研究。其理論乃是利用熱或化學作用使雙股 DNA 產生變性 (denaturant) 而使 DNA 分子的兩股分開。由於 DNA 之鹼基對是藉由氫鍵所連接，GC 間由三條氫鍵連接而成，而 AT 間僅有兩條氫鍵相連接，故 GC 鹼基對比 AT 鹼基對結合得要牢固，因此 GC 含量高的區域具有較高的開鏈溫度。開鏈溫度低的區域，通常位於端部稱作低溫開鏈區，如果雙股螺旋一端開鏈，那麼未開鏈部分則束在一起，而此為開鏈區便稱作高溫開鏈區 (如圖 2-3)，如果溫度或變性劑濃度繼續升

高，兩條鏈就會完全分開；變性梯度凝膠電泳法依據首要的一點是：DNA 雙股末端一旦解鏈，其在凝膠中的電泳速度將會極劇下降。第二個根據是，如果某一區域首先解鏈，而與其僅有一個鹼基之差的另一條鏈就會有不同的解鏈溫度，因此，將樣品加入含有變性劑梯度的凝膠進行電泳就可將二者分開。故當欲分析之 DNA 鹼基對以 GC 所佔比例較高時，則要使 DNA 開鏈所需的溫度則需較高；反之若 AT 所佔比例較高，則 denaturant 所需的溫度則較低。

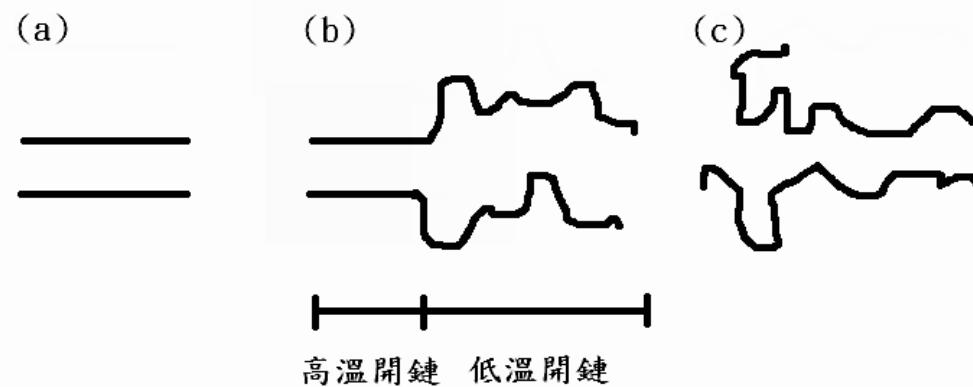


圖 2-3 雙股 DNA 開鏈示意圖

一個 DNA 分子會因核苷酸序列的不同可能具有數個不同的  $T_m$  值 (melting temperature)，如果加入尿素等可使 DNA 之氫鍵打斷（即變性）的物質，則由於 AT 與 GC 二種互補 DNA 的結合力不同，將會造成不同的變性效果；且由於兩種菌種其序列 AT 鍵與 GC 鍵的位置不同、數量不

同，其變性程度也不同，即雙股 DNA 遭到開鏈的程度及形狀也不相同，因此電泳時兩條序列穿過網狀結構的難易度變因而不同，而這種難易度是依 DNA 序列遭變性的程度不同來區分，而非限制酵素那種靠 DNA 序列大小來區分。如果在電泳過程中加上變性程度的梯度，則更能使這種差異性加大，進而降低不同樣本但有相同變性程度的機率。在 DGGE 電泳法中不同位置所呈現的亮帶表示不同的 16S rDNA 序列，這是一段經 PCR 反應後的完整序列，而非像限制酵素所得的遭切碎的序列，因此，不同位置的亮帶便為一單一菌種，然而，由於解析度的關係，此亮帶需切下再重複做 PCR、DGGE 的試驗方能加以純化。如此，將經純化的 DGGE 亮帶進行定序便能得知其族群的組成。

