

國立交通大學
環境工程研究所

碩士論文

胞外聚合物對生物重金屬溶出程序之影響

Effect of Extracellular Polymeric Substance (EPS) on bioleaching



研究生：范少奇

指導教授：林志高 博士

中華民國 九十四 年 六 月

胞外聚合物對生物重金屬溶出程序之影響

Effect of Extracellular Polymeric Substance (EPS) on bioleaching
process

研究生：范少奇

Student: Shao-Chi Fan

指導教授：林志高 博士

Adviser: Dr. Jih-Gaw Lin

國立交通大學

環境工程研究所

碩士論文



A Thesis

Submitted to Institute of Environmental Engineering
College of Engineering
National Chiao Tung University
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
In

Environmental Engineering

June 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年六月

胞外聚合物對生物重金屬溶出程序之影響

研究生：范少奇

指導教授：林志高 博士

國立交通大學環境工程研究所

摘要

因微生物胞外聚合物 (Extracellular Polymeric Substance, EPS) 在生物處理程序中可促進微生物群體之膠凝作用，進而形成顆粒化污泥或附着性生物膜，有助於微生物總量之增加和多元化菌種之截流，以達廢水中污染物之徹底分解。而由於 EPS 在生物溶出法中主要三大機制：(1) 保護作用、(2) 吸附作用及(3) 酵素作用。所以可見 EPS 對於生物溶出法具有一定的影響力。

以實驗設計的規劃為二因子 (X_1 = 固體物濃度、 X_2 = 硫片添加量) 的中央合成設計，而每個獨立因子變數分別具有 5 個水準範圍，固體物濃度 (X_1) 從 0.5% 至 5.0% (w/w)；硫粉添加量 (X_2) 則是從 0.5% 至 4.0% (w/w)。而根據實驗設計並以氣提示反應槽來進行反應所得到的結果如下：

pH: 1.15-5.82；EPS 產生量: 210-4300 mg/L；硫酸根濃度: 5540-28300 mg/L；懸浮固體物去除率: 30-65%；揮發性懸浮固體物去除率: 15-62%；銅溶出率: 23-98%；鎘溶出率: 23-98%；鉻溶出率: 11-91%；鉛溶出率: 17-52%；鋅溶出率: 42-99%；鎳溶出率: 54-98%；錳溶出率: 24-99%。由

反應曲面及等高線圖可知，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.5% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，重金屬溶出率即可達到 95% 以上。由 AFM 及 SEM 觀察可有效證實胞外聚合物之吸附及酵素作用，故 EPS 對污泥重金屬溶出程序確實具有一定的影響作用。pH 除了對重金屬溶出效率和硫酸鹽產率有一定的影響之外，對於微生物群體及 EPS 的產生也會有相當影響，所以 pH 值對於生物溶出法為一非常重要的因子。

關鍵字：生物溶出法；生物膠羽作用；吸附性生物膜；顆粒化污泥；胞外聚合物



Effect of Extracellular Polymeric Substance (EPS) on bioleaching process

Student: Shao-Chi Fan

Advisor: Dr. Jih-Gaw Lin

Institute of Environment Engineering National Chaio Tung University

Abstract

Because Extracellular Polymeric Substances (EPS) promote bacterial be adhesive biofilm and agglomerates. By mean of bioflocculation, it will raise bacterial population and increase capability of decompose pollutants. EPS are having three major functions in bioleaching such as adsorption, protection and catalysis on bioleaching process.

Using the experimental design method to plan Central Composite Design of two factors (X_1 = sludge concentration; X_2 = sulfur addition). The result is: pH: 1.15-5.82; yield of EPS: 210-4300 mg/L; concentration of SO_4^{2-} : 5540-28300 mg/L; SS removal ratio: 30-65%; VSS removal ratio: 15-62%; Cu solubilization: 23-98%; Cd solubilization: 23-98%; Cr solubilization: 11-91%; Pb solubilization: 17-52%; Zn solubilization: 42-99%; Ni solubilization: 54-98%; Mn solubilization: 24-99%. AFM and SEM imaged EPS include adsorption and catalysis.

EPS can reduce processing period and upgrade processing efficiency for removing heavy metals from sludge. The EPS production has increased with TS increased. However, it has a clear pick at 10-16 days. It is mean that when solution have a large number of H^+ and SO_4^{2-} and metal ions it will let bacterial product large EPS. Consequently, heavy metals solubilization and EPS production have effected by pH. So pH value will be a very important factor on bioleachinig process.

Keywords: bioleaching; bioflocculation; adhesive biofilm; agglomerates; EPS

誌謝

首先，感謝我的指導教授林志高老師的諄諄教誨及循循善誘，提供我一個學習的環境，讓我可以有機會學習以前所沒學過的部份，好讓我在研究所的課業不會落後太多；另外，感謝我的指導博士班王至誠學長，除了在實驗上提供寶貴的經驗及細心的指導，並協助我完成論文；最後，感謝親民技術學院的徐瑞蓮老師及交通大學材料所博士班江姿穎學姊，提供實驗上所需的技術及材料，並讓我可以使用該單位之儀器。在口試期間，亦承蒙宋士武老師、陳重元老師、陳勝一老師三位口試委員的指正及建議，使我獲益良多。



在研究生活上，感謝秀鳳學姊、人傑學長、宏邦、建銘學長及至誠學長不吝惜提供他們寶貴的經驗，好讓我能縮短實驗上的時間及減少不必要的錯誤；另外，感謝跟我同期畢業的好夥伴，理安、佳紘及憲昌，有他們的配扮，讓我在研究所的日子不會趕到孤單；最後要感謝的是，佩琪、怡湘及義雄雖然才相識一年，但我相信 3S 因為有你們的加入會更發揚光大。

最後感謝一路支持我的父母親及玟靜，沒有你們的支持就不會有今天的我，有你們的陪伴及關懷，讓我可以全心全力的投入研究的領域，所以我有今天的成就，你們絕對是因為你的的支持鼓勵，謝謝。

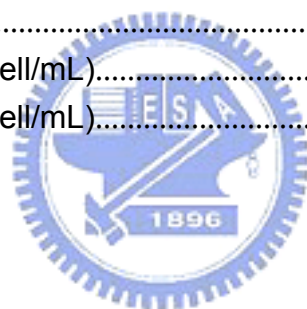
目錄

中文摘要	I
英文摘要	III
誌謝	IV
目錄	V
表目錄	VII
圖目錄	VIII
第一章 序論	1
1.1 研究緣起	1
1.2 研究內容與目的	2
第二章 文獻回顧	5
2.1 生物溶出法之法發展及簡介	5
2.2 生物溶出法中微生物之種類及生理特性	6
2.3 重金屬溶出機制	7
2.4 硫氧化菌吸附於硫粉上的機制	9
2.5 胞外聚合物 (EPS) 對生物溶出法 (Bioleaching) 的重要性	12
2.5.1 胞外聚合物的組成	12
2.5.2 胞外聚合物的功能	12
第三章 實驗設備與方法	15
3.1 實驗設備器材及材料藥品	15
3.2 實驗方法與步驟	16
3.3 污泥樣品來源及前處理	17
3.4 馴養試驗	18
3.4.1 片狀硫的製作	18
3.4.2 硫氧化菌的馴養試驗	19
3.5 生物溶出試驗	20
3.5.1 污泥重金屬總量分析 (CEM MARS 5)	21
3.5.2 污泥重金之屬連續萃取實驗 (Tessier <i>et al.</i> , 1979)	23
3.6 生物溶出法之實驗設計	24
3.6.1 中央合成設計 (CCD)	24
3.6.2 反應曲面法 (Response Surface Method)	26
3.6.3 批次實驗規劃	27
3.7 EPS 定量試驗	27
3.7.1 EPS 萃取方法	27
3.7.2 蛋白質定量 (Bradford protein-binding assay)	29
3.8 菌種的鑑定	29
3.8.1 採樣及保存	30

3.8.2 液相螢光原位雜交法步驟	30
3.8.3 固相螢光原位雜交法步驟	33
第四章 結果與討論	34
4.1 畜牧污泥基本特性	34
4.2 馴養實驗	35
4.3 不同固體物濃度及硫片添加量對生物溶出實驗之影響	37
4.3.1 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對 pH、氧化還原電位 (ORP) 和導電度 (EC) 之影響	37
4.3.2 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對硫酸根產生量之影響	41
4.3.3 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對有機物降解之影響	42
4.4 生物溶出實驗	46
4.4.1 重金屬溶出效率	46
4.4.2 連續萃取試驗	56
4.5 EPS 之影響	62
4.5.1 EPS 萃取試驗	62
4.5.2 蛋白質試驗	63
4.5.3 胞外聚合物之功用 (影響)	65
4.6 精密儀器分析 (AFM/SEM)	66
4.6.1 Atomic Force Microscopy (AFM)	66
4.6.2 Scanning Electron Microscope (SEM)	68
4.7 統計分析結果	71
4.7.1 中央合成設計結果	71
4.7.2 配適二階模型之設計	76
4.7.3 模型適當性與常態性假設檢驗	77
4.8 菌種鑑定及菌數估計	79
4.8.1 生物溶出法液相中菌相變化	79
4.8.2 生物溶出法硫片上之菌相變化	83
第五章 結論	86
第六章 參考文獻	88

表目錄

Table 3-1 實驗設備.....	15
Table 3-2 實驗材料及藥品.....	16
Table 3-3 因子水準表.....	28
Table 3-4 實驗組數表.....	28
Table 4-1 原始污泥的基本性質.....	35
Table 4-2 生物溶出法後污泥中重金屬含量.....	57
Table 4-3 各國污泥中重金屬含量法規標準.....	57
Table 4-4 添加不同 EPS 量後萃取變化情形.....	67
Table 4-5 添加不同 EPS 量後重金屬溶出情形.....	67
Table 4-6 中央合成設計因子與對應反應參數表.....	72
Table 4-7 銅溶出率之變異數分析.....	77
Table 4-8 迴歸係數預測銅溶出率之結果.....	77
Table 4-9 液相中 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比.....	80
Table 4-10 固相中 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比.....	83
Table 4-11 實驗組數對照表.....	84
Table 4-12 液相之總菌數 (cell/mL).....	85
Table 4-13 固相之總菌數 (cell/mL).....	85



圖目錄

Figure 1-1 生物溶出法架構流程圖.....	03
Figure 2-1 生物溶出法流程圖.....	09
Figure 2-2 硫氧化反應機制.....	10
Figure 2-3 EPS 的反應機制.....	14
Figure 2-4 EPS 的吸附機制.....	14
Figure 3-1 生物溶出試驗流程圖.....	17
Figure 3-2 不鏽鋼模板.....	18
Figure 3-3 片狀硫.....	18
Figure 3-4 硫氧化菌馴養流程圖.....	19
Figure 3-5 馴養反應槽.....	20
Figure 3-6 氣提式反應槽.....	22
Figure 3-7 2 因子 CCD 示意圖.....	26
Figure 3-8 FISH 流程圖.....	30
Figure 4-1 馴養實驗中 pH 值變化情形.....	36
Figure 4-2 生物溶出法中 pH 值變化情形.....	39
Figure 4-3 生物溶出法中 ORP 值變化情形.....	40
Figure 4-4 生物溶出法中 EC 值變化情形.....	40
Figure 4-5 生物溶出法中 SO_4^{2-} 變化情形.....	42
Figure 4-6 生物溶出法中 SS 變化情形 (A) SS Removal (B) Surface plot (C) Contours plot	44
Figure 4-7 生物溶出法中 VSS 變化情形 (A) VSS Removal (B) Surface plot (C) Contours plot.....	45
Figure 4-8 生物溶出法中銅變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	47
Figure 4-9 生物溶出法中鎘變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	48
Figure 4-10 生物溶出法中鉻變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	50
Figure 4-11 生物溶出法中鉛變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	51
Figure 4-12 生物溶出法中鋅變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	53
Figure 4-13 生物溶出法中鎳變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	54
Figure 4-14 生物溶出法中錳變化情形 (A) Surface plot (B) Contours polt.....	56
Figure 4-15 連續萃取中銅之鍵結變化情形.....	58
Figure 4-16 連續萃取中鎘之鍵結變化情形.....	59
Figure 4-17 連續萃取中鉻之鍵結變化情形.....	59
Figure 4-18 連續萃取中鉛之鍵結變化情形.....	60
Figure 4-19 連續萃取中鋅之鍵結變化情形.....	60
Figure 4-20 連續萃取中鎳之鍵結變化情形.....	61
Figure 4-21 連續萃取中錳之鍵結變化情形.....	61

Figure 4-22 生物溶出法中 EPS 變化情形.....	64
Figure 4-23 生物溶出法中 EPS 與 pH 之變化情形 (TS/S: 2.75/2.3).....	64
Figure 4-24 生物溶出法中 EPS 與 pH 之變化情形 (TS/S: 4.34/3.5).....	65
Figure 4-25 生物溶出法中蛋白質變化情形.....	65
Figure 4-26 EPS 變化情形.....	67
Figure 4-27 利用 AFM 觀察片狀硫上的表面情形.....	68
Figure 4-28 利用 SEM 觀察反應前片狀硫上的表面情形.....	69
Figure 4-29 利用 SEM 觀察反應前片狀硫的斷面情形.....	69
Figure 4-30 利用 SEM 觀察反應後片狀硫上的表面情形.....	70
Figure 4-31 利用 SEM 觀察反應後片狀硫上的斷面情形.....	71
Figure 4-32 銅溶出率之反應曲面圖.....	73
Figure 4-33 銅溶出率之等高線圖.....	73
Figure 4-34 EPS 之反應曲面圖.....	75
Figure 4-35 EPS 之等高線圖.....	75
Figure 4-36 銅溶出率之殘差對配適值的圖形.....	78
Figure 4-37 銅溶出率之殘差對配適值圖.....	79
Figure 4-38 DAPI/ Thio 082/Thiopa 511 /EUB338 (液相).....	81
Figure 4-39 Thio 082 之反應曲面圖.....	81
Figure 4-40 pH/T. thiopauris (Thiopa0511).....	82
Figure 4-41 DAPI/ Thio 082/Thiopa 511/EUB 332 (固相).....	84



第一章 序論

1.1 研究緣起

畜牧業污泥含有大量有機質及氮磷等營養成分，可利用為農地肥料或土壤改良劑，除可達到資源回收之目的，且亦有畜牧場減廢之功效。但由於畜牧方式的改良，在飼料中添加銅與鋅化學鹽類，以作為豬隻生長隻刺激與調理劑，造成養豬廢水及污泥中含有過量的重金屬，亦造成污泥中的重金屬含量升高，故不利於作為農地肥料或土壤改良劑。

對於污泥中重金屬的移除，比較常見方法包括螯合劑、錯合劑及酸劑萃取 (Olver et al., 1975)。而螯合劑對於銅、鉛、鎘的去除效率佳，但對於鐵的效果就沒有那麼好；而酸劑萃取對於銅的溶出效果也不是都很好。成本高、操作困難、需要大量的化學藥劑為上述兩種方法的主要缺點 (Tyagi et al., 1993)。而在採礦工業中生物濕式冶金術 (biohydrometallurgy)，及生物溶出法 (bioleaching)，結合物理及化學作用，多年來已被廣泛利用，利用生物的代謝作用，將不溶性的金屬礦物 (通常是金屬硫化物或金屬氧化物) 轉換為可溶性的金屬硫酸鹽，使得重金屬自固相轉至液相，再經由化學方法加以收集；生物溶出方法的優點在於價格便宜，且對於不易萃取的金屬亦能做有效溶出，如含金的砷硫礦及含硫化銅的礦物 (Muller and Portillo, 1981)。

然而生物溶出法主要的機制分為：直接接觸、間接接觸及共同作用三

種主要反應 (Schipper *et al.*, 1996; Schipper and Sand, 1999; Sand *et al.*, 2001; Rawling *et al.*, 2002)，但近幾年研究指出，在直接接觸機制中，雖然是利用硫氧化菌的氧化能力及產酸能力來處理受重金屬污染污泥，但硫氧化菌必需產生胞外聚合物 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 使微生物群體產生生物膠羽 (Bioflocculation)，逕而形成架橋作用 (Gehrke *et al.*, 1995; Escobar *et al.*, 1997; Pogliani and Donati, 1999; Hoa *et al.*, 2003)，才能使微生物有效吸附在固體顆粒及硫片上，讓重金屬自固體物中溶出。由於 EPS 在 pH=2 的條件下其表面電性為帶正電 (Yoshida and Murooka, 1994; Blake *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1995)，容易與帶負電性的固體顆粒 (Blake *et al.*, 1995) 進行結合反應，所以 EPS 在生物溶出法中佔有及重要得角色。在傳統實驗上通常利用 pH、ORP、 SO_4^{2-} ...等間接的方法，來監測評估生物溶出法的處理效率及終點，並不能精確觀察實際參於反應的微生物量，故只能利用估計的方式預測其反應結果。所以本研究探討以直接的方法來量測其反應效率，即利用生物處理中，微生物所產生的 EPS 來作為判斷。所量測出的數值會比傳統量測方法更有意義 (Gehrke *et al.*, 1995, 1998)。

1.2 研究內容與目的

利用生物溶出法處理污泥中的重金屬，添加硫片作為基質以提供微生物所需的能量，並藉由胞外聚合物的產生增加硫氧化菌吸附在硫片上的能

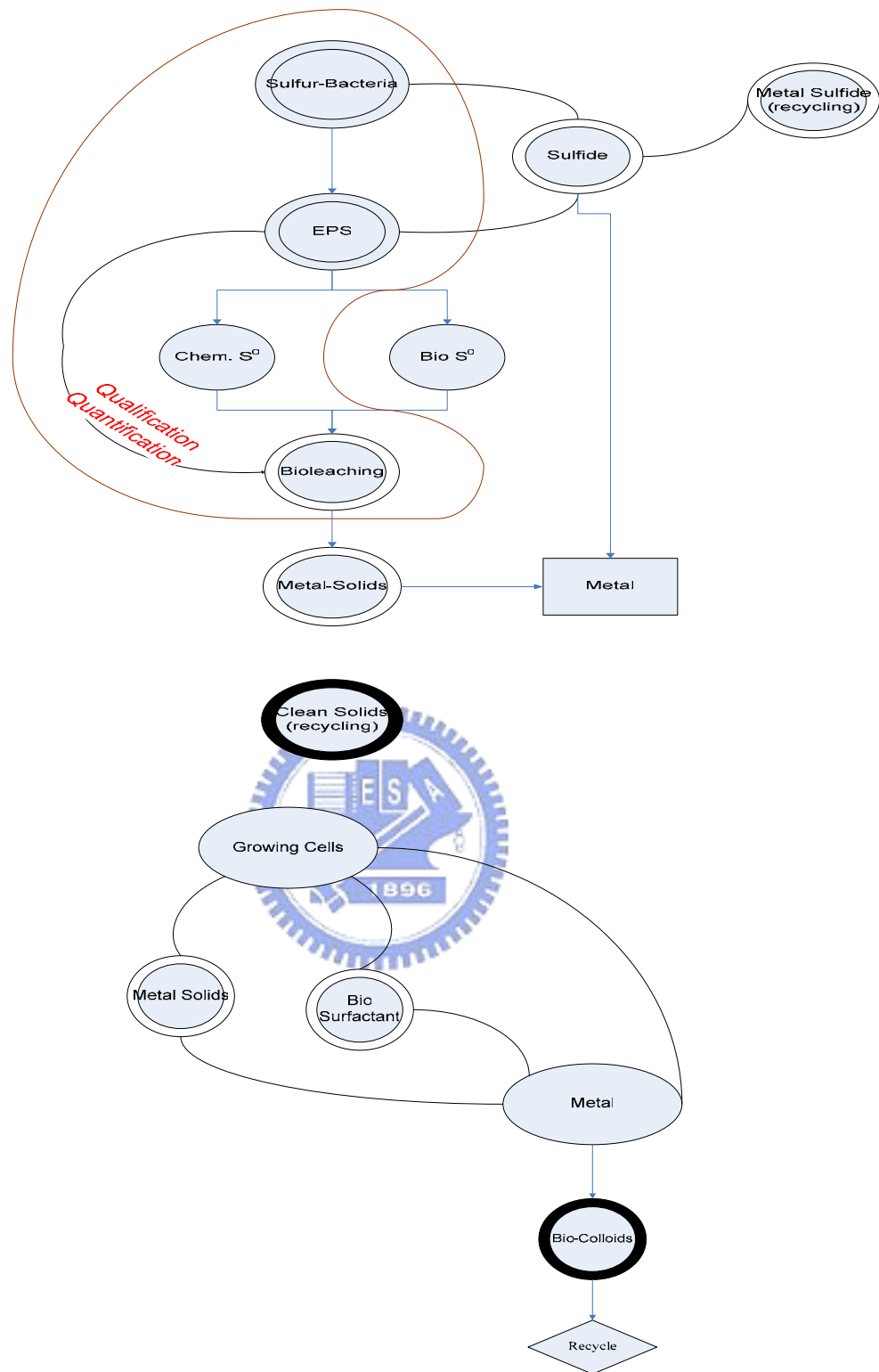


Figure 1-1 生物溶出法架構流程圖

力，Figure 1-1 為整個實驗的架構圖。故以大型氣提式生物溶出反應系統 (約 25 L) 來處理含重金屬之污泥，改變操作因子如:污泥濃度、植種量及硫片添加量，來探討胞外聚合物對硫氧化菌產酸及重金屬去除之影響。



第二章 文獻回顧

2.1 生物溶出法之法發展及簡介

生物溶出法 (Bioleaching) 早年大都應用在金屬採礦工業和酸礦廢水之處理，由於其處理效果佳，甚至有商業規模，但生物技術於環境工程並未廣泛應用，目前仍處於實驗研究階段，其主要應用於回收工業廢棄物中之重金屬及受重金屬污染之底泥之處理及移除下水污泥（包含初級污泥、二及污泥、好氧消化污泥及厭氧消化污泥）中之重金屬 (Blais *et al.*, 1992; Bosecker, 1986; Chen and Lin, 2000)。以往處理含過量重金屬污泥時，大都採取萃取法 (extraction method) 或固化 / 安定化法 (solidification/stabilization) 等傳統技術，而這兩技術主要的缺點為處理效果不佳及處理成本過高 (高和林，1994)。

污泥中部分之重金屬是以硫化物型態所存在，而通常此部分之重金屬不易為酸萃取法所去除，由於金屬硫化物之溶解度積 (K_{SP}) 極小，屬難溶性沉澱物。重金屬在中性條件下實際上是相當難溶的，在鹽酸中，鐵、錳和鎘的硫化物是可溶的；鎳和鈷的硫化物是難溶的；鈣、鉛和汞的硫化物只有在氧化力強的酸，特別是硝酸中才會溶解 (陳，1992)。若利用硫氧化菌來移除污泥中的重金屬，則可有效將以硫化物型態存在之重金屬移除，此為生物溶出法優於化學萃取法之處。

2.2 生物溶出法中微生物之種類及生理特性

生物溶出法中最具活性的細菌是 *thiobacilli* 屬，為格蘭氏陰性的無芽胞桿菌，適合於好氧環境下生存。多數 *thiobacilli* 屬是化學自營菌，係利用空氣中的 CO_2 為碳源來合成新的細胞，並以代謝氧化還原的硫化合物，如硫化物、元素硫或硫代硫酸鹽來獲得能源，最終產物為硫酸鹽 (Rohwerder *et al.*, 2003)。

生物溶出法需要於酸性環境 (pH 值介於 1.5-3.0) 下進行，此時大部份的重金屬已離子型態存在於溶液中，故嗜酸菌種的 *Thiobacillus ferrooxidans* 及 *Thiobacillus thiooxidans* 對重金屬溶出相當重要；*T. ferrooxidans* 及 *T. thiooxidans* 兩株菌種。*T. ferrooxidans* 最早由 Colmer 及 Hinkle 於 1947 年自酸礦廢水中分離出來，為格蘭氏陰性無芽胞末端為圓形之桿狀菌可移動具單一鞭毛同時也是絕對好氧的中溫菌 ($20-40^{\circ}\text{C}$) 適合生長範圍為 pH 1.0-4.5，pH 為 2 時生長最快，未發現存活於 pH 高於 6.5 或低於 1.0 以下的環境之中；1992 年 Waksman 與 Joffe 分離出 *T. thiooxidans*，最適合生長之 pH 範圍為 1.5-5.5，pH 2.5-4.0 時生長速率最快，此株菌能快速的氧化元素硫，亦能利用還原態的硫化合物產生硫酸，使 pH 降到 1.0-1.5，甚至更低，硫酸的大量產生使得岩石礦物快速分解，可加速酸性可溶之重金屬自礦物中溶出，釋放至溶液中形成硫酸鹽。*T. ferrooxidans* 氧化硫的速度比 *T. thiooxidans* 慢，但其異於其他

thiobacilli 屬的在於除了能氧化硫化物外二價鐵也能當做電子供給者。

T. thioparus 為格蘭氏陰性之桿狀菌，細胞間無明顯含硫之內含物適合生長 pH 之範圍為 5.9-9.0，pH 6.0-8.0 時生長速率最快，適合生長之溫度與最大生長溫度與 *T. thiooxidans* 相似。其他的 thiobacilli 屬也能夠氧化元素硫及硫化物，但僅能生長於 pH 值較高甚至在非酸的環境下，但此時重金屬無法以離子型態存在於溶液之中，因此較不利於生物溶出的進行。

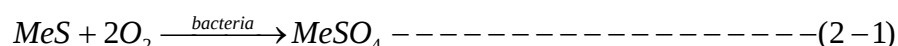
2.3 重金屬溶出機制

生物溶出法中微生物溶出礦石、廢棄物或污泥等介質中重金屬主要機制大致分為兩類 (Couillard and Zhu, 1992; Bosecker et al., 1997):

(1) 直接接觸：直接機制是藉由微生物細胞與硫化物或礦物的物理性吸附

再由酵素催化將金屬硫化物氧化成硫酸鹽其方程式如 (2-1)

式所示：



MeS: 金屬硫化物

Me: 二價金屬

(2) 間接接觸：經由溶液中三價鐵將金屬硫化物氧化為硫酸鹽形式，為一化學反應，如 (2-2) 式所示：



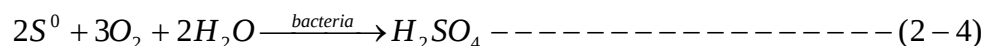
為使溶液中維持高量的三價鐵以進行金屬硫化物的化學氧化溶液的

pH 值需低於 4.0 以下 (Chemistry For Environmental Engineer, Fourth Edition)。而 *T. ferrooxidans* 與 *L. ferrooxidans* 能將二價鐵氧化為三價鐵，如 (2-3) 式所示，(2-2) 式加上 (2-3) 式可使溶出反應成為一循環程序。

$$2\text{FeSO}_4 + 0.5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{Fe}(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{O} \text{-----} (2-3)$$

進行間接機制時，微生物並不需要附著至硫化物或礦物表面，但可以加速二價鐵的再氧化，因為二價鐵的再氧化在無微生物催化之情形下，反應非常慢；在 pH 2-3 時，微生物催化二價鐵的氧化速率比純粹化學氧化快 10^5 - 10^6 倍 (Rohwerder et al., 2003)。

於 (2-2) 式中產生的硫同時也可被 *T. ferrooxidans* 利用氧化產生硫酸，如 (2-4) 式所示，但 *T. thiooxidans* 氧化硫的速度比 *T. ferrooxidans* 快很多，*T. thiooxidans* 於生長代謝過程中所產生的硫酸，可使環境中的 pH 下降而增進重金屬溶出效率。



重金屬溶出的過程以 Figure 2-1 來表示：

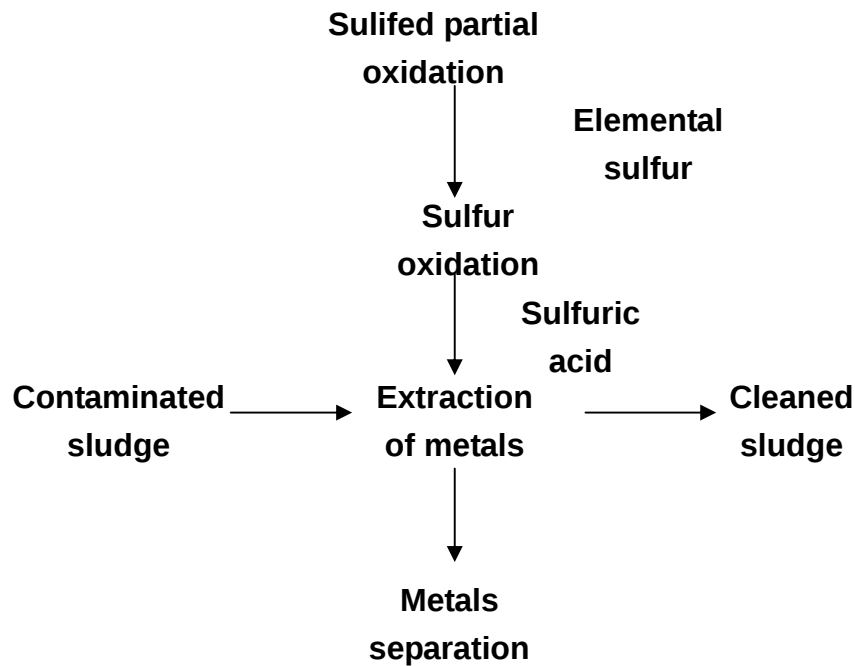
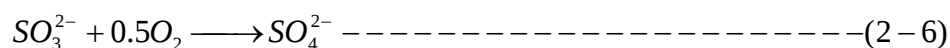
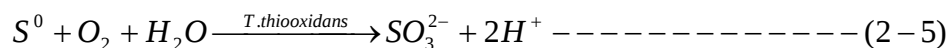


Figure 2-1 生物溶出法流程圖 (Tichy *et al.*, 1998)

2.4 硫氧化菌吸附於硫粉上的機制

在生物溶出法中，微生物會因對流及凡得瓦力而吸附至硫及固體顆粒物的表面，其吸附速度遠大於脫附速度，因此脫附可被忽略 (Kumer *et al.*, 1991; Bhavaraju *et al.*, 1992)。當元素硫被當作電子供應者而由外界供應時，由於元素硫的極不溶性，菌體必須附著在硫粉上生長，藉由吸附於硫粉上，細菌能有效地獲得所需的硫原子，元素硫會緩慢的溶解，進而將硫粉消耗。*T. thiooxidans* 生長代謝硫的全反應可以 (2-4) 式表示，最佳氧化的 pH 值在 4.0 左右，且在細菌代謝硫的氧化過程中，會產生一連串的中間產物，其反應如 (2-5) 與 (2-6) 式。



其中 *T. thiooxidans* 與 *T. ferrooxidans* 的硫氧化酵素可以將元素硫氧化為亞硫酸根進而與硫反應形成硫代硫酸根 (Rohwerder et al., 2003)，以 Figure 2-2 表示。

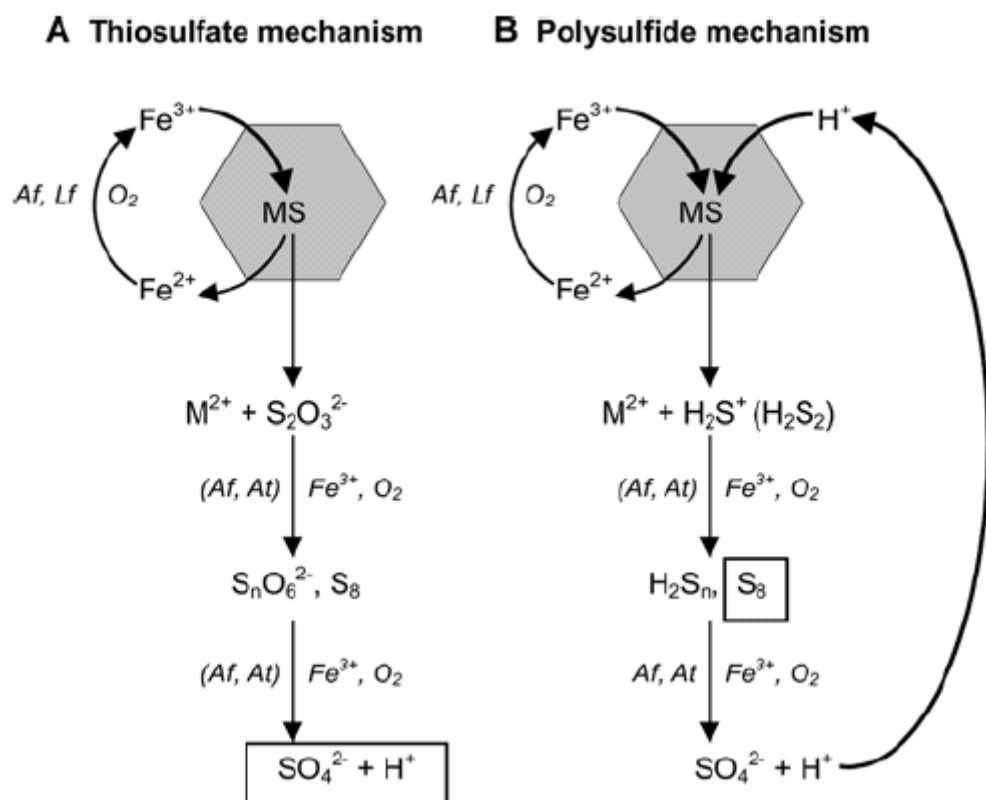


Figure 2-2 硫氧化反應機制 (Rohwerder et al., 2003)

這些中間產物為離子型態，釋放至溶液中時提供未附著及脫附的細胞作為生長基質來源 (Rohwerder et al., 2003)。

細菌於溶出過程中，會吸附於礦物顆粒上生長，微生物於固液介面上

形成菌落約可以四個階段加以敘述。

第一階段為傳輸 (transport): 到固體表面，分為三種形式:

擴散: 細菌因布朗寧運動 (Browian movement)，不規則且快速與固體表面積接觸，即使在無攪拌、平靜的反應狀態下，任可以通過擴散層而達到固體物表面，但與下列兩種傳輸模式比較起來來，擴散的速度是很慢的。

對流: 細菌因水流的帶動而傳輸至固體表面。

移動: 微生物可能是隨機地碰到固體物表面或是因濃度梯度的關係而往固體表面移動。

第二階段是初步的附著 (initial adhesion)，此階段主要是一物理化學過程，可分為可逆及不可逆的附著，可逆的附著是因為細菌持續受到布朗寧運動的影響、顆粒表面的剪力或細菌本身的移動而自顆粒表面附著;若細菌並不受布朗寧運動之影響或承受到強烈的力量方可自固體表面移除，則呈現不可逆的附著。

第三階段是穩固的附著 (attachment)，細菌沉降至固體表面後，細菌表面的特殊構造 (如纖維或聚合物) 可將細菌細胞與固體物間形成幾密的鍵結，這層表面薄膜主要是由多醣類 (polysaccharides) 形成。

最後的表面菌落的形成 (surface colonization)，附著的細胞開始生長，新生成的細胞並互相附著，進而形成微生物菌落或生物膜。

2.5 胞外聚合物 (EPS) 對生物溶出法 (Bioleaching) 的重要性

2.5.1 胞外聚合物的組成

胞外聚合物主要的型態分為 3 種，即黏膜狀、碎粒狀、纖維狀，分別存在於不同之生物處理系統。EPS 主要成分為聚碳水化合物、脂質及蛋白質 (Nishikwa and Kariyuma, 1968; Vallom and McLoughlin, 1984; Goodwin and Forster, 1985; Vallom and Urbain *et al.*, 1993; Gehrke *et al.*, 1998)，但其所佔比例並非為一定值，需視廢水性質及生物處理程序而異。故在不同條件下所產生的 EPS 會對處理效果有一定的影響，所以在選擇處理條件時也必須慎重考慮。



2.5.2 胞外聚合物的功能

因微生物 EPS 在生物處理程序中可促進微生物群體之膠凝作用，進而形成顆粒化污泥或附著性生物膜，有助於微生物總量之增加和多元化菌種之截流，以達廢水中污染物之徹底分解 (Brown *et al.*, 1980; Novak *et al.*, 1981; Hoa *et al.*, 2003)。故藉由 EPS 的產生可促進生物群的膠凝及架橋作用，進而加速反應效果。

一般而言 EPS 在生物溶出法中主要有三大功能：

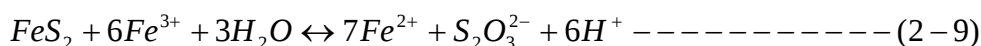
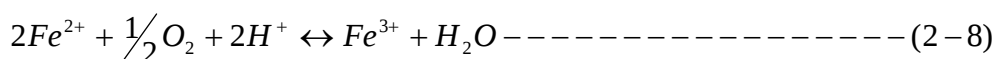
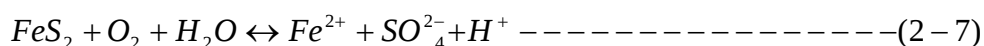
- (1) 保護作用：由之前的研究可知重金屬對於微生物有一定的抑制作用，故在生物溶出法中所產生的重金屬或水體中所含有的中金屬都會對於微生物具有一定的影響，所以藉由 EPS 生成可

以吸附溶液中的重金屬，降低重金屬對微生物的影響
(Brown *et al.*, 1982)。

(2) 吸附作用：因為 EPS 最主要的組成成分為蛋白質、醣類及脂質，藉由 EPS 的生成可以有效的使微生物穩固的吸附至固體物表面上 (Brown *et al.*, 1980)。同時因為組成成分的不同，其帶電性也會不同 (Blake *et al.*, 1994)，所以藉由帶電性的不同又可去吸附至其他的固體物表面上。Figure 2-4 為 EPS 之吸附作用。

(3) 酵素作用：EPS 會與固體物進行反應，而侵蝕固體物表面，藉由 EPS 的酵素作用可加速整個反應速率。而 Figure 2-3 為 EPS 的反應機制 (Rohwerder *et al.*, 2003)。

所以由於 EPS 三種反應機制的存在，才能加速整個反應速率，(2-7)、(2-8)、(2-9)、(2-11) 式 (Rodriguez *et al.*, 2003) 可以表示其整個反應：



所以藉由這循環反應可一直反覆作用，以加速整個反應速率、提升反應結果。

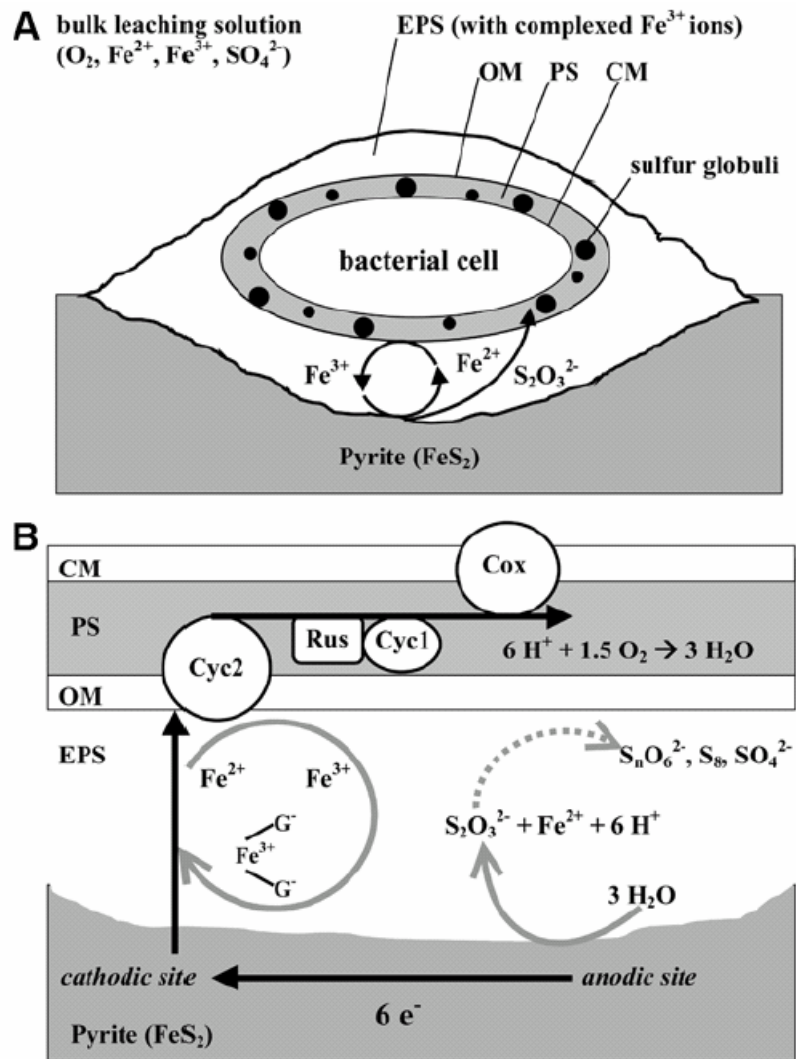


Figure 2-3 EPS 的反應機制 (Rohwerder *et al.*, 2003)

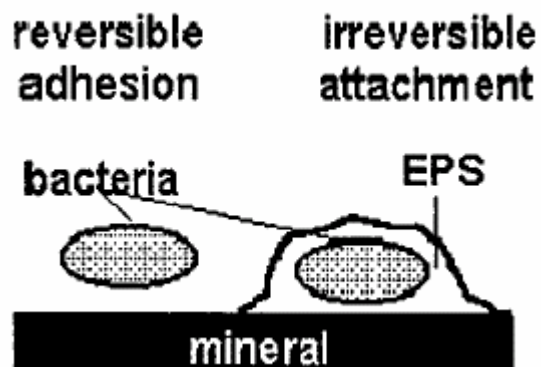


Figure 2-4 EPS 的吸附機制 (Rodriguez *et al.*, 2003)

第三章 實驗設備與方法

3.1 實驗設備器材及材料藥品

以下為本實驗所需用到之儀器設備、名稱、廠牌及規格，如： Table 3-1

所述。

Table 3-1 實驗設備

儀器設備名稱	廠牌及規格
1. 高溫爐 (550 ⁰ C)	Nabertherm, Model: L9/R
2. 烘箱 (105 ⁰ C)	RISEN
3. 恆溫水平震動器	FIRSTEK, Model: B603
4. 微波樣品消化器	CEM, MARS 5
5. 真空過濾機	GAST, Model: 1VSF-10-M100X
6. pH 測定儀	Suntex, Mode
7. 磁石攪拌機	Corning, Model: PC-310
8. 火燄原子吸收光譜	Hitachi, Model: Z-8100
9. 離心機	Harmoic Series
10. 高速離心機	Beckman® High Speed centrifuge
11. 冷凍乾燥機	EYELA FD-5N
12. 高溫滅菌釜	Hirayama, Model HA-300M
13. 恆溫循環水槽	Channel
14. pH 電極	Mettler Toledo, Pt4805-60-P-PA-K19/120/3M
15. ORP 電極	Mettler Toledo, 405-60-SC-PA-K19/120/3M
16. pH 監測器	Tank 96-A
17. ORP 監測器	Jenco pH/ORP Controller 3676
18. 酵素免疫分光光度計	Packard Spectra Count ELISA
19. 相位差顯微鏡	Olympus CCD

以下為本實驗所需用到之藥品名稱、等級及廠牌分別，如：Table

3-2 所述。

Table 3-2 實驗材料及藥品

藥品名稱	等級	廠牌
1. 元素硫	分析級	R.D.H.，德國
2. 乙酸	HPLC 級	Fisher，英國
3. 乙醇	實驗級	R.D.H.，德國
4. 丙酮	實驗級	Fisher，英國
5. 硼酸	實驗級	Shimakyu's
6. 酚石酞	實驗級	Panreac
7. 鹽酸羥胺	實驗級	Yakuri
8. 醋酸胺	實驗級	Panreac
9. 醋酸鈉	實驗級	Merck
10. Bio-red	Sigma 級	
11. 牛血清蛋白 (BSA)	Sigma 級	
12. 不鏽鋼模板	自訂	
13. 分析篩，Mesh 20		KUANG YANG

3.2 實驗方法與步驟

本研究之實驗流程圖如 Figure 3-1，包括六個部分：(1) 前處理；(2) 污泥基本性質分析；(3) 馴養實驗；(4) 生物溶出試驗；(5) EPS 萃取試驗；(6) 菌種及菌數的鑑定；(7) 實驗數據分析。其所使用的材料及方法分別如下：

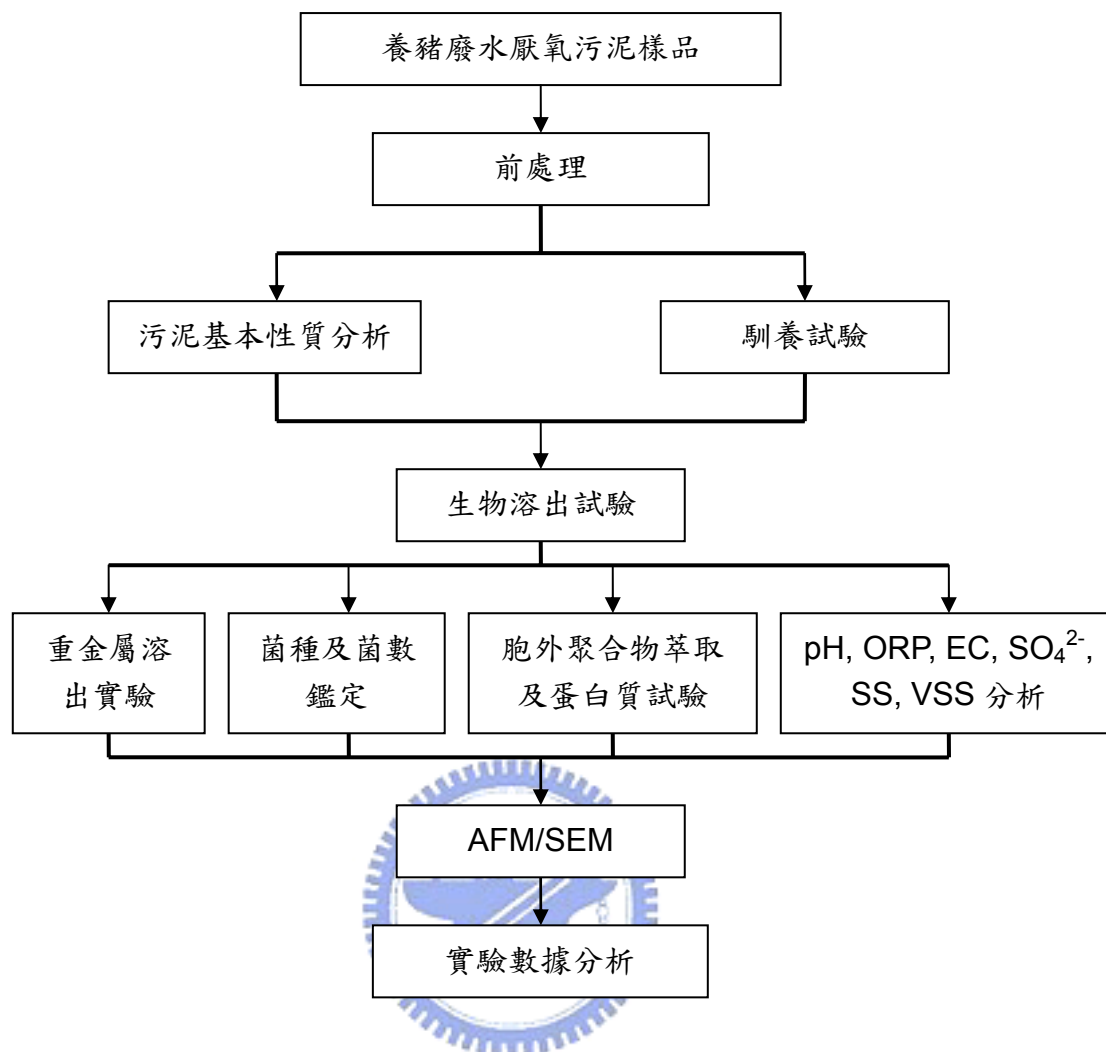


Figure 3-1 生物溶出試驗流程圖

3.3 污泥樣品來源及前處理

本研究中的污泥來源為北部某養豬場三段式廢水處理之厭氧污泥。所採集回來的污泥，先將其全部混和均勻，再分別裝入數個採樣桶之中，置入低溫冰箱內保存。然後取出一部分的原始污泥，經自然風乾、研磨過後再利用 20 mesh (0.84 mm) 細篩過篩後，再進行污泥基本性質分析。

3.4 馴養試驗

3.4.1 片狀硫的製作

片狀硫顆粒之製作過程為將滅菌後粉末狀的元素硫，置於 125°C 的烘箱中加熱 1-2 小時，將熔融狀之元素硫倒入不繡鋼模板 (如 Figure 3-2)，此模板之直徑為 1 cm，厚度為 0.5 cm，於室溫下固化，等固定形狀後即為片狀硫顆粒 (如 Figure 3-3)。



Figure 3-2 不繡鋼模板



Figure 3-3 片狀硫

3.4.2 硫氧化菌的馴養試驗

硫氧化菌馴養流程可見 Figure 3-4。首先取總固體物含量 1.5% 的污泥 10 L，置於馴養反應槽中（如 Figure 3-4），加入片狀硫 1Kg (10%)，利用攪拌器使污泥完全混和，並加以曝氣，待 pH 值降至 2.5 以下。重複上述步驟，添加原始污泥 9 L 於反應槽中，再加入經馴養過的原始污泥 1 L (10%)，反覆馴養直到每次 pH 值降至 2.5 以下只需 3-4 天，即完成馴養。在 pH 2.5 以下時，微生物成對數生長，即可作為批次試驗之植種。

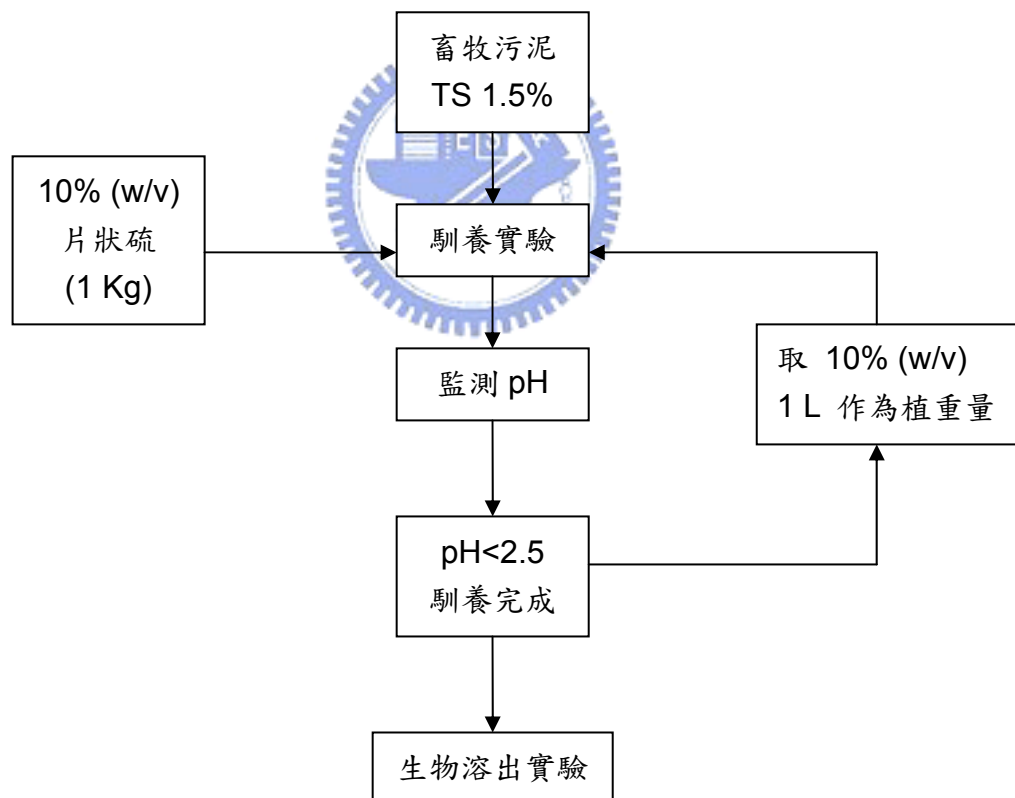


Figure 3-4 硫氧化菌馴養流程圖

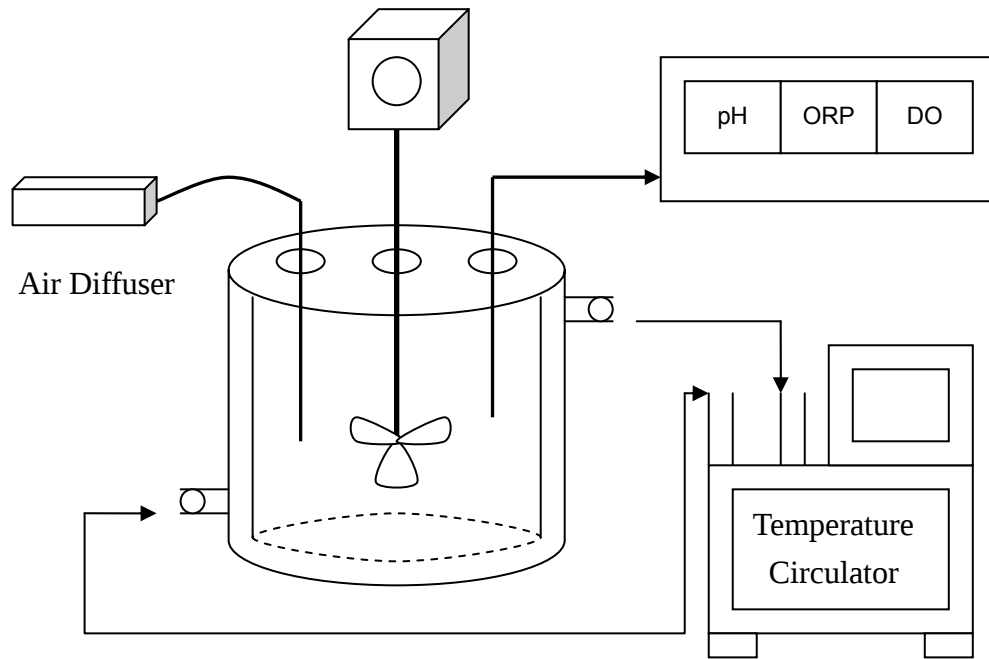


Figure 3-5 馴養反應槽

3.5 生物溶出試驗

在生物溶出試驗中，重金屬離子自固相溶出至液相，其中一個重要的反應機制是藉由酸化溶液，使液相中的氫離子與固相中的重金屬產生置換作用，進而使重金屬離子從固相轉至液相。

生物溶出試驗利用統計方法-中心組合設計 (Central Composite Design) 設計 2 因子水準試驗，如：固體物含量 (TS = 0.5-5.0%) 及硫片添加量 (S = 0.5-4.0%)，並對重金屬溶出效率作個別比較。在整個生物溶出程序中，所使用的反應槽為氣提式生物溶出反應系統，其主要是利用曝氣的方式達到均勻攪拌的目的。如 Figure 3-6 所示，首先加入 10% (v/v) 已馴養完成之污泥於 25 L 氣提式生物溶出反應槽中，並於進行下一批次實

驗時添加前一批回收之片狀硫顆粒，並補充添加滅菌之片狀硫顆粒至 2% 為止，於溫度 30⁰C、曝氣強度 7 L/min 下進行試驗，在實驗過程中分別取出上、中、下層各 100 mL 之污泥分析 pH、ORP、EC、SS、VSS、重金屬及硫酸根濃度及 EPS 和 FISH。氣提式生物溶出反應系統實驗進行期間同時監測 pH 值與氧化還原電位 (ORP) 之變化。將溶出之重金屬濾液以火焰式原子吸收光譜儀分析，分析的重金屬種類包括:鎳、鉛、鉻、鎘、銅、錳、鋅。硫酸根濃度以紫外光光譜儀於波長 420 nm 下測其吸光度 (Standard Methods 4500E) 判定之。最後利用連續萃取實驗來分析生物溶出反應前後重金屬鍵結的變化情形。

3.5.1 污泥重金屬總量分析 (CEM MARS 5)

此方法提供一種重金屬酸消化法係於密閉容器內以溫度控制微波加熱作為重金屬分析之前處理。

- (1) 於每一消化瓶中置入 0.5 g 風乾後污泥樣品加入 9 mL HNO₃、2 mL HCl 及 3 mL HF。
- (2) 除了溫度監測瓶外，旋轉其餘之消化瓶。
- (3) 旋轉溫度監測瓶。
- (4) 將消化瓶置於旋轉盤內從消化瓶連接排氣管制廢氣收集瓶。
- (5) 將轉盤放入微波消化器內，連接溫度監測器至溫度偵測瓶。
- (6) 設定加熱程式或叫出以前儲存之加熱程式。

- (7) 執行加熱程式直到完成。
- (8) 消化完成後，使消化瓶於爐腔內冷卻至少 10 分鐘，將轉盤取出，以人工洩壓並且打開消化瓶。
- (9) 每一消化瓶中加入約 2 g 之硼酸 (Boric acid)，混和均勻使硼酸完全溶解。
- (10) 將混和液過濾，並定量至 50 mL。
- (11) 於原子吸收光譜儀進行重金屬總量分析。

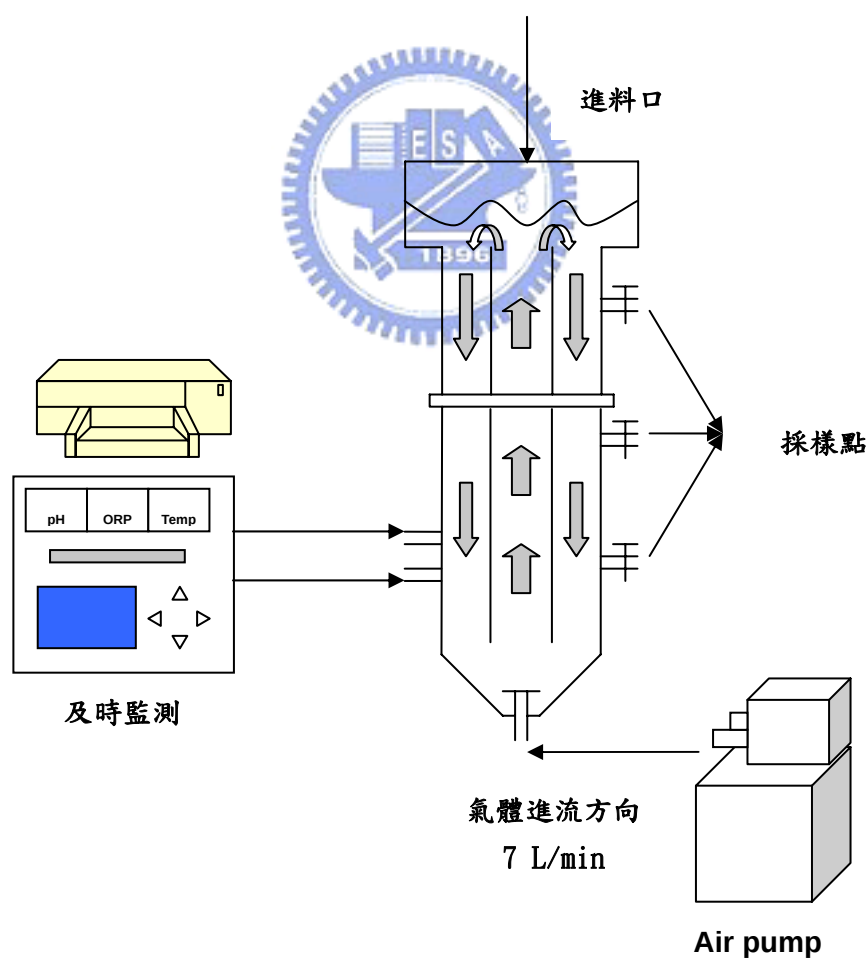


Figure 3-6 氣提式反應槽

3.5.2 污泥重金之屬連續萃取實驗 (Tessier et al., 1979)

重金屬之連續萃取流程步驟:

1. 離子交換態萃取實驗:

約取 0.5 g 之風乾污泥置入 45 mL 離心管中，加入 45 mL 之 1 M MgCl_2 溶液，以 250 rpm 震盪 1 小時後，並以 4000 rpm 離心 20 分鐘，將上澄液過濾之，之後加入 HNO_3 保存待測，再加 5 mL 去離子水於離心管，離心過後捨棄廢液。

2. 碳酸鹽態萃取實驗:

承步驟 1，加入 45 mL 之 CH_3COOH 及 CH_3COONa 之緩衝溶液於離心管中，以 250 rpm 震盪 6 小時後，並以 4000 rpm 離心 20 分鐘，將上澄液過濾，之後加入 HNO_3 保存待測，再加 5 mL 去離子水於離心管，離心過後捨棄廢液。

3. 鐵錳氧化態萃取實驗:

承步驟 2，加入 45 mL 之 0.04 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (in 25% HOAc)，並將離心管移入油浴 $96 \pm 3^\circ\text{C}$ ，以 250 rpm 震盪 5 小時後，並以 4000 rpm 離心 20 分鐘，將上澄液過濾，之後加入 HNO_3 保存待測，再加 5 mL 去離子水於離心管，離心過後捨棄廢液。

4. 有機態及硫酸鹽態萃取實驗:

- (1) 承步驟 3，加入 10 mL 之 0.02 M HNO_3 及 10 mL H_2O_2 (30%) 於離心管中，並將離心管移入油浴 $85 \pm 2^\circ\text{C}$ ，以 250 rpm 震盪 3 小時。
- (2) 承步驟 4. (1)，加入 10 mL H_2O_2 (30%) 於離心管中，並將離心管移入油浴 $85 \pm 2^\circ\text{C}$ ，以 250 rpm 震盪 3 小時。
- (3) 承步驟 4. (2)，取出離心管冷卻至室溫後，加入 15 mL 之 3.2 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (in 10% HNO_3)，震盪 30 分鐘，以防止萃取出之重金屬再度吸附於污泥中，並以 2000 rpm 離心 20 分鐘，將上澄液過濾，之後加入 HNO_3 保存待測，再加 5 mL 去離子水於離心管，離心過後捨棄廢液。



5. 殘存態萃取實驗:

承步驟 4. (3)，將離心管內污泥至入消化瓶中，以總重金屬萃取方法，分析殘存相之重金屬，取其濾液冷藏保存。

由前述五項萃取步驟所的上澄液及濾液，以火焰式原子吸光光譜儀 (FAAS) 分析欲測之重金屬，必要時加以稀釋。

3.6 生物溶出法之實驗設計

3.6.1 中央合成設計 (CCD)

為了要聯繫相關和獨立變數 (Dependent and independent variables) 並使用最少實驗組數，使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。

CCD 包含了一個 2^K 因子設計 (實心圓點), $2K$ 個軸點試驗 (星形點), 和 N_C 個中心點試驗使得其可以估計出曲率。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, 則中心點到星點的距離是 $\pm\alpha$, 在此 $|\alpha| < 1$ 。CCD 通常含有因子數兩倍的星點, 星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, 如果此因子設計是全因子則 α 值一般定義為 $\alpha = (2^K)^{1/4}$ 。

以二因子為例 $K=2$ 則 $\alpha=1.414$, 二因子的中心組合設計概念如 Figure 3-7 所示 (Charin Techapun et al., 2002)。

實驗所需組數 $N=2^K + 2K + 1$, 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 9 組 (Diaz et al., 2003)。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 (3-1) 式正規化 (normalized) 從 -1.414 到 1.414, 此正規化過程能更精準估計回歸係數而且降低線性和二次項之間的交互關係。

$$X_n = \frac{X - \bar{X}}{(X_{\max} - X_{\min})/2} \text{-----(3-1)}$$

X : 獨立變數的絕對值

$\bar{X}$: 變數平均值

$X_{\max}$ 和 $X_{\min}$: 變數最大最小值

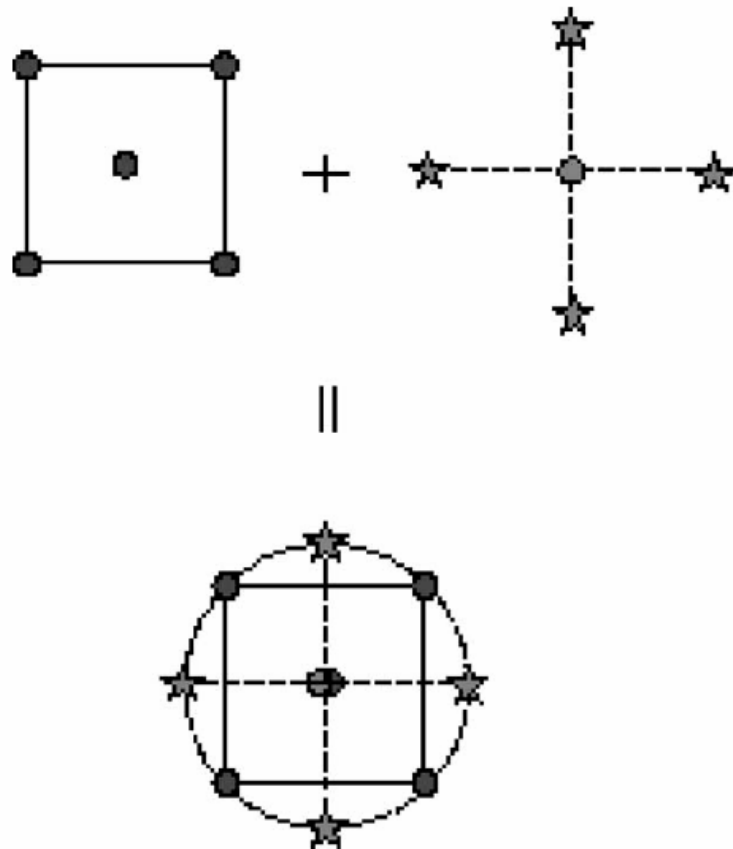


Figure 3-7 2 因子 CCD 示意圖

3.6.2 反應曲面法 (Response Surface Method)

反應曲面法 (RSM) 搭配著 CCD，可更有效對於我們有興趣的反應及變數的影響達到最佳化的目標。假設重金屬溶出速率 (Y)，操作因子為固體物濃度 (X_1) 及硫粉添加量 (X_2)，則反應速率的函數，如 (3-2) 式

$$Y = f(X_1, X_2) + \varepsilon \quad \text{-----}(3-2)$$

其中 ε 代表反應速率 Y 中所觀測到的誤差。如簡化成 $Y = f(X_1, X_2)$ ，則此方程式所代表的曲面就稱之為反應曲面。利用 RSM 以及等高線圖可以決定因子最佳操作條件或範圍。

3.6.3 批次實驗規劃

目前實驗設計的規劃為二因子 (X_1 =固體物濃度、 X_2 =硫片添加量) 的 CCD，而每個獨立因子變數分別具有 5 個水準範圍，固體物濃度(X_1) 從 0.5% 至 5.0%；硫片添加量 (X_2) 則是從 0.5% 至 4.0%。其所對應的自然變數 (natural levels) 以及編碼變數 (coded levels) 如 Table 3-3 所示。經由統計軟體 minitab 的 CCD 亂數執行出來的組數及順序，中心點取三重覆所以一共需執行 11 組批次實驗如 Table 3-4 所示。

3.7 EPS 定量試驗

3.7.1 EPS 萃取方法

沸騰水浴萃取法 (Forster, 1971；Brown *et al.*, 1982):

一、步驟:

- (1) 將適量樣品污泥放入二根離心管。
- (2) 污泥以 4000 rpm 離心 30 分鐘，傾棄上澄液。
- (3) 加入 20 mL 蒸餾水淘洗溶解值，使下層污泥重新懸浮，重覆離心 2-3 次。
- (4) 污泥在 95^oC 的水中震盪 1-2 小時。冷卻至室溫，以 10000 rpm 離心 20 分鐘，分離菌體顆粒與 EPS 溶液。
- (5) 收集上澄液後，加入 1:3 的乙醇:丙酮進行 EPS 聚合。

(6) 冷藏於攝氏 4°C 冰箱放置隔夜，完成 EPS 之聚合。

Table 3-3 因子水準表

設計因子	Level				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1 : 固體物濃度 (%)	0.5	1.16	2.75	4.34	5.0
X_2 : 硫片添加量 (%)	0.5	1.0	2.3	3.5	4.0

Table 3-4 實驗組數表

Std Order	Coded value		Natural value	
	X_1	X_2	固體物濃度 (%)	硫片添加量 (%)
6	1	1	4.34	3.50
4	1.414	0	5.00	2.30
9	0	0	2.75	2.30
11	0	0	2.75	2.30
2	-1	-1	1.16	1.00
8	0	1.414	2.75	4.00
1	-1.414	0	0.50	2.30
3	0	-1.414	2.75	0.50
5	-1	1	1.16	3.50
10	0	0	2.75	2.30
7	1	-1	4.34	1.00

- (7) 將聚合隔夜的溶液以 10000 rpm 離心 30 分鐘，所得沉澱物用蒸餾水沖入試管中，置於攝氏零下 80⁰C 冷凍櫃結冰。
- (8) 冰狀試樣用冷凍乾燥機使之乾燥脫水 24 小時以上。
- (9) 乾燥後的試樣稱重，並重新溶入定量水中，以進行其他分析。在電壓穩定的情況下，進行 24 小時即可乾燥完全。

3.7.2 蛋白質定量 (Bradford protein-binding assay)

- (1) 標準溶液的配製：

Electricity	0	1	2	3	4	5
BSA (100 µg/ml) (µl)	160	128	96	64	32	0
Citrate buffer (10 mM) (µl)	0	32	64	96	128	160
Bio-Rad Dye Reagent (µl)	40	40	40	40	40	40
Total volume (µl)	200	200	200	200	200	200
Final concentrarion (µg/ml)	100	80	60	40	20	0

- (2) 將配製好的 BSA 標準溶液及樣品加入每一個 well 中，利用酵素免疫分光光度計 (Enzyme-Linked Immunofiltration spectrophotometer Assay, ELISA) 在 595 nm 吸光值之下建立一標準曲線，並藉由之前所建立出的標準取線來估計為之樣品中蛋白質濃度。

3.8 菌種的鑑定

本實驗使用的方法為螢光原為雜交法 (Fluorescence *in situ* Hybridization FISH)，其原理為利用微生物 16 rRNA 的保守性，設計只針對某屬或某種微生物具專一性的螢光探針，將微生物樣本經特殊處理後置

於載玻片上，再加上螢光探針。此經過螢光標示的探針再適宜的雜交條件下會進入細胞內，與細胞內特定的 rRNA 配對。此探針雜交後會留在該細胞體內便會產生螢光，置於螢光顯微鏡下便可清楚的觀察出族群分布情形及依螢光的多寡來決定該微生物族群數量的多寡。能快速同時鑑定多個未知菌種，而且無須任何培養，此為傳統細菌鑑定所不及的優勢。也可進一步將微生物定性、定量。其流程圖可見 Figure 3-8。

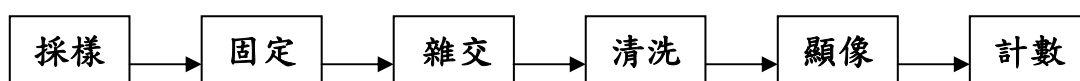


Figure 3-8 FISH 流程圖

3.8.1 採樣及保存

採樣時必須充分混合，使樣品具有代表性，且在檢驗前不再被污染。使用清潔並經過滅菌的容器或 Microtubes，及溫度能維持在 0°C 至 5°C 之樣品儲存設備。水樣運送及保存之溫度應維持在 0°C 至 4°C 。樣品自採樣後至進行固定，其保存時間不得超過 24 小時。採樣後立即以 4% Paraformaldehyde 固定，並保存於 50% PBS-EtOH (v/v)。

3.8.2 液相螢光原位雜交法步驟

固定 (Fixation)

(1) 依 1:3 的體積比進行固定，使用 1.5 mL 的微量離心管加入 0.25 mL

的污泥與 0.75 mL 100% EtOH 固定 120 分鐘 (on ice)。

- (2) 適用 1000 rpm 離心 20 分鐘，使污泥形成 pellet。
- (3) 小心倒掉上澄液，加入 1 mL PBS (pH 7.2) 使 pellet 再懸浮。
- (4) 步驟 2、3 重覆兩次以去除剩餘的固定劑。
- (5) 將樣品保存於 50% PBS-EtOH (v/v)。
- (6) 打散污泥：使用針筒 (3 mL-27G) 慢慢抽打污泥 10 次，再用均質器抽打 10 次。
- (7) 分別取 3 μ L 固定好的樣品點到 Slide 的 well 上，室溫風乾 (避免污染)。
- (8) 分別將 Slide 浸入 50%、80%、96% (v/v) 的乙醇裡脫水 2 分鐘。
- (9) 風乾後，將 Slide 保存於室溫下不受污染處。



雜交 (Hybridization)

- (1) 將 16 μ L 的 Hybridization buffer (註 1) (% Formamide、0.9 M NaCl、0.01% SDS、20 mM Tri-HCl buffer (pH 7.2)、DNA probe (50 ng/16 μ L well) 注入各個雜交井 (50 ng/16 μ L well)。
- (2) 準備一個 50 mL 尖底離心管，將衛生紙 + Washing buffer (1-2 mL) 沾濕平鋪於離心管中 (保濕)，以備雜交 (避免被污染)。
- (3) 再將 Slide 水平放入離心管，再置於培養箱 46⁰C 下，雜交 1.5 小時 (同時將 Washing buffer 置入培養箱中預熱)。

註 1:

Probe Name	Hybridization	Washing Buffer	Reference
	Buffer Formamide conc. (%)	NaCl conc. (mM)	
S-D-Bact-0338-a-A-18	20%	170	Amann <i>et al.</i> , 1980
S-S-Thio-08200-a-A-22	20%	170	Peceia <i>et al.</i> , 2000
S-S-Thiopa-0511-a-A-18	20%	170	

清洗 (Washing)

- (1) 取出 Slide 以 1 mL Washing buffer (No Formamide, NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)) (48⁰C) 淋洗兩次。
- (2) 將雜交管中的衛生紙取出，加入 30-35 mL Washing buffer，再將 Slide 浸入，48⁰C 培養箱中 20 分鐘。
- (3) 取出 Slide 以 1 mL 去離子水淋洗兩次，於室溫下風乾。

DAPI Staining

- (1) 將 DAPI 染劑 20 μ L (1 μ g/mL) 加入 well 中，染色 30 分鐘。
- (2) 以去離子水淋洗，去除過剩的染劑。
- (3) 室溫下烘乾。

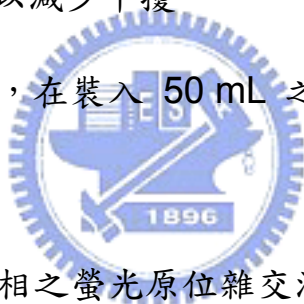
一般染色之樣品本應立即觀察，因當時的螢光最顯著；若不能馬上觀察，需儲存於乾燥盒 (Polyethylene Bag) 內，保存於 0-5⁰C 冰箱內，可保存一個月左右，仍可呈現螢光。使用直落式螢光顯微鏡對載玻片進行觀

察，以數位相機 (CCD camera) 觀察樣品螢光強度並對其進行分析比較。

3.8.3 固相螢光原位雜交法步驟

預先處理

- (1) 取出反應槽中的硫片 (約 3-5 g)，以裝入 50 mL 之離心管中，並加入無菌水 20 mL，以 6000 rpm 離心 20 分鐘。
- (2) 離心完後，將上澄液倒出，加入 20 mL 之無菌水，再次以 6000 rpm 離心 20 分鐘。
- (3) 重複 1、2 兩步驟，以減少干擾。
- (4) 將硫片取出予以研磨，在裝入 50 mL 之離心管中，並加入 20 mL 之無菌水。
- (5) 接下來的步驟皆與液相之螢光原位雜交法步驟相同。



第四章 結果與討論

4.1 畜牧污泥基本特性

污泥樣品取自畜牧業廢水處理廠，厭氧消化槽所產生的污泥；污泥中基本性質如 Table 4-1 所示；由表中可知，污泥中的有機含量 (VS) 相當的高，大約佔固體物的 1/3 左右；污泥中重金屬以鋅 ($4450 \pm 141 \text{ mg/kg}$) 的含量最高，其次為銅 ($3500 \pm 48.8 \text{ mg/kg}$)、錳 ($2450 \pm 79.1 \text{ mg/kg}$)、鎳 ($910 \pm 39.4 \text{ mg/kg}$) 的含量較高，鉛、鉻及鎘的含量都相對較低，因為養豬飼料中添加銅與鋅等化學鹽類，做為豬隻生長之刺激與調理劑，導致污泥中銅與鋅的含量特別高；然而草本植物中含有錳，而養豬飼料中多以草本植物為主，所以錳在污泥中的含量也相當高，如此一來污泥中的重金屬含量升高，不利於作為農地肥料或土壤改良劑，無法達到資源回收之目的，對於畜牧場減廢亦無功效。

因為一般污水處理廠中，重金屬的去除大部分在第一階段的沉澱池中，故廢水中的重金屬絕大部分會沉積在厭氧污泥中。所以污泥中的重金屬對於資源化為一重大的屏障。

Table 4-1 原始污泥的基本性質

Property	Values (a)
pH	8.5±0.3
TS (%)	4.82±0.91
VS (%)	1.76±0.32
EC (ms/cm)	4.30±0.18
SS (mg/L)	35800±91.6
VSS (mg/L)	25000±79.5
TOCw (mg/L)	102±0.71
TDS (mg/L)	1920±1.1
Cu (mg/kg)	3500±48.8
Cd (mg/kg)	85.0±3.53
Cr (mg/kg)	104±6.52
Pb (mg/kg)	176±7.42
Zn (mg/kg)	4450±141
Ni (mg/kg)	910±39.4
Mn (mg/kg)	2450±79.1

a: average ± standard deviation, n=5

4.2 馴養實驗

在畜牧污泥的馴養實驗中，以監測污泥的 pH 值作為馴養成效之指標，當污泥的 pH 值降到 2.5 以下，則視為污泥中的野生硫氧化菌已充分適應污泥環境，且大量生長。因為考慮到之後污泥酸化之影響，所以改採以硫片來馴養，可有效將硫片加以回收，故在馴養槽中以 TS = 1.5%，S = 1.0% 來進行馴養，Figure 4-1A 中可見到第 1 次馴養的時間較長，所以要等到第 56 天污泥中的 pH 值才會達到 2.52，pH 值降低的趨勢較為緩和，經過 3-4 次的反覆馴養，污泥中的 pH 值可在 3-4 天內達到 2.5 以

下 (Figure 4-1B)，由於經過馴養的硫片上含有硫氧化菌，而硫片受到硫氧化菌作用反應，造成硫片表面粗糙度提高，所以此時硫片的比表面積以改變 (Liu *et al.*, 2003)，可提供多餘位址讓硫氧化菌吸附在硫片上，如此可有效加速酸化的速率，並提供硫氧化所適合存在的環境，故此時污泥中之硫氧化菌已活化至最佳狀況，足以作為生物溶出法之植種。

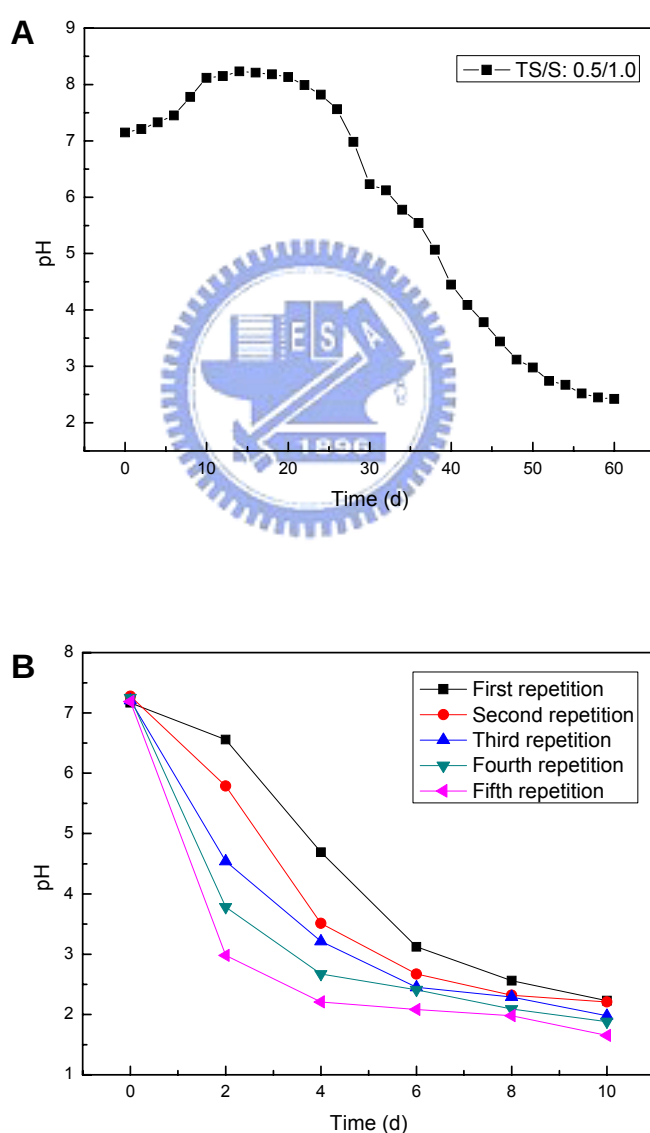


Figure 4-1 馴養實驗中 pH 值變化情形

4.3 不同固體物濃度及硫片添加量對生物溶出實驗之影響

4.3.1 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對 pH、氧化還原電位 (ORP) 和導電度 (EC) 之影響

在生物溶出程序中，pH、ORP 和 EC 值會隨著固體物濃度及硫片添加量的不同而有所改變。Figure 4-2 為不同操作條件下 pH 值的變化情形。高固體物濃度會有較高的緩衝能力及較長的遲滯期 (Sreekrishnan *et al.*, 1993)，硫氧化菌在高固體物濃度下為非優勢菌種，無法在短時間內迅速產酸，使得污泥中的 pH 下降趨勢緩慢。TS=5.0%、S=2.3% 在 20 天內都無法將 pH 降到 2.5，而是維持在 pH 3.21 左右；在低固體物濃度 TS=0.5%、S=2.3%，在第 4 天 pH 值就降至 2.5 左右，相當迅速；TS=1.16%、S=1.0% 和 TS=1.16%、S=3.5%，在第 8 天 pH 值就降至 2.36 和 2.96，亦是相當迅速的；TS=2.75%、S=2.3%，TS=2.75%、S=1.0% 和 TS=2.75%、S=4.0%，分別在第 14 天 pH 值就降至 2.5 左右；TS=4.34%、S=1.0% 和 TS=4.34%、S=3.5%，前者是無法使 pH 值下降至 2.5 左右，而一直維持在 pH 5.82，其原因為硫片添加量不足，無法提供充足的基質，故 pH 值無法有效下降；而後者在第 12 天 pH 值就降至 2.5 左右。故由上述可知，必須同時考慮到固體物濃度及硫片添加量的情形，方能使硫氧化菌有效地產酸，同時使 pH 值是快速達到 2.5 以下。

Figure 4-3 為不同操作條件下 ORP 值得變化情形。在低固體物濃度

TS=0.5%、S=2.3%，在第 6 天 ORP 值就上升至 450 mv 左右，顯示硫氧化菌能快速適應環境；TS=1.16%、S=1.0% 和 TS=1.16%、S=3.5%，在第 8 天和第 12 天 ORP 值就達到 455 mv 和 451 mv；TS=2.75%、S=2.3%，TS=2.75%、S=1.0% 和 TS=2.75%、S=4.0%，分別在第 14 天、第 16 天和第 20 天 ORP 值就達到 455 mv、457 mv 和 450 mv；TS=4.34%、S=1.0% 和 TS=4.34%、S=3.5%，前者在 20 天內均無法使 ORP 值達到 450 mv，而後者在第 14 天就能使 ORP 值達到 499 mv；在高固體物濃度 TS=5.0%、S=2.3%，在 20 天內無法使 ORP 值達到 450 mv，但最終也可以使 ORP 值達到 400 mv 以上。所以在生物溶出程序中，固體物濃度越低，ORP 值上升趨勢越快速；反之固體物濃度越高，ORP 值上升趨勢越緩慢。所以固體物濃度高低，決定 ORP 值變化趨勢。

Figure 4-4 為不同操作條件下 EC 值得變化情形。在生物溶出法中，添加硫片作為基值提供微生物所需的能量，而硫氧化菌氧化硫片導致 pH 值下降，同時溶液中存在大量的 H^+ 、 SO_4^{2-} 及金屬離子，故量測 EC 值亦可作為一種指標。在低固體物濃度 TS=0.5%、S=2.3%，在第 8 天 EC 值就上升至 23.8 ms/cm 左右；TS=1.16%、S=1.0% 和 TS=1.16%、S=3.5%，在第 12 天 EC 值就達到 42.8 ms/cm 和 67.5 ms/cm；TS=2.75%、S=2.3%，TS=2.75%、S=1.0% 和 TS=2.75%、S=4.0%，分別在第 14 天、第 16 天和第 18 天 EC 值就達到 22.5 ms/cm、23.5

ms/cm 和 25.78 ms/cm ; TS=4.34.%、S=1.0% 和 TS=4.34%、S=3.5% , 前者在 20 天內均無法使 EC 值達到 20 ms/cm , 而後者在第 12 天就能使 EC 值達到 25.5 ms/cm ; 在高固體物濃度 TS=5.0%、S=2.3% 和 TS=4.34%、S=1.0% , 在 20 天內均無法使 EC 值大量提升, 也就是溶液中的 H^+ 、 SO_4^{2-} 及金屬離子含量較低, 及經 bioleaching process 後效果不彰。

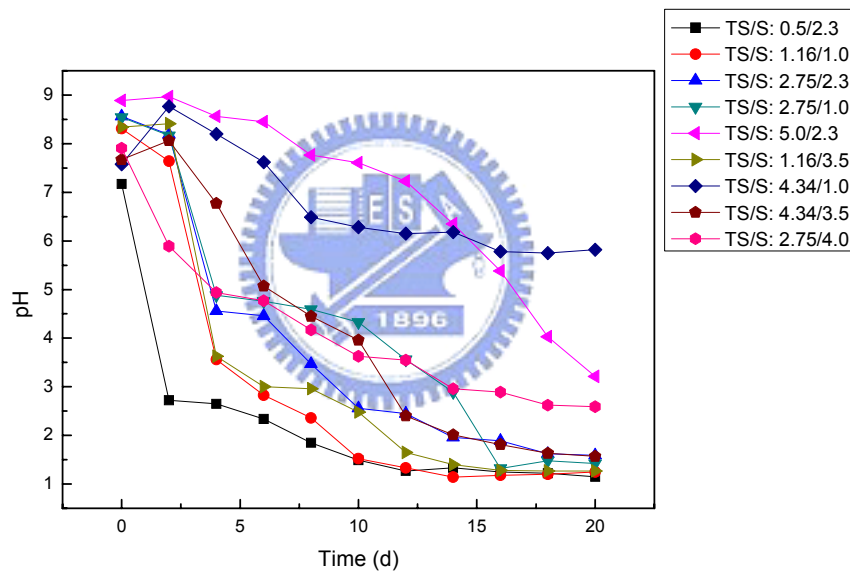


Figure 4-2 生物溶出法中 pH 值變化情形

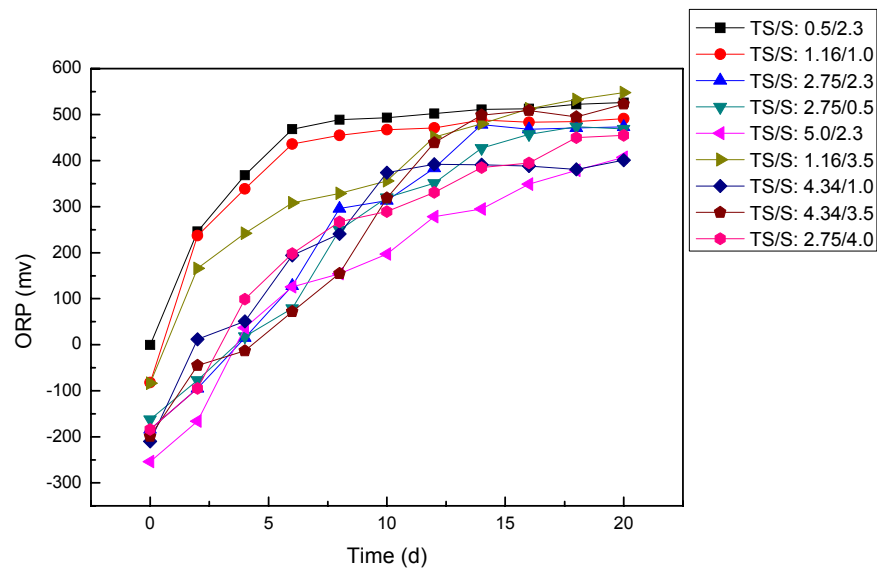


Figure 4-3 生物溶出法中 ORP 值變化情形

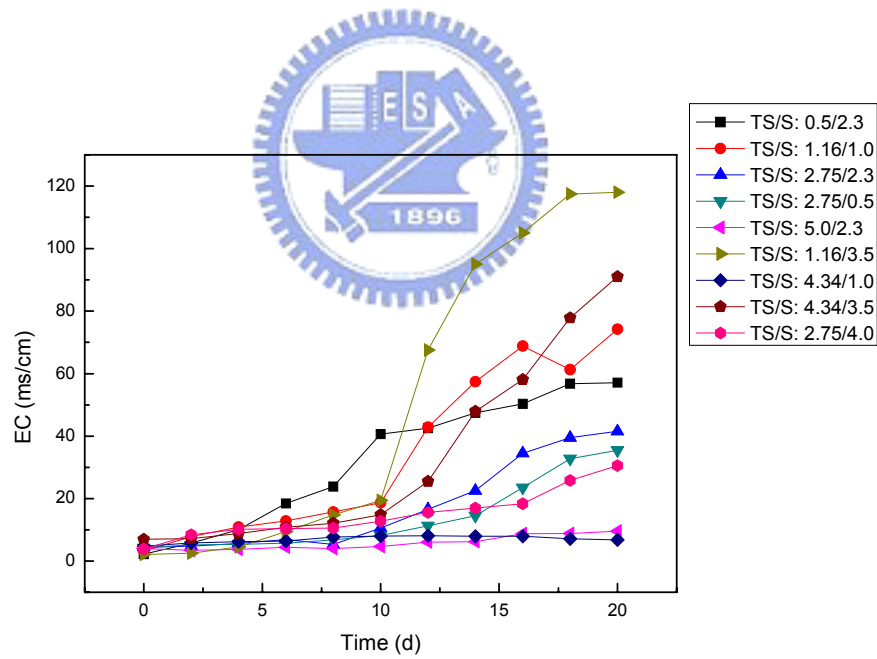


Figure 4-4 生物溶出法中 EC 值變化情形

4.3.2 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對硫酸根產生量之影響

Figure 4-5 為 SO_4^{2-} 變化情形，理論上 pH 值越低其硫酸根濃度會越高，但在 Figure 4-5 中所顯示的並非如此，TS=0.5%、S=2.3% 其 pH 值為 1.15，硫酸鹽濃度為 14300 mg/L；而 TS=4.34%、S=3.5% 其 pH 值為 1.57，硫酸鹽濃度為 28400 mg/L。故無明顯的規則，所以硫酸根產量的多寡並不足以決定 pH 值得高低，還需考慮固體物濃度高低，因為固體物濃度高低會影響硫氧化菌產酸的能力。但可由 Figure 4-4 和 Figure 4-5 中發現兩者有相同的變化情形，Figure 4-4 中 EC 值濃度由高到低的變化情形為 6>8>2>1>3>4>9>5>7；而 Figure 4-5 中 SO_4^{2-} 濃度由高到低的變化情形為 8>6>3>1>2>4>9>5>7。由上述可知雖然前面幾組有稍不同，但整體變化情形卻有相同的趨勢，某些實驗組數中其相關係數高達 99% 以上，可能是的 SO_4^{2-} 為影響溶液中導電度的最大原因，故以 EC 值來作為一種指標也是具有可行性的。(EC/ SO_4^{2-} 之相關係數 -----附錄二)

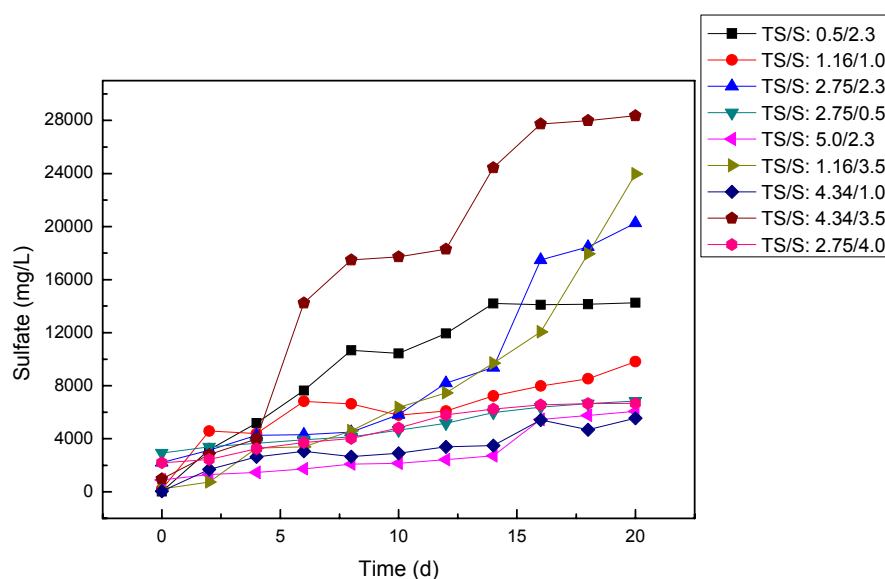


Figure 4-5 生物溶出法中 SO_4^{2-} 變化情形

4.3.3 不同固體物濃度及硫片添加量在生物溶出程序中對有機物降解之影響

利用生物溶出法來使重金屬溶出的同時，有機物會隨著時間的增加而有所降解，達到消化的作用 (Benmoussa et al., 1994)。Figure 4-6A 為生物溶出法中懸浮性固體物降解情形，可以看出每一組試驗隨著時間的增加都有一定程度的降解，其中降解的原因包括生物分解作用與酸溶解作用，在 pH 值較高的實驗當中，微生物作用佔大部分，而酸溶解作用佔較少部分；而在 pH 值較低的實驗中則是相反的。Figure 4-6B 和 Figure 4-6C 中可知固體物濃度在較低的範圍 (0.5-1.0%)，且硫片添加量在 0.5-2.0% 時，其降解情形可高達 60% 左右；反之固體物濃度在較高的範圍，若硫片添加量不足時，其降解情形越差，但反應曲面圖並非為收斂之曲線，這

也意謂著無法由反應曲面圖找出最適當之操作範圍。其懸浮性固體物降解情形如下：TS/S: 0.5/2.3，降解率為 63.73%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 51.39% 和 53.05%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 44.57%、35.97%和 42.88%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 30.85% 和 65.19%；TS/S: 5.0/2.3，降解率為 30.30%。在不同操作條件下其懸浮性固體物降解率大約維持在 30-65% 左右，均較活性污泥法降解率來的高 (20-50%) (歐陽嶠暉，下水道工程學 2001)。

Figure 4-7A 為揮發性懸浮固體物降解情形，其 VSS 降解趨勢與 SS 降解趨勢大致相同，一樣會隨著時間增加而有一定程度的將解效果。Figure 4-7B 和 Figure 4-7C 中可知固體物濃度在較低的範圍 (0.5-1.0%)，只要硫片添加量足夠時 (0.5-1.5%)，其降解情形可高達 50% 左右，但反應曲面圖並非為收斂之曲線，這也意謂著無法由反應曲面圖找出最適當之操作範圍。其揮發性懸浮性固體物降解情形如下：TS/S: 0.5/2.3，降解率為 49.65%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 43.75% 和 46.18%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 42.56%、35.56% 和 32.88%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 24.29% 和 62.75%；TS/S: 5.0/2.3，降解率為 15.93%。在不同操作條件下其揮發性懸浮固體物降解率大約維持在 15-62% 左右，均較活性污泥

法降解率來的高。

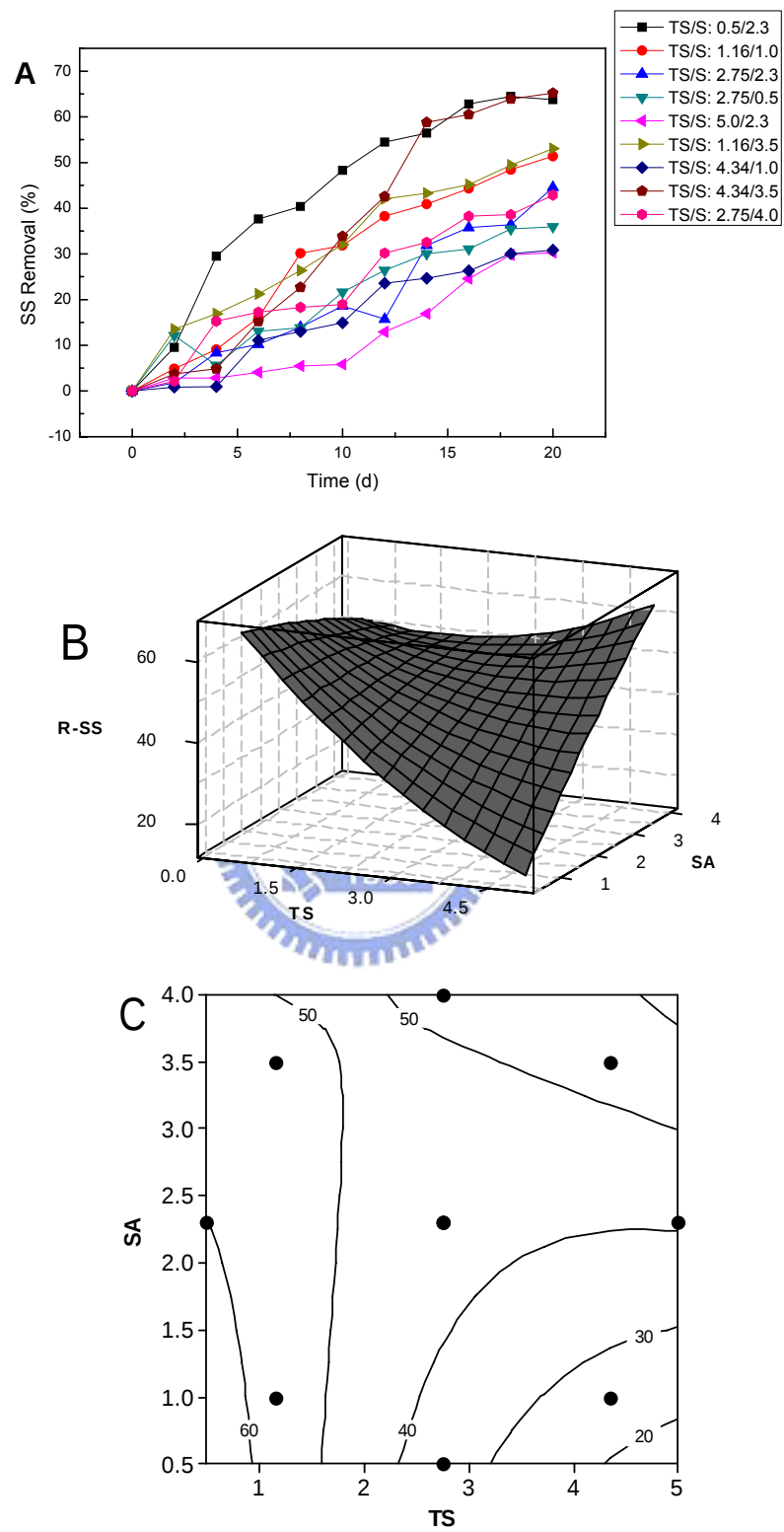


Figure 4-6 生物溶出法中 SS 變化情形 (A) SS Removal (B) Surface (C) Contour plots

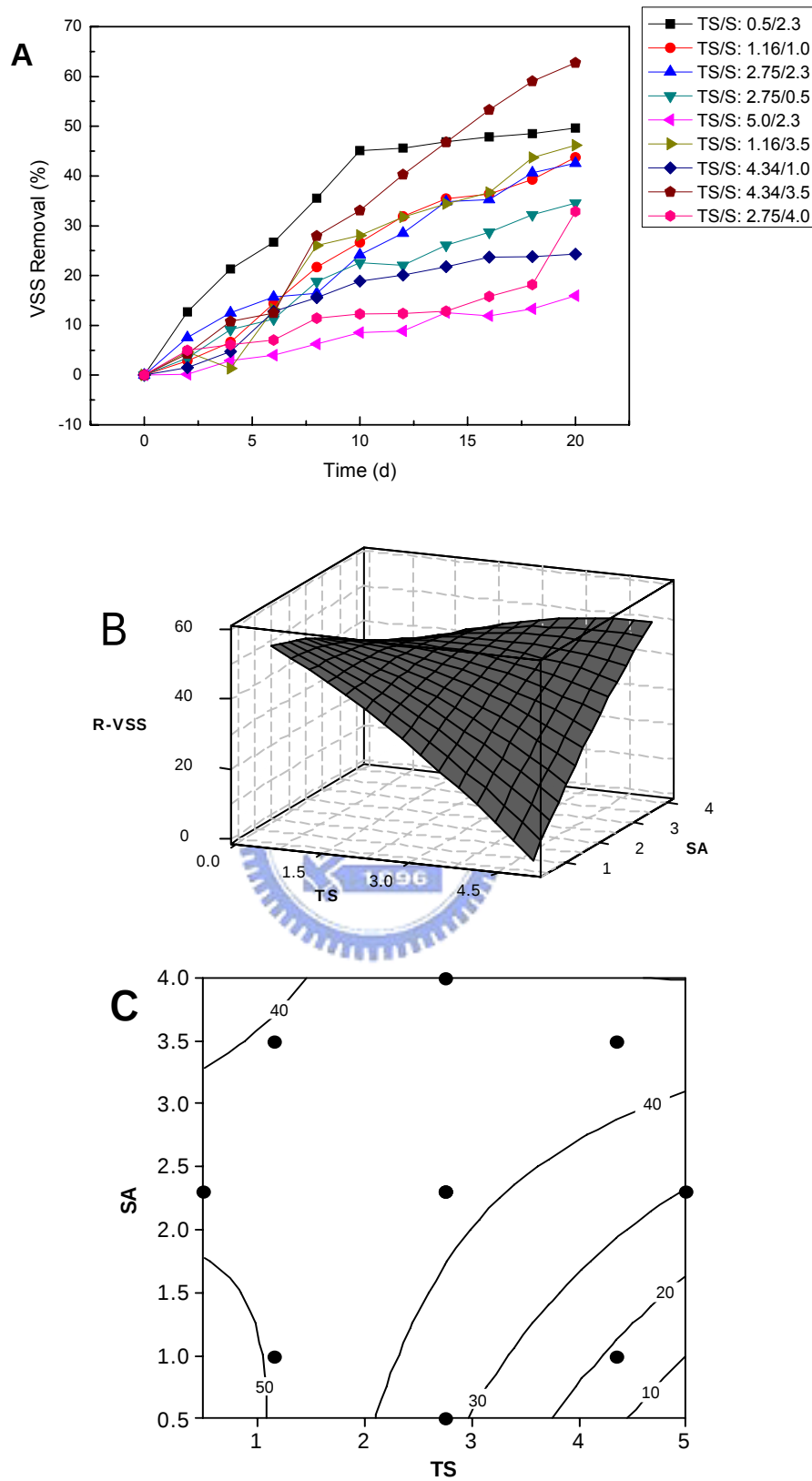


Figure 4-7 生物溶出法中 VSS 變化情形 (A) VSS Removal (B) Surface plot (C) Contours plot

4.4 生物溶出實驗

4.4.1 重金屬溶出效率

因為銅容易在固體物濃度較高的情形下與有機物錯合 (Tyagi *et al.*, 1992), 故重金屬溶出效果並不佳, 所以在低固體物濃度下銅的溶出效率較佳。Figure 4-8A 為銅在 Bioleaching 程序中銅的反應曲面圖, 從彎曲的幅度歸納出固體物濃度對銅的溶出率影響較大, 隨著固體物濃度增加也就是有機物含量的增加, 銅的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差, 暗示有機物含量越高將會對銅的溶出效果影響越大。Figure 4-8B 為高線圖, 其為收斂曲線, 這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍, 只要將固體物濃度控制在 0.5-1.5% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時, 銅的溶出率即可達到 95% 以上。銅的溶出率結果如下: TS/S: 0.5/2.3, 溶出率為 98.89% ; TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5, 分別為 95.74% 和 96.88% ; TS/S: 2.75/2.3, TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0, 分別為 94.88%、80.74% 和 76.31% ; TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5, 分別為 29.29% 和 76.02% ; TS/S: 5.0/2.3, 溶出率為 34.81%。而重金屬溶出效率從 30-100% 左右, 其中有如此大的差距, 除了與固體物濃度高低有關之外, 還有一重要因素為 pH 值; 在 pH 值越低的情況之下, 反應溶液中才會有足夠的 H^+ 離子與重金屬進行置換作用。(各重金屬之溶出效率

-----附錄三)

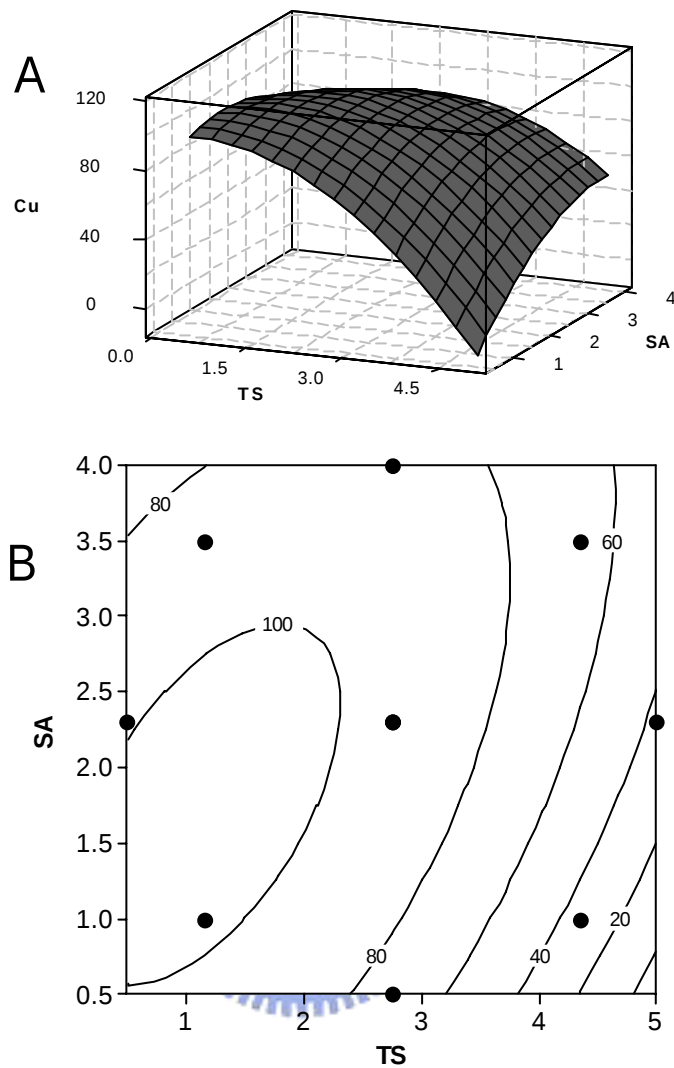


Figure 4-8 生物溶出法中銅變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

Figure 4-9A 為鎘的反應曲面圖，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鎘的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加也就是有機物含量的增加，鎘的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，暗示有機物含量越高將會對鎘的溶出效果影響越大。但仍需考慮到硫的添加量，因為硫添加量多寡對於 pH 下降有一定的影響，所以鎘在 Bioleaching 程序中溶出的最重要因子為 pH 值，pH 值越低其溶出效果越佳。Figure 4-9B 為高線圖部份，

其為收斂曲線，可由等高線圖找出最適當之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.5% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鎘的溶出率即可達到 95% 以上。鎘的溶出率結果如下: TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 98.23%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 95.29% 和 94.23%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 85.29%、79.88% 和 61.67%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 23.52% 和 71.41%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 24.70%。

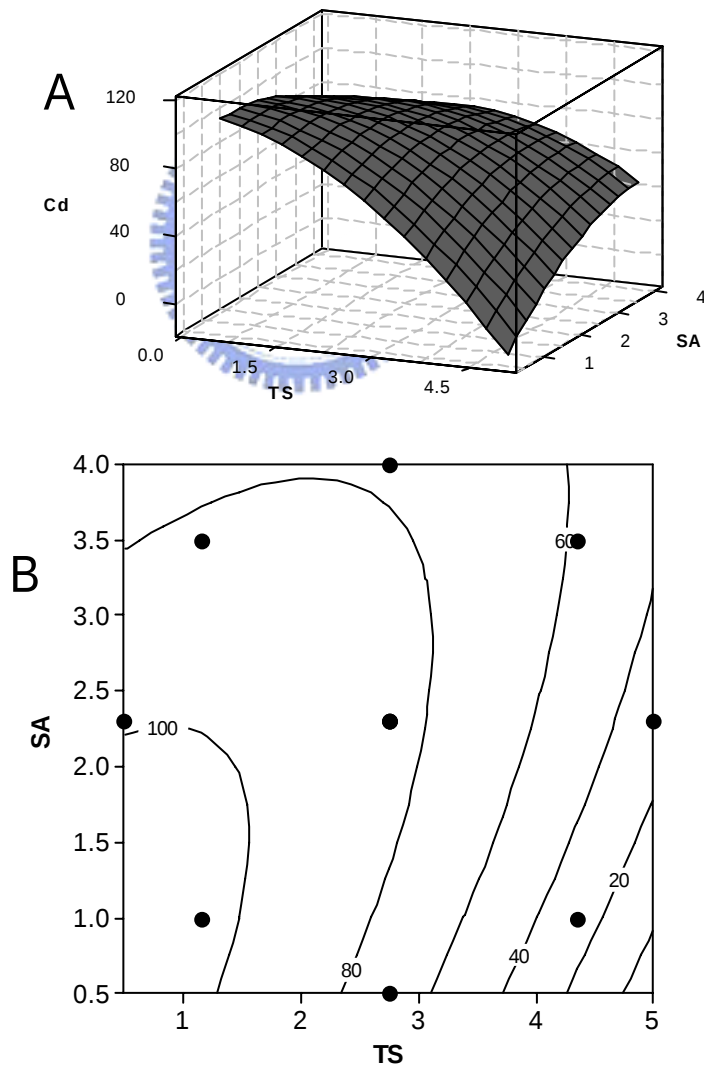


Figure 4-9 生物溶出法中鎘變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

因為鉻屬於較難去除的重金屬，需在極酸的條件下 (pH 1.3) 才可達到較高的去除率 (Sreekrishnan et al., 1996)；隨著固體物的增加，鉻會與有機物形成 $\text{Cr}_3(\text{SO}_4)_2$ 的錯合物，而降低溶出效果。Figure 4-10A 為鉻的反應曲面圖，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鉻的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加鉻的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，暗示有機物含量越高將會對鉻的溶出效果影響越大。但硫添加量多寡對於 pH 下降有一定的影響，所以如何讓 pH 在極酸的條件下 (pH 1.3) 是對鉻溶出效果最大影響因子。Figure 4-10B 為等高線圖部份，其為收斂曲線，這也意味著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.0% 且硫片添加量在 1.0-2.0% 之間時，鉻的溶出率即可達到 95% 以上。鉻的溶出率結果如下：TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 91.83%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 90.58% 和 69.71%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 35.58%、31.25% 和 24.04%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 11.54% 和 33.74%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 13.46%。

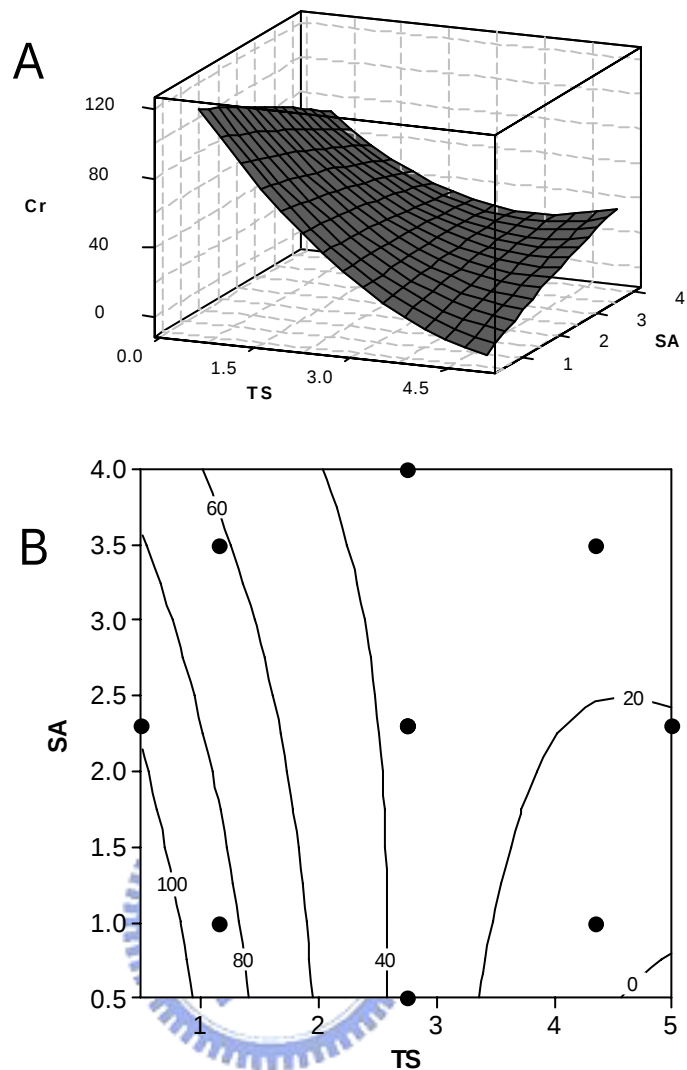


Figure 4-10 生物溶出法中鉻變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

鉛容易與硫酸根離子形成溶解度低的硫酸鉛 PbSO_4 ($K_{sp} = 1.62 \times 10^{-8}$)，再加上鉛易與有機物結合形成難溶解性錯合物，所以通常鉛的溶出效果並不佳 (Tyagi 1992; Chen and Lin 2001)。Figure 4-11A 為鉛的反應曲面圖，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鉛的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加鉛的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，及有機物含量越高將會對鉛的溶出效果影響越大。Figure 4-11B 為高線圖部

份，其為收斂曲線，這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.0% 且硫片添加量在 1.0-2.0% 之間時，鉛的溶出率即可達到 50% 以上。鉛的溶出率結果如下: TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 52.56%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 46.14% 和 46.88%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 39.26%、38.35% 和 33.52%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 17.89% 和 28.32%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 23.86%。

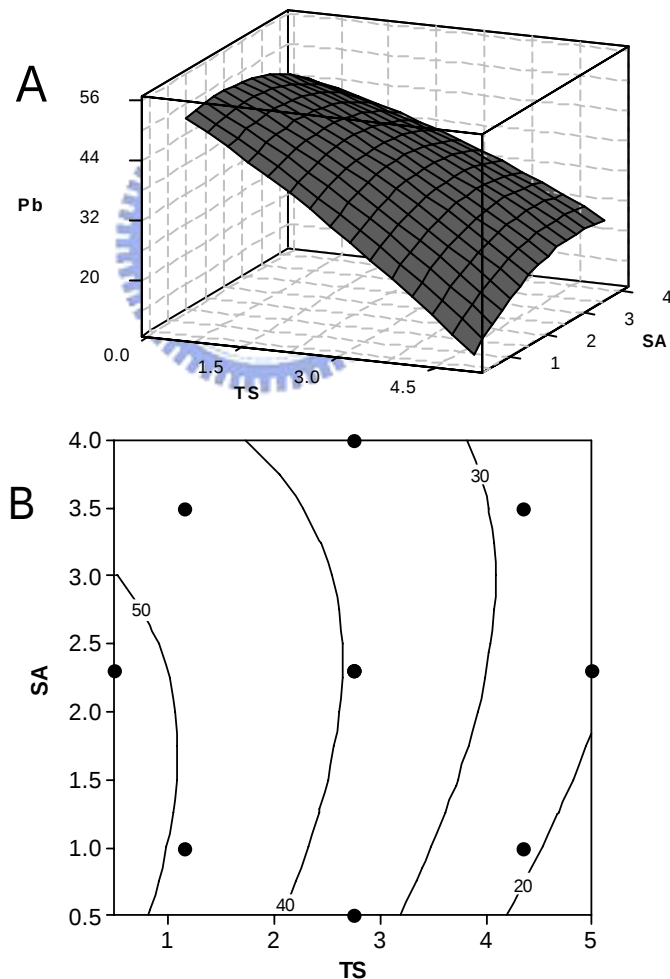


Figure 4-11 生物溶出法中鉛變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

鋅在 Bioleaching 程序中，並不會受到固體物濃度高低影響，而導致鋅溶出效果不佳，但溶出的時間點會有明顯的差別，pH 值下降越快，溶出效果越佳。Figure 4-12A 為反應曲面圖部分，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鉛的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加鋅的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差。Figure 4-12B 為高線圖部份，其為收斂曲線，這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-2.0% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鋅的溶出率即可達到 95% 以上。鋅的溶出率結果如下：TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 99.55%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 97.75% 和 99.77%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 97.52%、94.38% 和 88.89%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 42.45% 和 91.07%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 23.86%。只有 2 組並未達到較好的溶出結果，主要是因為 pH 值並未有效下降至 2.5 左右，才導致結果不佳。

鎳在 Bioleaching 程序中為較容易溶出的金屬，只要 pH 值降低，污泥中的重金屬就可輕易溶出。Figure 4-13A 為反應曲面圖部分，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鎳的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加鎳的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，暗示有機物含量越高將會對鎳的溶出效果影響越大。

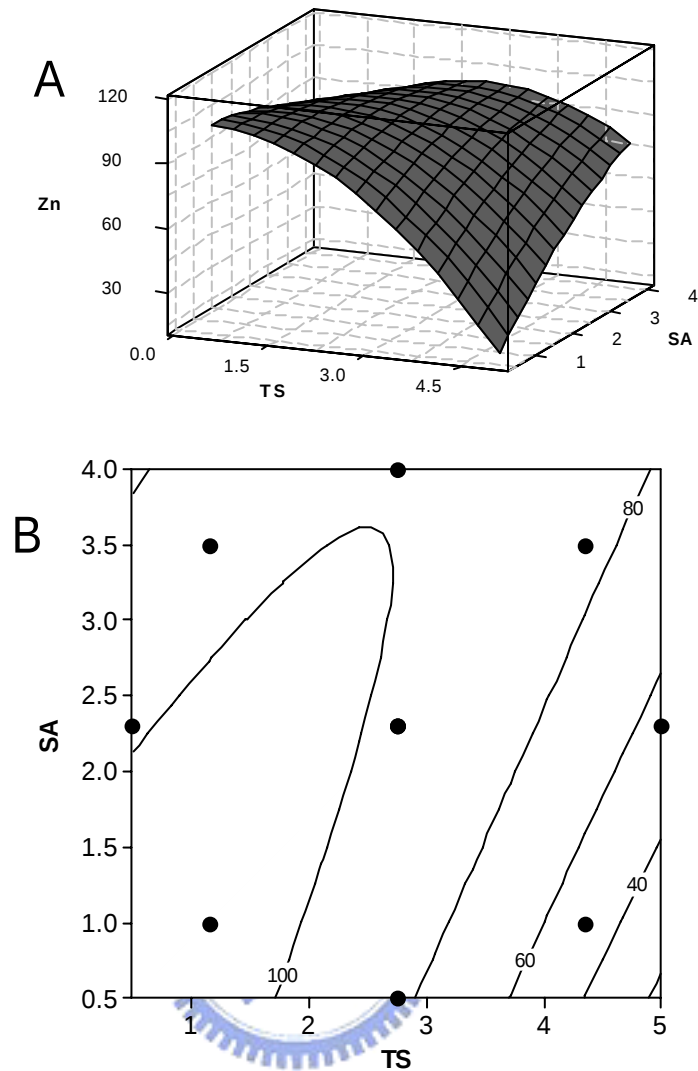


Figure 4-12 生物溶出法中鋅變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

Figure 4-13B 為等高線圖部份，其為收斂之曲線，這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.5% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鎳的溶出率即可達到 95% 以上。鎳的溶出率結果如下: TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 98.90%; TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 98.35% 和 98.90%; TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 96.26%、93.96% 和 87.91%; TS/S: 4.34/1.0 和

TS/S: 4.34/3.5，分別為 54.28% 和 86.69%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 69.23%。

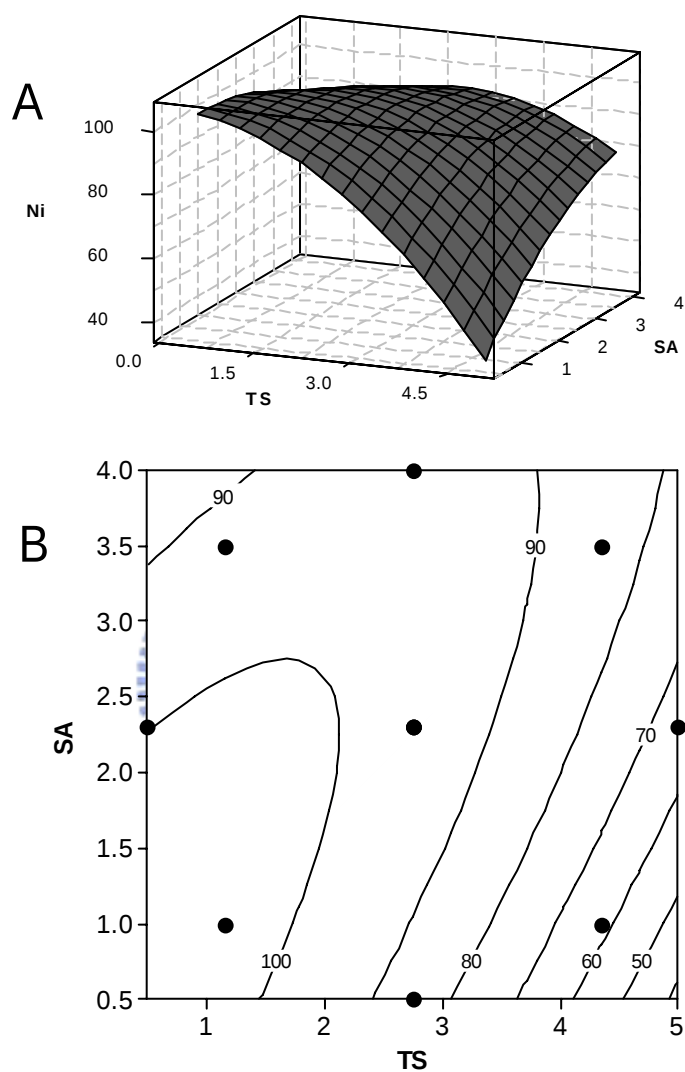


Figure 4-13 生物溶出法中鎳變化情形 (A) Surface plot (B) Contours plot

錳在 Bioleaching 程序中溶出的情形，固體物濃度高低並不會影響錳的溶出結果，但溶出的時間點有明顯的差別，pH 值下降越快，溶出效果越佳。Figure 4-14A 為反應曲面圖，從彎曲的幅度可歸納出固體物濃度對鉻

的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加鎳的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，意味著有機物含量越高將會對鎳的溶出效果影響越大。

Figure 4-14B 為高線圖部份，其為收斂之曲線，這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，只要將固體物濃度控制在 0.5-2.0% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鎳的溶出率即可達到 95% 以上。鎳的最佳溶出率結果如下: TS/S: 0.5/2.3，溶出率為 99.79%；TS/S: 1.16/1.0 和 TS/S: 1.16/3.5，分別為 99.59% 和 92.48%；TS/S: 2.75/2.3，TS/S: 2.75/1.0 和 TS/S: 2.75/4.0，分別為 97.14%、91.42% 和 87.95%；TS/S: 4.34/1.0 和 TS/S: 4.34/3.5，分別為 24.49% 和 83.35%；TS/S: 5.0/2.3，溶出率為 34.26%。只有 2 組並未達到較好的溶出結果，是因為 pH 值並未有效下降至 2.5 左右，所以導致溶出結果不佳。

所以以污泥中重金屬含量較高的銅、鋅和鎳為指標，將固體物濃度控制在 0.5-2.0% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鎳的溶出率即可達到 95% 以上。Table 4-2 為生物溶出法後污泥中重金屬含量，各個重金屬溶出效率除了 TS/S: 5.0/2.3 和 TS/S: 4.34/1.0 這兩組之外，皆有達到良好的去除結果；而 Table 4-3 為各國污泥中重金屬含量法規標準，同樣的在扣除 TS/S: 5.0/2.3 和 TS/S: 4.34/1.0 這兩組之外，其他組數也可符合各國法規標準。

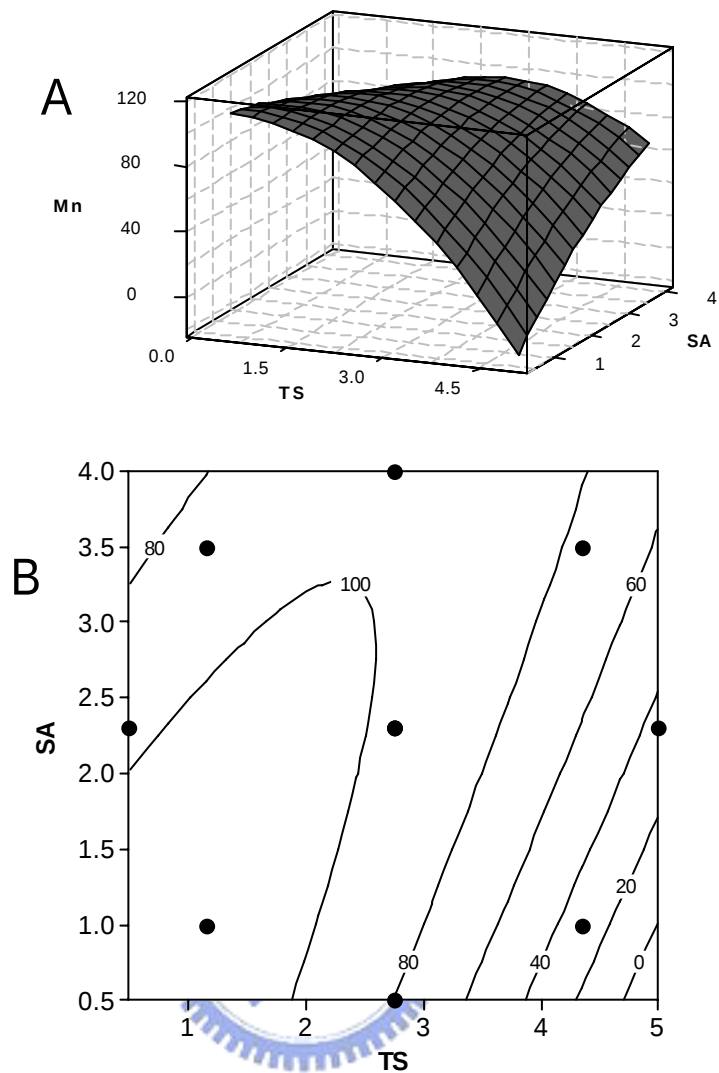


Figure 4-14 生物溶出法中錳變化情形 (A) Mn Solubilization (B) Surface plot

4.4.2 連續萃取試驗

經過生物溶出法後，各個重金屬鍵結情形會有明顯改變，以 Figure 4-15 為例：銅容易與有機物進行鍵結，而原始污泥中含有大量的有機物，但隨著有機物的減少，鍵結在有機物相的重金屬也隨之減少，反而轉向鐵-錳氧化相和碳酸鹽相；由 Figure 4-16 可知鎘與銅有相同的結果；由 Figure 4-17 和 Figure 4-18 可知鉻與鉛在生物溶出反應前是以鐵-錳氧化

相、碳酸鹽相和有機物相為主，但在反應後是以鐵-錳氧化相和碳酸鹽相為主，雖然均是鐵-錳氧化相和碳酸鹽相為主但分配比例卻有明顯改變，但在

Table 4-2 生物溶出法後污泥中重金屬含量

	Cu	Cd	Cr	Pb	Zn	Ni	Mn
Initial	3499	85	104	175	4450	910	2450
TS/S: 0.5/2.3	N.D ^a	N.D ^b	47.5	82.5	N.D ^c	N.D ^d	N.D ^e
TS/S: 1.16/1.0	N.D ^a	N.D ^b	58.5	93.8	N.D ^c	N.D ^d	N.D ^e
TS/S: 2.75/2.3	34	36	67	105.9	210	35	70
TS/S: 2.75/0.5	174	39	66.5	107.5	350	56	210
TS/S: 5.0/2.3	1784	64	90	133	2100	280	1610
TS/S: 1.16/3.5	109	N.D ^b	70.5	92.5	N.D ^c	N.D ^d	184
TS/S: 4.34/1.0	2474	66.5	92	143.5	2570	416	1850
TS/S: 4.34/3.5	839	46	86.91	125.16	397	121.1	1008
TS/S: 2.75/4.0	829	43	79	116	450	110	295
TS/S: 2.75/2.3	34	36	67	105.9	210	35	70
TS/S: 2.75/2.3	34	36	67	105.9	210	35	70

a:<0.005; b:<0.004; c:<0.003; d:<0.01; e:<0.004

Table 4-3 各國污泥中重金屬含量法規標準

	Cu	Cd	Cr	Pb	Zn	Ni	Mn
Canada ^a	600	10	500	300	1750	100	1500
U.S.A ^b	1500	39	1200	300	2800	420	-
Germany ^b	800	10	900	1000	2000	200	-
Holland ^b	75	1.25	75	100	300	38	-
Denmark ^b	1000	0.8	100	120	4000	30	-
Sweden ^b	600	2	100	100	800	50	-
EU ^b	1000	20	-	750	2500	300	-
Brazil ^c	1000	20	1000	750	2500	300	-
South Africa ^d	50	15.7	1750	50.5	353.5	200	-
Australian ^e	140	-	200	150	300	60	-
EPA	400	20	250	2000	1000	200	

^a Benmoussa *et al.* (1997); ^b Sauerbeck (1993); ^c Lara *et al.* (1999); ^d Snyman *et al.* (2000); ^e Xiang *et al.* (2000)

鉻的部分離子交換相卻在反應後明顯增加，為無法理解的部分；由 Figure 4-19 可知鋅在生物溶出反應前是以鐵-錳氧化相和有機物相為主，反應後是以鐵-錳氧化相、碳酸鹽相和有機物相為主；由 Figure 4-20 可知鎳在生物溶出反應前是以鐵-錳氧化相、碳酸鹽相和有機物相為主，反應後是以離子交換相、碳酸鹽相和鐵-錳氧化相為主，由於鎳本身為易溶出在液相當中所以離子交換相量佔多數，也就是說鎳為一不穩定之重金屬；由 Figure 4-21 可知錳在生物溶出反應前是以鐵-錳氧化相和有機物相為主，反應後是以鐵-錳氧化相、碳酸鹽相和錳氧化相為主。所以 pH 值對於連續萃取試驗為一重要因子，由於 pH 值下降速度越快及越低對於有機物去除和重金屬溶出效果皆越佳。污泥中之重金屬釋出難易度：離子交換相 < 碳酸鹽相 < 鐵-錳氧化相 < 殘存相 < 有機物相，故鉻和鉛最穩定，鎳最不穩定。

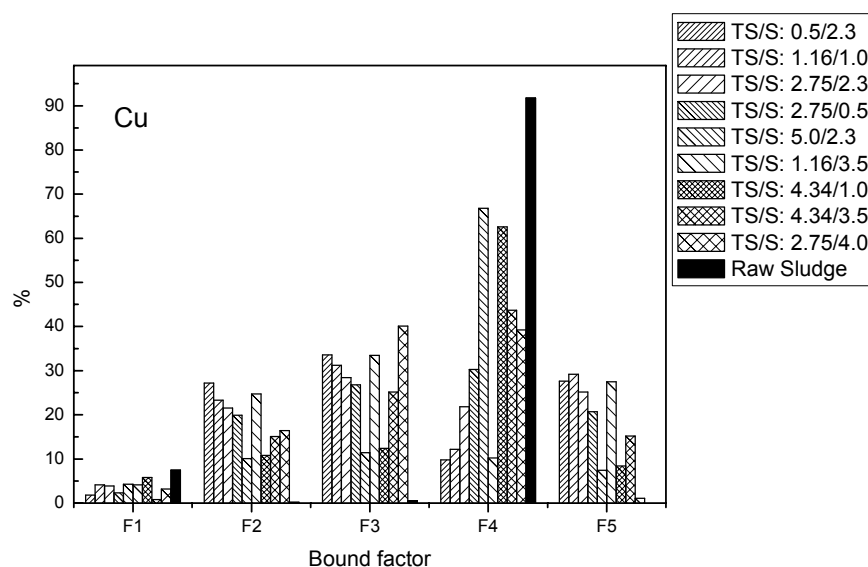


Figure 4-15 連續萃取中銅之鍵結變化情形

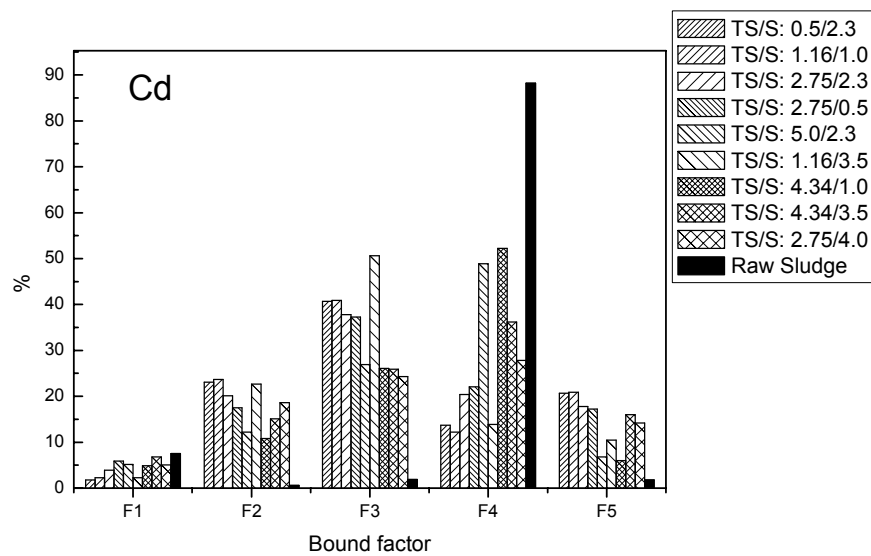


Figure 4-16 連續萃取中鎘之鍵結變化情形

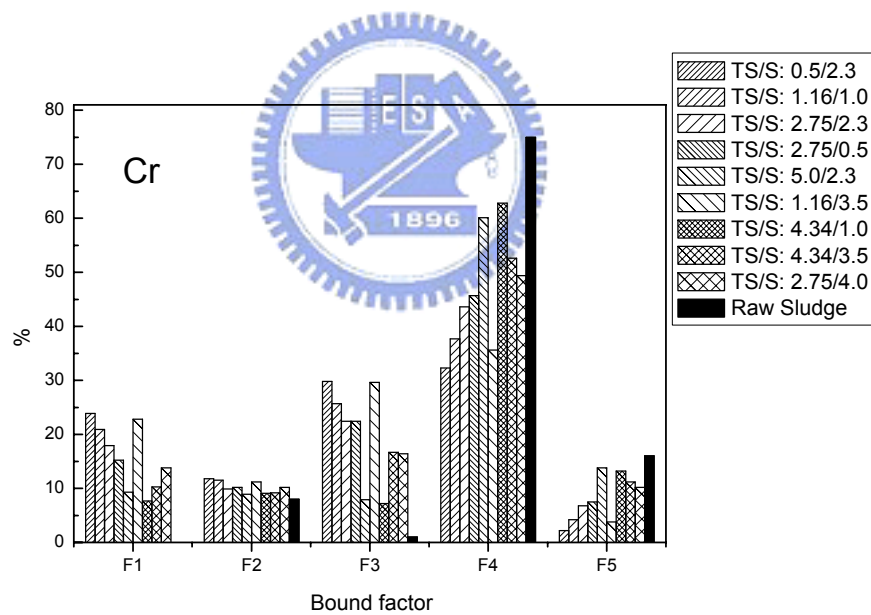


Figure 4-17 連續萃取中鉻之鍵結變化情形

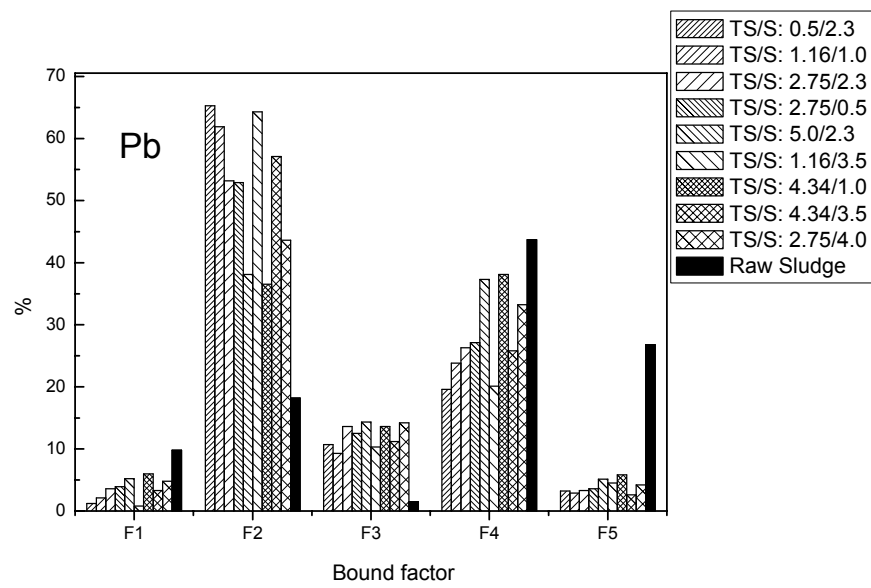


Figure 4-18 連續萃取中鉛之鍵結變化情形

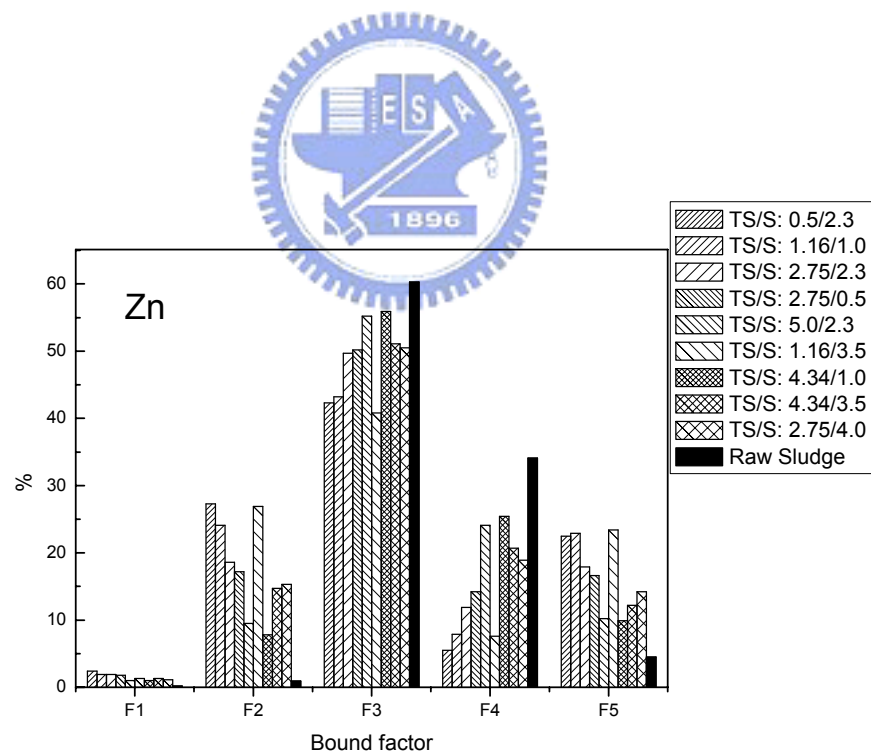


Figure 4-19 連續萃取中鋅之鍵結變化情形

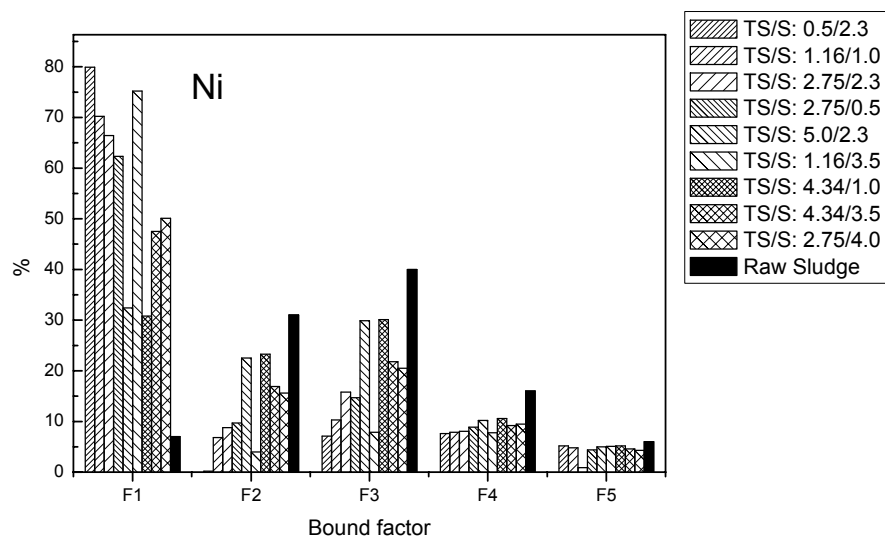


Figure 4-20 連續萃取中鎳之鍵結變化情形

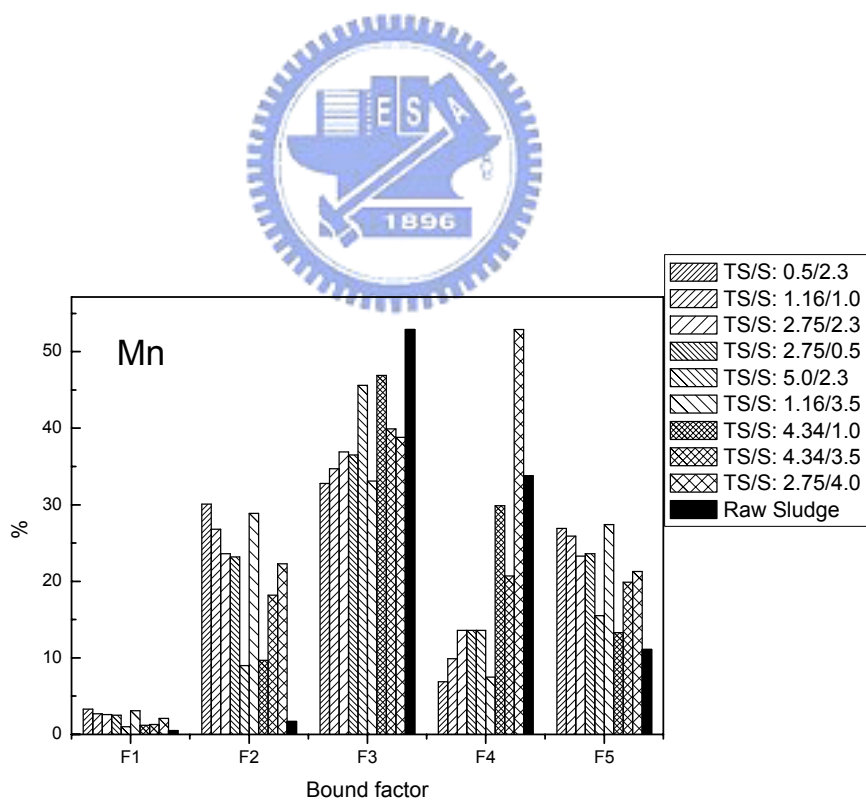


Figure 4-21 連續萃取中錳之鍵結變化情形

F1: exchangeable; F2: bound to carbonate; F3: bound to Fe-Mn-oxides; F4: bound to organics; F5: bound to residue

4.5 EPS 之影響

4.5.1 EPS 萃取試驗

由於微生物在不同的環境條件下產生的細胞體外高分子聚合物，如生物合成、新陳代謝或細胞發生分裂作用時之分解產物 (bioproduct) (Morgan *et al.*, 1989)，而 EPS 被認為在微生物膠羽化及單體附著生物膜過程中扮演一重要角色。在 Figure 4-22 中顯示，EPS 會隨著固體物濃度的增加而增加，而各組在第 10-16 天左右都有一明顯的波峰，也就是說第 10-16 天左右微生物會大量產生 EPS，然而由附錄三中可知重金屬大量溶出，也是在第 10-16 天左右。所以 EPS 的生成會加速硫氧化菌吸附至硫片上的能力，而使得硫氧化菌能在硫片行氧化作用，產生大量的 H^+ 離子，導致 pH 值能快速下降。但在 Figure 4-22 中無法有效歸納出 EPS 對於固體物濃度及硫片添加量之關係。

不過由 Figure 4-23 和 Figure 4-24 可知，當 pH 值約在 4-3 左右時，EPS 產量會迅速增高，其原因可能為溶液中含有大量的重金屬微生物一時無法適應此環境，但為了不使菌體受到破壞，所以大量分泌出胞外聚合物以保持菌體的完整性。在生物溶出法中主要是以微嗜酸菌及嗜酸菌為來進行作用，在反應初期以微嗜酸菌為主，但在此階段 pH 值較高（約 8-5 左右），較利於其他微生物生長，所以 EPS 在初期會有明顯的上升趨勢；然而當 pH 值下降至 4 以下時，變為以嗜酸菌為來進行反應，而此階段

pH 值較低（約 2-4 左右），不較利於其他微生物生長，所以 EPS 會有明顯的下降趨勢。故可知 pH 除了對重金屬有一定的影響之外，對於 EPS 的產生也會有相當作用。（各 pH 與 EPS 之反應曲面及等高線圖-----附錄四）

4.5.2 蛋白質試驗

由 Figure 2-3 可知 EPS 有一重要的機制就是酵素作用，硫氧化菌藉由 EPS 的產生可對硫片進行氧化作用，加速酸化反應，而 EPS 內的 Charge transport 與蛋白質有一定的關聯 (Abdelali *et al.*, 2002)，藉由蛋白質的提升，氧化能力也會增加；以及不同醣類和蛋白質的比例會決定 EPS 的組成型態 (鄭幸雄，第十八屆廢水處理技術研討會論文集)。Figure 4-25 中顯示，同樣地如同 EPS 的生成量一樣，在第 10-14 天左右有一明顯的波峰，也就是在微生物無法適應環境突變時，大量分泌胞外聚合物以保持菌體的完整性，故此時的 EPS 為黏膜型態主要為保護菌體主；同時蛋白質量越高代表酵素能力越高，此時便可有效加速硫氧化菌對硫片產生氧化作用，造成酸化速度加快，使 pH 值快速下降重金屬大量溶出，故由以上可知 EPS 的產生對於生物溶出程序為一重要因子。

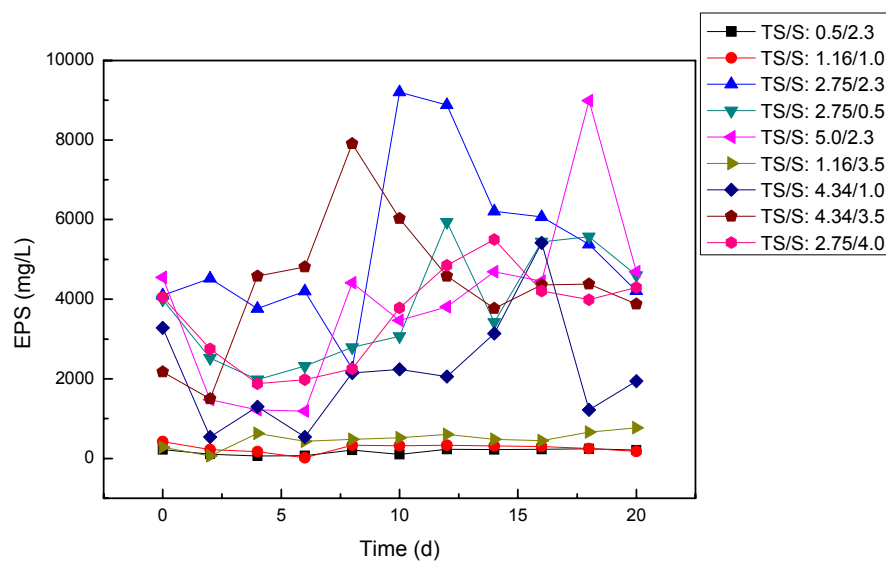


Figure 4-22 生物溶出法中 EPS 變化情形

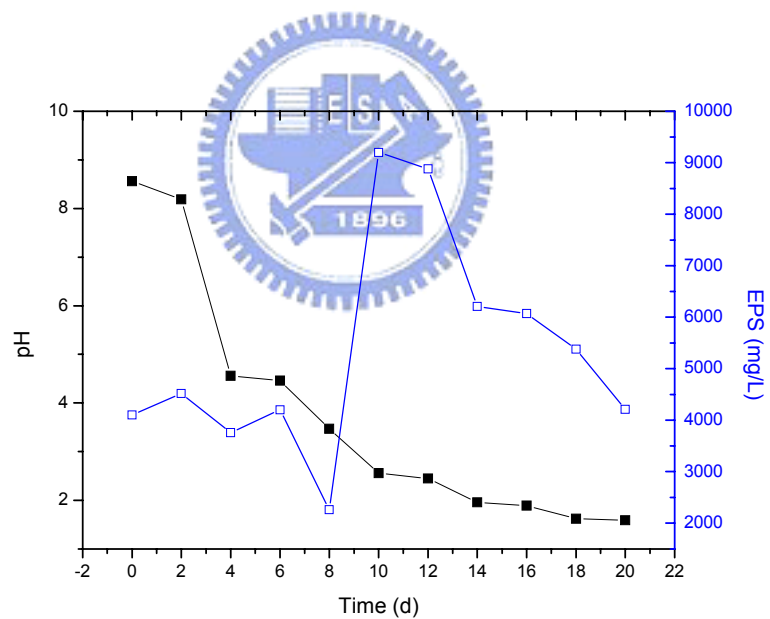


Figure 4-23 生物溶出法中 EPS 與 pH 之變化情形 (TS/S: 2.75/2.3)

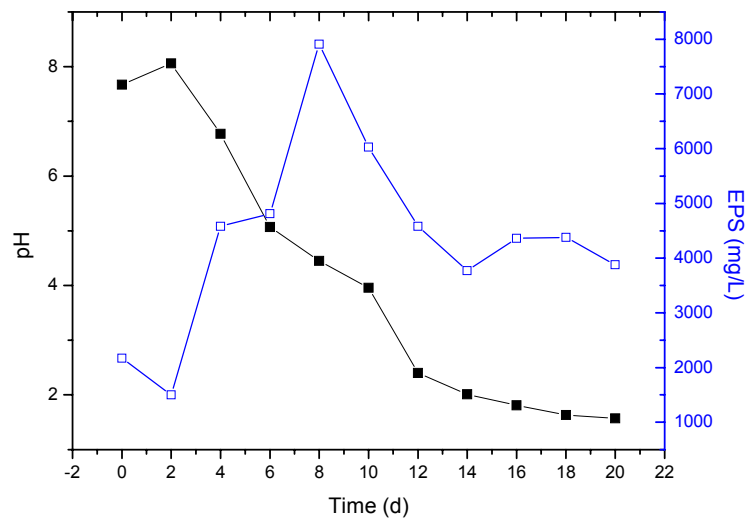


Figure 4-24 生物溶出法中 EPS 與 pH 之變化情形 (TS/S: 4.34/3.5)

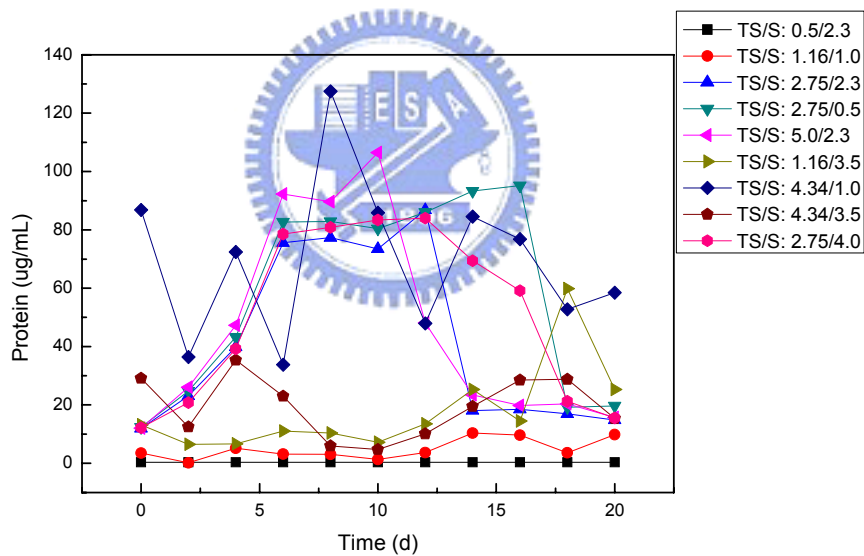


Figure 4-25 生物溶出法中蛋白質變化情形

4.5.3 胞外聚合物之功用 (影響)

由於 EPS 主要有三大重要機制，包括：保護、吸附及酵素作用，所以將萃取過後的 EPS 加入原始污泥中（不添加硫片及植種量），觀看 EPS

在此種條件下，以哪一種機制為主。在 Table 4-4 中並無發現有明顯的規則，即使添加較多量的 EPS 在 20 天後萃取出的量並無明顯的增加；Table 4-5 亦無法有效判斷加入 EPS 後重金屬溶出結果是受到 EPS 之影響；而 Figure 4-26 中顯示，其在不同條件下 EC 值得變化情形，發現雖然各組的 EC 值均會隨著時間的增加而增加，但主要的原因應該是污泥中原有的硫化物代謝成硫酸根離子，使得溶液中的 EC 值上升，但當硫化物消耗完後便不在產生硫酸根離子，亦無法辨別是以哪一種機制所存在。故 EPS 必須在某些特定條件下，才能產生胞外聚合物。

4.6 精密儀器分析 (AFM/SEM)

4.6.1 Atomic Force Microscopy (AFM)

Figure 4-27 為利用原子力顯微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) 觀察硫顆粒表面的情形中顯示，圖 A 為沒經過 bioleaching 反應的硫顆粒表面，其表面較平坦；圖 B、C、D 為經過 bioleaching 反應後的硫顆粒表面，其顆粒表面上出現數個亮點且略為粗造，推測可能為硫氧化菌吸附在硫顆粒上的位置且在該位置上發生氧化還原反應，所以藉由 EPS 的產生可有效使硫氧化菌吸附至疏水性的硫顆粒表面，逕而使硫氧化菌與硫顆粒發生反應，形成酸化作用。故由 AFM 分析顯示出 EPS 具有吸附及酵素作用的機制。

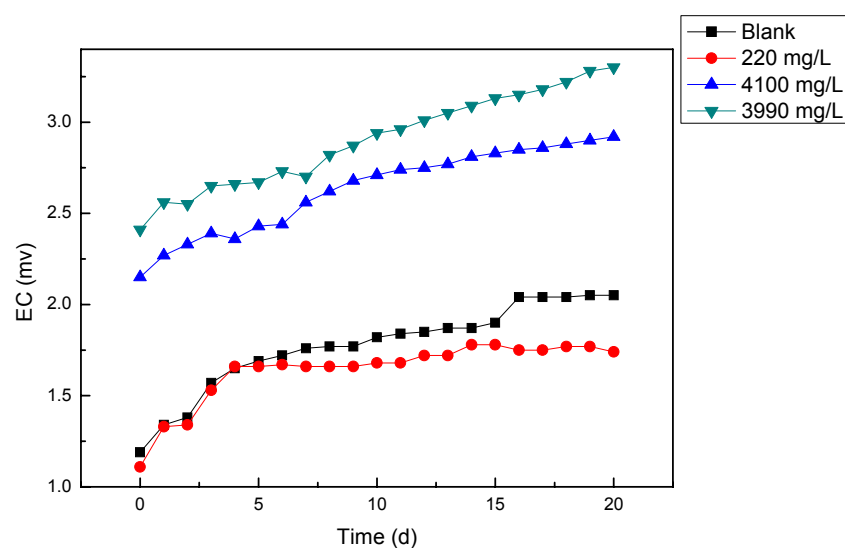


Figure 4-26 EPS 變化情形

Table 4-4 添加不同 EPS 量後萃取變化情形

	乾燥前 (g)	乾燥後(g)	mg/L	
E-1	21.7899	21.7911	0.0012	120
E-2	21.7975	21.7988	0.0013	130
E-3	21.9060	21.9080	0.0020	200
E-4	21.1201	21.1219	0.0018	180

Table 4-5 添加不同 EPS 量後重金屬溶出情形

	Cu (mg/L)	Cd (mg/L)	Cr (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)	Ni (mg/L)	Mn (mg/L)
E-1	6.55	0.00	0.00	0.00	12.25	30.33	10.12
E-2	6.42	0.01	0.00	0.01	12.20	29.75	10.24
E-3	6.66	0.01	0.02	0.00	12.45	30.30	10.25
E-4	6.63	0.01	0.01	0.01	12.33	30.45	10.30

E-1: 原始污泥； E-2: 原始污泥+220 mg/L； E-3: 原始污泥+4100 mg/L； E-4: 原始污泥+3990 mg/L

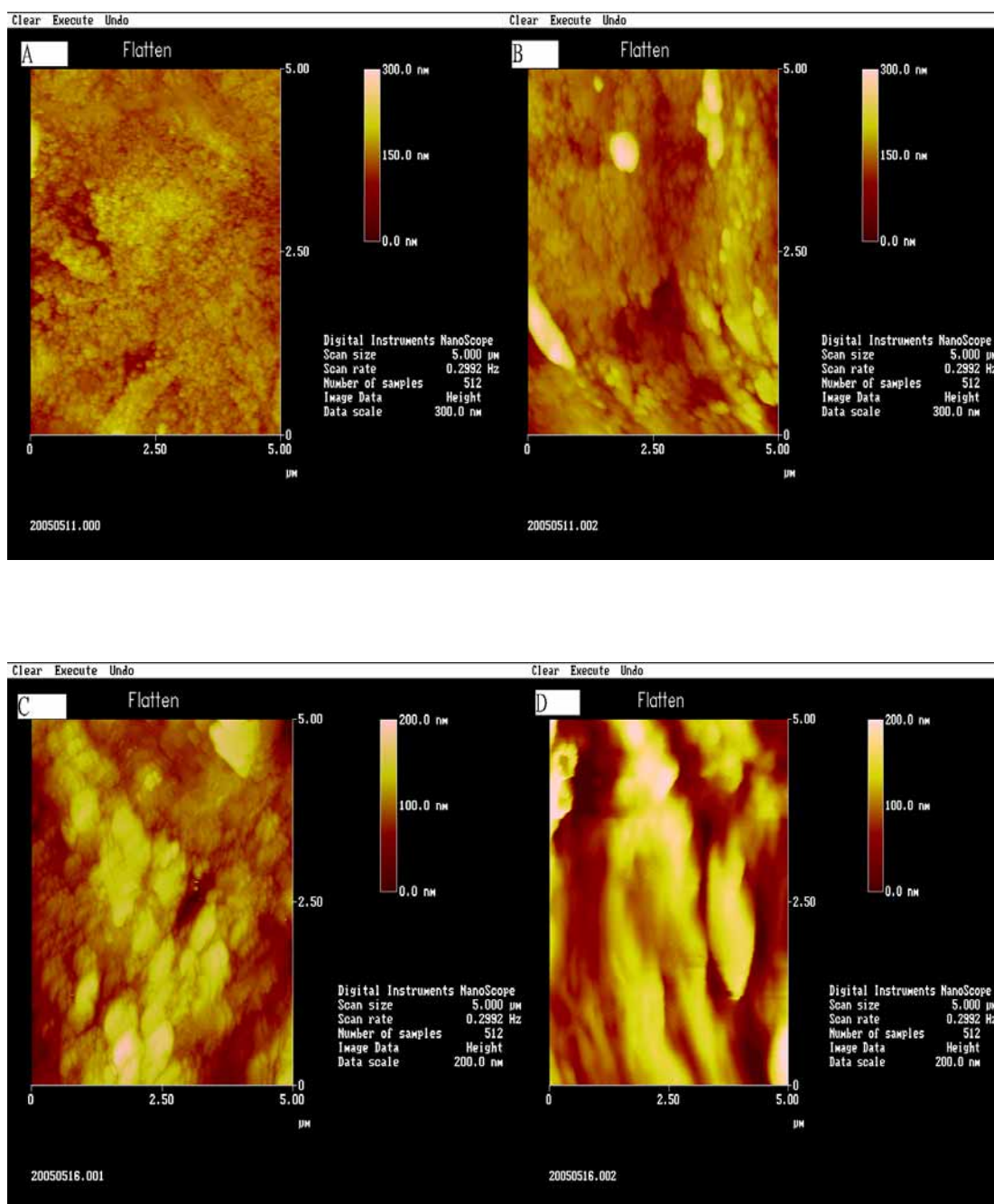


Figure 4-27 利用 AFM 觀察片狀硫上的表面情形

4.6.2 Scanning Electron Microscope (SEM)

Figure 4-28 為 SEM 觀察反應前片狀硫上的表面情形，由於利用不鏽鋼模板所製成的硫片如：Figure 3-3 可知其表面可分為較粗糙和較平滑面，利用 SEM 顯像後其晶格結構會有明顯不同，較粗糙面其晶格結構較

大，反之較平滑面其晶格結構較小。Figure 4-29 為反應前片狀硫的斷面情形，在圖中其晶格組成趨勢以不規則方向所形成，如同片狀硫的表面情形一樣。

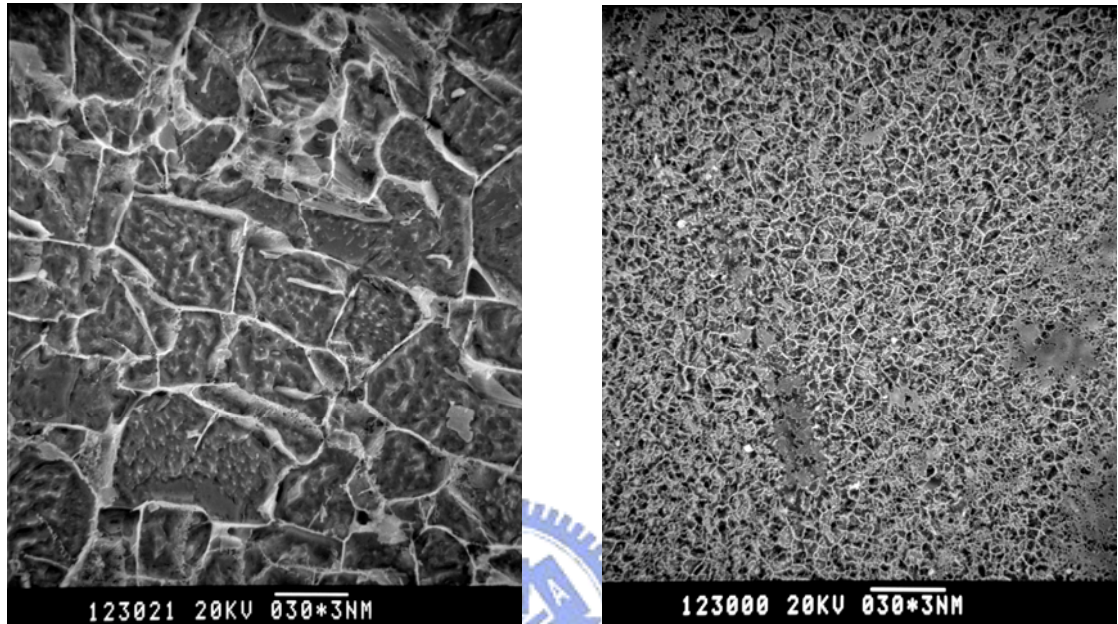


Figure 4-28 利用 SEM 觀察反應前片狀硫上的表面情形

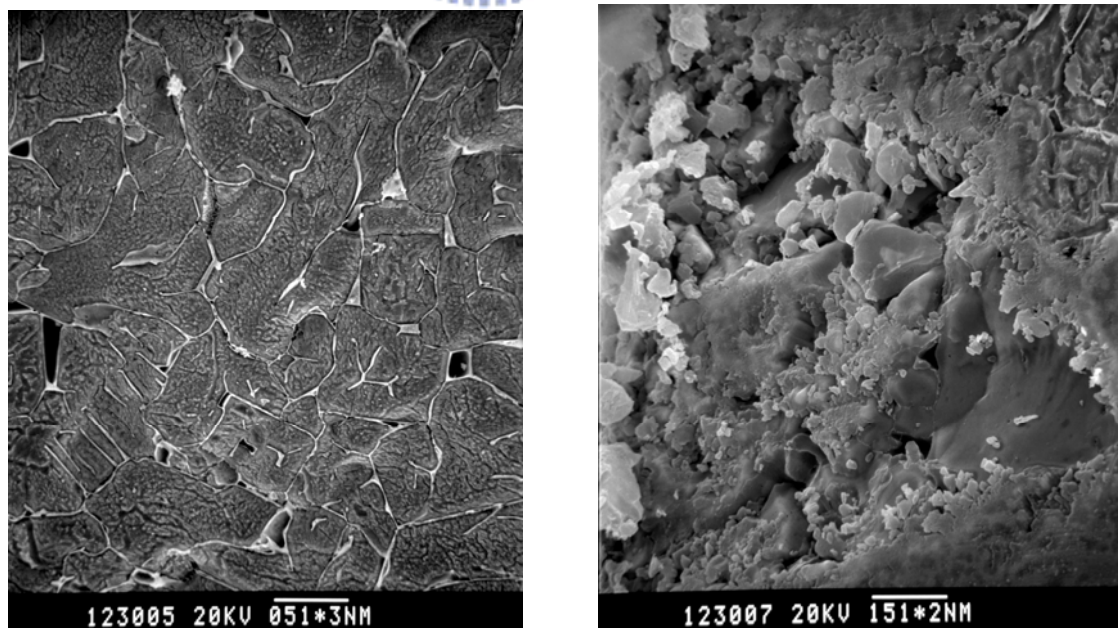


Figure 4-29 利用 SEM 觀察反應前片狀硫的斷面情形

Figure 4-30 為反應後片狀硫上的表面情形，相較於 Figure 4-28 可知其表面粗造度及破碎情形亦有明顯增加，其原因為硫氧化菌在硫片表面進行氧化還原反應，導致硫片表面粗造度提高。

Figure 4-31 為反應後片狀硫上的斷面情形，由圖中可硫氧化菌不僅只有針對表面反應，甚至反應至硫片內部；而其晶格分部趨勢成一致性，推斷其方向為硫氧化菌反應所導致而成的，順著其方向硫氧化菌可有效到達硫片內部進行氧化還原作用。在圖中亦可發現硫片表面經硫氧化菌吸附過後，其表面會有一明顯的坑洞，故藉由 EPS 的生成可有效加速硫氧化菌吸附到硫片的能力，並提高產酸速率。

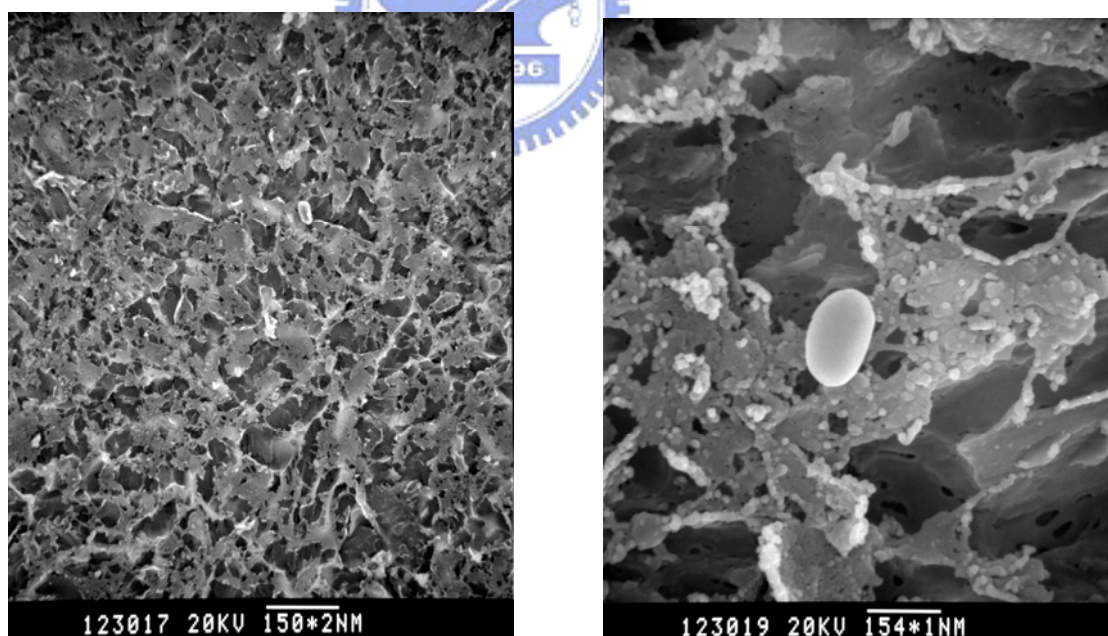


Figure 4-30 利用 SEM 觀察反應後片狀硫上的表面情形

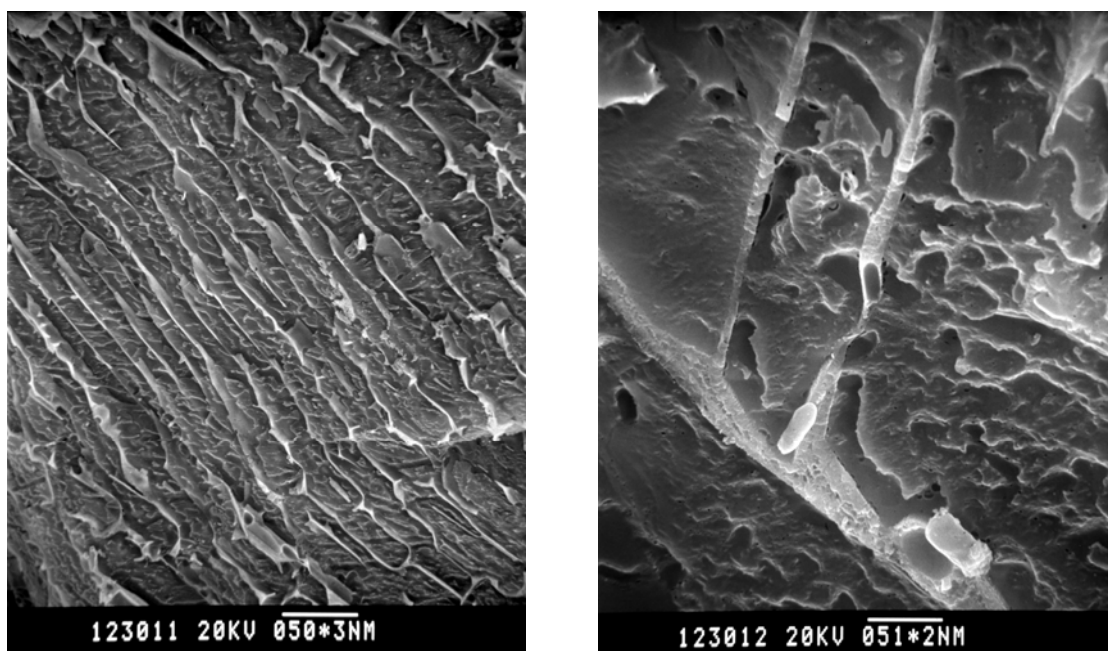


Figure 4-31 利用 SEM 觀察反應後片狀硫上的斷面情形

4.7 統計分析結果

4.7.1 中央合成設計結果



在本階段的實驗中，考慮固體物濃度及硫片添加量兩項操作參數，以實驗設計的 CCD 搭配 RSM 的方法，來評估此兩項參數對反應變數重金屬溶出率。以銅的溶出效率作為代表，按照統計軟體 Minitab 所排列的實驗組數及實驗結果如 Table 4-6 所列，數據經統計軟體 Minitab 分析後，銅溶出率之反應曲面及等高線圖分別如 Figure 4-32、Figure 4-33 所示。反應曲面圖的部分由圖形彎曲的趨勢，可以看出皆有最大值的存在，而從彎曲的幅度歸納出固體物濃度對銅的溶出率影響較大，隨著固體物濃度增加也就是有機物含量的增加，銅的溶出率比低固體物濃度時的溶出效果來的差，暗示有機物含量越高將會對銅的溶出效果影響越大。Figure 4-33 為

等高線圖部分值得一提的是皆為收斂之曲線，這也意謂著由等高線圖即可找出最適之操作範圍，若以銅的溶出率為評估指標時，只要將固體物濃度控制在 0.5-1.5% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，銅的溶出率即可達到 95% 以上。

Table 4-6 中央合成設計因子與對應反應參數表

Std Order	Code Value		Sludge conc. (%)	Addition of Sulfur (%)	Cu solubilization (%)
	X1	X2			
4	1	1	4.34	3.50	76.0217
6	1.414	0	5.00	2.30	34.8099
9	0	0	2.75	2.30	94.8842
11	0	0	2.75	2.30	94.8842
1	-1	-1	1.16	1.00	95.7416
8	0	1.414	2.75	4.00	76.3075
5	-1.414	0	0.50	2.30	98.8854
7	0	-1.414	2.75	0.50	80.7373
3	-1	1	1.16	3.50	96.8848
10	0	0	2.75	2.30	94.8842
2	1	-1	4.34	1.00	29.2940

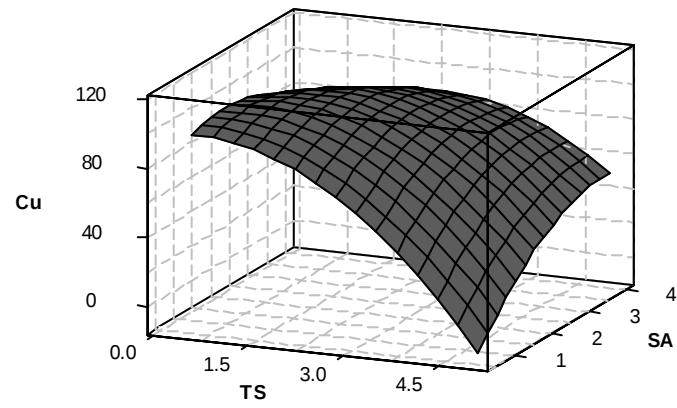


Figure 4-32 銅溶出率之反應曲面圖

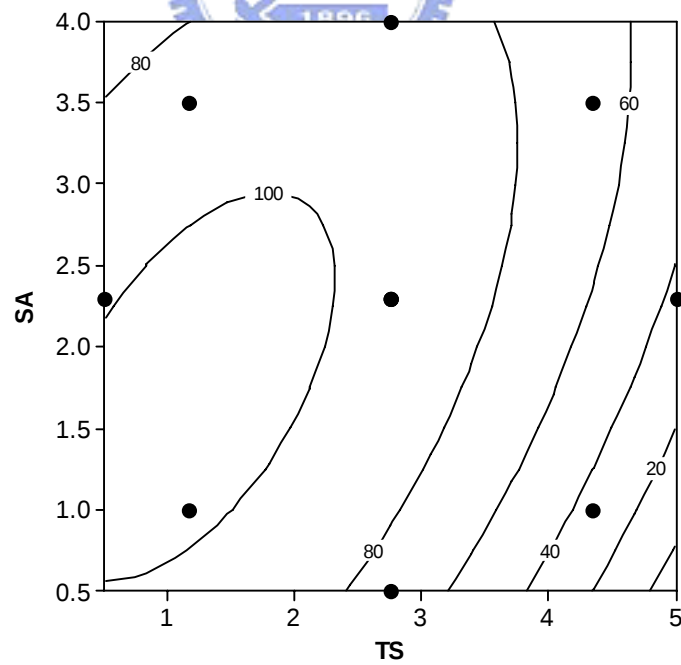


Figure 4-33 銅溶出率之等高線圖

EPS 產率之反應曲面及等高線圖分別如 Figure 4-34 和 Figure 4-35 所示，而從彎曲的幅度歸納出固體物濃度對 EPS 的產生量影響較大，隨著固體物濃度增加也就是有機物含量的增加，微生物會因一時不適應抑制濃度環境之突變而分泌較多之 EPS 於細胞外，暗示有機物含量越高將會對 EPS 的溶出效果影響越大。Figure 4-35 可知只要將固體物濃度高達 3.0-4.5% 且硫片添加量在 1.5-4.0% 之間時，EPS 的產率即可達到 4000 mg/L 以上。

但由 Figure 4-32 與 Figure 4-34 可知重金屬溶出效率和 EPS 產率為完全相反的趨勢，也就是重金屬溶出效率越佳 EPS 產率反而越低，其原因為：當重金屬溶出效率越佳時，反應溶液中含有大量的重金屬及硫酸根離子，導致濃度環境之突變，微生物會大量分泌胞外聚合物，保持菌體的完整性並且使的微生物可以生長在此環境條件之下。

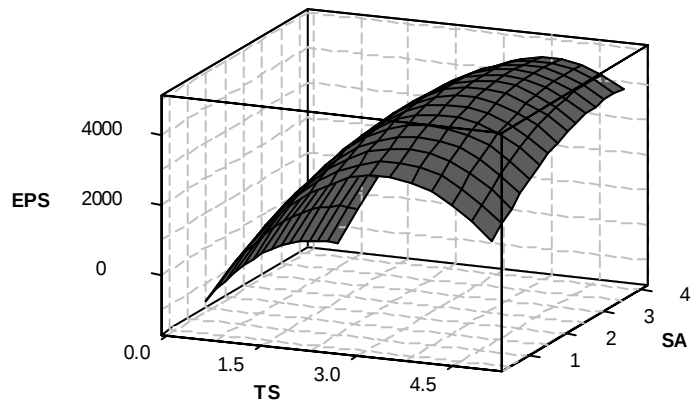


Figure 4-34 EPS 之反應曲面圖

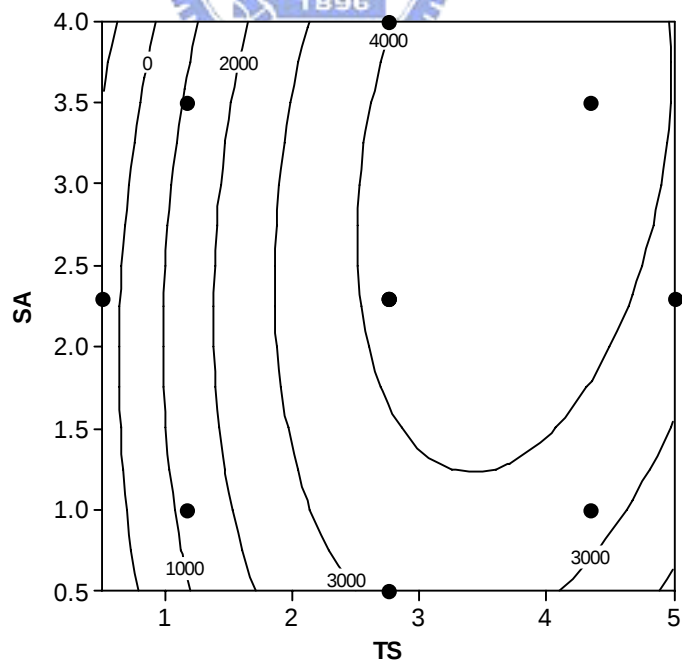


Figure 4-35 EPS 之等高線圖

4.7.2 配適二階模型之設計

銅溶出率之變異數分析結果如 Table 4-7 和 Table 4-8 所示，利用 P-value 來判斷其顯著性，P-value 為導致棄卻虛無假設的最小顯著水準，當 α 為 0.05 時定義 P 值小於 0.05 為顯著性影響因子。因為兩者一次及二次項的 P 值皆很大 (>0.05)，其可能原因為有許多的非顯著性影響因子，導致一次及二次項的 P 值皆很大，故可預測銅溶出率實驗結果並不適合配適一二階反應曲面。而從迴歸係數 Table 4-7 和 Table 4-8 中可歸納出，銅溶出率的 R^2 為 93.9% 而修正後的 R^2 只有 87.9%，這通常是由於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則必須保留組成高階項的所有低階項)，致使無法將非顯著因子刪除，得到更佳的 R^2 值。不過銅溶出率 R^2 值皆在 85% 以上，這亦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分別如 (4-1) 式所示。

$$Y_1 = 94.128 + 2.347X_1 + 10.682X_2 - 5.336X_1^2 - 4.937X_2^2 + 5.721X_1X_2 \text{-----}(4-1)$$

X_1 : 固體物濃度 % (TS)

X_2 : 硫片添加量 % (SA)

Y₁: Cu 溶出率 %

Table 4-7 銅溶出率之變異數分析

Source	DF	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F	P
Regression	5	5818.38	5818.38	1163.675	15.52	0.005
Linear	2	485.49	485.49	28.675	0.38	0.701
Square	2	1115.29	1115.29	557.645	7.44	0.032
Interaction	1	517.59	517.59	517.590	6.90	0.479
Residual Error	5	375.00	375.00	75.000		
Lack-of-Fit	3	375.00	375.00	125.000		
Pure Error	2	0.00	0.00	0.00		
Total	10	6193.38				

Table 4-8 迴歸係數預測銅溶出率之結果

Term	Coef.	SE Coef.	T	P
Constant	94.128	21.179	4.444	0.007
TS	2.347	9.530	0.246	0.815
SA	10.682	12.436	0.859	0.430
TS*TS	-5.336	1.438	-3.710	0.014
SA*SA	-4.937	2.371	-2.082	0.092
TS*SA	5.721	2.178	2.627	0.047
S= 8.660		R-Sq= 93.9%		R-Sq (adj) = 87.9%

4.7.3 模型適當性與常態性假設檢驗

如果模型正確且如果所有的假定都滿足，則殘差應該是無結構的，特別的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 4-36 所示，銅溶出率圖中並

沒有不尋常的結構出現 (如像漏斗型), 表示模型為正確且滿足所有的假定。

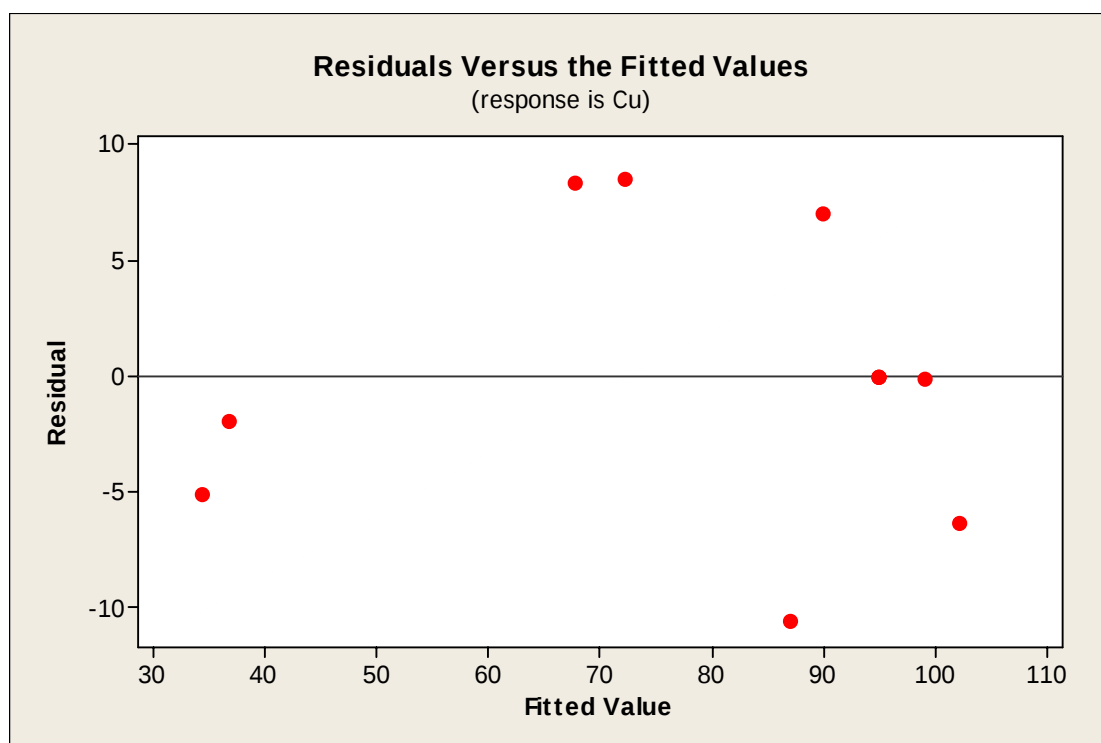


Figure 4-36 銅溶出率之殘差對配適值的圖形

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向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 4-37 和所示，是一種非常有用的方法，結果顯示兩圖形皆成一條線，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。

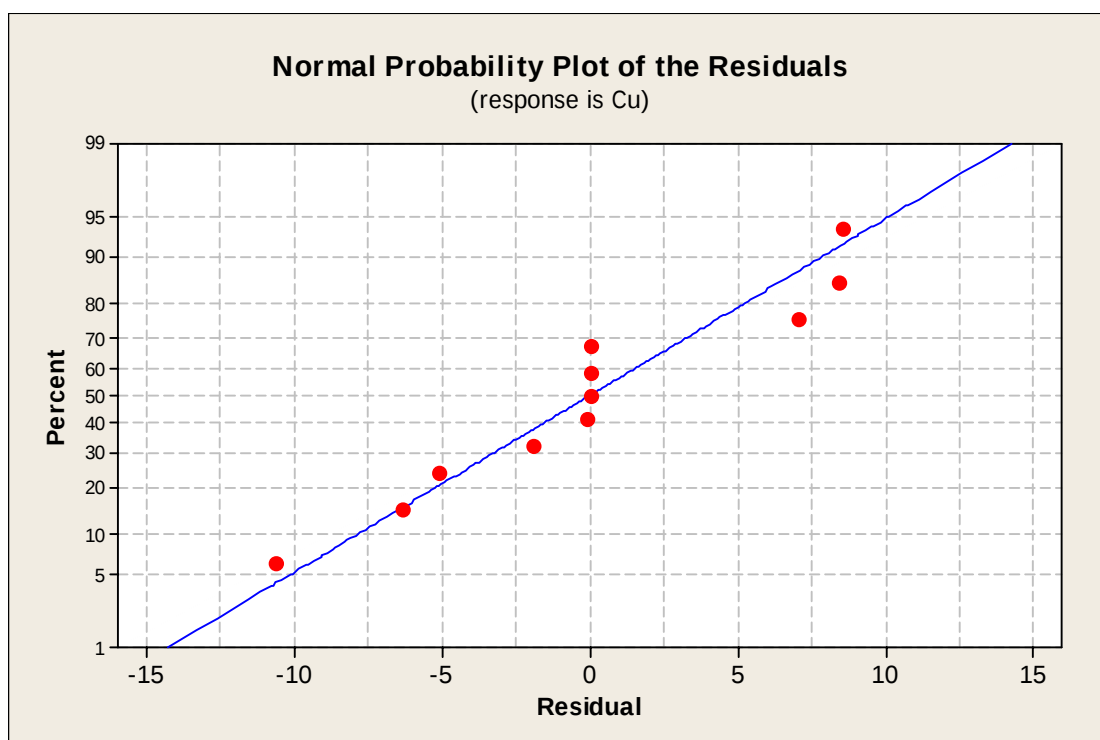


Figure 4-37 銅溶出率之殘差對配適值圖



4.8 菌種鑑定及菌數估計

4.8.1 生物溶出法液相中菌相變化

本研究以 DAPI 染色，將所觀察到之螢光反應，當作總菌數的代表（作為 100%），再以 probe Thio 820 和 Thiopa 0511 染色，而 Thio 820 代表作為 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 的數量，以 Thiopa 0511 代表作為 *T. thioparus* 的數量。Table 4-9 及 Figure 4-38 代表液相中 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比，可看到 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 所佔的百分比隨著時間的增加而增加，表示硫氧化菌 (*T. Thiooxidans*) 及鐵硫氧化菌 (*T. ferrooxidans*) 在生物溶出法中會隨著時間的增加會成為優勢菌

種，表示在生物溶出過程中卻實為這些菌種在進行代謝作用。Figure 4-39 為 Thio 820 之反應曲面圖，其彎曲的程度受固體物濃度影響較大，主要是因為固體物濃度越高，造成微生物的遲滯期時間增加，降低微生物的活性 (Chen and Lin, 2000)；在圖中發現 Thio 820 的百分比會隨著硫片量的增加而增加，所以硫片添加量對於微生物生長也有一定之影響。故控制固體物濃度在 1.0-2.0% 左右，及硫片添加量在 1.5-2.5% 左右，其 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 的數量會達到最多。(FISH 原始數據 -----附錄六)

Table 4-9 液相中 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比

Time (d)	DAPI 189	Thio820	Thiopa 0511
0	100%	1.3%	7.1%
2	100%	3.7%	6.3%
4	100%	4.8%	4.9%
6	100%	7.9%	4.1%
8	100%	4.9%	3.6%
10	100%	10.3%	1.3%
12	100%	14.9%	2.1%
14	100%	8.5%	2.6%
16	100%	17.1%	1.7%
18	100%	21.7%	1.5%
20	100%	23.5%	1.3%

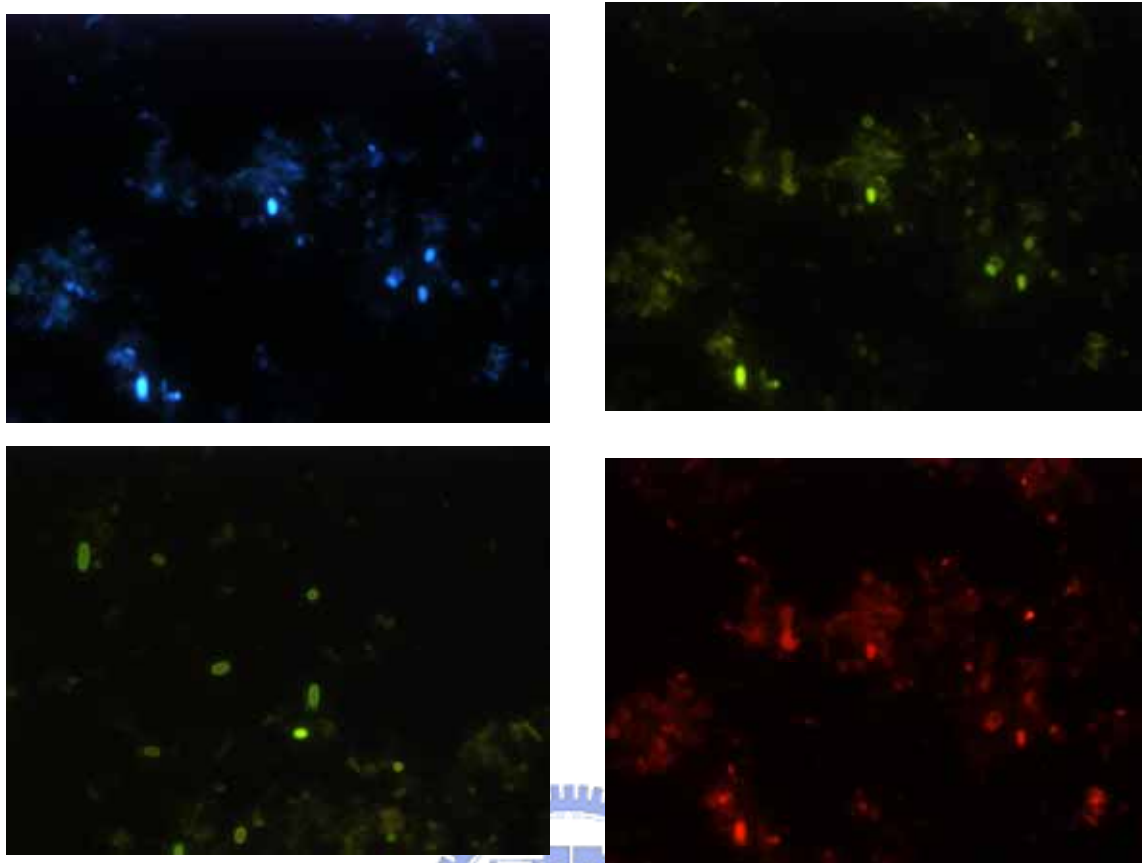


Figure 4-38 DAPI/ Thio 082/Thiopa 511 /EUB338 (液相)

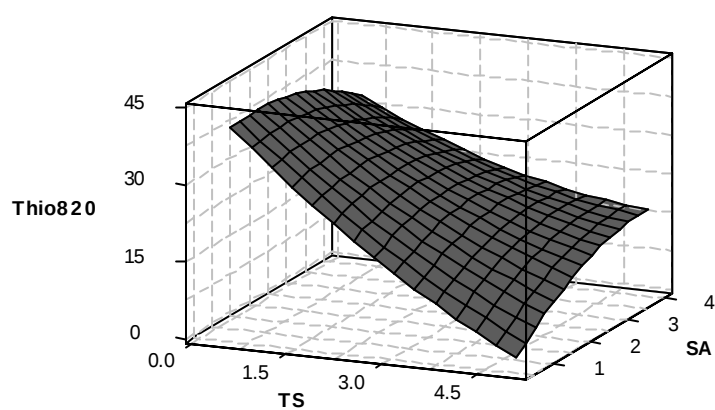


Figure 4-39 Thio 820 之反應曲面圖

由 Figure 4-40 可知，在 Bioleaching process 中對 pH 值的變化，可見到 *T. thioparus* (Thiopa 0511 所染色的菌體) 隨著 pH 值得降低，而所佔的百分比漸漸減少，也證明 bioleaching 前段的酸化作用為此株菌所造成，當 pH 值降到 4 以下時，*T. thioparus* 所佔的百分比降至 2% 以下；而 *T. Thiooxidans* 和 *T. ferrooxidans* 所佔的百分比卻漸漸增加，證明 bioleaching 後段酸化作用為此兩株菌所造成的，並且成為優勢菌種。可見在第 6-8 天時為菌種變化期間，優勢菌由 *T. thioparus* 轉換為 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 這兩株菌，前段微嗜酸條件下以 *T. thioparus* 為主，主要使 pH 下降至 4-5 左右，接著由 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 這兩株菌為主，負責使 pH 下降至 2 以下，所以此時的環境以不適合 *T. thiopars* 生長，所以所佔的百分比大幅下降。

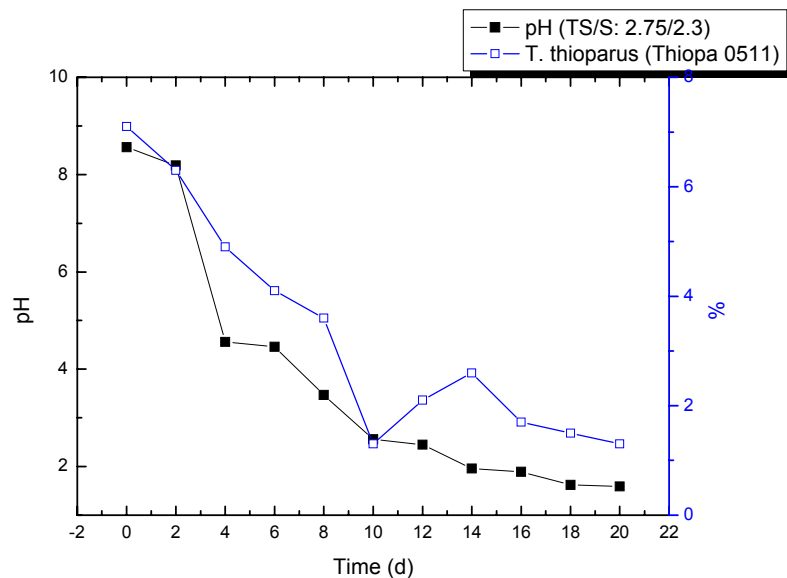


Figure 4-40 pH/*T. thiopars* (Thiopa0511)

4.8.2 生物溶出法硫片上之菌相變化

Table 4-10 及 Figure 41 代表硫片上 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比，可看到如同液相中一樣 *T. Thiooxidans* 及 *T. ferrooxidans* 所佔的百分比隨著時間的增加而增加，表示硫氧化菌 (*T. Thiooxidans*) 及鐵硫氧化菌 (*T. ferrooxidans*) 在生物溶出法中會隨著時間的增加會成為優勢菌種，表示在生物溶出過程中卻實為這些菌種在進行代謝作用。由 Table 4-11 及 Table 4-12 可知，硫片上的總菌數比液相中的總菌數來的少，其主要原因為：硫片為一疏水性表面且帶電中性，所以不容易讓微生物吸附表面上，只能藉由凡德瓦力或液體的對流力，讓微生物吸附在其表面上，所以微生物吸附至硫片上的能力相較吸附至其他載體來的困難 (Genhrke *et al.*, 1998)。



Table 4-10 固相中 TS/S: 2.75/2.3 的變化百分比

Time (d)	DAPI	Thio820	Thiopa 0511
0	100%	3.1%	8.0%
2	100%	3.7%	6.2%
4	100%	4.8%	6.2%
6	100%	7.9%	4.5%
8	100%	4.9%	9.8%
10	100%	10.3%	8.5%
12	100%	4.9%	5.9%
14	100%	8.5%	4.1%
16	100%	13.1%	4.5%
18	100%	13.7%	2.3%
20	100%	13.5%	2.6%

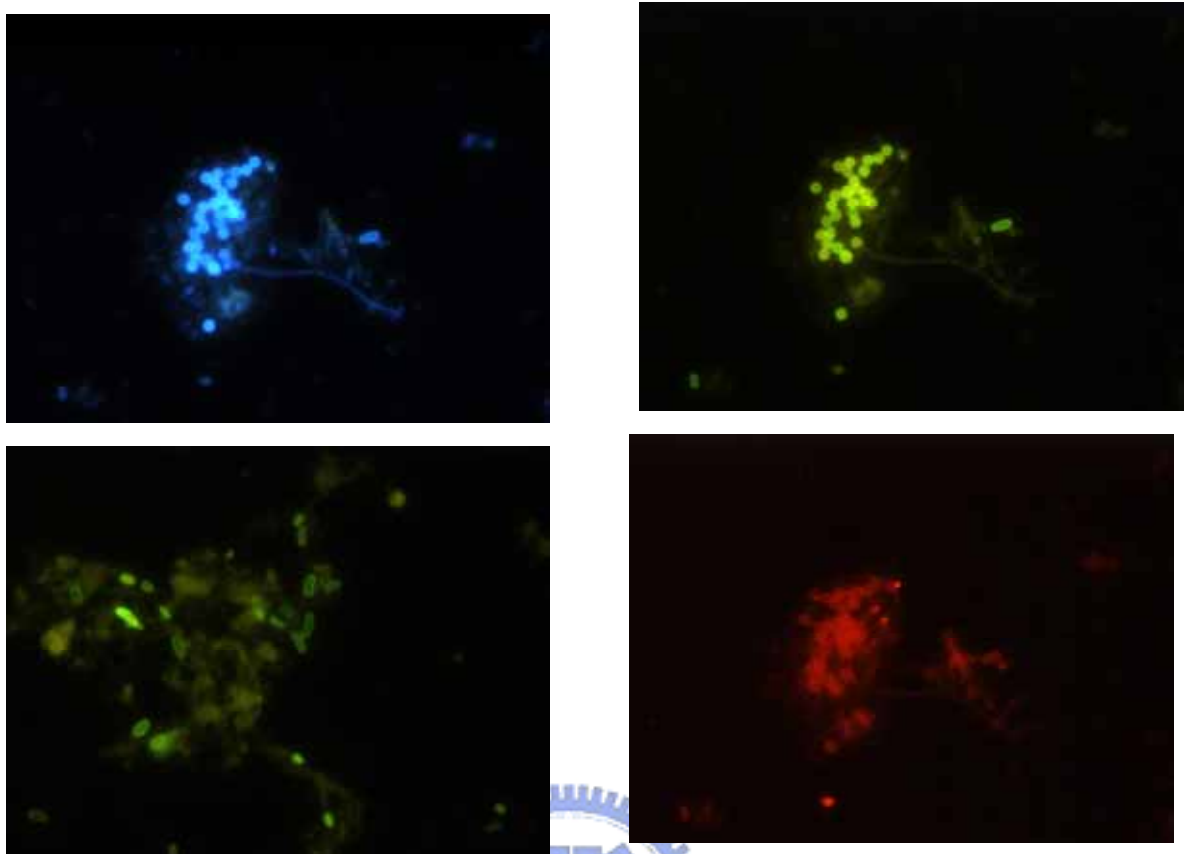


Figure 4-41 DAPI/ Thio 082/Thiopa 511/EUB 332 (固相)

Table 4-11 為實驗的組數對照表，分別列出 11 組不同的的操作條件，T 代表為：固體物濃度；S 代表為：硫片添加量，並於每兩天估計其菌數。

Table 4-11 實驗組數對照表

1	TS/S: 0.5/2.3	7	TS/S: 4.34/1.0
2	TS/S: 1.16/1.0	8	TS/S: 4.34/3.5
3	TS/S: 2.75/2.3	9	TS/S: 2.75/4.0
4	TS/S: 2.75/0.5	10	TS/S: 2.75/2.3
5	TS/S: 5.0/2.3	11	TS/S: 2.75/2.3
6	TS/S: 1.16/3.5		

Table 4-12 液相之總菌數 (cell/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
第 0 天	2.1E+09	4.01E+09	3.92E+10	3.81E+10	4.35E+10	2.68E+09	3.13E+10	2.07E+10	3.87E+10	3.87E+10	3.97E+10
第 2 天	1.05E+09	2.1E+09	4.32E+10	2.41E+10	1.41E+10	5.73E+08	5.16E+09	1.43E+10	2.63E+10	4.25E+10	4.54E+10
第 4 天	5.73E+08	1.62E+09	3.59E+10	1.89E+10	1.17E+10	6.02E+09	1.24E+10	4.38E+10	1.8E+10	3.49E+10	3.51E+10
第 6 天	6.69E+08	1.91E+08	4.01E+10	2.22E+10	1.14E+10	4.11E+09	5.16E+09	4.6E+10	1.89E+10	3.01E+10	3.97E+10
第 8 天	2.01E+09	3.15E+09	2.16E+10	2.67E+10	4.21E+10	4.59E+09	2.05E+10	7.56E+10	2.15E+10	2.46E+10	2.15E+10
第 10 天	9.55E+08	3.06E+09	8.79E+10	2.93E+10	3.32E+10	4.97E+09	2.14E+10	5.76E+10	3.61E+10	8.74E+10	8.84E+10
第 12 天	2.2E+09	3.15E+09	8.48E+10	5.68E+10	3.64E+10	5.73E+09	1.97E+10	4.38E+10	4.63E+10	8.55E+10	8.36E+10
第 14 天	2.1E+09	2.96E+09	5.93E+10	3.27E+10	4.48E+10	4.59E+09	3E+10	3.6E+10	5.26E+10	6.28E+10	6.16E+10
第 16 天	2.2E+09	2.87E+09	5.8E+10	5.2E+10	4.25E+10	4.3E+09	5.18E+10	4.17E+10	4.02E+10	5.88E+10	5.68E+10
第 18 天	2.29E+09	2.39E+09	5.14E+10	5.32E+10	8.59E+10	6.31E+09	1.17E+10	4.18E+10	3.81E+10	5.02E+10	5.29E+10
第 20 天	2.01E+09	1.72E+09	4.02E+10	4.4E+10	4.48E+10	7.36E+09	1.85E+10	3.71E+10	4.11E+10	4.13E+10	4.06E+10

Table 4-13 固相之總菌數 (cell/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
第 0 天	1.58E+08	2.79E+08	1.47E+09	1.43E+09	1.63E+09	2.01E+08	1.17E+09	7.74E+08	1.45E+09	1.45E+09	1.48E+09
第 2 天	7.88E+07	1.43E+08	1.81E+09	9.17E+08	5.3E+08	42995760	3.87E+08	5.37E+08	9.82E+08	1.76E+09	1.66E+09
第 4 天	4.30E+07	1.15E+08	1.35E+09	7.09E+08	4.37E+08	3.08E+08	5.52E+08	1.64E+09	7.09E+08	1.3E+09	9.53E+08
第 6 天	5.02E+07	1.29E+08	1.5E+09	8.67E+08	4.23E+08	3.51E+08	3.73E+08	1.73E+09	7.74E+08	1.13E+09	1.48E+09
第 8 天	5.73E+07	2.29E+08	8.1E+08	9.96E+08	1.58E+09	3.73E+08	7.67E+08	2.86E+09	8.03E+08	9.17E+08	8.03E+08
第 10 天	7.17E+07	2.22E+08	3.3E+09	1.9E+09	1.23E+09	4.44E+08	8.03E+08	2.16E+09	1.35E+09	3.27E+09	3.31E+09
第 12 天	9.32E+07	2.29E+08	3.18E+09	2.1E+09	1.37E+09	4.08E+08	9.67E+08	1.66E+09	2.45E+09	3.2E+09	3.06E+09
第 14 天	1.36E+08	2.15E+08	2.22E+09	1.65E+09	1.68E+09	3.73E+08	1.02E+09	1.35E+09	2.54E+09	2.35E+09	2.31E+09
第 16 天	1.65E+08	1.72E+08	2.17E+09	1.95E+09	1.59E+09	2.79E+08	1.94E+09	1.56E+09	2.14E+09	2.2E+09	2.09E+09
第 18 天	1.72E+08	1.58E+08	1.92E+09	1.27E+09	2.54E+09	2.51E+08	1.59E+09	8.67E+08	1.43E+09	1.88E+09	1.95E+09
第 20 天	1.29E+08	1.43E+08	1.5E+09	1.28E+09	1.68E+09	3.01E+08	1.38E+09	1.43E+09	1.61E+09	1.55E+09	1.52E+09

第五章 結論

1. 理論上硫片添加量越多，污泥酸化速度越快，但添加量高達 4% 時由於硫片過多並且有一定的重量，所以會堵塞住氣流孔動，使的 ORP 無法迅速上升，pH 無法快速下降，所以導致重金屬溶出效率沒有預期中來的高。
2. 固體物濃度對重金屬溶出效果有一定的影響力，因為固體物濃度高低就等於有機物含量高低，然而重金屬容易與有機物結合形成錯合物，所以在高固體物濃度時會導致重金屬溶出效果不佳。除了 TS=5.0%，S=2.3% 及 TS=4.34%，S=1.0% 之外，其餘實驗後污泥中重金屬含量皆符合各國標準。
3. 重金屬在不同處理條件下之溶出效率以鋅、錳及鎳較佳，而鉛和鉻的溶出效果不佳，應另尋其他萃取方法，針對鉛和鉻處理。以污泥中重金屬含量較高的銅、鋅和鎳為指標，將固體物濃度控制在 0.5-2.0% 且硫片添加量在 0.5-2.0% 之間時，鎳的溶出率即可達到 95% 以上。
4. 生物溶出程序對於有機物的降解具有一定的作用，SS 去除率約為 30~65%，VSS 去除率約為 15~62%，均較一般活性污泥法來的好。
5. 由 AFM 及 SEM 實驗結果顯示，EPS 具有吸附及酵素的作用，有助於幫助硫氧化菌快速產酸的能力，所以 EPS 在 bioleaching 程序重扮演一重要的角色。

6. 由各重金屬溶出結果可知，在 pH 值快速下降至 2.5 時，可有效始重金屬溶出，而已氣提示反應槽來處理畜牧業污泥，可縮短時間為 14 天左右，及在 14 天後重金屬就可達到高溶出結果。
7. 隨著 pH 值得降低，*T. thioparus* 所佔的百分比漸漸減少，也證明 bioleaching 前段的酸化作用為此株菌所造成，當 pH 值降到 4 以下時，*T. thioparus* 所佔的百分比降至 2% 以下；而 *T. Thiooxidans* 和 *T. ferrooxidans* 所佔的百分比卻漸漸增加，證明 bioleaching 後段酸化作用為此兩株菌所造成的，並且成為優勢菌種。
8. pH 值的高低對微生物總量有一定的影響力，pH 值 (<2.5) 越低所能生存的微生物量越少，也越適合硫氧化菌的生存，可有效提高硫氧化菌的數量，但此時產生 EPS 量會較少，所以與重金屬溶出效果成反比。
9. 重金屬溶出效率和 EPS 產率為完全相反的趨勢，也就是重金屬溶出效率越佳 EPS 產率反而越低，其原因為：當重金屬溶出效率越佳時，反應溶液中含有大量的重金屬及硫酸根離子，導致濃度環境之突變，微生物會大量分泌胞外聚合物，保持菌體的完整性並且使的微生物可以生長在此環境條件之下。

第六章 參考文獻

Agate, A. D., Korczynski, M.S., Lundgren, D.G., 1969. Extracellular complex from culture filter of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 15, 259-265.

Bhavaraju, S.S. R., Modak, J. M., Kumar, R., Gandhi, K.S., 1992. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. *Biotechnology and Bioengineering.* 41, 612-616

Blais, J.F., Tyagi, R.D. Auclair, J.C. 1993b. Bioleaching of metals from sewage sludge: effect of temperature. *Water Res.* 27, 110-120.

Blake, R.C., Howard, G.T., McGinness, S., 1994. Enhanced yields of iron-oxidizing bacteria by in situ electrochemical reduction of soluble iron in the growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2704-2710.

Blake II, R.C., Lyles, M.M., Simmons, R.C., 1995. Morphological and physical aspects of attachment of *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Jerez, C.A., Vargas, T., Toledo, H., Wiertz, J.V. (Eds.), *Biohydrometallurgical Processing*, vol. 1. University of Chile, Santiago, 13-22.

Blake II, R.C., Shute, E.A., Howard, G.T., 1994. Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite, and sulfur. *Applied Environ Microbiol.* 60,

3349-3357.

Bosecker, K., 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Review*. 20, 591-604.

Brown, M.J., Lester, J.N., 1979. Metal removal in activate in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. *Wat. Res.* 13, 817-837

Brown, M.J., Lester, J.N., 1980. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction method. *Appl. Environ. Microbial.* 40, 179-185

Brown, M.J., Lester, J.N., 1982. Role of bacteria ECP in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge- I : Effects of metal concentration. *Water Res.* 16, 1539-1548.

Charin, T., Thanakorn, C., Masanori, W., Ken, S., Naiyatat, P., 2002. 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, 99-105.

Chen, S.Y., Lin, J.G., 2001. Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. *Chemosphere* 44, 1093-1102.

Clair, N., Sawyer, Perry, L., McCarty, Gene, F., Parkin., 1994. Chemistry

For Environmental Engineering. Fourth Edition. 157 Figure 4-13.

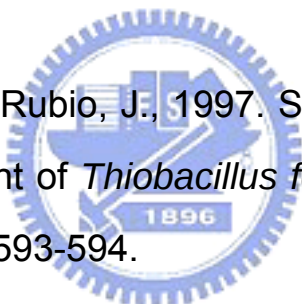
Couillard, D., Zhu, S., 1992. Bacterial leaching of heavy from sewage for agricultural application. *Water, Air and Soil Pollution*. 63, 67-80.

Diaz, L.F., Savage, G.M., Eggerth, L.L. Golueke, C.G., 1991 Composting and Recycling Municipal Solid Waste. *Lewis Publisher New York* 122

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Fred, S., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356

Ehrlich, H.L., 2002. *Geomicrobiology*. 4th edn. Dekker, New York.

Escobar, B., Huerta, G., Rubio, J., 1997. Short communication: influence of LPS on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. W. J. *Microbiol. Biochem.* 13, 593-594.



Filali-Mouhim, A., Benrahmoune, M., Jean-Pual J.G., 2002. Effect of protein binding on charge transfer in DNA: A simple model based on the superexchange mechanism. *Can. J. Chem.* 80, 333-344.

Forster, C.F., 1971. Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index. *Water Res.* 5, 861-870

Gehrke, T., Hallmann, R., Sand, W., 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. In: Jerez C. A., Vargas T., Toledo H., Wiertz J. V. (Eds.),

Biohydrometallurgical Processing, University of Chile, Santiago 1, 1-11

Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W., 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (7), 2743-2747

Goodwin, J.A.S., Forster, C.F., 1985. A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Res.* 19, 527-533.

Hoa, P.T., Nair, L., Visvanathan, C., 2003. The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water SA.* 29 (4), 437-442

Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Sand, W., 2003. Bioleaching-a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71, 83-88

Kumar, S.R., Gandhi, K.S., Natarajan, K.A., 1991. Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 36, 278-282

Morgan, J.W., Forster, C.F., Eyison, L., 1989. A comparative study the nature of bio-polymers extracted from anaerobic and activated sludge. *Water Res.* 24, 743-750.

Muller, J.D., Portillo, H.Q., 1981. Silver catalysis in ferric sulphate leaching of chalcopyrite. In: Laskowski, J. (Ed.), 13th International Mineral Processing Congress, Warsaw, 1979. Elsevier, Amsterdam, 851-894.

Nishikawa, S., Kariyuma, M., 1986. Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge. *Water Res.* 20, 811-812.

Novak, John, T., Haugan, Bjorn-Erik., 1981. Polymer extraction from activated sludge. *Journal WPCF.* 53, 1420-1424.

Olver, R.E., Davis, R., Marin, M.G., Nadel, J.A. 1975. Active transport of sodium and chloride across the canine tracheal epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 112, 811-814.

Poglian, C., Donati, E., 1999. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 22, 88-92.

Rawlings D.E., 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiology* 56, 65-91.

Rodriguez, Y., Ballester, A., Blazquez, M.L., Gonzalez, F., Munoz, J.A., 2003. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy.* 71, 37-46.

Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology Biotechnol.* 63, 239-248.

Sand, W., Gehrake, T., Hallmann, R., Schippers, A., 1995. Sulfur chemistry, bioflok, and the (in)direct attack mechanism-a critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 961-966

Sand, W., Gehrake, T., Jozsa, P.G., Schippers, A., 1999. Direct versus indirect bioleaching. In: Amils, R., Ballester, A. (Eds.) *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Part A*. Elsevier, Amsterdam, 27-49.

Sand, W., Gehrake, T., Jozsa, P.G., Schippers, A. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*. 51, 115-129.



Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfide proceeds by two indirect mechanisms via *thiosulfate* or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 319-321.

Schippers, A., Jozsa, P.G., Sand, W., 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 3424-3431.

Sharma, P.K., Das, A., Hanumantha., Rao, K., Forssberg, K.S.E., 1999. *Thiobacillus ferrooxidans* interaction with sulfide minerals and selective chalcopyrite flotation from pyrite. In: Parekh, B. K., Miller, J. D. (Eds.), *Advances in Flotation Technology. SEM/AIME, Littleton, CO, USA*. 147-165.

Sreekrishnan, T.R., Tyagi, R.D., Blais, J.F., Meunier, N., 1996. Effect of Sulfur concentration on Sludge Acidification during the SSDML Process. *Water Research*. 30, 2728-2738.

Tessier, A., Campbell, P.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*. 51, 544-581.

Tichy, R., Nydl, J., 1997. Quantifying and growth of sulphur-oxidizing bacteria during bioleaching of a thick suspension. *Biotechnology Techniques*. 11, 679-682.

Tyagi, R.D., 1992. Microbial leaching of metals from municipal sludge: effects of sludge solid concentration. *Proc. Biochem*. 27, 89-96.

Tyagi, R.D., Blais, J.F., Auclair, J.F., Meunier, N., 1993. Bacterial leaching of toxic metals from municipal sludge: influence of sludge characteristic. *Water Environ. Res*. 65, 196-204.

Urbain, V., Block, J.C., Manem, J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: analytical approach. *Water Res*. 18, 1523-1528.

U.S. EPA. Soxhlet Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste, *Method 3540C*, December 1996.

Vallom, J.K., McLoughin, A.J., 1984. Lysis as a factor in sludge

flocculation. *Water Res.* 18, 1523-1528.

Yoshida, N., Murooka, Y., 1994. Adsorption of bacterial cells to crystal particles of heavy metals: role electrostatic interaction. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 636-641.

王至誠 (2003). 畜牧污泥同時好氧消化及重金屬溶出程序之研究。

國立交通大學環境工程研究所碩士論文。

林昆宏 (2003). 氣提式生物溶出反應系統處理重金屬污泥底泥之研究。國立交通大學環境工程研究所碩士論文。

高正忠，林志高 (1994) 水體底泥污染特性及處理可行性研究，國立交通大學環境工程研究所。

陳靜生 (1992) 水環境化學，曉園出版社。

鄭幸雄、彭徵決、魏憶琳 第十八屆廢水處理技術研討會論文集，生物處理程序中胞外聚合物測定方法之建立。

歐陽嶠輝 2001. 下水道工程學

附錄一 反應槽操作對照表

發生情況	解決方法 (處理及應變步驟)	改善後恢復情形
反應槽內氣流曝氣停止轉動	檢查空壓機是否當機	攪拌器正常運轉
恆溫水槽停止流動	檢查馬達是否孔轉或燒壞 (緊急連絡維護廠商)	恆溫水槽繼續流動
恆溫水槽水位無法上升	檢查水量是否不足	恆溫水槽水位上升

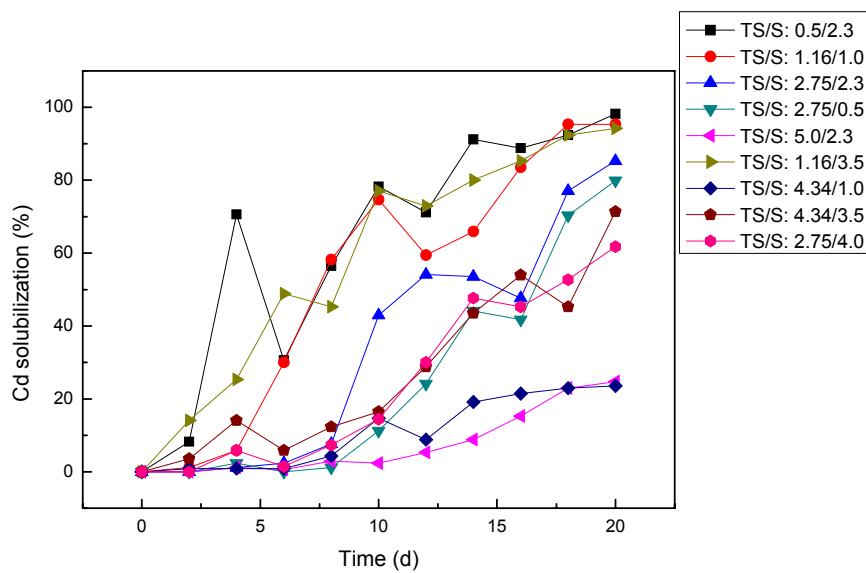
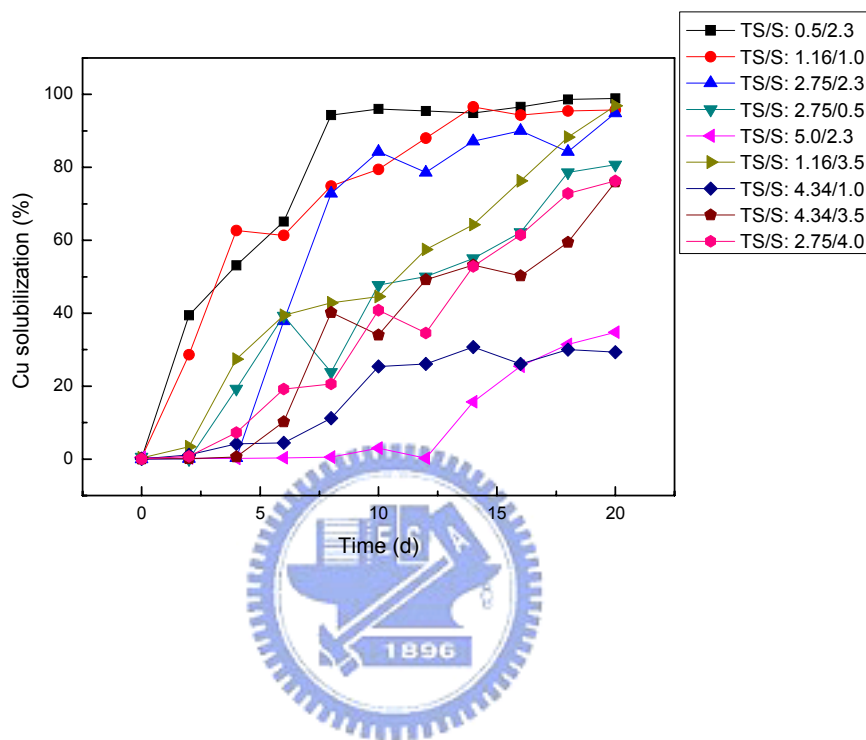


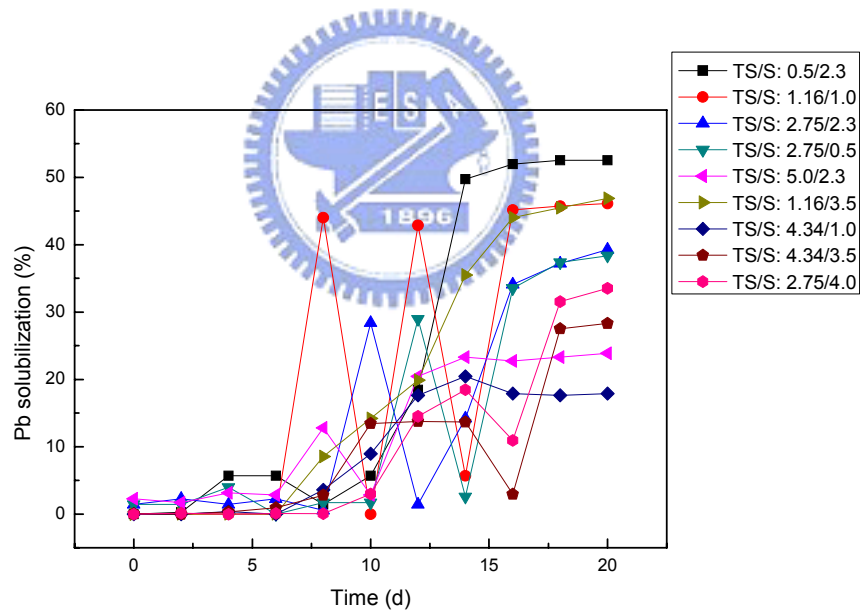
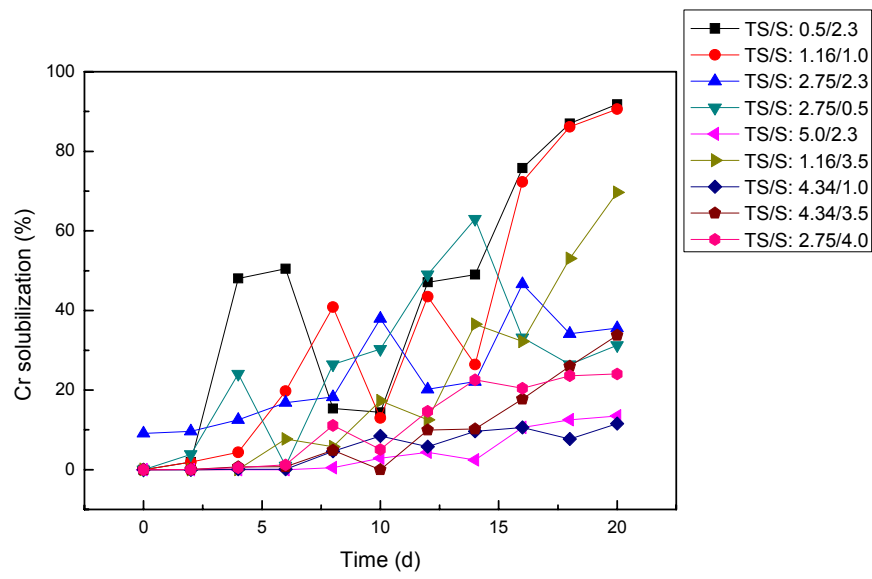
附錄二 EC/ SO_4^{2-} 之相關係數

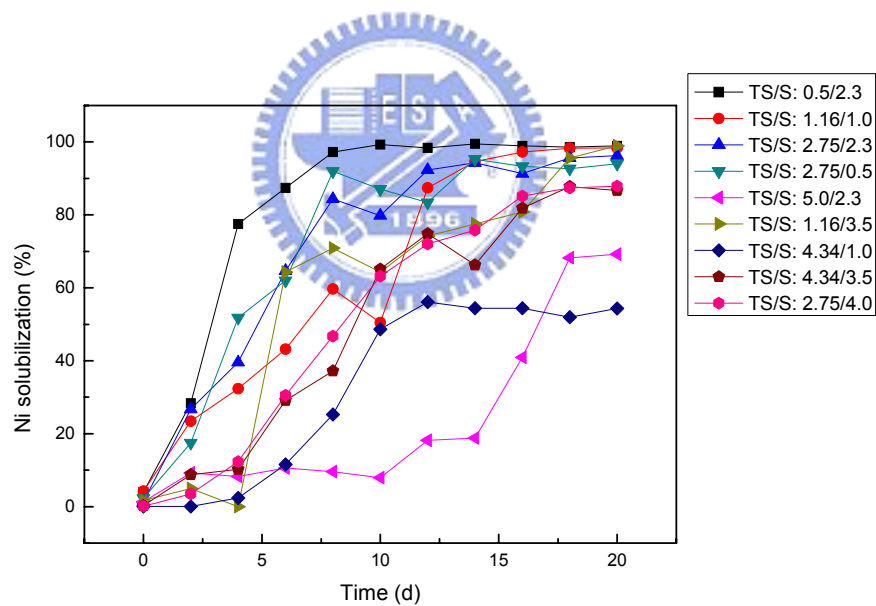
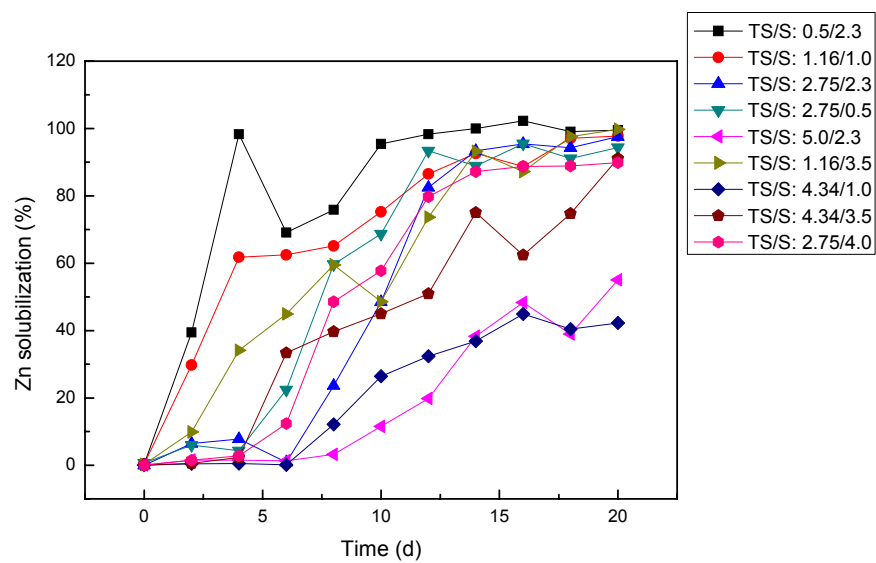
Std Order	Code Value		Sludge conc. (%)	Addition of Sulfur (%)	Correl. Coefficient (%)
	X1	X2			
4	1	1	4.34	3.5	84.02
6	1.414	0	5	2.3	97.47
9	0	0	2.75	2.3	99.22
11	0	0	2.75	2.3	99.22
1	-1	-1	1.16	1	78.96
8	0	1.414	2.75	4	88.38
5	-1.414	0	0.5	2.3	95.21
7	0	-1.414	2.75	0.5	91.57
3	-1	1	1.16	3.5	90.45
10	0	0	2.75	2.3	99.22
2	1	-1	4.34	1	61.98

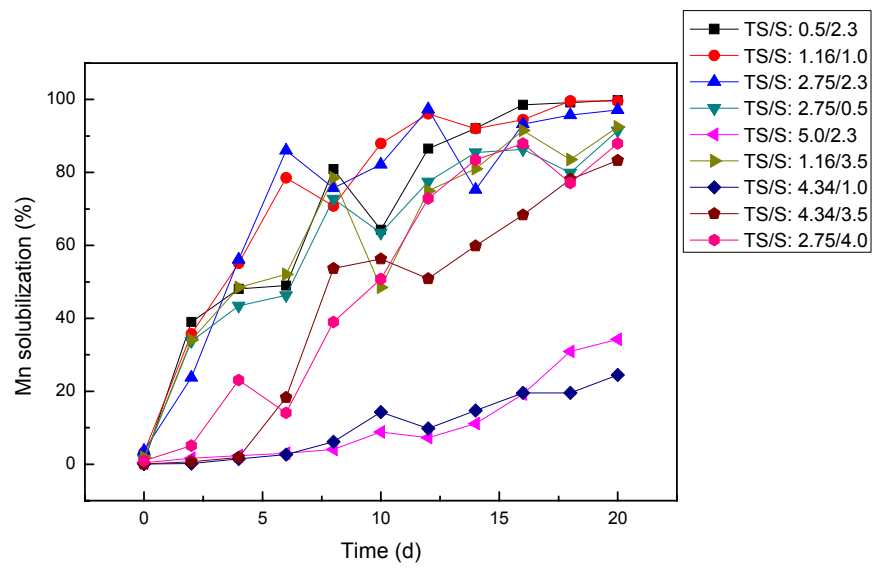


附錄三 各重金屬之溶出率

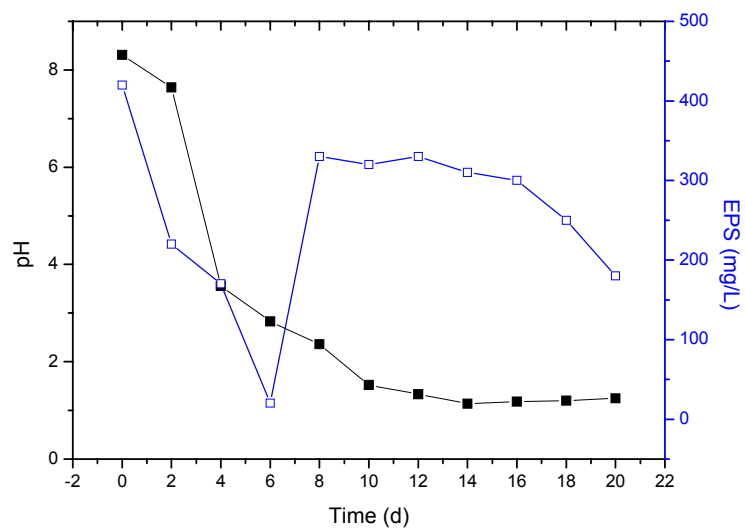
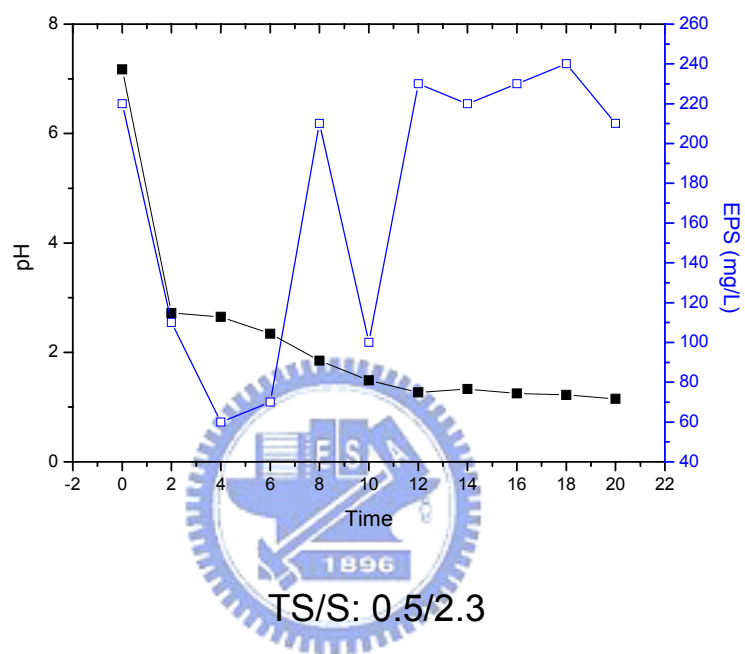


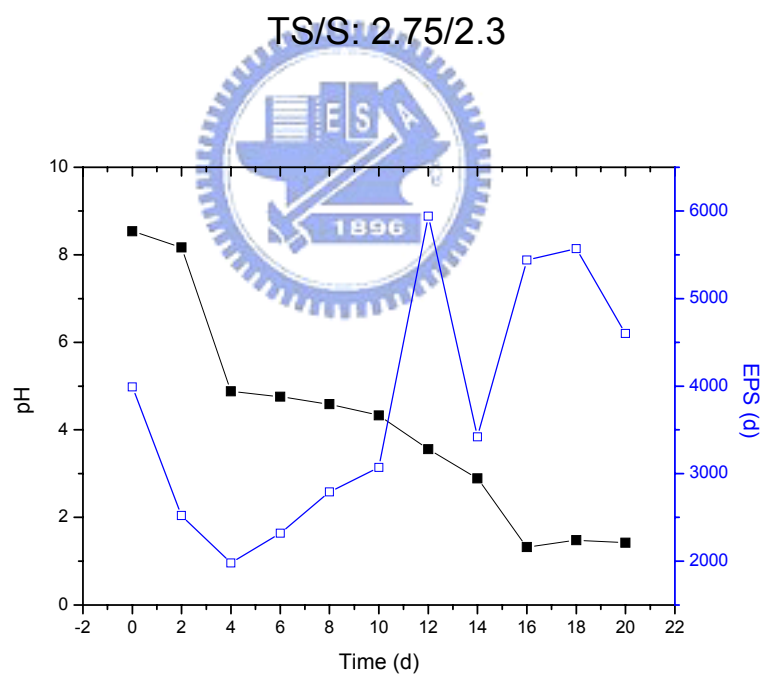
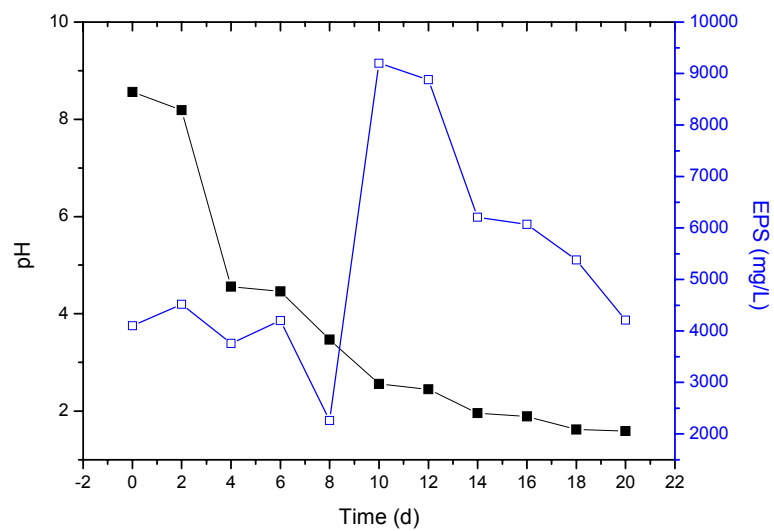


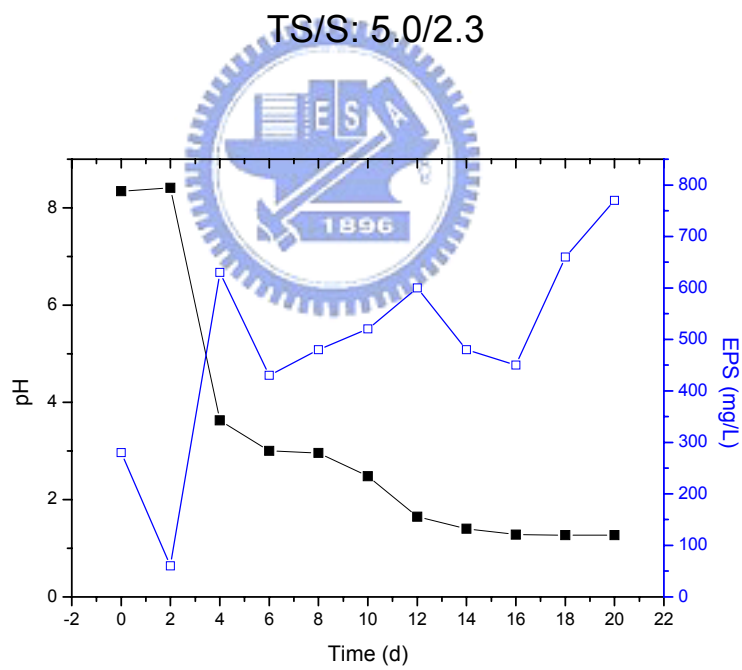
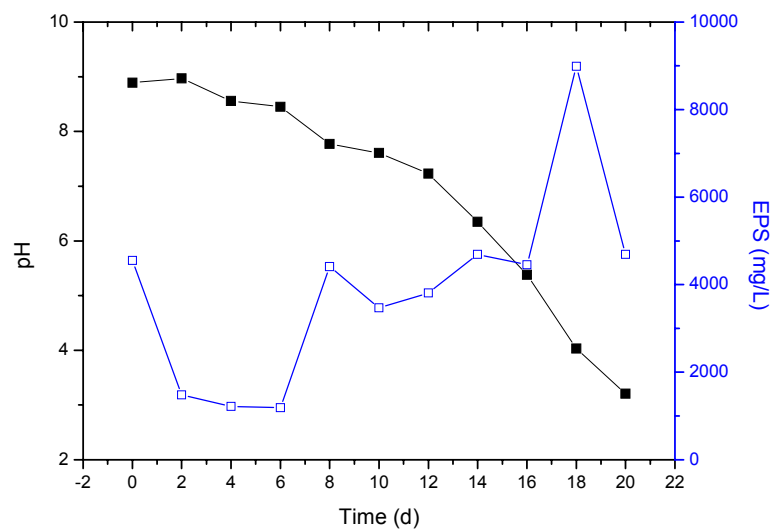


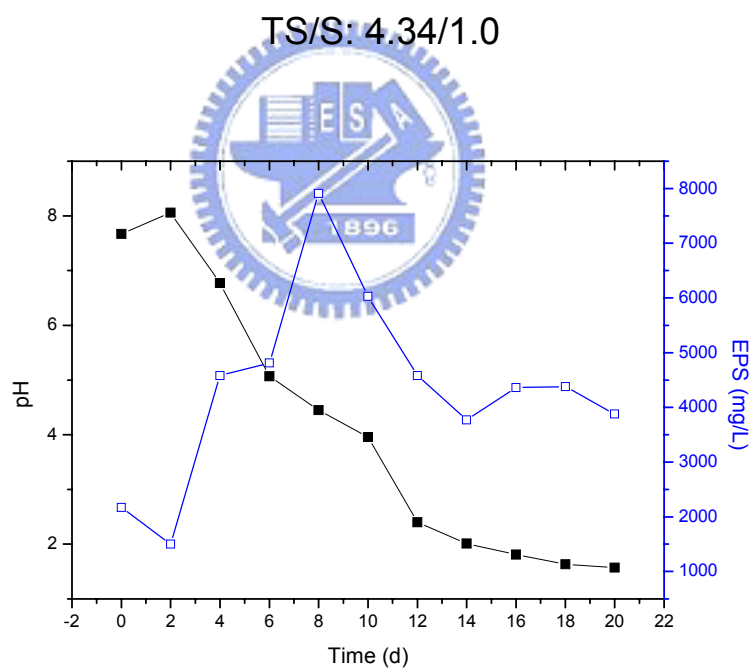
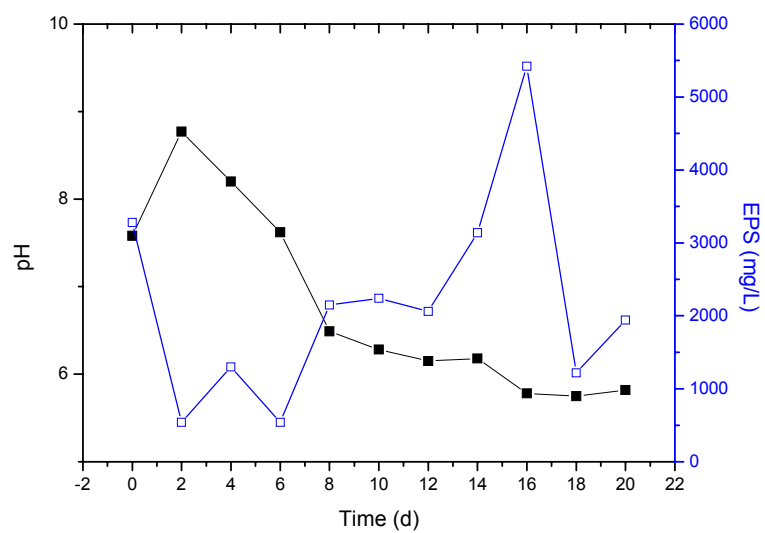


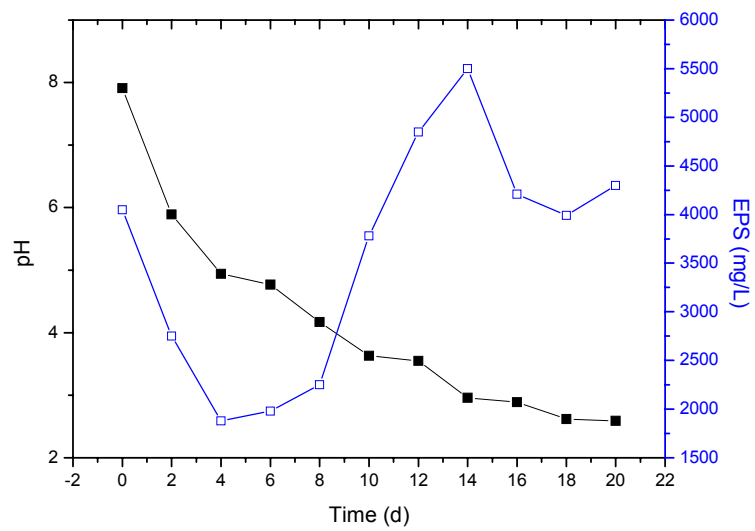
附錄四 各 pH 與 EPS 之反應曲面及等高線圖











TS/S: 2.75/4.0



附錄五 原始數據

1	TS/S: 0.5/2.3	7	TS/S: 4.34/1.0
2	TS/S: 1.16/1.0	8	TS/S: 4.34/3.5
3	TS/S: 2.75/2.3	9	TS/S: 2.75/4.0
4	TS/S: 2.75/0.5	10	TS/S: 2.75/2.3
5	TS/S: 5.0/2.3	11	TS/S: 2.75/2.3
6	TS/S: 1.16/3.5		

1. pH 之原始數據:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	7.17	8.31	8.56	8.54	8.89	8.34	7.58	7.67	7.91	8.34	8.66
2	2.72	7.64	8.19	8.17	8.97	8.41	8.77	8.06	5.89	8.21	8.17
4	2.65	3.56	4.56	4.88	8.56	3.63	8.2	6.77	4.94	4.54	4.58
6	2.34	2.83	4.46	4.76	8.45	3	7.62	5.07	4.77	4.44	4.48
8	1.85	2.36	3.47	4.59	7.77	2.96	6.49	4.45	4.17	3.46	3.48
10	1.49	1.52	2.56	4.33	7.61	2.48	6.28	3.96	3.63	2.56	2.57
12	1.27	1.33	2.45	3.56	7.23	1.65	6.15	2.4	3.55	2.39	2.51
14	1.33	1.14	1.96	2.89	6.35	1.4	6.18	2.01	2.96	2.01	1.91
16	1.25	1.18	1.89	1.32	5.38	1.28	5.78	1.81	2.89	1.88	1.91
18	1.22	1.2	1.62	1.48	4.03	1.27	5.75	1.63	2.62	1.62	1.62
20	1.15	1.25	1.59	1.42	3.21	1.27	5.82	1.57	2.59	1.58	1.6

2. ORP 之原始數據 (mv):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	-0.55	-82	-184	-162	-254	-84	-210	-199	-184	-181	-185
2	246	237	-95	-77	-166	166	12	-45	-95	-99	-91
4	368	339	15	18	37	242	51	-13	99	16	15
6	468	436	128	79	126	308	194	72	198	128	129
8	489	455	296	249	154	329	241	155	267	297	295
10	493	467	313	320	197	356	374	319	289	313	312
12	502	471	384	351	278	451	392	439	331	383	384
14	511	488	478	427	295	480	391	499	385	478	478
16	513	483	468	457	349	513	388	509	395	474	473
18	522	485	471	474	379	533	381	495	450	471	469
20	526	491	473	469	407	548	401	523	455	472	473

3. EC 之原始數據 (ms/cm):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	2.23	3.17	4.45	4.23	4.03	2.16	4.74	6.93	3.83	4.44	4.45
2	5.72	7.82	4.71	5.19	3.46	2.54	5.85	7.21	8.42	4.69	4.73
4	10.07	10.87	5.67	5.34	3.75	4.46	6.26	8.82	10.18	5.63	5.69
6	18.42	12.86	6.84	5.74	4.4	9.45	6.4	10.82	10.36	6.81	6.87
8	23.8	15.72	5.28	6.76	4.03	14.78	7.69	12.12	10.58	5.27	5.28
10	40.6	18.68	10.54	8.19	4.66	19.44	8.01	14.82	12.78	10.53	10.54
12	42.5	42.8	16.54	11.29	6.04	67.5	8.14	25.5	15.54	16.55	16.54
14	47.4	57.4	22.5	14.51	6.24	95	7.98	47.9	16.99	22.25	23.5
16	50.3	68.8	34.5	23.5	8.72	105	7.9	58.1	18.32	34.5	35.5
18	56.8	61.3	39.5	32.8	8.87	117.5	7.13	77.8	25.78	38.5	39.5
20	57.1	74.2	41.5	35.5	9.59	118	6.79	91	30.55	41.2	41.5

4. SO_4^{2-} 之原始數據 (mg/L)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	36.29	193.67	2202	2916	899.3	212.275	55.29	975.85	2198	2192	2213
2	3179	4592.65	3132.75	3388.5	1305	740.25	1688	2800	2432.75	3150	3100
4	5180	4383.67	4247	3659.25	1465.25	3284.5	2634.5	3990.25	3247	4100	4300
6	7641	6825.51	4317.5	3932	1728	3384.5	3056.5	14235	3717.5	4350	4295
8	10670	6626.53	4501	4135.5	2088.5	4611	2650.5	17476.5	4015	4490	4560
10	10430	5783.67	5820	4641.5	2143	6369.25	2897.5	17713.5	4820	5850	5795
12	11950	6100	8195	5172	2424.75	7452.5	3382.75	18289.5	5795	8215	8175
14	14198	7234.67	9379.5	5975	2709	9707.5	3481	24430	6237	9400	9365
16	14112	7991.83	17490	6378	5455	12065	5418	27737.5	6549	17500	17480
18	14134	8522.44	18460	6659	5760	17943	4677.5	27995	6646	18500	18430
20	14256	9812.24	20265	6845	6071	23980	5542.5	28355	6678	20255	20278

5. SS 去除率之原始數據 (*1000 mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	2.981	9.349	24.965	25.783	41.362	11.576	37.337	43.917	28.03	24.995	24.955
2	2.697	8.893	24.514	22.655	40.199	10.012	37.019	42.278	27.432	24.641	24.641
4	2.102	8.499	22.883	24.33	40.194	9.617	36.991	41.767	23.748	23.158	23.668
6	1.859	7.848	22.425	22.411	39.68	9.118	33.189	37.231	23.19	22.554	22.341
8	1.777	6.531	21.477	22.225	39.11	8.522	32.47	33.952	22.904	21.547	21.378
10	1.541	6.375	20.319	20.202	38.955	7.862	31.776	29.046	22.714	20.413	20.013
12	1.357	5.773	18.099	18.976	36.01	6.708	28.53	25.228	19.564	19.883	19.001
14	1.299	5.528	17.007	18.032	34.378	6.566	28.118	18.104	18.91	17.175	17.023
16	1.108	5.207	16.034	17.768	31.194	6.346	27.509	17.336	17.31	16.013	16.012
18	1.06	4.818	15.872	16.635	29.034	5.855	26.123	15.859	17.21	15.567	15.325
20	1.081	4.544	13.838	16.508	28.829	5.435	25.817	15.287	16.01	13.983	13.786

6. VSS 去除率之原始數據 (*1000 mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	3.60	8.12	18.74	18.64	27.72	8.42	25.96	29.42	18.19	18.69	18.77
2	3.14	7.89	17.32	18.00	27.68	8.03	25.57	28.16	17.29	17.46	17.99
4	2.83	7.59	16.39	16.94	26.91	8.31	24.73	26.24	17.08	16.55	16.59
6	2.64	6.96	15.80	16.54	26.61	7.31	22.65	25.75	16.91	15.03	15.78
8	2.32	6.36	15.66	15.14	25.98	6.23	21.92	21.19	16.11	14.78	15.00
10	1.98	5.96	14.21	14.43	25.35	6.06	21.07	19.69	15.96	14.02	14.53
12	1.96	5.53	13.39	14.53	25.26	5.75	20.75	17.57	15.94	13.55	13.70
14	1.91	5.24	12.21	13.78	24.23	5.52	20.30	15.65	15.86	12.02	12.34
16	1.88	5.17	12.13	13.29	24.42	5.33	19.81	13.74	15.32	11.08	11.93
18	1.85	4.93	11.12	12.64	24.03	4.74	19.79	12.05	14.88	10.60	11.54
20	1.81	4.57	10.77	12.20	23.30	4.53	19.66	10.96	12.21	10.53	10.89

7. 銅溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	8	14	0	20	16	11	1.74	1.37	0.25	0.01	0
2	1380	1002	5	0	10	120	41	4.2	25.32	4.5	3.5
4	1860	2194	12	675	6	960	146	21	255.5	10	13.5
6	2280	2146	1325	1375	12	1380	157	357	673	1300	1280
8	3300	2620	2550	835	18	1500	393	1407	721	2560	2400
10	3360	2780	2950	1670	104	1560	887.5	1190	1430	2750	2850
12	3340	3080	2750	1750	10	2010	912.5	1722	1210	2000	2750
14	3320	3380	3050	1925	550	2250	1075	1862	1850	3100	3150
16	3380	3300	3150	2175	890	2670	912.5	1757	2150	3050	3250
18	3450	3340	2950	2750	1100	3090	1050	2079	2550	3050	3100
20	3460	3350	3320	2825	1218	3390	1025	2660	2670	3250	3300

8. 鎘溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0
2	7	1	0	0	0	12	0.73	3	0	0.02	0
4	60	5	1	2	1	21.5	0.74	12	5	0.95	1.02
6	26	25.5	2	0	0.5	41.5	0.73	5	1.25	2.5	1.99
8	48	49.5	6.5	1	2.5	38.5	3.65	10.5	6.25	7.5	7.7
10	66.5	63.5	36.5	9.5	2	65.5	12.5	14	12.25	38.5	35.5
12	60.5	50.5	46	20.5	4.5	62	7.5	24.5	25.5	44.5	44.8
14	77.5	56	45.5	37.5	7.5	68	16.25	37	40.5	42.5	45.5
16	75.5	71	40.5	35.5	13	72.5	18.25	45.9	38.5	51.5	52.5
18	78.5	81	65.5	59.8	19.5	78.5	19.5	38.5	44.8	58.5	61.5
20	83.5	81	72.5	67.9	21	80.1	20	60.7	52.5	69.5	70.5

9. 鉻溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	0	9.5	0	0	0.02	0	0	0	0	1.1
2	2	2	10	4	0	0	0	0.04	0.04	0.05	0
4	50	4.5	13	25	0	0.05	0.08	0.74	0.5	0.95	8.5
6	52.5	20.5	17.5	1	0	8	0.12	0.78	1.25	18.5	15.5
8	16	42.5	19	27.5	0.5	6	4.8	5.04	11.55	5.8	25.5
10	15	13.5	39.5	31.5	3	18	8.8	0	5.25	26.5	27.5
12	49	45.2	21	51	4.5	13	6	10.36	15.25	29.5	22.5
14	51	27.5	23	65.5	2.5	38	10	10.64	23.45	35.5	18.5
16	78.8	75.2	48.5	34.5	11	33.5	11	18.48	21.25	36.5	33.5
18	90.5	89.6	35.5	27.5	13	55.2	8	27.05	24.55	35.5	34.5
20	95.5	94.2	37	32.5	14	72.5	12	35.09	25	36.5	35.5

10. 鉛溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	0	2.5	2.5	4	0	0	0.12	0	0	1.1
2	0.5	0	4	2.5	3	0.02	0	0	0.25	0.85	2.3
4	10	0	2.5	7	5.5	0.01	0.65	0.56	0	5.5	0.95
6	10	0	4	0	5	0.03	0	1.63	0.17	1.5	5.5
8	2.5	77.5	1	3	22.5	15	6.35	4.95	0.12	0.5	12.5
10	10	0	50	3	5	25	15.75	23.66	5.25	23.5	28.5
12	32.5	75.5	2.5	51	36	35	31	24.22	25.55	2.5	33.5
14	87.5	10	25	4.5	41	62.5	36	24.08	32.5	44.5	45.5
16	91.5	79.5	60	59	40	77.5	31.5	5.19	19.25	58.5	52.5
18	92.5	80.5	65.5	65.8	41	80	31	48.44	55.55	61.5	61.5
20	92.5	81.2	69.1	67.5	42	82.5	31.5	49.84	59	66.5	67.5

11. 鋅溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	17	18.5	0	28	2	11	0.82	1.73	0.25	1.1	0
2	1755	1325	285	265	67	440	18	26.74	65	265	128
4	4375	2750	347	191	66	1520	21.6	102	125	335	285
6	3075	2780	38	998	59	2000	3.6	1484	550	538	458
8	3375	2900	1052	2655	145	2650	540	1764	2160	998	935
10	4245	3350	2159	3058	512	2160	1175	2002	2570	2012	1980
12	4375	3850	3670	4155	882	3280	1440	2268	3550	3458	3150
14	4450	4120	4155	3955	1705	4150	1640	3339	3880	4050	3990
16	4550	3950	4245	4250	2152	3880	2000	2779	3950	4150	4180
18	4410	4320	4195	4055	1735	4340	1800	3325	3955	4250	4200
20	4430	4350	4340	4200	2450	4440	1880	4053	4000	4300	4280

12. 鎳溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	36	39	12	21	12	15	0.39	2.24	1.25	9.5	10.5
2	258	213	243	159	84	45	0.46	79.8	32	198	223
4	705	294	360	471	75	-0.01	21.5	93.1	112	289	355
6	795	393	588	564	96	585	105	264.6	278	532	575
8	885	543	768	837	87	645	230	338.1	425	670	665
10	903	459	726	792	72	585	442.5	592.9	575	725	750
12	895	795	840	759	165	675	510	681.1	655	835	820
14	905	861	858	867	171	705	495	602.7	690	840	845
16	900	885	831	849	372	735	495	744.8	775	812	825
18	897	894	870	843	621	870	472.5	798.7	795	865	855
20	900	895	876	855	630	900	494	788.9	800	870	868

13. 錳溶出率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	15	79	90	35.3	9.5	45	0.73	0.82	23.5	55	85
2	955	875	582	826	41	836	5.1	15.68	125	545	553
4	1178	1350	1376	1065	57	1188	35	46.34	565	1250	1125
6	1200	1925	2109	1134	74	1276	65	448	345	1400	1780
8	1983	1735	1855	1784	99.5	1924	150	1316	955	1855	1950
10	1575	2155	2014	1555	215.5	1188	350	1379	1245	1995	2010
12	2121	2355	2385	1898	178.5	1836	240	1246	1785	2015	2350
14	2256	2255	1845	2095	272.5	1985	360	1467	2045	1785	1985
16	2415	2315	2285	2115	470	2242	480	1674	2155	2150	2250
18	2430	2440	2345	1958	757.5	2046	480	1914	1890	2250	2350
20	2445	2440	2380	2240	839.5	2266	600	2042	2155	2350	2350

14. EPS 產率之原始數據 (mg/L):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	220	420	4100	3990	4550	280	3280	2170	4050	4050	4150
2	110	220	4520	2520	1480	60	540	1500	2750	4450	4750
4	60	170	3760	1980	1220	630	1300	4580	1880	3650	3670
6	70	20	4200	2320	1190	430	540	4810	1980	3150	4150
8	210	330	2260	2790	4410	480	2150	7910	2250	2570	2250
10	100	320	9200	3070	3470	520	2240	6030	3780	9150	9250
12	230	330	8880	5940	3810	600	2060	4580	4850	8950	8750
14	220	310	6210	3420	4690	480	3140	3770	5500	6570	6450
16	230	300	6070	5440	4450	450	5420	4360	4210	6150	5950
18	240	250	5380	5570	8990	660	1220	4380	3990	5250	5540
20	210	180	4210	4600	4690	770	1940	3880	4300	4320	4250

14. 蛋白質產率之原始數據 (μg/mL):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0.32	3.51	11.94	12.39	12.04	13.18	86.85	29.14	12.24	12.00	11.89
2	0.32	0.21	23.10	24.72	26.11	6.49	36.39	12.43	20.78	23.13	23.10
4	0.32	5.19	39.89	43.27	47.28	6.67	72.40	35.34	39.27	38.05	39.87
6	0.32	3.20	75.53	82.65	92.23	11.03	33.79	23.03	78.55	75.00	75.36
8	0.32	3.08	77.35	82.89	89.65	10.34	127.43	5.99	80.88	77.55	77.55
10	0.32	1.35	73.49	80.39	106.47	7.21	85.80	4.73	83.38	73.98	73.89
12	0.32	3.69	86.83	85.99	48.07	13.52	47.89	10.11	83.99	89.00	88.98
14	0.32	10.32	18.12	93.34	23.48	25.25	84.51	19.50	69.45	18.13	20.90
16	0.32	9.65	18.51	95.12	19.84	14.47	76.82	28.49	59.12	18.00	18.99
18	0.31	3.58	16.98	19.22	20.33	59.89	52.73	28.83	21.22	17.00	17.87
20	0.32	9.87	14.82	19.65	15.68	25.25	58.48	15.35	15.56	14.90	15.01

附錄六 FISH 原始數據

TS/S: 0.5/2.3 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	3.6%	3.9%	100%	1.8%	3.2%
2	100%	2.8%	2.3%	100%	3.3%	1.7%
4	100%	12.9%	1.6%	100%	5.9%	1.3%
6	100%	30.0%	1.6%	100%	7.7%	1.2%
8	100%	33.5%	1.7%	100%	9.3%	0.9%
10	100%	29.4%	1.0%	100%	13.5%	0.7%
12	100%	38.6%	1.1%	100%	15.8%	0.5%
14	100%	39.1%	0.9%	100%	17.9%	0.5%
16	100%	40.1%	0.5%	100%	20.5%	0.4%
18	100%	40.5%	0.4%	100%	18.8%	0.6%
20	100%	40.4%	0.2%	100%	21.5%	0.2%

TS/S: 1.16/1.0 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.5%	4.1%	100%	1.5%	4.5%
2	100%	1.6%	5.7%	100%	1.6%	2.3%
4	100%	2.0%	3.7%	100%	4.6%	2.6%
6	100%	3.2%	2.2%	100%	7.8%	2.2%
8	100%	10.6%	1.8%	100%	14.9%	1.8%
10	100%	23.9%	1.3%	100%	9.3%	1.2%
12	100%	24.6%	2.1%	100%	15.2%	1.5%
14	100%	25.1%	2.6%	100%	16.3%	1.1%
16	100%	29.1%	1.3%	100%	13.2%	1.3%
18	100%	30.3%	1.5%	100%	20.8%	0.5%
20	100%	31.7%	1.1%	100%	18.3%	0.5%

TS/S: 2.75/2.3 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.3%	7.1%	100%	3.1%	8.0%
2	100%	3.7%	6.3%	100%	3.7%	6.2%
4	100%	4.8%	4.9%	100%	4.8%	6.2%
6	100%	7.9%	4.1%	100%	7.9%	4.5%
8	100%	4.9%	3.6%	100%	4.9%	9.8%
10	100%	10.3%	1.3%	100%	10.3%	8.5%
12	100%	14.9%	2.1%	100%	4.9%	5.9%
14	100%	8.5%	2.6%	100%	8.5%	4.1%
16	100%	17.1%	1.7%	100%	13.1%	4.5%
18	100%	21.7%	1.5%	100%	13.7%	2.3%
20	100%	23.5%	1.3%	100%	13.5%	2.6%

TS/S: 2.75/0.5 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	2.8%	12.6%	100%	1.6%	8.1%
2	100%	2.9%	11.4%	100%	2.5%	6.7%
4	100%	4.2%	9.9%	100%	2.7%	7.7%
6	100%	5.9%	4.2%	100%	3.8%	7.6%
8	100%	7.9%	9.8%	100%	4.9%	7.4%
10	100%	12.1%	7.9%	100%	5.3%	8.8%
12	100%	15.9%	8.8%	100%	8.2%	5.9%
14	100%	17.6%	7.9%	100%	9.5%	4.1%
16	100%	21.5%	4.4%	100%	11.5%	3.3%
18	100%	20.9%	6.5%	100%	10.1%	3.1%
20	100%	21.9%	6.3%	100%	10.5%	3.7%

TS/S: 5.0/2.3 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.1%	12.5%	100%	1.2%	8.9%
2	100%	2.1%	11.8%	100%	1.8%	8.8%
4	100%	2.3%	9.3%	100%	3.2%	7.4%
6	100%	5.3%	7.8%	100%	2.7%	7.7%
8	100%	4.9%	9.2%	100%	4.9%	6.1%
10	100%	6.1%	8.6%	100%	5.2%	6.8%
12	100%	6.9%	7.4%	100%	4.9%	5.2%
14	100%	7.6%	7.7%	100%	5.8%	4.9%
16	100%	10.5%	7.9%	100%	6.3%	4.5%
18	100%	9.9%	7.5%	100%	6.7%	4.4%
20	100%	10.1%	7.7%	100%	6.5%	4.3%

TS/S: 1.16/3.5 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	3.2%	5.9%	100%	3.6%	3.4%
2	100%	5.6%	6.3%	100%	2.8%	6.3%
4	100%	6.9%	3.9%	100%	5.6%	3.9%
6	100%	7.7%	4.5%	100%	10.4%	2.3%
8	100%	19.4%	2.3%	100%	9.9%	1.6%
10	100%	23.9%	2.6%	100%	14.3%	1.2%
12	100%	29.2%	1.2%	100%	17.5%	0.8%
14	100%	26.3%	1.3%	100%	18.8%	0.4%
16	100%	31.2%	1.0%	100%	20.1%	0.2%
18	100%	30.8%	0.8%	100%	20.5%	0.5%
20	100%	33.8%	0.6%	100%	20.4%	0.2%

TS/S: 4.34/1.0 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.2%	8.0%	100%	1.5%	10.3%
2	100%	1.9%	6.2%	100%	2.2%	9.2%
4	100%	2.3%	6.2%	100%	3.2%	7.3%
6	100%	4.3%	4.5%	100%	4.8%	6.9%
8	100%	5.9%	9.8%	100%	3.9%	4.1%
10	100%	6.5%	8.5%	100%	5.5%	5.9%
12	100%	6.1%	7.4%	100%	4.3%	4.8%
14	100%	7.6%	4.1%	100%	5.2%	4.2%
16	100%	7.5%	7.9%	100%	5.8%	3.8%
18	100%	7.9%	7.5%	100%	6.7%	5.2%
20	100%	8.8%	7.7%	100%	5.8%	5.5%

TS/S: 4.34/3.5 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.8%	12.1%	100%	1.3%	7.8%
2	100%	2.7%	11.2%	100%	3.3%	5.9%
4	100%	3.2%	10.4%	100%	3.5%	6.3%
6	100%	9.9%	9.1%	100%	7.7%	5.4%
8	100%	6.9%	8.2%	100%	7.9%	8.8%
10	100%	10.3%	9.9%	100%	10.2%	7.3%
12	100%	11.9%	7.4%	100%	5.9%	6.1%
14	100%	18.5%	4.1%	100%	8.5%	4.5%
16	100%	21.1%	3.3%	100%	11.8%	2.8%
18	100%	21.3%	5.8%	100%	13.1%	3.3%
20	100%	22.5%	4.9%	100%	12.3%	3.2%

TS/S: 2.75/4.0 (L/S)

Time (d)	DAPI (L)	Thio820 (L)	Thiopa 0511 (L)	DAPI (S)	Thio820 (S)	Thiopa 0511 (S)
0	100%	1.2%	13.8%	100%	2.3%	9.2%
2	100%	2.1%	12.1%	100%	2.7%	8.9%
4	100%	3.2%	9.7%	100%	3.8%	8.1%
6	100%	5.9%	3.9%	100%	6.8%	8.2%
8	100%	4.9%	7.2%	100%	4.9%	7.9%
10	100%	10.1%	8.5%	100%	6.7%	7.1%
12	100%	13.9%	7.4%	100%	7.1%	6.3%
14	100%	13.6%	4.1%	100%	8.5%	5.2%
16	100%	14.5%	7.9%	100%	9.2%	4.5%
18	100%	19.9%	6.6%	100%	8.8%	3.3%
20	100%	15.9%	7.2%	100%	9.7%	4.1%

