

第四章 結果與討論

4-1 混合設計實驗-銅、鋅、鎳三種重金屬對 SRB 活性之影響

本實驗第一部份為探討銅、鋅、鎳三種重金屬交互作用對 SRB 進行硫酸鹽還原作用之影響，SRB 在高活性時會消耗水中碳源及硫酸鹽以產生硫離子，硫離子易與水中溶解性金屬結合產生不溶性之金屬硫化物沈澱，藉此移除掉水中重金屬。利用混合實驗設計法 (mixture design) 之原則，規劃設計 16 組不同重金屬混合濃度實驗，以硫酸鹽還原效率為指標，判斷 SRB 之生長活性，再藉 minitab 統計軟體分析結果，評估銅鋅鎳三種重金屬對 SRB 生長活性之影響。



4-1.1 碳源利用情形

SRB 利用低分子量有機酸 (如：乳酸鹽、醋酸鹽、丙酮酸鹽及甲酸鹽等) 為電子提供者，硫酸鹽類為電子接受者。本研究以乳酸鹽為 SRB 之碳源，在不同重金屬濃度混合條件下反應 14 天，各反應槽中可得到不同的 SRB 生長狀況。圖 4-1 結果顯示第 11 組反應槽 (含高濃度鋅，不含銅及鎳離子) 之碳源利用率最大，利用率約為 35%，且當 3 種重金屬混合比例鋅濃度較高時 (即第 4、7 及 11 組)，其碳源利用率亦較高 (第 2 組 DOC 實驗數據由於誤差過大，故予以刪除)，顯示微生物生長活性較佳，

唯反應槽中有其他厭氧菌 (如：甲烷生成菌、醋酸菌等) 存在，故碳源的利用未必完全是被 SRB 所消耗，且溶液中含較高濃度的銅、鎳重金屬之實驗組，其碳源利用率幾乎接近於 0%，顯示微生物活性明顯受抑制。

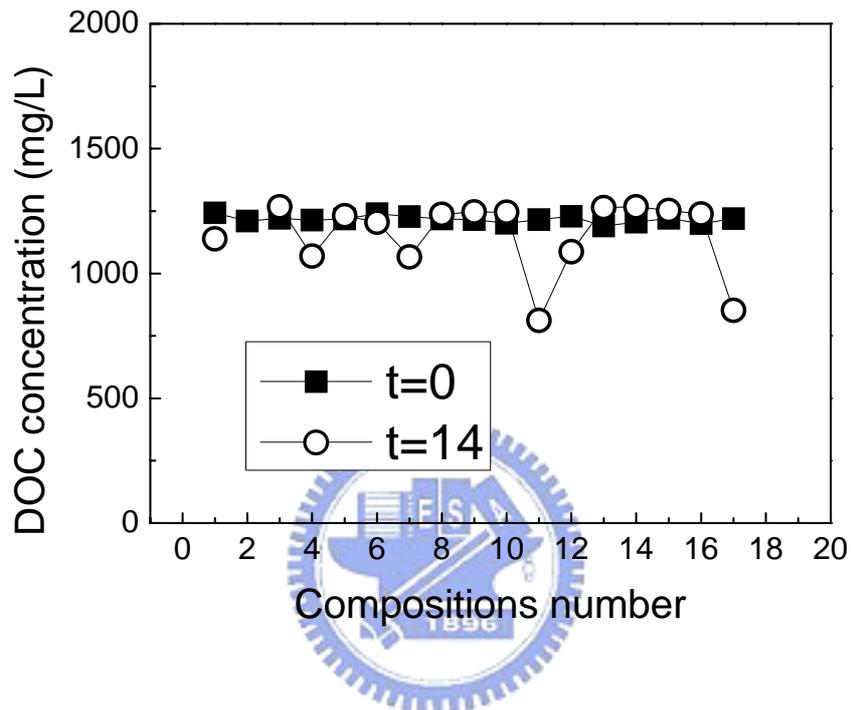


圖 4-1 混合試驗各組反應槽之碳源變化情形

4-1.2 硫酸鹽還原情形

重金屬對於混合性培養之 SRB 的毒性交互作用相當複雜，且其作用機制主要有硫離子生物沈澱作用、微生物表面吸附作用、及與微生物發生錯合作用等，Utgikar et al. (2001) 曾提出溶液中之溶解性重金屬對於混合性培養 SRB 之毒性效應可間接藉由分析硫酸鹽還原率加以得知。而文獻回顧中亦提到，在高濃度硫酸鹽存在的厭氧底泥環境下，有助於硫酸還原

菌與其他厭氧菌競爭碳源，並進行硫酸鹽還原作用，將水中硫酸鹽轉換成硫離子型態，硫離子為反應性較大之物種，當遇到水中重金屬時，會快速與之結合產生不溶性之金屬硫化物質。

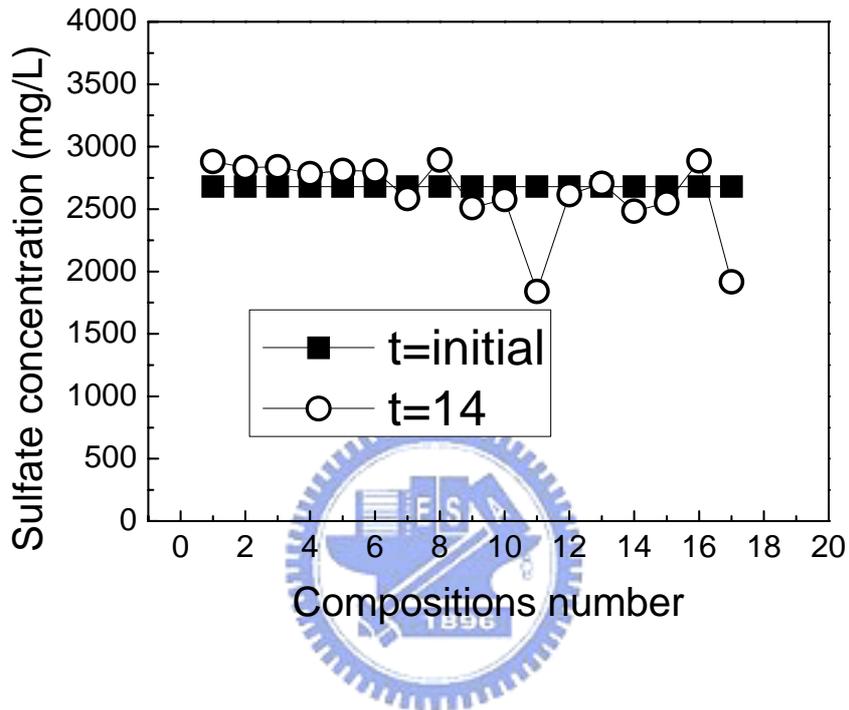


圖 4-2 混合試驗各組反應槽之硫酸鹽濃度變化情形

圖 4-2 結果顯示，最大硫酸鹽還原率亦出現在第 11 組反應槽中，其還原率約分別為 37%，與控制組之硫酸鹽還原率 (34%) 相當接近，顯示達 180 mg/L 高濃度鋅不會抑制 SRB 之硫酸鹽還原作用，但是當水溶液中若存在其他兩種重金屬 (銅、鎳) 時，則會降低硫酸鹽還原作用的進行。文獻中曾指出銅及鋅離子會對 SRB 產生毒性而降低其對醋酸碳源的利用率 (Hao et al., 1994; Utgikar et al., 2001)。

4-1.3 硫離子產生及質量平衡

文獻中曾提到，SRB 對處理含重金屬及硫酸鹽之廢水具有很大的應用潛力，Utgikar et al. (2002) 指出利用 SRB 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成金屬硫化物沈澱，當溶液中重金屬濃度低時有助於促進 SRB 進行生物還原作用，反之高濃度重金屬則會對 SRB 產生生長抑制甚至毒性。由圖 4-3 可看出，以第 11 組反應槽所產生的硫離子濃度較高，達 224 mg/l。反應槽中產生之硫離子理論濃度可藉由初始及最終之硫酸鹽濃度的差加以計算得知，其化學關係式如下所示：

$$S^{2-} \text{ theoretical concentration} = 1/3 (SO_4^{2-}{}_i - SO_4^{2-}{}_f)$$

其中 $SO_4^{2-}{}_i$ 表示初始之硫酸鹽濃度 (mg/l)； $SO_4^{2-}{}_f$ 表示最終之硫酸鹽濃度 (mg/l)。

控制組分析所得之硫離子濃度與理論之硫離子濃度分別為 290 mg/L 及 283 mg/L，分析之硫離子濃度相當接近理論濃度，顯示消耗掉之硫酸鹽應完全轉換成硫離子，無其他之中間產物產生。其相關計算如下所示：

混合實驗控制組 t = 0 day 的硫離子濃度 = 56 mg/L

t = 14 day 的硫離子濃度 = 346 mg/L

實際測得之硫離子產生量 = 346 - 56 = 290 mg/L

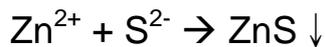
混合實驗控制組 t = 0 day 的硫酸鹽濃度 = 2768 mg/L

t = 14 day 的硫酸鹽濃度 = 1918 mg/L

實際硫酸鹽還原量 = 2768 - 1918 = 850 mg/L

理論應得之硫離子產生量 = $1/3 \times (850) = 283$ mg/L

然而第 11 組反應槽所測得知硫離子濃度低於控制組 (有別於硫酸鹽還原率之情形) 乃是因為生物沈澱作用的產生，其反應方程式如下所示：



第 1 至第 16 組反應槽皆添加不同濃度的重金屬，由硫離子分析結果發現第 11 組約有 224 mg/L 剩餘濃度，然而其濃度又低於控制組之硫離子濃度，由此可證明第 11 組反應槽發生生物沈澱作用消耗掉部分硫離子，致使得測得之硫離子濃度低於控制組濃度，由於硫離子與重金屬有很強的結合作用，當水中同時存在此兩種物質時會迅速結合成金屬硫化物沈澱，故若溶液中偵測到有硫離子的存在，則可推測水中硫離子量相較於重金屬為過量，由此可推知溶液中之重金屬應全部移除，此理論由表 4-1 重金屬分析結果可得到證實。同理，其他實驗組之硫離子皆已耗盡，推測水中仍有其他重金屬存在，所產生之硫離子不足以將之全部去除。

表 4-1 混合試驗各組反應槽第 0 天及第 14 天之重金屬去除率

No.	Cu ²⁺ (%)		Zn ²⁺ (%)		Ni ²⁺ (%)	
	t = 0 day	t = 14 day	t = 0 day	t = 14 day	t = 0 day	t = 14 day
1	93	97	—	—	—	—
2	100	73	84	99	—	—
3	96	91	—	—	43	56
4	100	100	93	89	—	—
5	99	82	88	97	57	64
6	99	84	—	—	51	57
7	100	100	97	94	—	—
8	99	84	95	95	50	52
9	98	79	92	98	56	46
10	97	84	—	—	59	38
11	—	—	100	100	—	—
12	—	—	100	100	52	36
13	—	—	100	100	52	53
14	—	—	99	100	59	41
15	—	—	—	—	67	48
16	99	98	92	99	60	74

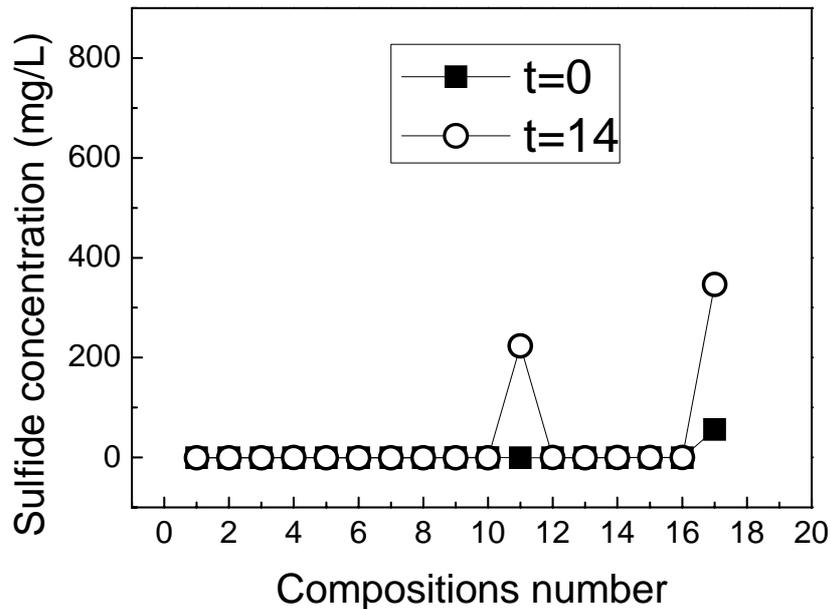


圖 4-3 混合試驗各組反應槽之硫離子濃度之變化情形



4-1.4 重金屬對硫酸鹽還原活性的影響

重金屬對於 SRB 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 SRB 的生物活性，此結果會對利用 SRB 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 SRB 生長的抑制及衝擊是絕對必要的。而本研究利用混合實驗設計法探討重金屬的去除率及其對硫酸還原菌的生長抑制與對硫酸鹽還原效率的影響。

表 4-2 為三種重金屬銅、鋅、鎳對 SRB 之硫酸鹽還原效率影響之混合試驗結果，將其結果以 minitab 統計軟體計算所得之回歸方程式如式

4-1，而表 4-3 及表 4-4 為回歸方程式中各項式之係數表及各因子交互作用分析表。圖 4-4 為三種重金屬（銅、鋅、鎳）對混合培養 SRB 之硫酸鹽還原效率影響結果，經由統計軟體計算所得之等高線圖。

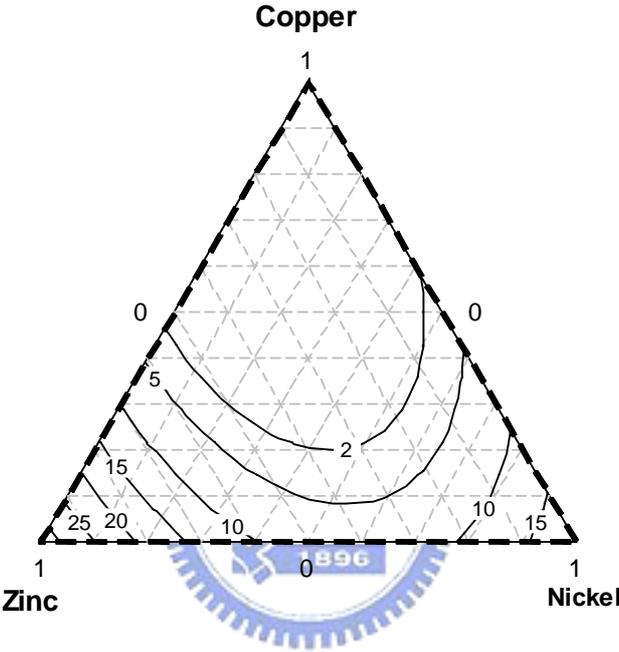


圖 4-4 不同重金屬組合下之硫酸鹽還原率等高線圖 (單位：%)

表 4-2 混合試驗各組反應槽之硫酸鹽還原率

No.	X	Y	Z	Sulfate reduction ratio (%)
1	1	0	0	0
2	0.75	0.25	0	0
3	0.75	0	0.25	0
4	0.5	0.5	0	0
5	0.5	0.25	0.25	0
6	0.5	0	0.5	0
7	0.25	0.75	0	7.36
8	0.25	0.5	0.25	0
9	0.25	0.25	0.5	10.24
10	0.25	0	0.75	7.6
11	0	1	0	37.16
12	0	0.75	0.25	6.16
13	0	0.5	0.5	2.52
14	0	0.25	0.75	11.4
15	0	0	1	8.72
16	0.33	0.33	0.33	0
17	0	0	0	34

備註：硫酸鹽還原率小於 0 者一律視為 0。

由圖可看出，在三種重金屬交互作用下，最小硫酸鹽還原率並非出現在三角形頂點 (1, 0, 0) 的位置，而是出現在約 (0.7, 0.25, 0.07) 的位置，此結果表示此三種重金屬對 SRB 之毒性順序以銅 > 鎳 > 鋅。而由等高線圖可回歸出如下之公式：

Sulfate reduction ratio (%) =

$$1.13 X + 33 Y + 19.65 Z - 65.39 XY - 28.35 XZ - 73.13 YZ \dots\dots(式 4-1)$$

其 R-square 值為 0.85，相關之統計分析表如表 4-3 及表 4-4 所示：在統計意義上若兩因子相乘之二次方項式所得之 p-value 值小於 0.05，表示兩因子有顯著之交互作用，信賴水準為 95%，而由表 4-3 可看出，銅及鎳對 SRB 的毒性交互作用較不顯著，而以銅及鋅兩者之毒性交互作用對 SRB 會產生較明顯的影響。而表 4-4 為所得之回歸方程式之確適性分析，由其 p-value 值皆小於 0.05 可知該方程式在本實驗條件控制下預測未知的硫酸鹽還原效率上有 95% 信賴水準。

表 4-3 各項式之回歸係數統計表

Estimated Regression Coefficients for Sulfate reduction ratio (%)			
Term	Coefficient Estimate	T-value	P-value
Cu^{2+}	1.13	*	*
Zn^{2+}	33.00	*	*
Ni^{2+}	19.65	*	*
$\text{Cu}^{2+} \times \text{Zn}^{2+}$	-65.39	-3.46	0.009
$\text{Cu}^{2+} \times \text{Ni}^{2+}$	-28.35	-1.16	0.280
$\text{Zn}^{2+} \times \text{Ni}^{2+}$	-73.13	-2.84	0.022
R-Sq = 0.85			



表 4-4 各次方項式之 ANOVA 分析表

Analysis of Variance for Sulfate reduction ratio (%)						
Source	D F	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
Regression	5	1120.78	1120.777	224.155	9.08	0.004
Linear	2	593.09	688.073	344.037	13.93	0.002
Quadratic	3	527.68	527.684	175.895	7.12	0.012
Residual Error	8	197.57	197.569	24.696		
Total	13	1318.35				

由上列所得之公式可預測出在其他未進行實驗之任何重金屬混合溶液下，其可得之硫酸鹽還原率。

由圖 4-4 亦可看出，相較於鋅及鎳而言，銅離子對 SRB 生長有較高的抑制作用。Hao et al. (1994) 也曾發表過類似之結果，其文中表示水溶液中存在之銅濃度較鋅及鎳低時，即會對硫酸還原菌產生生長抑制，Utgikar et al. (2003) 亦曾指出銅離子對於 SRB 的毒性較鋅離子大，其毒性常數分別為 10.6 (銅) 及 2.9 (鋅) m/M。

而由圖 4-4 中發現當銅離子濃度低於 45 mg/L 時，仍有硫酸鹽還原作用產生，Booth and Mercer (1963) 兩位學者研究發現，純菌培養之 SRB 可承受之溶液中銅離子濃度約介於 20 到 50 mg/L，此和本實驗所觀察之結果亦相符合。Saleh et al. (1964) 亦曾發表過類似的結果，SRB 所能承受之銅離子濃度與上述數值接近，而鋅離子最大承受濃度約 100 mg/L。在本實驗中，當銅離子濃度高於 60 mg/L 時，即會使 SRB 對乳酸鹽之利用能力完全受抑制。而當水溶液中僅存在鋅離子濃度為 180 mg/L 時，其硫酸鹽還原率可達 37%，此相對應之結果亦可由重金屬去除率中發現，重金屬鋅之去除率明顯較銅及鎳為高，乃是因為高硫酸鹽還原率的關係。Poulson et al. (1997) 曾指出當鎳及鋅的濃度分別大於 10 mg/L 及 13 mg/L 時，會對 *Desulfovibrio Desulfuricans* 明顯造成毒性，且此兩種重金屬混合 (鎳 + 鋅) 之總濃度超過 2.5×10^{-5} M 即會對 SRB 進行硫酸鹽

還原作用產生抑制。

而第 11 組數據所得之重金屬鋅去除率約達 100%，若依理論而言，重金屬可藉由與生物所產生的硫離子相結合而產生沈澱從水相中去除，經由換算結果可推測所產生的硫離子足以完全和所加入之 180 mg/L 重金屬鋅結合沈除進而達到 100% 的重金屬鋅去除率。

相關計算如下：

由混合實驗控制組得知硫離子產生量 = $346 - 56 = 290$ mg/L

第 11 組反應槽 $t = 14$ day 的硫離子濃度 = 224 mg/L

耗損掉的硫離子量 = $290 - 224 = 66$ mg/L

由於第 11 組反應槽 $t = 0$ day 所偵測到的硫離子濃度為 0 mg/L 表示在污泥植入反應槽的瞬間已有生物沈澱反應產生，故應將原污泥含有的硫離子一併加入計算。

故 總耗損調的硫離子量 = $66 + 56 = 122$ mg/L

由於 $Zn^{2+} + S^{2-} \rightarrow ZnS \downarrow$ ($Zn = 65$ g/mole, $S = 32$ g/mole)

可知消耗掉的硫離子毫莫耳數 = $122 / 32 = 3.8125$ mmole

足以去除掉的溶解性的鋅離子量 = $3.8125 \times 65 = 248$ mg/L

然而由分析結果卻發現，當反應第 0 天所得之第 11 組重金屬鋅去除率已高達 99%，但又因計算硫離子被消耗結果推斷重金屬是因生物沈澱所去除，推測其原因為初始加入之重金屬因生物吸附作用而完全附著於微生物

表面，隨著反應時間的增加，硫酸鹽還原作用產生之硫離子再與微生物表面之重金屬結合使重金屬由微生物表面脫附而去除，Diels et al. (2003) 曾指出利用微生物進行重金屬之生物處理，其作用機制不止包含生物吸附作用，亦包含生物沈澱作用，其對鋅及銅離子去除率約介於 95% 到 100%。

4-2 重金屬鋅對生物沉澱系統影響之確認試驗

混合試驗結果顯示，銅、鋅、鎳三種重金屬中以鋅離子對 SRB 之硫酸鹽還原率影響最低(run 11)，為進一步了解其對反應動力及 SRB 族群變化影響，以 run 11 實驗條件及改以 3 L 反應槽再次進行批次確認實驗。由於第二部分實驗過程中需進行採樣，為避免採樣過程中不慎使反應槽成好氧狀態，故於每次採樣後進行曝氣 3-5 分鐘。各分析結果如下所示：

4-2.1 碳源利用情形

由第一部份實驗結果可知，SRB 對碳源利用率約為 30-35%，此部分實驗在相同條件控制下進行反應，反應過程中選擇 12 個時間點採樣以監測碳源被利用之連續變化，其結果如圖 4-5 所示，由圖可發現，在反應時間 48 小時內，未添加任何重金屬之控制組的碳源利用率已達極限，之後從 48 小時至反應第 336 小時內碳源並未有明顯變化，此表示反應槽中之 SRB 生長受到某些因素限制 (後續再說明)，致使其對碳源利用的抑制。

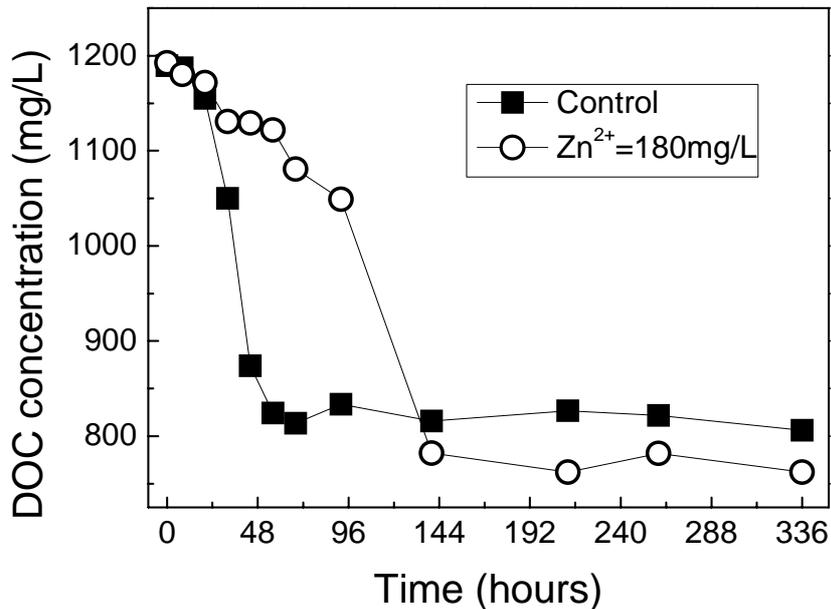


圖 4-5 確認試驗反應 14 天中碳源濃度隨時間變化

而由實驗組 (添加 Zn^{2+} 濃度 180 mg/L) 對碳源利用的結果顯示，在反應 56 小時內，SRB 對碳源利用率相當遲緩，直至 92 小時以後才有明顯的碳源利用情形發生，當反應達 140 小時對碳源利用達到極限，且實驗組對碳源利用率明顯大於控制組，此意味著實驗組中有某些利於 SRB 繼續利用碳源的機制存在。

4-2.2 硫酸鹽還原變化

在混合設計實驗之圖 4-1 及 4-2 可發現到，當 SRB 對碳源利用率低時，其硫酸鹽會被 SRB 釋放出，由測值可看出碳源利用率為 0% 時，

其硫酸鹽濃度則提高很多，該結果在確認試驗中（圖 4-5 及 4-6）亦可明顯看出，控制組 SRB 在反應八小時內對碳源利用率僅 0.17%，則其硫酸鹽濃度相對的增加約 210 mg/L，實驗組中亦出現類似反應，在初期 92 小時內 SRB 對碳源利用率不高，則其硫酸鹽濃度則往上提升，直到有明顯之碳源利用情形發生時，溶液中硫酸鹽才迅速被還原，且其硫酸鹽還原作用皆在兩天內即達到極限，且實驗組及控制組對硫酸鹽還原效率皆相近，此結果暗示著濃度高達 180 mg/L 之重金屬鋅雖會對 SRB 初期之生長產生抑制，但當反應時間長達 6 天以上則可獲得與控制組相同之硫酸鹽還原結果。

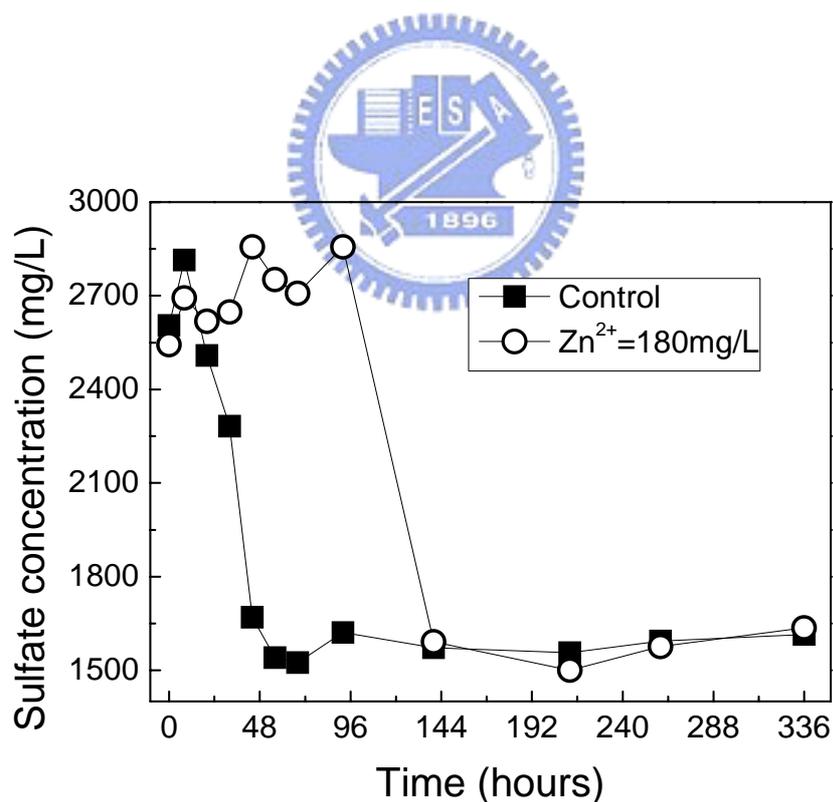


圖 4-6 確認試驗反應 14 天中硫酸鹽濃度隨時間變化

而致使初期硫酸鹽濃度上升的原因，推測可能是因為 SRB 初期接觸到新的生長環境時，突增的高濃度硫酸鹽及重金屬離子使得部分無法適應之 SRB 死亡，而使得原本存在於質體內之硫酸鹽被釋出，才會造成此一結果產生，至於詳細原因尚待更進一步之分析方法才能確認。

4-2.3 硫離子產生變化

硫離子的變化隨著硫酸鹽還原作用的進行而增加，由圖 4-6 及 4-7 可發現，當硫酸鹽還原率達極限時，硫離子的產生濃度亦達最高，隨後開始降低，推測可能是因為高濃度硫離子存在於水中會對 SRB 產生毒性，而抑制其繼續進行硫酸鹽還原作用；若可應用其他方式如 2-5.5 章節提到，利用薄膜方式分離出硫離子，再以不接觸 SRB 菌體為原則的情況下，藉由重金屬與硫離子結合產生沈澱，如此不但可以避免 SRB 菌體受金屬硫化物的阻礙而以連續流方式進行硫酸鹽還原作用，又可持續處理含重金屬廢水。然而在此實驗中，控制組所產生之硫離子會對 SRB 產生毒性而抑制硫酸鹽還原作用的進行，實驗組雖有重金屬可和硫離子產生金屬硫化物沈澱以去除硫離子，然而所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 (Utgikar, 2002)，其結果亦使後續硫酸鹽還原作用受到抑制。

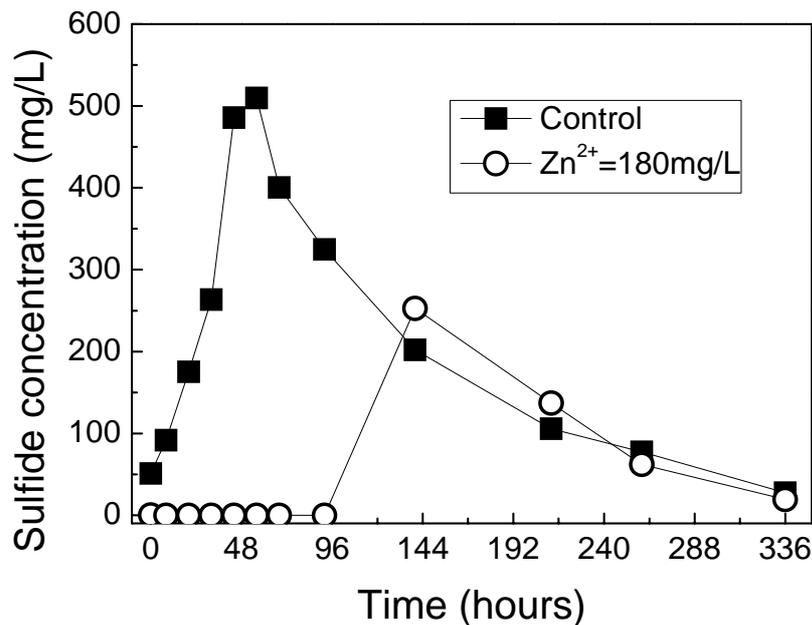


圖 4-7 確認試驗反應 14 天中硫離子濃度隨時間變化



4-2.4 MLVSS 變化

由前一小節結果可知，當硫離子產生濃度過高時，會對硫酸鹽還原作用產生抑制，亦會使 SRB 對碳源的利用能力降低，此一結果亦反應在 MLVSS 上，由圖 4-8 可明顯對照出，當控制組之硫離子濃度持續上升，表示硫酸鹽還原作用正在進行，亦表示 SRB 菌正持續利用水溶液中之碳源以促進其生長，因此在反應 48 小時內，MLVSS 亦隨時間持續上升，當硫離子濃度高達會抑制 SRB 生長時，其對碳源利用率及硫酸鹽還原率降低，MLVSS 濃度亦隨之下降。實驗組亦有類似的現象產生，在反應 96 小時候迅速產生硫離子，產生的硫離子和重金屬反應產生不溶金屬硫化物

而阻礙 SRB 之硫酸鹽還原作用及碳源利用的進行，因而在此同時 MLVSS 濃度亦開始呈現下滑現象，直至 SRB 開始適應另一個新的生長環境後，MLVSS 濃度才又呈現上升現象。

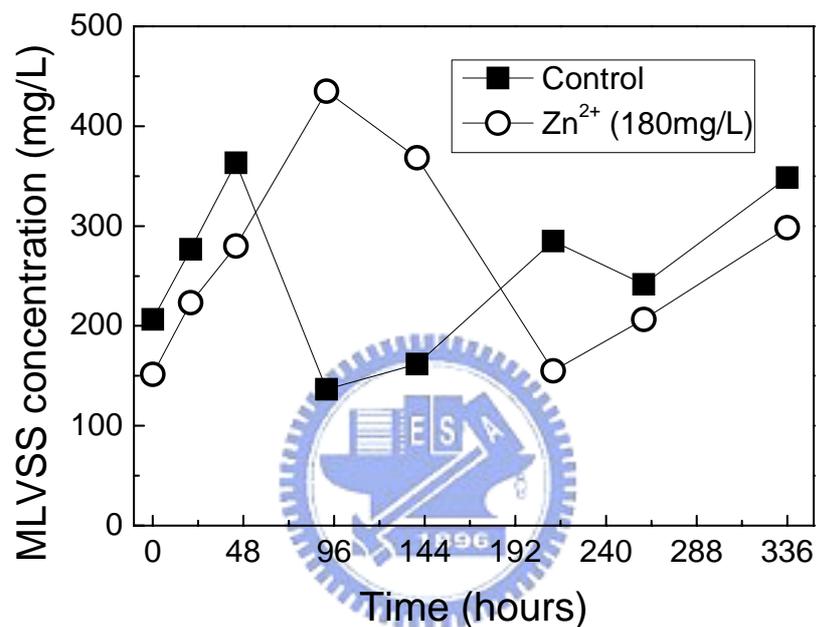


圖 4-8 確認試驗反應 14 天中 MLVSS 濃度隨時間變化

4-2.5 重金屬變化

圖 4-9 可明顯看出，在反應第 96 小時，鋅離子濃度有個明顯落差，濃度從 0.2 mg/L 迅速降為 0.02 mg/L，其造成原因可由圖 4-7 硫離子濃度變化推測出，控制組硫離子在反應第 96 小時，硫離子濃度大幅度產生，所產生的硫離子極易和二價金屬離子發生反應而形成不溶性金屬硫化

物沈澱，因而在第 20 至 68 小時間原本重金屬變化較為平緩，在第 68 小時開始產生硫離子時，則致使鋅離子濃度迅速減少。結果顯示，在反應第 0 小時，水溶液中即有 99.4% 重金屬鋅被移除，且隨時間的增加，至第 68 小時已有 99.88% 重金屬鋅從水溶液中移除，推測在此階段重金屬之去除機制主要是由微生物表面吸附作用所造成。

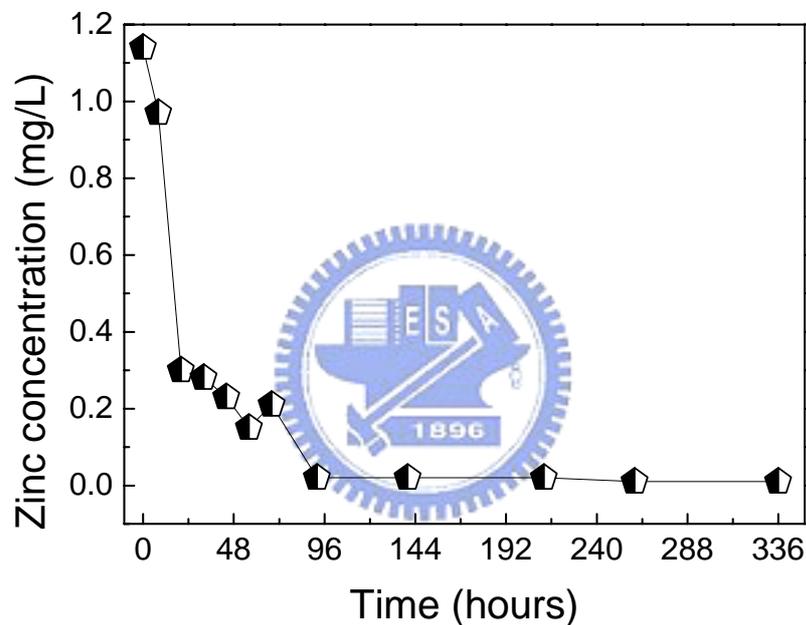


圖 4-9 確認試驗反應 14 天中重金屬鋅濃度隨時間變化

4-2.6 反應速率分析

為進一步瞭解確認試驗於 14 天的反應時間內 SRB 對碳源利用率、硫酸鹽還原率及硫離子產生率的利用情形，故藉由下列公式運算探討各項水質參數之反應速率，經由軟體回歸所得之反應速率結果如表 4-6 所示。

$$dS/dt = Ks$$

$$\int dS = \int Ks \cdot dt$$

$$(S_e - S_0) = Ks (t_e - t_0)$$

表 4-5 是由反應初期水質參數有較明顯的變化數據計算所得的結果，由其數據可更清楚瞭解，控制組之 SRB 對碳源利用速率約為實驗組的 3.7 倍，而硫酸鹽還原速率與硫離子的產生速率之數值很相近，表示兩者之消耗及產生速率幾乎相等，且因控制組反應速率大於實驗組，可證明重金屬鋅在反應初期確實會對 SRB 的生物活性造成影響，然而由前面幾節的最終結果可知，在反應時間長達 14 天的情況下，實驗組與控制組對各水質參數皆有相同的反應率。圖 4-10 為表 4-5 之相對應關係圖。



表 4-5 確認試驗之各項反應速率分析表

	反應速率 Ks (ML-1hr-1)	
	控制組	實驗組
碳源利用	0.48	0.13
硫酸鹽還原	0.22	0.10
硫離子產生	0.26	0.16

備註：控制組之 R-square 約介於 0.91-0.95

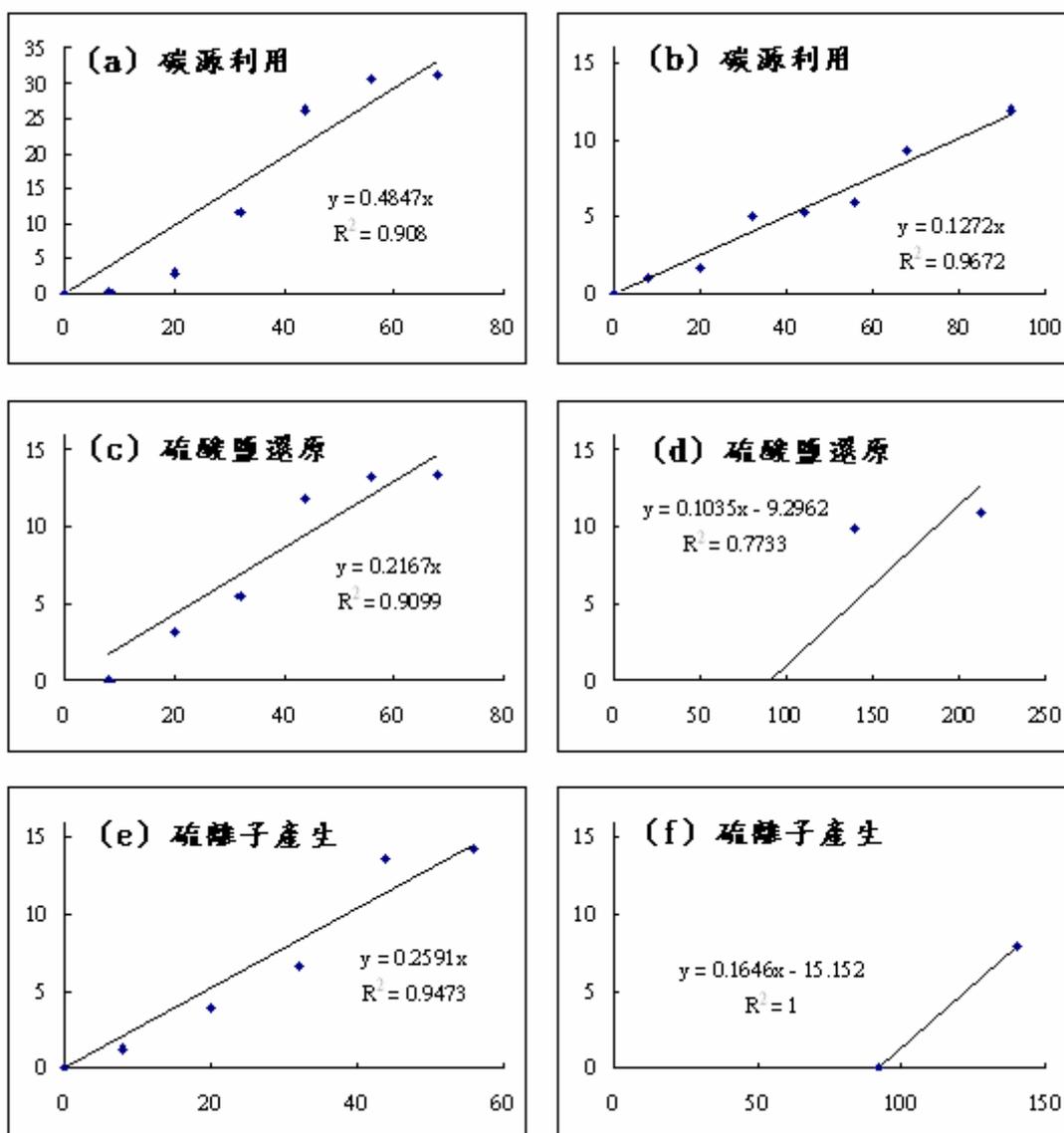


圖 4-10 確認試驗之碳源利用、硫酸鹽還原及硫離子產生對時間之相關線性圖。(a) 控制組之碳源變化與時間之線性關係；(b) 實驗組之碳源變化與時間之線性關係；(c) 控制組之硫酸鹽還原變化與時間之線性關係；(d) 實驗組之硫酸鹽還原變化與時間之線性關係；(e) 控制組之硫離子產生變化與時間之線性關係；(f) 實驗組之硫離子產生變化與時間之線性關係。

4-3 混合設計與確認試驗結果比較

結合硫酸鹽、硫離子及溶解性有機碳濃度變化圖可比較發現三者在此時間上的變化是同步發生的，碳源消耗之遲滯同時硫酸鹽濃度也隨時間增加，當碳源與硫酸鹽受 SRB 的利用率增加時，硫離子產生量也隨之提高，直至產生之硫離子濃度過高，開始會對 SRB 產生毒性抑制時，硫酸鹽還原率及碳源消耗率隨即終止 (圖 4-11)，同樣的結果亦可從圖 4-12 看出，唯一不同點為，實驗組之硫酸鹽還原率及碳源利用率之中止時間相較於控制組延後約 4 天。

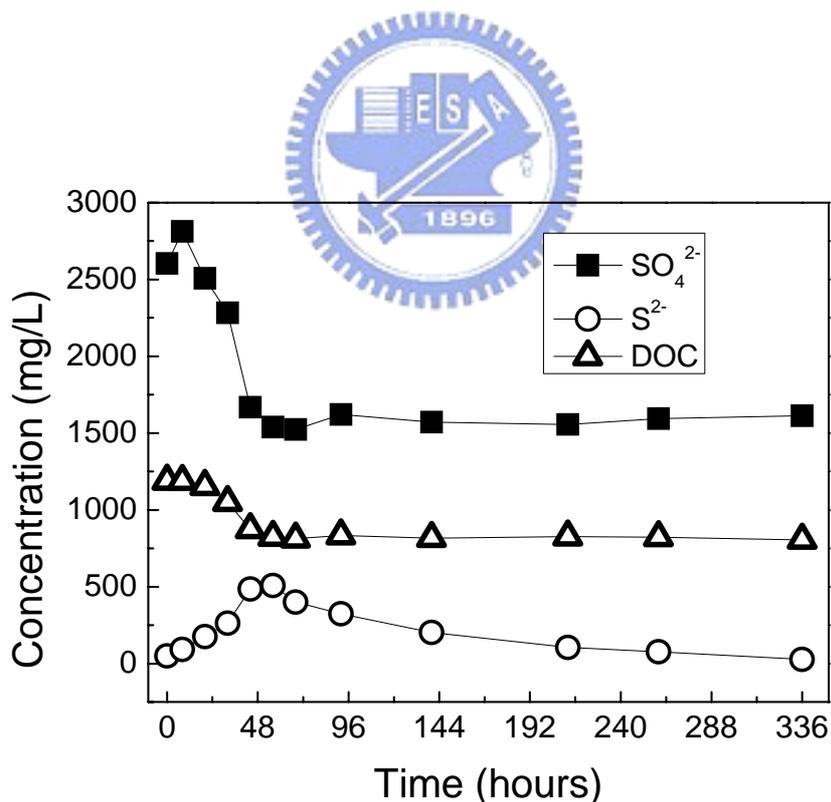


圖 4-11 控制組硫酸鹽、硫離子及 DOC 對時間變化圖

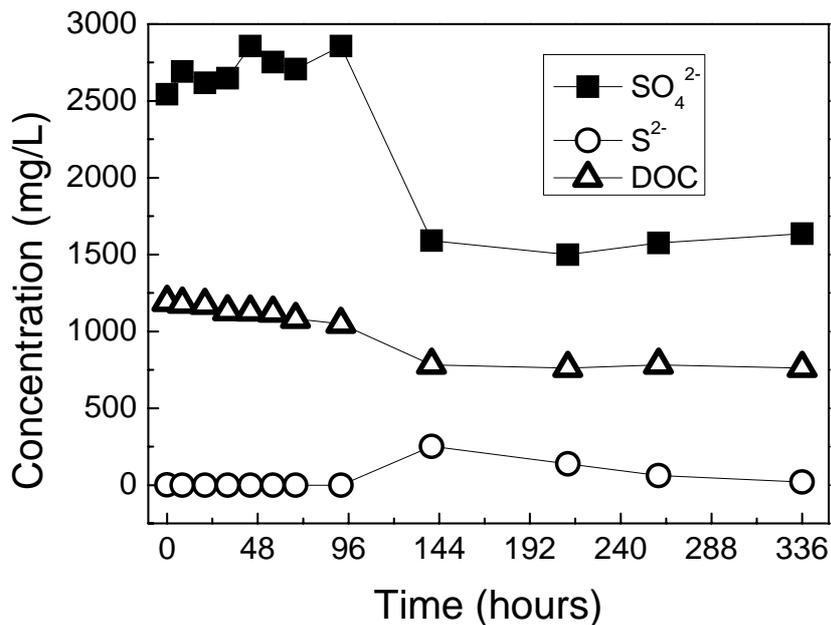


圖 4-12 實驗組硫酸鹽、硫離子及 DOC 對時間變化圖



4-4 吸附作用與沈澱作用的探討

上述結果皆以硫酸鹽被還原量換算成硫離子產量之比較，來證明重金屬去除是藉由生物沈澱程序所造成，然而對於微生物表面吸附作用的影響力卻不容忽視；故針對微生物吸附作用本實驗室曾進行過 SRB 對重金屬銅的吸附實驗，其結果顯示，經高溫高壓 (121°C, 15 分鐘) 處理後的 SRB 污泥對重金屬銅的吸附量為 1.2 mg-Cu²⁺/mg-MLVSS，而 未經高溫高壓處理之 SRB 污泥對重金屬銅的吸附量則為 1.28 mg-Cu²⁺/mg-MLVSS；雖然未進行 SRB 對重金屬鋅吸附量的實驗，然而由混合實驗重金屬分析的數據結果可發現，在反應第 0 小時所測得之銅及鋅的去除率皆介於

95-100%，除了部分重金屬的去除是經由原本殘留在污泥中的硫離子沈澱作用去除外，其餘水相中重金屬的去除應皆為吸附作用所造成，致使在反應第 0 小時重金屬銅及鋅即有大於 95% 的去除率，故在此假設 SRB 對鋅的吸附量與銅相接近 ($1.28 \text{ mg-Zn}^{2+}/\text{mg-MLVSS}$)，經由換算結果得知，所加入的 SRB 污泥足以將鋅離子完全吸附 (可吸附量： 584 mg-Zn^{2+})。

在同時提供兩種去除重金屬途徑的情況下，微生物表面的吸附作用與化學結合的沈澱作用可說是反應瞬間即可同時進行的，然而吸附作用是在吸附劑表面瞬間附著上第一層物質後，隨著反應時間增加而繼續吸附量達飽和，化學作用則是在瞬間及反應完全，故扣除實驗組中原本存在污泥中的硫離子濃度 (27 mg/L) 所能反應掉的鋅離子量 (55 mg/L)，剩餘 125 mg/L 鋅離子在水相中能達近乎 100% 上的去除率推測是由微生物表面吸附作用所造成，然而隨著反應時間的增加，由控制組及實驗組的硫離子測得結果發現，實驗組中確實有明顯的硫離子耗損，故推測硫離子耗損的原因乃是因原本吸附在微生物表面的鋅離子與後續產生的硫離子結合產生生物沈澱作用而造成硫離子的減少，其結果亦可由 FISH 分析結果得到證實。

相關計算如下：

確認試驗體積 = 3 L

初始反應槽鋅離子濃度 = $180 \text{ mg-Zn}^{2+}/\text{L}$

初始反應槽硫離子濃度 = $27 \text{ mg-S}^{2-}/\text{L}$

初始反應槽 MLVSS 濃度 = 152 mg-MLVSS/L

則 t = 0 hour 時經由沈澱去除的鋅離子濃度

$$= 27 \text{ mg-S}^{2-}/\text{L} \div 32 \text{ g-S}^{2-}/\text{mole} \times 65 \text{ g-Zn}^{2+}/\text{mole} = 55 \text{ mg-Zn}^{2+}/\text{L}$$

水相中剩餘鋅離子濃度 = 180 - 55 = 125 mg-Zn²⁺/L

水相中剩餘鋅離子量 = 125 mg-Zn²⁺/L × 3 L = 375 mg-Zn²⁺

反應槽中 MLVSS 量 = 152 mg-MLVSS/L × 3 L = 456 mg-MLVSS

假設 SRB 對鋅離子的表面吸附量 = 1.28 mg-Zn²⁺/mg-MLVSS

SRB 污泥可吸附之鋅離子量 = 1.28 × 456 = 584 mg-Zn²⁺

4-5 FISH 分析結果



DAPI (4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole) 染色原理主要是利用其與 DNA 上的 A = T 鍵結合產生反應，使其於螢光顯微鏡下呈藍色反應以利數量計算用，所以其目標為所有含有 DNA 遺傳物質的有機體，故可視為總菌數之觀察 (Hick et al., 1992)。本實驗將 DAPI 計算結果視為總菌數，搭配三種不同 Probe (EUB338、SRB385、SRB385Db)，由於不同 Probe 可針對不同 SRB 族群進行雜交 (表 3-7)，故分別及算各個 Probe 佔 DAPI (總菌數) 百分比來表示各個族群佔反應槽中總菌數多寡，以方便判定 SRB 是否為反應槽中之優勢菌。

4-5.1 微生物生長生長變化

本實驗利用分子生物技術之螢光原位雜交法分析第二階段確認試驗中微生物之變化及數量，此方法相較於傳統方法之優點為不需額外進行培養，即可針對特定微生物進行定量，可節省較多的時間。在本實驗之實驗組及控制組反應過程中選擇七個時間點採樣進行固定、雜交等特殊處理後，再進行螢光顯微照相。圖 4-13 至 4-20 分別為確認試驗實驗組植入前的污泥及反應時間為 0、20、44、92、140、212、336 小時污泥進行雜交 (EUB338) 後之 DAPI stain 照相結果。由圖 4-13 可看出，馴養 7 天後之污泥中分佈著經染色呈現藍色形狀為短桿狀之微生物，除微生物外鮮少發現其他雜質，然而在實驗組反應時間 0 小時之螢光顯微照片中卻發現所有微生物皆被澄紅色物質所包覆 (圖 4-14)，但隨著反應時間的增加，包覆在微生物外的澄紅色物質卻漸漸減少，由於在控制組中的螢光顯微照片中並未發現類似的物質，且實驗組及控制組唯一不同的反應條件為實驗組中含有 180 mg/L 的重金屬鋅離子，故可推測該物質應為重金屬鋅。由照片中亦可發現，隨著反應時間的增加，澄紅色物質亦逐漸減少，當反應時間達 140 小時時，幾乎沒有發現澄紅色物質存在，推測重金屬鋅可能在污泥植入實驗組反應槽後，迅速與微生物表面的物質產生結合作用，故原始鋅離子濃度為 180 mg/L，在反應 0 小時後水相中所測得之鋅離子濃度僅剩 1.14 mg/L (圖 4-9)，前面所推測之鋅離子迅速減少的原因除了少部分

為生物沈澱作用外，其餘為吸附作用所造成，在此部分之螢光顯微照相結果可得到證實。

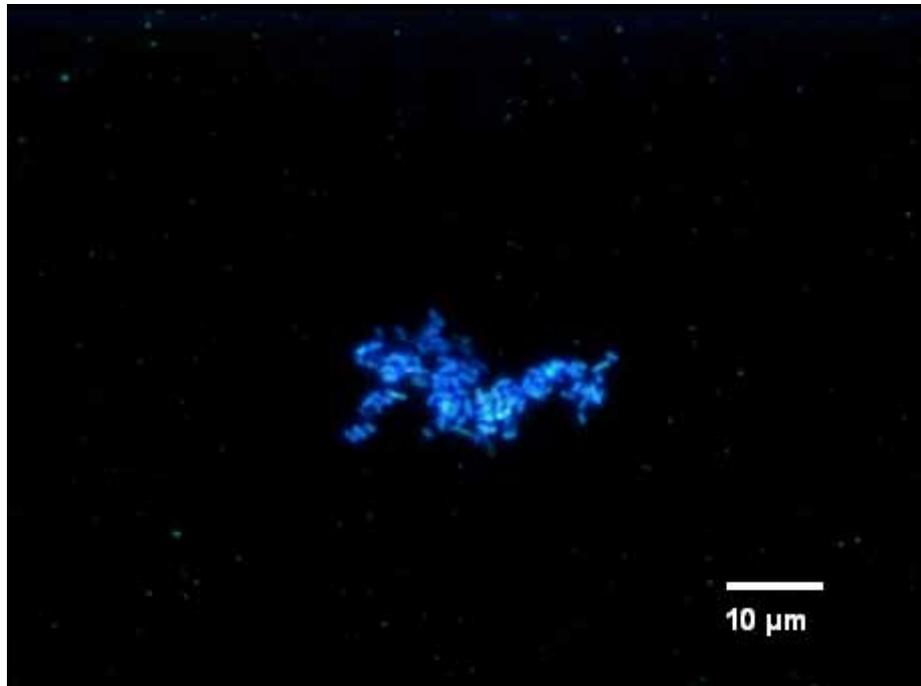


圖 4-13 確認試驗實驗組植種前之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

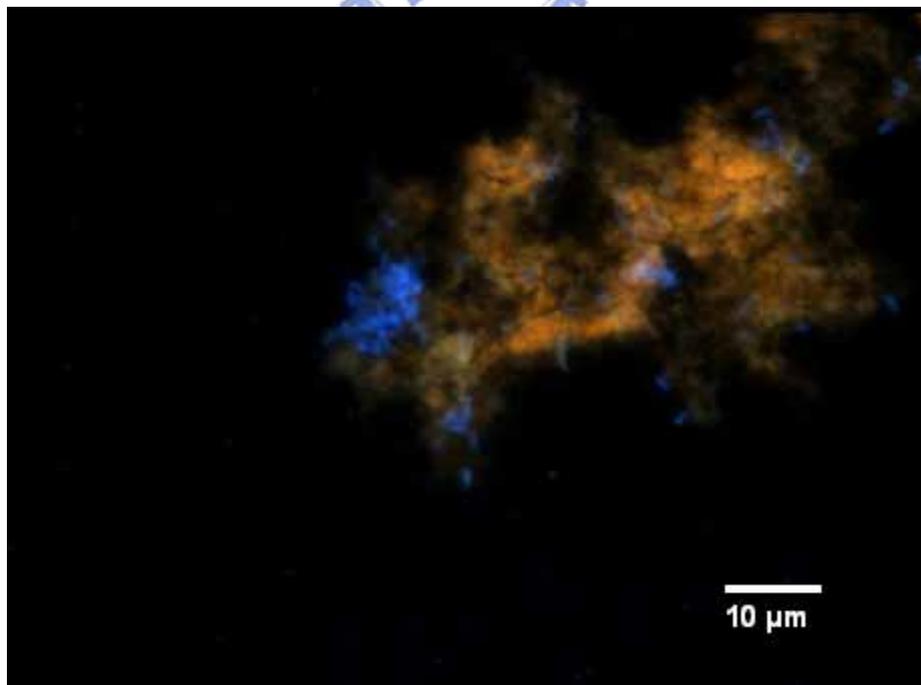


圖 4-14 確認試驗實驗組 t = 0 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

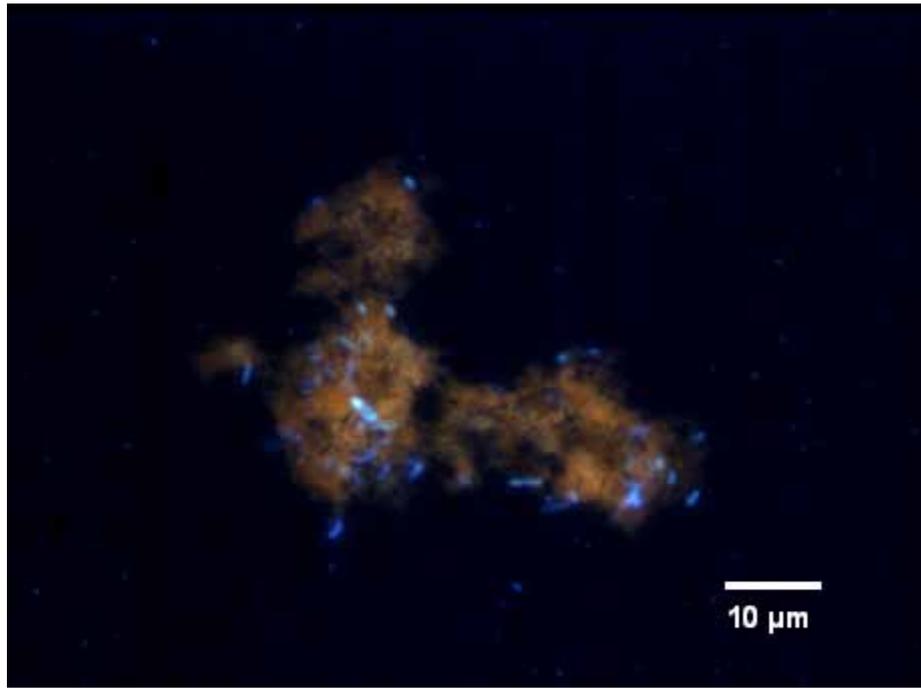


圖 4-15 確認試驗實驗組 t = 20 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

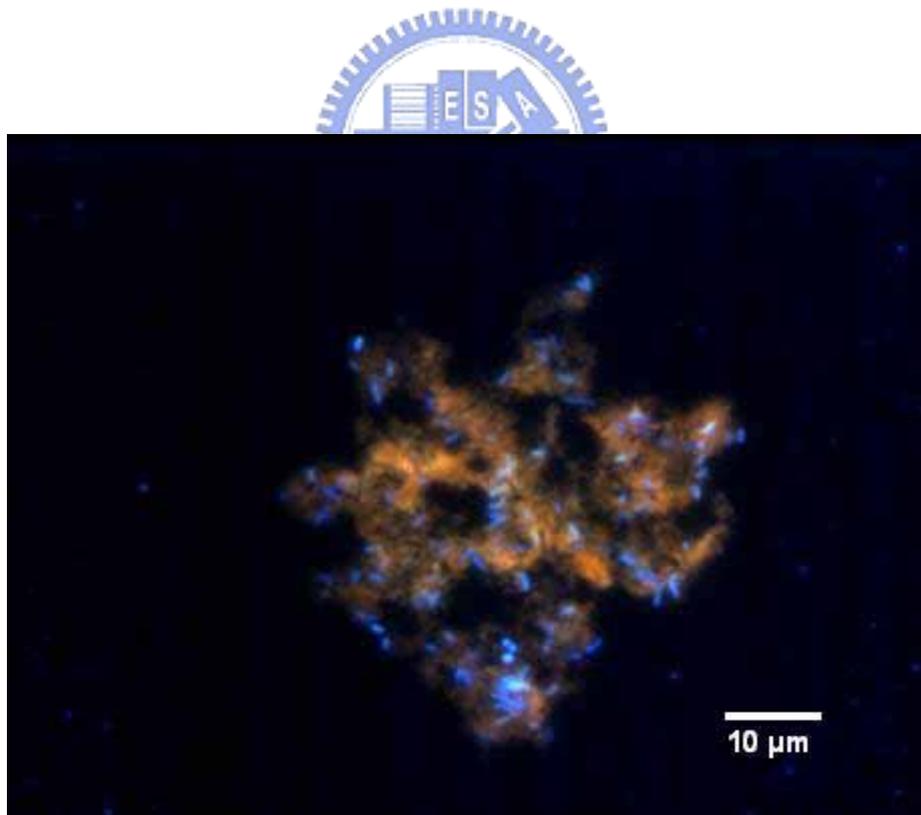


圖 4-16 確認試驗實驗組 t = 44 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

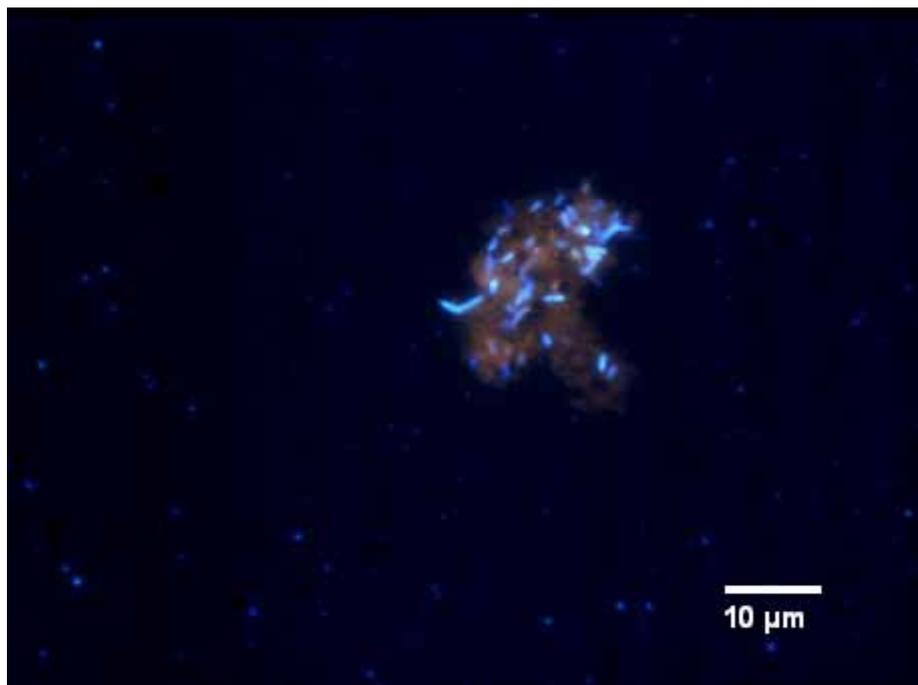


圖 4-17 確認試驗實驗組 t = 92 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

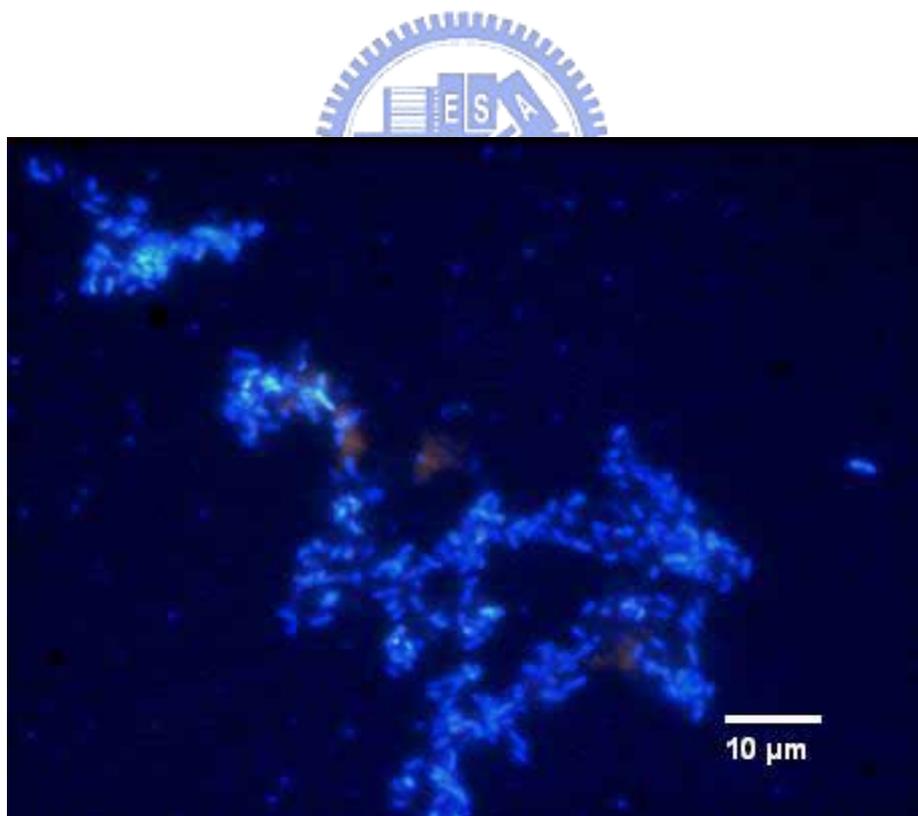


圖 4-18 確認試驗實驗組 t = 140 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

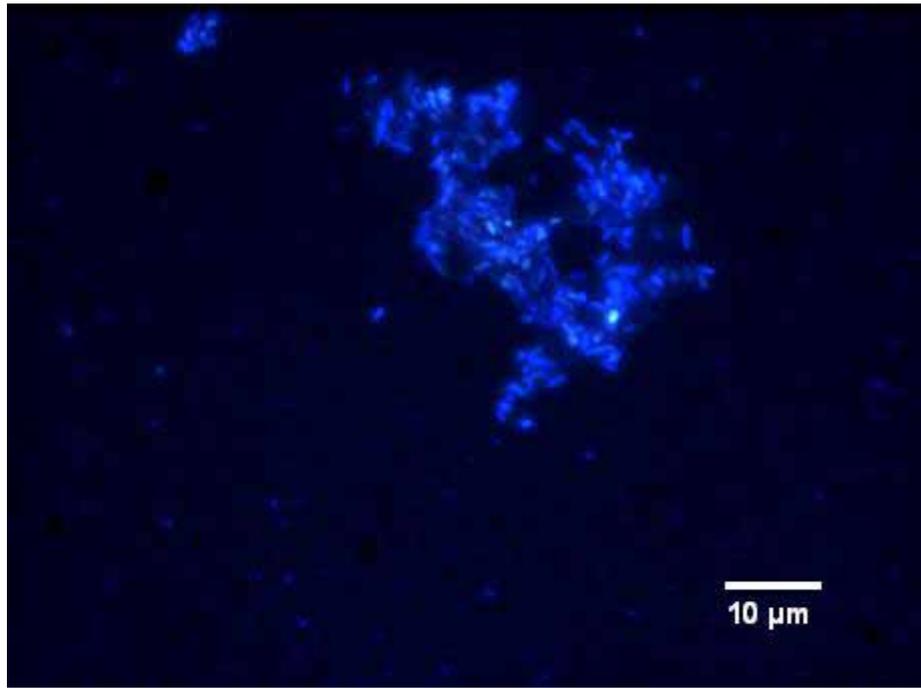


圖 4-19 確認試驗實驗組 t = 212 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

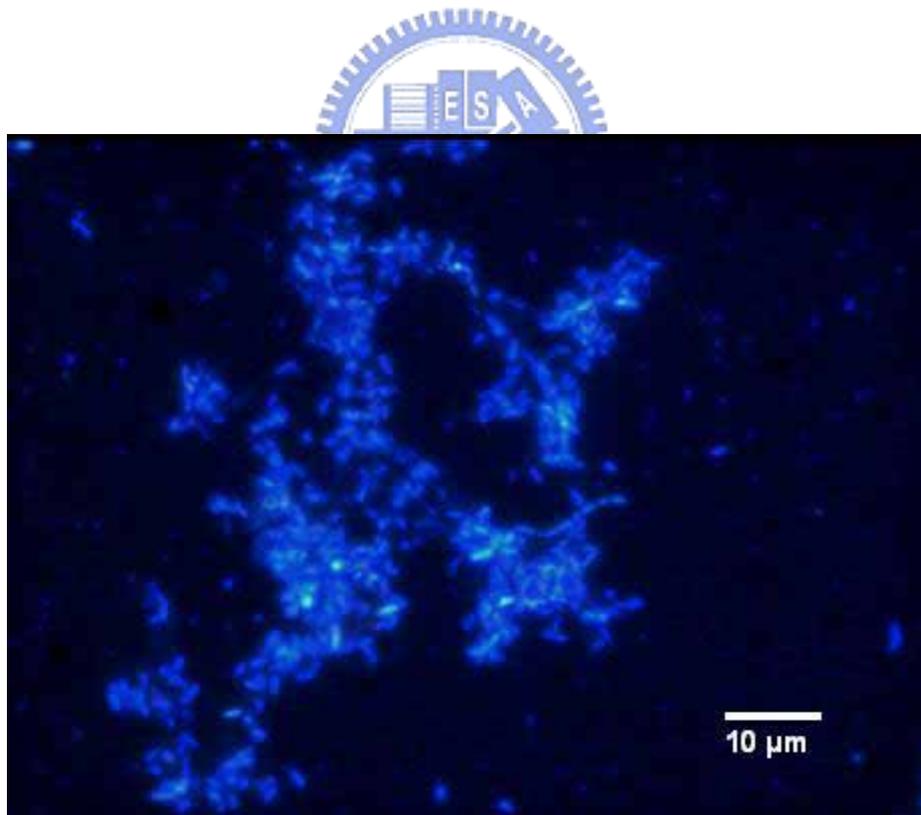


圖 4-20 確認試驗實驗組 t = 336 小時之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

4-5.2 FISH 的干擾

利用分子生物技術之螢光原位雜交法的目的，是希望能利用具專一性的探針找出反應槽中 SRB 佔總菌數的比例，及得知其族群數量及結構的變化；然而在觀察顯微鏡時卻發現實驗組出現嚴重受干擾的情形發生，圖 4-13 到 4-20 的照片為雜上 EUB338 探針後所觀察染上 DAPI 的螢光顯微照片情形，由照片中可明顯分辨出染上 DAPI 藍色的菌及澄紅色不明物質，然而當以特殊濾鏡 (Cy3) 觀察雜上探針的螢光顯微照片卻發現，在此濾鏡下無論是菌或不明澄紅色物質皆呈現大紅色現象如圖 4-21，該圖為圖 4-17 之 Probe (EUB338) 圖，由圖 4-21 可見所有物質在螢光顯微鏡下皆呈紅色，並無菌體與雜質的分別，由於此現象僅出現在實驗組，故推測該干擾的物質為鋅離子所造成。

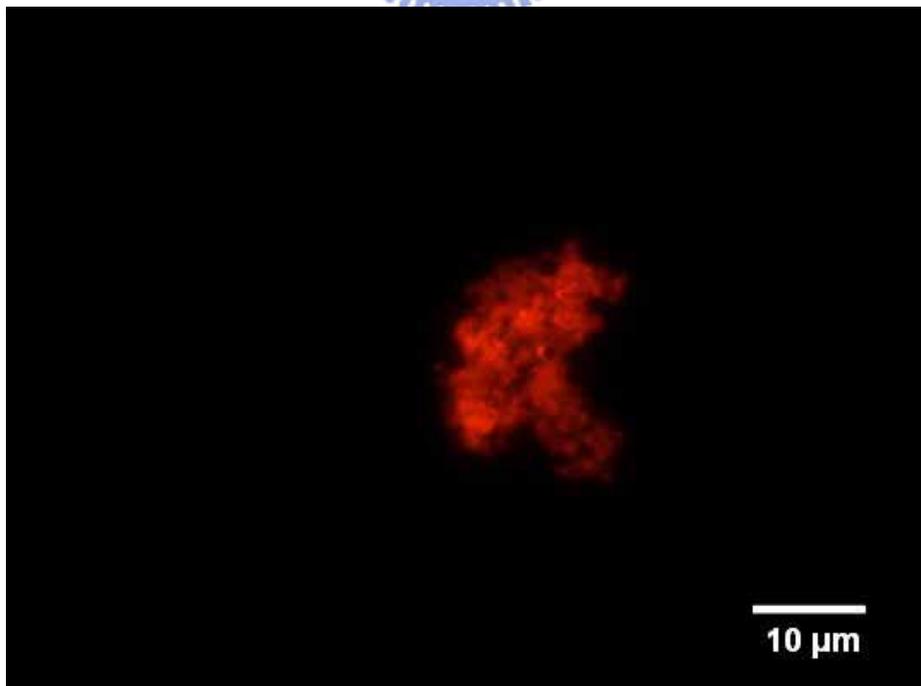


圖 4-21 確認試驗實驗組 $t = 92$ 小時之污泥雜 EUB338 之螢光顯微照片

為進一步證實造成干擾現象的物質為鋅離子，故後續再增加一組實驗，將單純氯化鋅所配成之化學溶液進行雜交實驗，選擇一部份 Well 以 EUB338 探針進行雜交後染 DAPI，另一部份僅進行染 DAPI 的步驟，其螢光顯微照相結果如圖 4-22 到 4-25 所示，圖 4-22 為雜上 EUB338 探針後在螢光顯微鏡下觀察染 DAPI 的情形，由畫面中並未發現任染上 DAPI 的物質，此與前一小節所敘述推測澄紅色物質為鋅離子的結果相互矛盾，然而觀察圖 4-22 所相對應之 Cy3 照片 (圖 4-23) 卻發現大片呈現紅色物質，由於進行此部分實驗的樣品中僅含氯化鋅溶液，故推測氯化鋅在以探針進行雜交後會對螢光顯微結果造成干擾；而圖 4-24 為氯化鋅溶液直接染 DAPI 後在螢光顯微鏡下觀察染上 DAPI 的情形，該結果與圖 4-22 相同，畫面中並未發現任染上 DAPI 的物質，再觀察與對應的 Cy3 螢光顯微情形亦無紅色物質產生，故可證實氯化鋅水溶液在進行探針雜交時確實會對螢光顯微照相結果造成干擾。再進一步討論為何鋅離子在此部分的 DAPI 螢光顯微照片中並未呈現澄紅色現象，推測當鋅離子與 SRB 污泥進行混何時，可能由於鋅離子與微生物表面某些有機物質 (如：胞外聚合物等) 產生吸附或結合，使得在進行 DAPI 染色時染劑會對此物質產生反應，而於螢光顯微鏡下呈現澄紅色現象，至於詳細原因則需進一步利用其他方式加以探究。

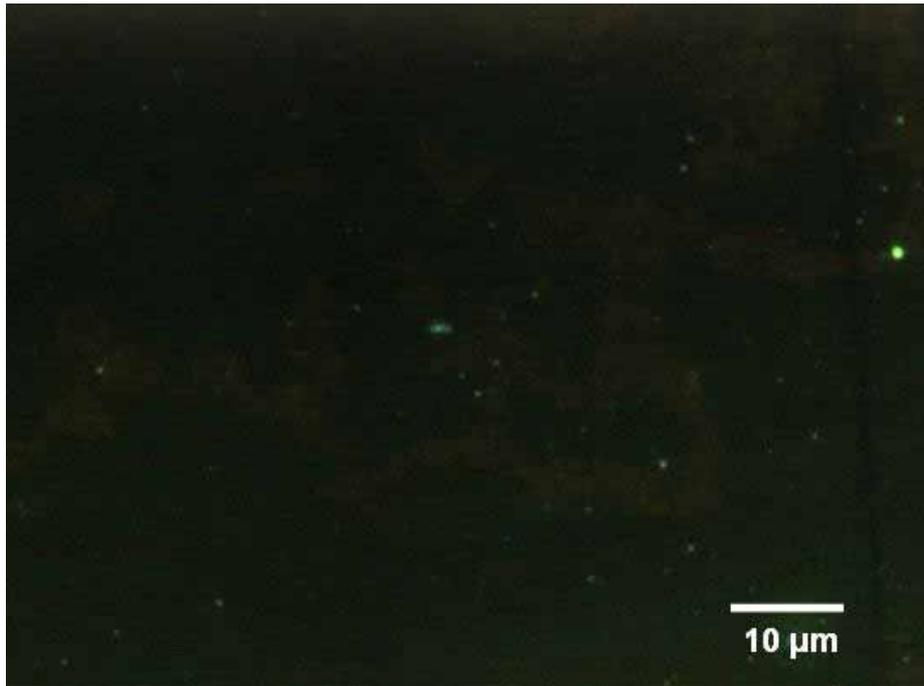


圖 4-22 氯化鋅溶液有雜 EUB338 探針之 DAPI 螢光顯微照片

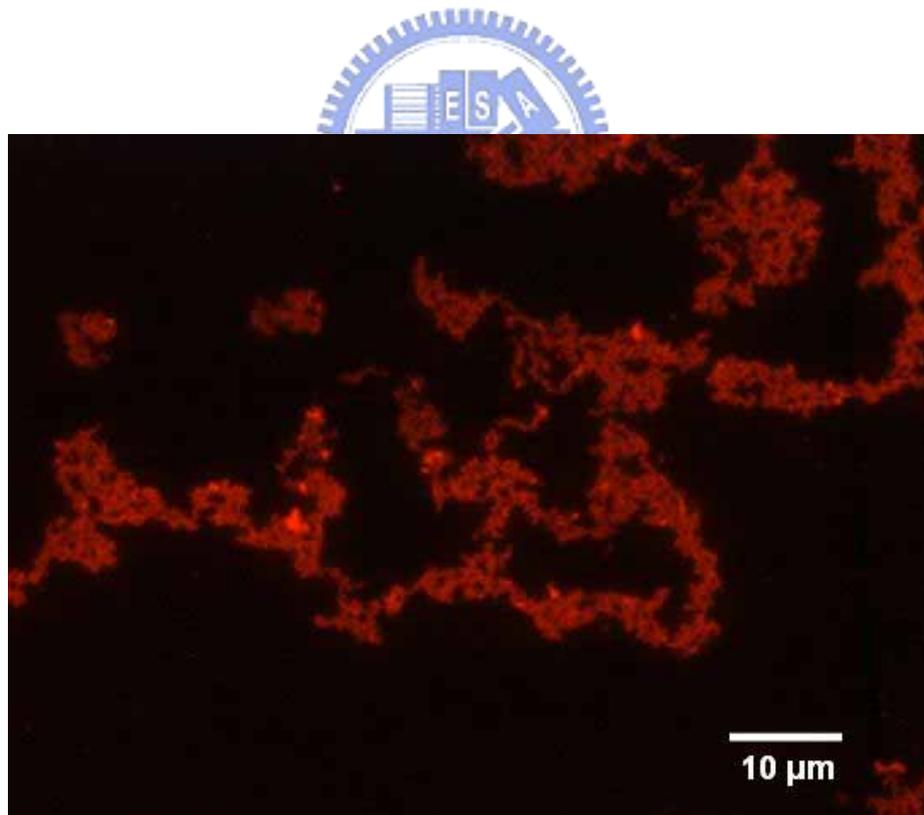


圖 4-23 氯化鋅溶液有雜 EUB338 探針之 Cy3 螢光顯微照片

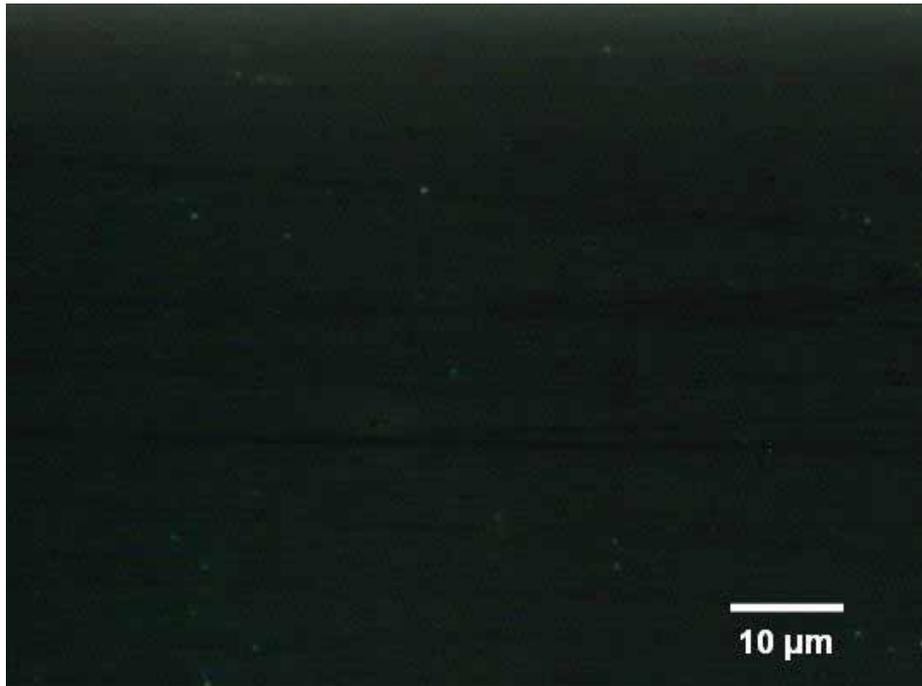


圖 4-24 氯化鋅溶液沒有雜任何探針之 DAPI 螢光顯微照片



圖 4-25 氯化鋅溶液沒有雜任何探針之 Cy3 螢光顯微照片

4-5.3 FISH 的百分比及數量計算

本實驗在 FISH 百分比計算部分，採用 IPP (Image-Pro Plus 5.1) 軟體進行計算，由於當螢光顯微照片中微生物個數有重疊現象發生時，容易造成計算個數的誤差，故採用面積計算方式，找出微生物族群 (Probe，如圖 4-26) 佔總菌數 (DAPI，如圖 4-27) 面積百分比的結果進行討論。而由於鋅離子會對 Probe 雜交後的照相結果產生干擾，造成實驗組 SRB 佔總菌面積百分比無法計算，故本實驗僅對控制組織 Probe 佔 DAPI 百分比做計算，其計算結果如表 4-6 所示。由其數據結果可知，在反應 14 天中 EUB338 佔 DAPI 百分比約為 80%，由於 EUB338 只針對所有 bacteria 進行雜交，若反應槽中存在真核生物則無法藉由 EUB338 探針的雜交進行討論，故表示在此確認試驗反應槽中，bacteria 數量約佔總微生物數量約 80%；而由另外兩種特別針對硫酸還原菌具專一性的探針 (SRB385 及 SRB385Db) 雜交分析結果可知，在此確認實驗中，硫酸還原菌之族群數量佔總微生物數量約為 55-60%。

表 4-6 確認試驗控制組 Probe 佔 DAPI 百分比

Time (hour)	Probe / DAPI (%)		
	EUB338	SRB385	SRB385Db
0	89	57	70
0	81	54	64
20	81	54	54
44	86	51	51
92	78	56	69
140	85	56	54
212	76	53	62
336	80	55	65

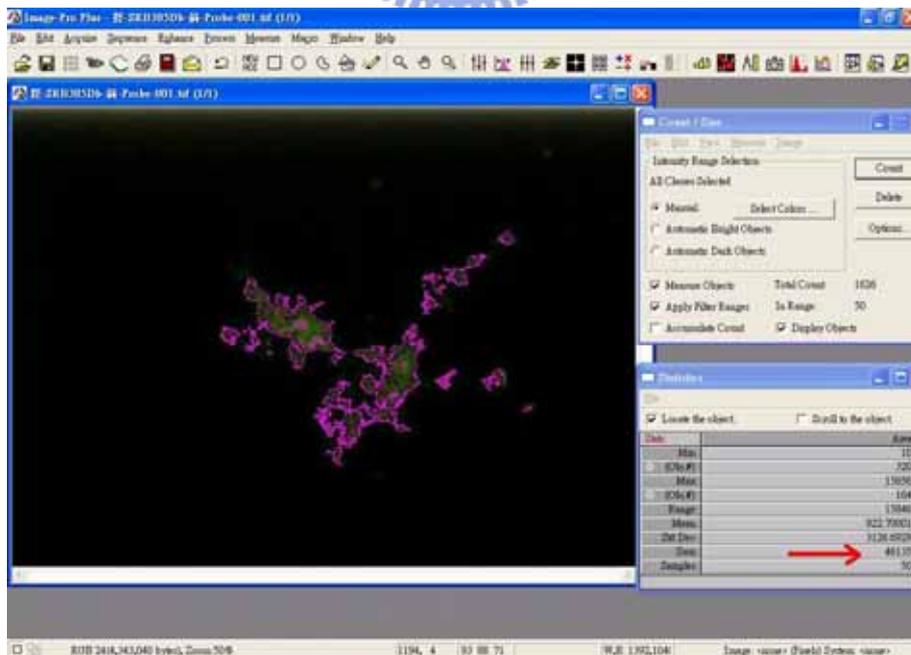


圖 4-26 軟體計算 Probe stain 結果

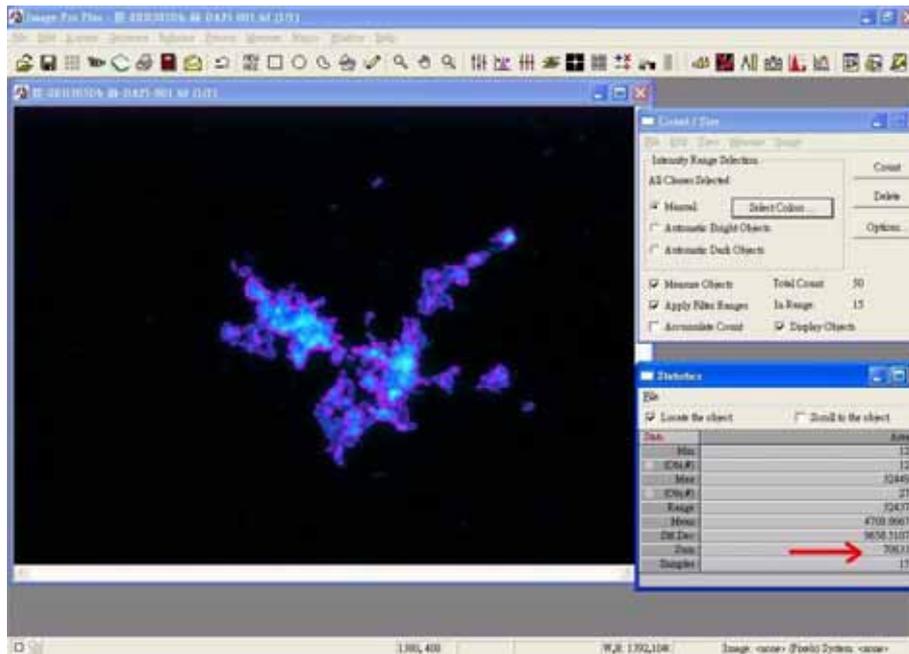


圖 4-27 軟體計算 DAPI stain 結果

至於微生物數量的計算，由於螢光顯微照相結果若有微生物個體重疊現象產生時，則會造成軟體計數上的誤差，故改以人工判斷方式計算反應槽中總微生物數量，圖 4-28 為控制組染 DAPI 之螢光顯微照片其中一範例，其計方式如圖 4-29 所示，在每一採樣時間點所照的結果選則 10 張照片計算每張照片中的菌體個數取平均，再反推算反應槽中理論之微生物濃度，計數結果如表 4-7 所示，相關計算方式如下：

玻片每個 Well 半徑 = 3.35 mm = 3350 μ m

$$\text{面積} = (3350)^2 \times \pi = 35256524 \mu\text{m}^2$$

照片長 = 82 μ m

寬 = 60 μ m

$$\text{面積} = 4920 \mu\text{m}^2$$

Well 面積 / 照片面積 = 7166 倍

總菌數 (cells/well) = 平均菌數 \times 7166

總菌濃度 (cells/mL) = 總菌數 \times 4 \times 1000 \div 3

備註：每個 Well 點入已固定的 樣品 量為 3 μ L

原污泥在固定時皆稀釋 4 倍

由表 4-7 的結果可知，本實驗反應槽中整體之微生物個數約為 10^9 cells/mL。

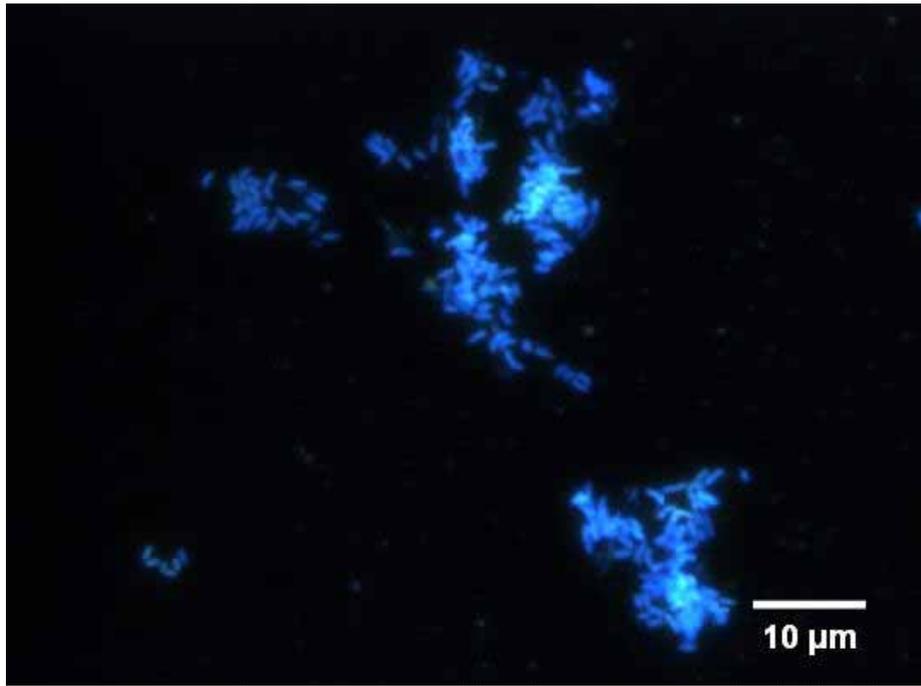


圖 4-28 確認試驗控制組之污泥 DAPI stain 螢光顯微照片

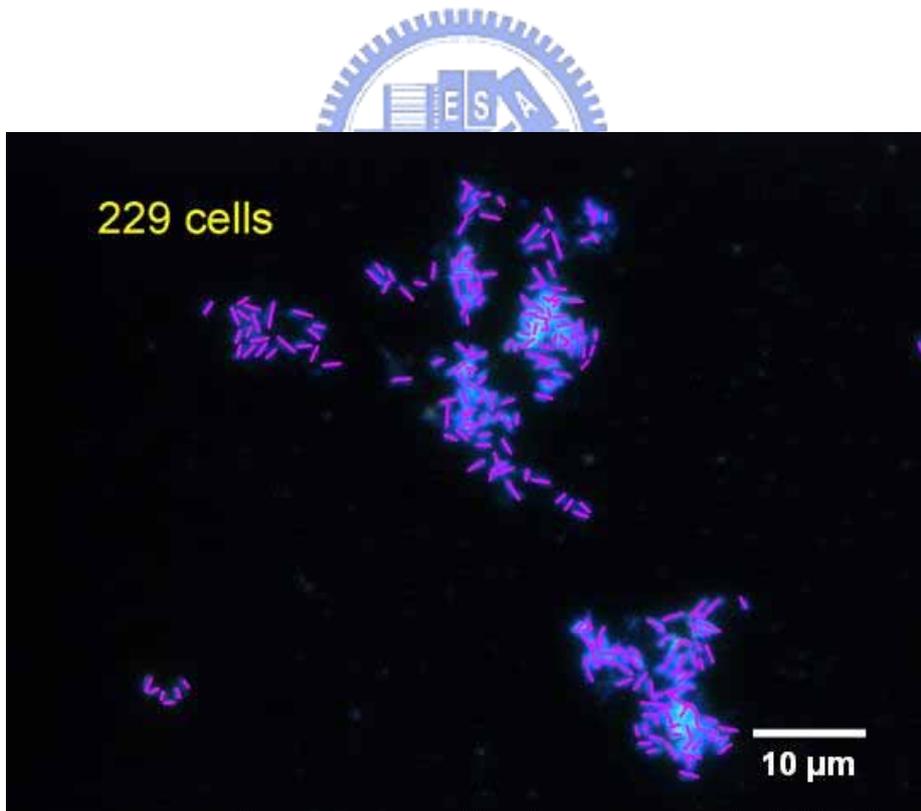


圖 4-29 DAPI stain 螢光顯微照片計數方式

表 4-7 確認試驗控制組 DAPI stain 數量計算

照片編號	個數計算 (cells)						
	0 hr	20 hr	44 hr	92 hr	140 hr	212 hr	336 hr
1	152	204	268	200	231	204	409
2	129	135	229	122	198	198	420
3	127	146	216	104	207	330	380
4	199	98	220	215	204	351	301
5	142	209	187	110	300	487	260
6	156	173	364	156	194	190	451
7	193	88	258	101	202	267	208
8	184	222	179	123	352	190	258
9	135	87	236	109	234	278	208
10	133	99	274	156	356	364	407
平均 (cells)	155	146	243	140	248	286	330
標準偏差 (cells)	27	53	53	41	64	98	93
總菌數 (cells/well)	1110724	1046947	1742045	1000368	1775725	2048748	2366200
總菌濃度 (cells/mL)	1.481×10^9	1.396×10^9	2.323×10^9	1.334×10^9	2.368×10^9	2.732×10^9	3.155×10^9

4-6 DGGE 分析結果

利用變性梯度膠體電泳法的優點在於不需利用分離純菌馴養方式，即可分離出所欲瞭解的菌種，藉由微生物 DNA 的萃取，利用 519fGC-907r 這一組引子進行 PCR 放大，反應後將 PCR 產物置於變性梯度為 30-70%，濃度 7% 的 polyacrylamide gel 中進行電泳分析，在 200 V 的電壓下電泳 5 小時，其結果如圖 4-30 及 4-31 所示。圖 4-30 為確認試驗控制組反應之原污泥及反應第 0、20、44、92、140、212、336 小時的微生物變化，分別以 1 到 8 進行編號，由圖可明顯看出，從原污泥到反應第 0 小時至第 336 小時微生物的菌相幾乎沒有任何改變，表示此馴養環境對於反應槽中的微生物生長並未造成任何衝擊及影響；然而在圖 4-31 中卻發現在反應第 20 小時開始出現另一族群微生物相，而在反應第 92 小時則有某一微生物族群數量急遽減少（箭頭指處），由此結果可知，重金屬鋅的添加會引起 SRB 菌相的改變，使在重金屬存在的環境下亦能生長之 SRB 菌種成為優勢菌種，至於詳細菌種為何，則需進一步定序得知。

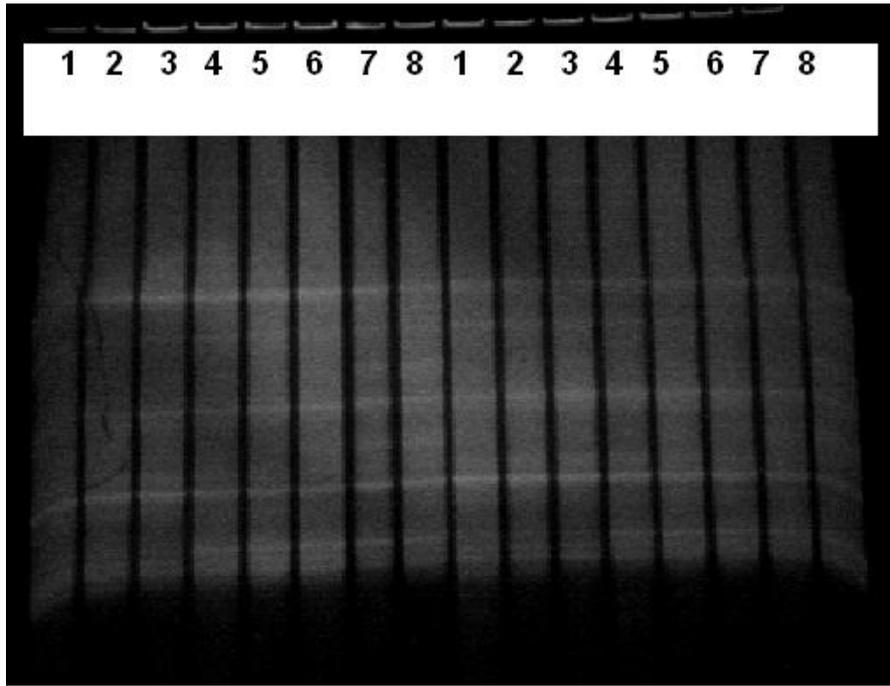


圖 4-30 確認試驗控制組 DGGE 之微生物相變化 (二重複)

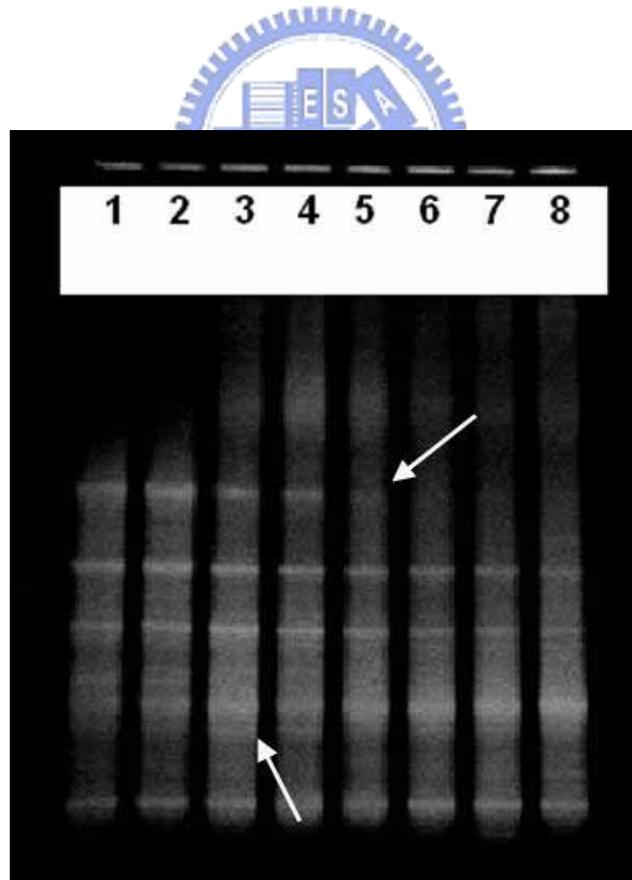


圖 4-31 確認試驗實驗組 DGGE 之微生物相變化