



微生物技術 在廢水處理之應用

張嘉修

前言

過去人類一直以爲自然環境可以吸收或分解人類活動所產生的廢棄物，然而，隨著全世界工業的發展與經濟的起飛，所產生的廢棄物，早已遠超過自然環境所能負荷的處理量；尤其人類又合成了許多新的且有毒的化學物質(如冷媒、溶劑、農藥、染料等)並大量使用重金屬，使得生態環境的負擔更加沈重。因此，很明顯地，環境污染的問題將成爲21世紀中亟待改善與解決的全球性問題之一。

近年來許多學者專家以不同的角度切入，嘗試用各種技術來進行污染物之處理，當然其中也包括了生物方法。在廢水處理的單元操作中，以生物方法爲主體的二級處理，通常能有效地去除廢水中之BOD (biochemical oxygen demand)，但對於有毒廢棄物、生物難降解化合物或是重金屬之處理，

則常效果不彰。因此，這些化合物常使用焚化法與化學法進行處理，惟其高成本或易造成二次污染的顧慮，使得人類仍一直在尋求其它替代方法，例如建立更經濟、更自然、或更有效率的生物方法來處理這些環境污染物。

雖然許多被歸類爲「外來物質」(xenobiotics)的人工合成物質，如鹵化脂肪族、鹵化芳香族、多環芳香族碳氫化合物等，極不易被環境中的微生物所降解，但自1960年中葉以來，人類已陸續發現土壤中確實有一些微生物(如假單胞菌屬，*Pseudomonas*)具有分解 xenobiotics 的能力，使得利用微生物方法來處理這些廢棄化學物質的可能性大幅地提高。再則，隨著生物技術的蓬勃發展，對於微生物處理效果的強化與多樣化，更有莫大的助益。本文首先說明各種環境污染物之微生物處理的原理機制，並以筆者過去所從事之相關研究爲例，舉出利用微生物技術進行難降

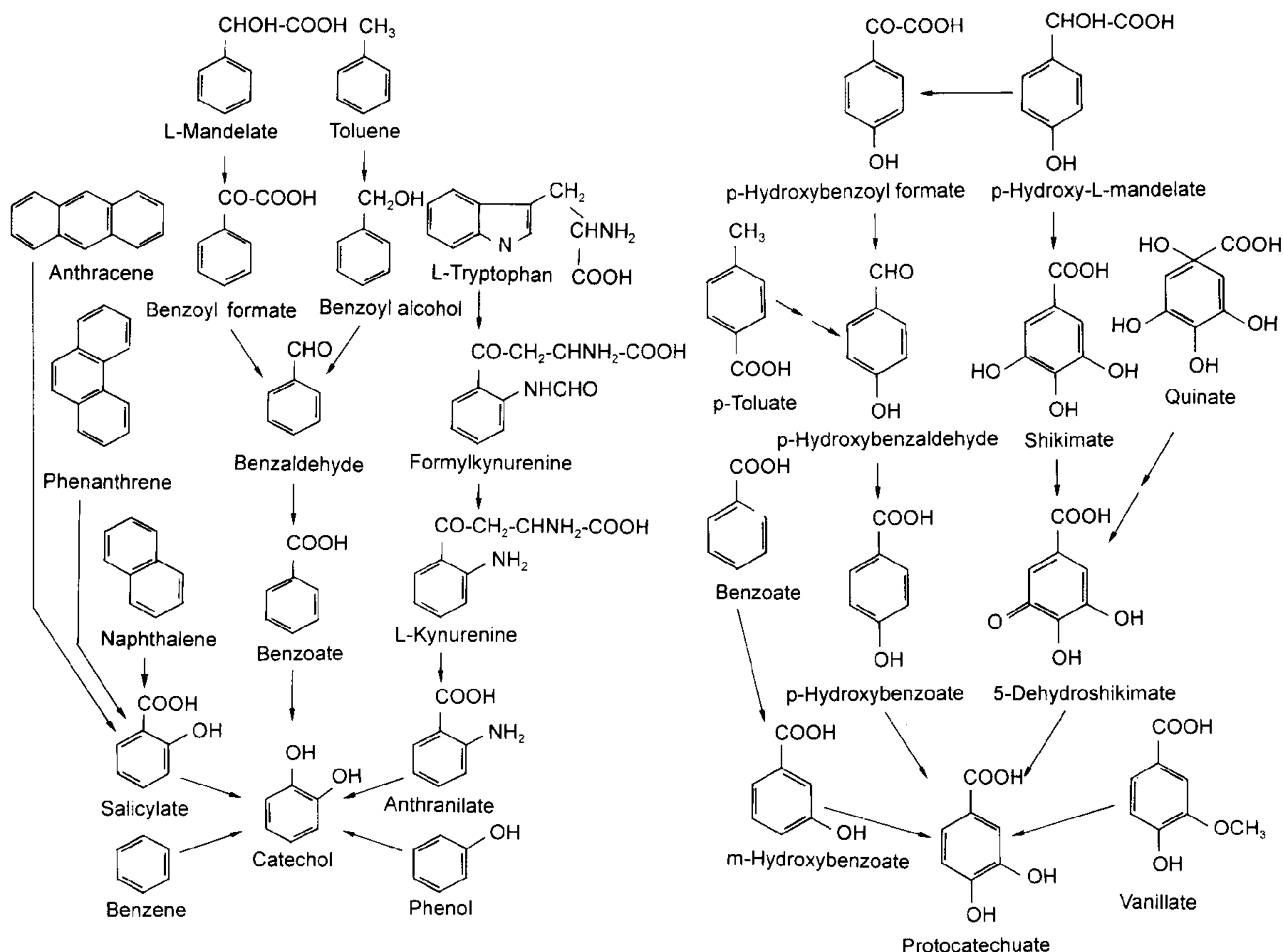


圖1 芳香族化合物微生物降解之起始步驟——鄰苯二酚與3,4-二羥苯酸之形成途徑(Glick and Pasternak, 1998)。

解化合物(如人工合成染料)之分解與重金屬處理等之原理與實例，期能拋磚引玉，以增進讀者對環境微生物技術之認識。

微生物處理之原理

(一)有機物之微生物處理

一般有機物(如碳水化合物、蛋白質、脂質等)能提供環境中微生物族群之碳源或能

源，藉著微生物生長繁殖並合成能量的代謝過程，有機物便一步一步地被降解，以致於礦化(好氧環境時)或甲烷化(厭氧環境時)。有機物代謝的機制是一連串的生物化學反應，並以特定的酵素為其催化劑。通常單一微生物無法降解所有的有機物，因其基質的種類有限，故常需混合微生物族群藉著其互助與共生的機制，方能有效且較完整地將有機物分解(Glazer and Nikaido, 1994)。

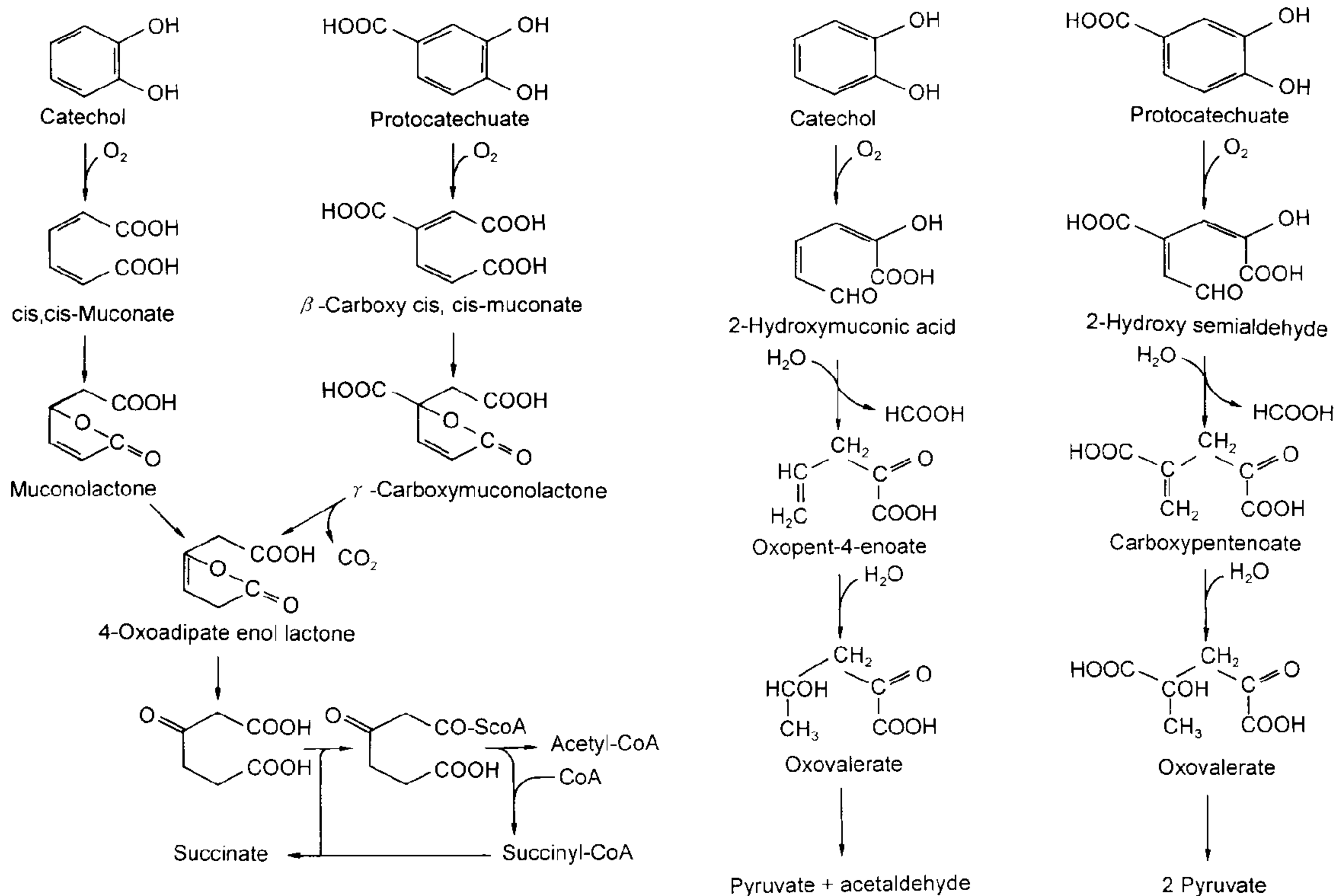


圖2 鄰苯二酚與3,4-二羥苯酸之微生物分解代謝途徑。左圖：鄰(ortho)裂環作用；右圖：間(meta)裂環作用。(Glick and Pasternak, 1998)

至於較難分解的有機物如芳香族或長鏈碳氫化合物則亦有特定的降解機制。芳香族化合物之生物降解乃先以一連串的酵素反應(如phenol hydroxylation等)將其轉化為鄰苯二酚(catechol)或3,4-二羥苯酸(protocatechuate)(如圖1)，在經由雙氧酵素(dioxygenase)催化進行間或鄰裂環反應後，繼續轉化為乙酰基輔酶A(acetyl CoA)或琥珀酸(succinate)，並進入檸檬酸循環(citric acid cycle or TCA cycle)進行礦化(如圖2)。長鏈正烷類(n-alka-

nes or aliphatic paraffins)的降解，因其溶解度差，故通常需由微生物分泌出類似乳化劑之生物分子，幫助長鏈正烷類分子穿過細胞膜，再藉著單氧酵素(monooxygenase)使其 CH_3 基氧化成OH基，再藉由酒精去氫酶(alcohol dehydrogenase)與醛去氫酶(aldehyde dehydrogenase)的作用轉換成長鏈有機酸，接著以 β -氧化的方式繼續降解(圖3)。

由於厭氧與好氧狀態時微生物代謝途徑之不同，有時候污染物之微生物處理也需適

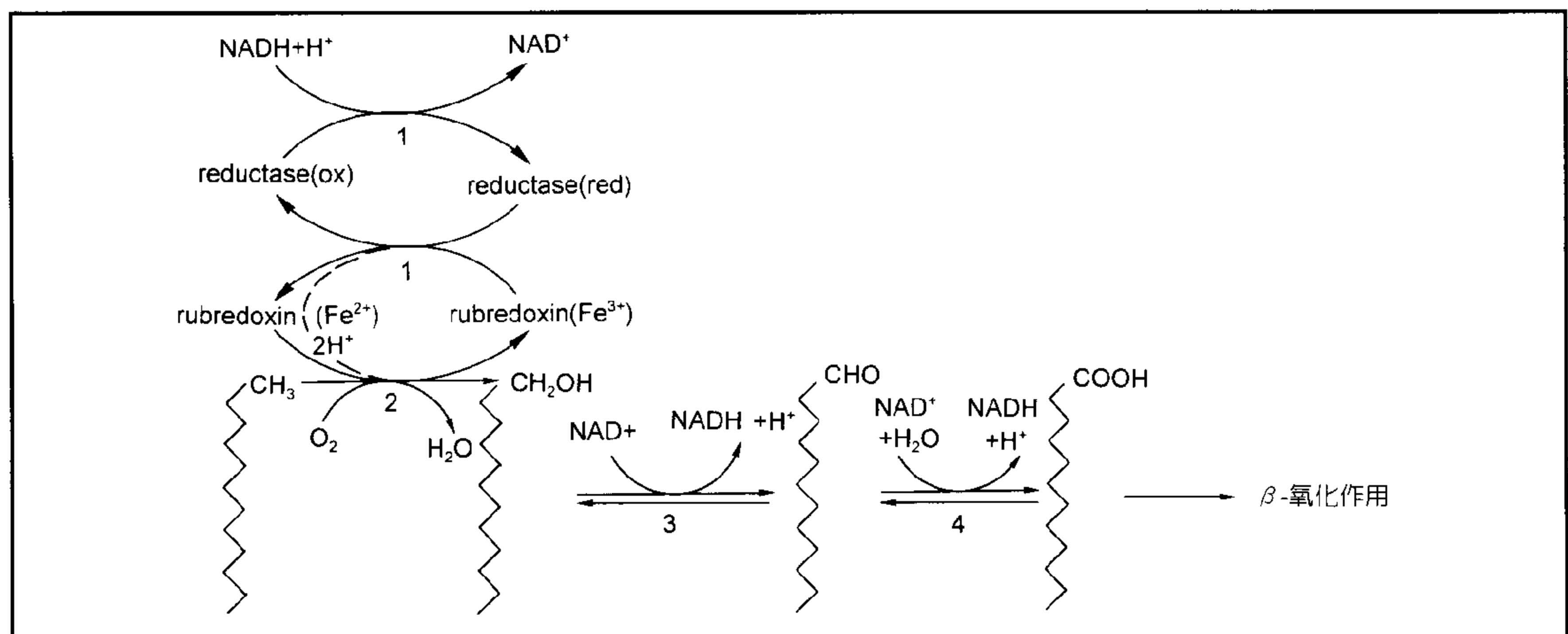
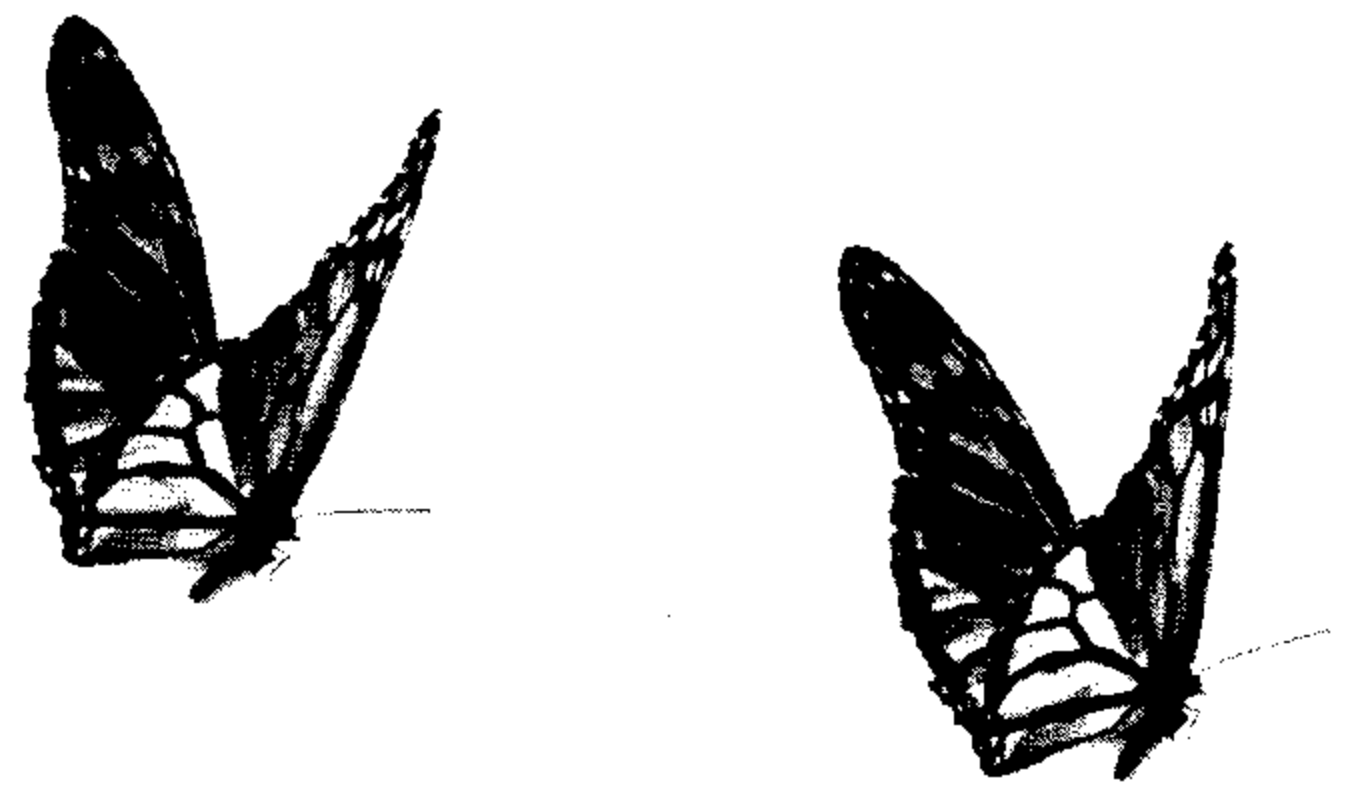


圖3 正烷類之生物降解代謝途徑。1：NADH 氧化還原；2：正烷類單氧化；3：酒精去氫；4：醛去氫(Gottschalk, 1986)

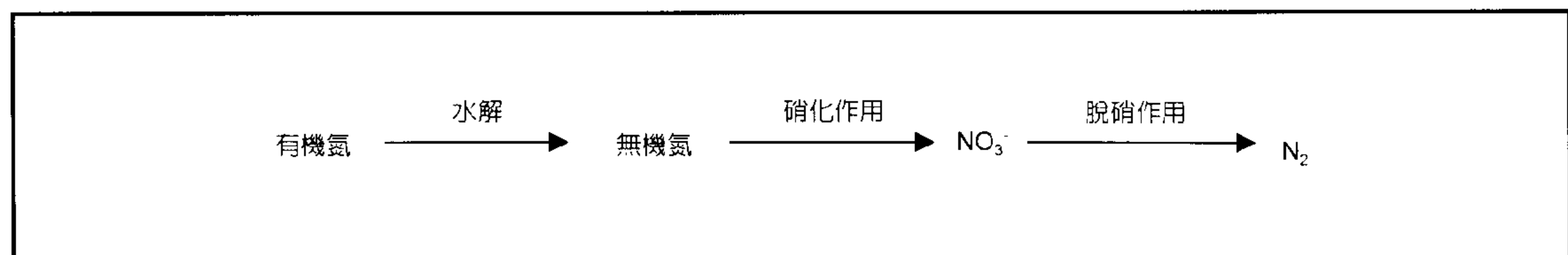


圖4 廢水中含氮有機物的去除過程

當的在好氧與厭氧條件下交互操作，以達最佳的效果：這種被稱為sequential environments的操作方式(Zitomer and Speece, 1993)可適用於偶氮染料之礦化(Banat et al., 1996)或是氯化芳香族有機物之降解(Fathepure and Vogel, 1991)。前者需先在厭氧環境下由含偶氮還原酵素之微生物打斷偶氮鍵，接著由好氧菌中苯胺氧化酵素與鄰苯二酚雙氧酵素(catechol 2,3-dioxygenase)將殘餘之芳香胺化合物繼續分解；後者同樣需在厭氧條件下進行脫氮反應，並在好氧條件下藉由雙氧酵素

(dioxygenase)進行環狀有機物之開環作用，進而利用 β 氧化作用持續代謝，以達到礦化的目的。

(二)無機物之微生物處理

1.氮與磷的生物去除

無機物不能像有機物被礦化或甲烷化，但無機物中如容易造成優養化的氮與磷，仍能藉著不同微生物的代謝途徑進行適當的生物轉換，形成各種能進入該物質生態循環的化合物，以達到從水體中去除之目的。如廢

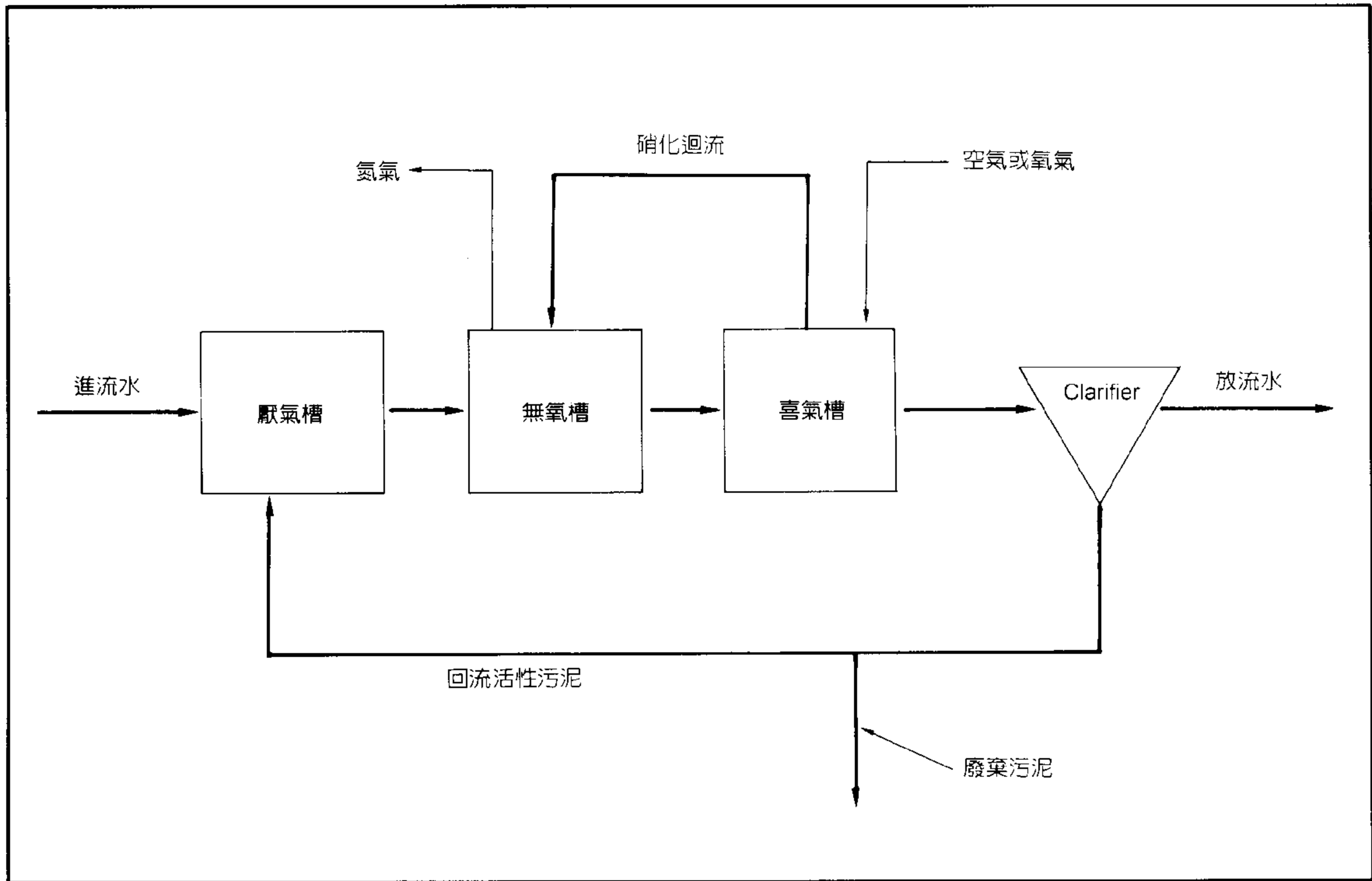


圖5 同時去除BOD、氮與磷之活性污泥程序示意圖

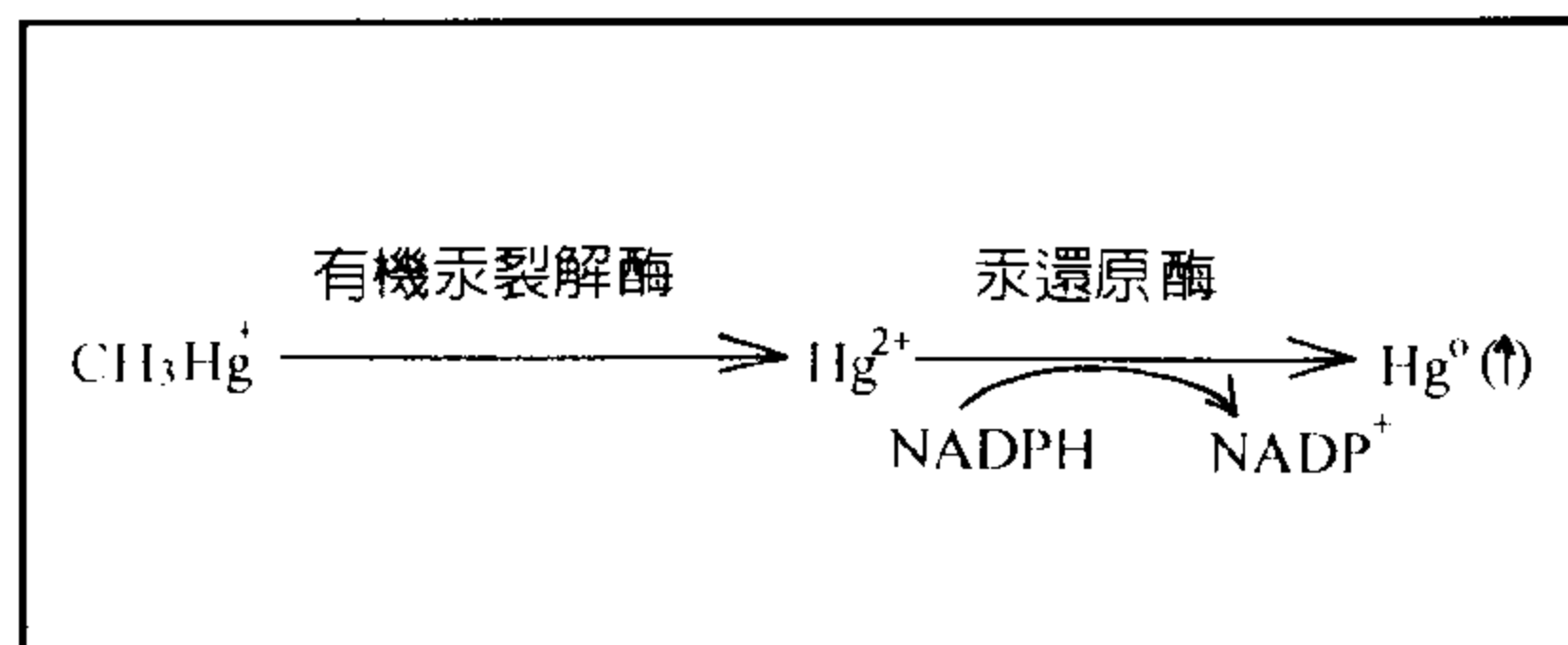


圖6 汞之生物去毒反應方程式(Chang and Law, 1998)

水中含氮有機物的去除(圖4)，乃先將其分解成氨或銨鹽後，在好氧條件下由硝化菌氧化成硝酸鹽(俗稱「硝化作用」)，之後再由厭氧

的脫硝菌還原成氮氣(俗稱「脫硝作用」)。

近年來漸受重視的生物脫磷作用也是利用兼性的磷酸蓄積菌(如*Acinetobacter calcoaceticus*)在好氧環境下對磷以聚磷酸鹽的方式蓄積並在厭氧條件下將聚磷酸鹽分解釋放磷的生理特性，藉由反應器設計適當地控制溶氧條件(圖5)，其對水中磷之去除量可大幅提升(Zitomer and Speece, 1993)。微生物對聚磷酸鹽之蓄積與分解與細胞需要維持細胞膜之質子驅動力息息相關，亦與PHB (poly- β -hydroxybutyrate)之合成與分解途徑有密切的交互作用，詳細機制可以Comeau model來描



述 (Comeau, 1986)。

2. 重金屬之生物去毒或去除

有些微生物能藉著生物轉換作用(如氧化、還原或甲基化)來改變重金屬之物理化學形態以降低其毒性，或是利用重金屬在生物體內外累積以及在細胞表面吸附的現象 (Shumate and Strandberg, 1985; Brierley et al, 1989; Gadd, 1988)，來進行重金屬之微生物去毒或去除。其中最典型的例子就是汞與鉻的還原去毒作用以及鈾、鉛、鋅、鎘等金屬離子的生物吸附或生物累積。汞生物去毒的機制(圖6)，乃源於抗汞微生物(如*Pseudomonas aeruginosa*)體內質體上所含的抗汞基因，通稱為汞操縱子，這操縱子上的*merB*基因會製造有機汞裂解酵素，將有機汞的碳—汞鍵打斷，使其降解成無機汞，再經由*merA* 基因製造的汞還原酵素的作用藉著輔因子NADPH所提供的電子，將無機汞還原為毒性小且易揮發的金屬汞(Hg^0)，繼而藉著擴散作用迅速排出微生物體外 (Misra, 1992; Belliveau and Trevors, 1989; Foster, 1987)。

近年來亦發現許多細菌、真菌 (fungi)、藻類及植物等的細胞或是其分泌出的一些代謝產物或是多醣體等，可以大量吸附累積各種金屬 (Shumate and Strandberg, 1985; Brierley et al, 1989; Gadd, 1988) 及放射性物質如鈾 (Feldstein et al, 1983)。這種引起學者專家濃厚興趣的生物累積或生物吸附的現象不但可發生在細胞體內、外和細胞表面，而且無論是活細胞或是死細胞都有可能發生 (Gadd, 1988)，因此可利用生物體濃縮與去除廢水中有害重金屬，進而達到去毒或回收的

目的。同時，生物體對一些微量貴重金屬的累積或吸附的能力，使其應用更具經濟價值 (Brierley et al, 1985)。

廢水色度之微生物處理技術

廢水所含之色度會阻隔光線進入水體，造成水中生態之破壞，且有些合成染料被發現具有突變性或致癌性 (Heiss et al, 1922; Chung et al, 1978)，故廢水中之色度必須有效地被去除。一般而言，傳統廢水處理之二級處理單元通常無法有效地去除色度，因此目前國內去除廢水色度之方法以理化處理為主，有物理吸附法(如使用活性炭)、化學混凝法，或化學氧化法(如使用臭氧、雙氧水)等；這些方法雖能有效地降低色度，但卻各有不同程度的缺點：如化學混凝法會產生大量污泥(張, 1992; Shelley, 1976)，而物理吸附法需考慮經濟成本及再生使用問題(張, 1992)，至於高級氧化法、Fenton法、電化學法及添加化學脫色劑等 (Vandevivere et al, 1998)，雖亦具有良好的脫色效果，但其成本高且有二次污染的顧慮。因此，目前仍迫切需要一可行性高且具環保概念之染整廢水處理替代方案，而微生物技術即為深具潛力的方法之一。

過去已有學者發現某些環境中的微生物(細菌或真菌)對染料具降解褪色的能力。細菌類微生物如*Pseudomonas*，*Bacillus*，*Salmonella*等通常能分解偶氮類染料與三苯甲烷類染料 (Michaels and Lewis, 1986; Chung and Stevens, 1993; Chung et al, 1978; Yatome et al, 1981)；而真菌類，主要是白腐真菌類

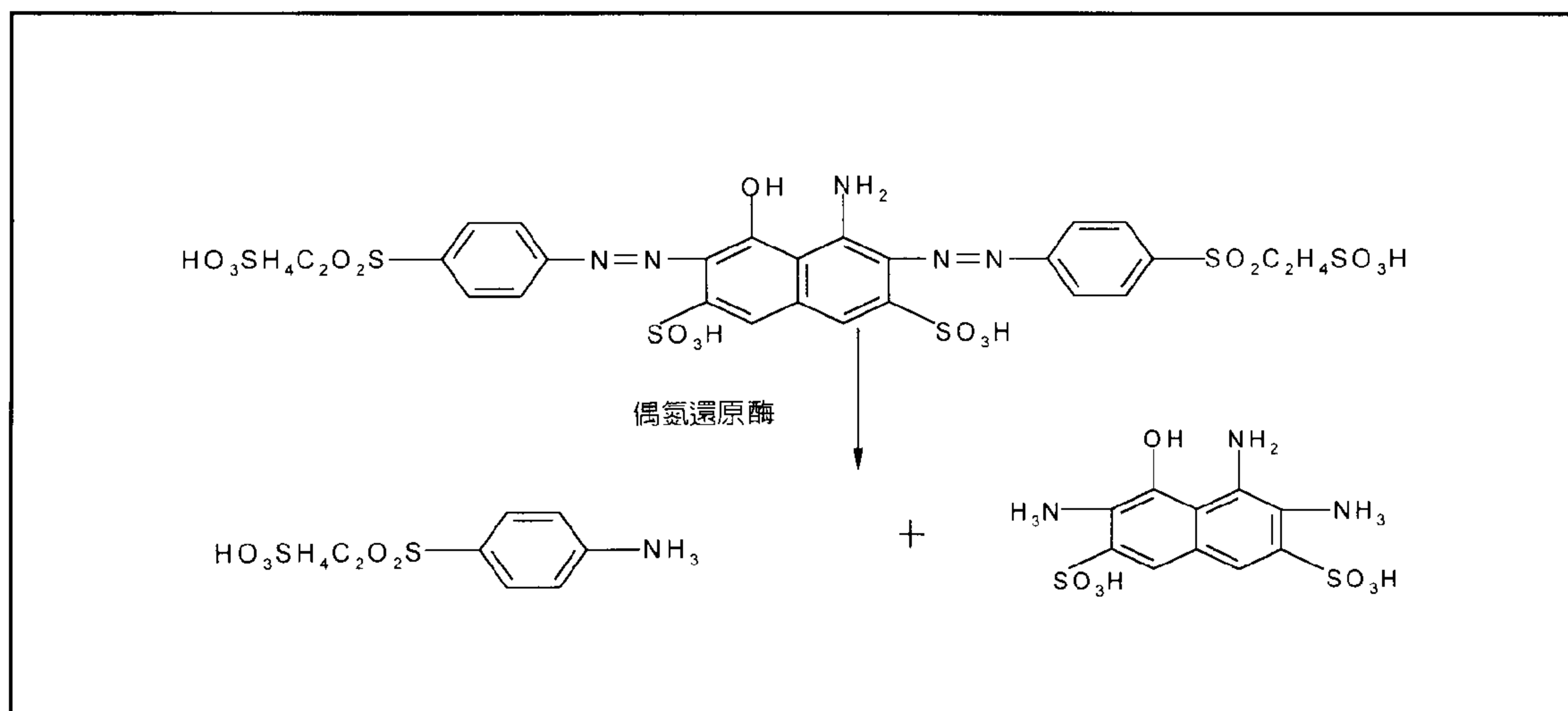


圖7 偶氮染料Reactive Black B被大腸桿菌*E. coli* NO3生物褪色之反應式(葉等，2000)。

(white rot fungus)，亦具有良好的脫色能力 (Chung and Stevens, 1993; 曾與鍾, 1990; Bumpus and Brock, 1988; Cripps et al, 1990; Prouty, 1990)。微生物對染料之降解能力，通常受到許多環境因素之影響，譬如真菌類與細菌類在降解染料時對環境中溶氧量之需求有所差異，前者通常在喜氣狀態下進行褪色，而後者則在厭氣狀態下較能有效率地分解偶氮染料。氮源含量過高會亦會抑制白腐真菌之本質素過氧化酶活性，造成真菌脫色效果降低。此外，硝酸鹽對細菌之偶氮還原作用亦有負面之影響(Chung and Stevens, 1993)。

(一)以真菌類微生物進行生物褪色

白腐真菌類(如*Phanerochaete chrysosporium*)因具有對木質素的分解活性，故能在氮

源限制之狀態下分泌出木質素過氧化酶或Mn-dependent peroxidase (Cripps et al, 1990; Kirk and Farrel, 1987; Banat et al, 1996)而將木質素分解或礦化，並藉著次級代謝的方式降解各種染料分子 (Haug, 1991)。白腐真菌對染料之降解並無明顯的專一性 (Nigam and Marchant, 1995)，但其脫色效率會隨著染料種類、氮源含量與菌株木質素分解活性之不同而改變 (Flores et al, 1997)。在低含氮量的情況下，*P. chrysosporium*對偶氮染料與異環染料(如Orange II、Congo Red、Azure B等)之去色效果，在6小時內可達90%以上；但當氮源過量時，則需5天的時間才能達到63-93%之脫色率 (Cripps et al, 1990)。至於染料種類對白腐真菌脫色效果之影響，以偶氮染料為例，當其環狀結構中含磺酸根時，對白腐真菌脫色之脫色影響不大，但當其結構中含羥基、胺



基、乙胺基或硝基時，則有較佳之褪色效果 (Banat et al, 1996)。

目前有關以微生物進行染料褪色程序的報告，絕大多數是以白腐真菌類為生物觸媒。如 Yang 與 Yu (1996) 以多孔隙之 polyurethane foam 固定化白腐真菌進行分散性染料 Red 533 之褪色反應器設計，結果顯示在培養 4-5 天後，真菌濃度可達 2-3 g/L，而在染料進料濃度範圍為 50-500 mg/L 時，可於 1-2 天內達到 80% 之色度去除率。最近則有 Zhang 等 (1999) 以藻酸鈣包覆之白腐真菌為生物觸媒，設計各種褪色生物反應器組態，包括填充床、饋料批次流化床、連續式流化床等，發現其染料降解效率、操作穩定性與持久性皆相當優異，其中尤以饋料批次流化床最佳，在 1 天內即可將進料濃度為 1,000 mg/L 之 Orange II 去除 97% 以上的色度。雖然白腐真菌具有將染料完全降解之能力，但由於其生長速率通常遠遜於細菌類微生物，且其細胞濃度偏低，故以真菌進行染料廢水褪色較為費時，因而影響其對染料降解處理之整體效率。因此，近年來有不少學者專家致力於以偶氮還原能力為主軸之細菌類染料褪色作用之研究 (Chung and Stevens, 1993; Banat et al, 1996)。

(二) 以細菌類微生物進行生物褪色

過去的研究 (Chung and Stevens, 1993; Banat et al, 1996) 發現能對染料具有褪色作用的細菌有 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Salmonella*、*Enterobacter*、*Streptomyces*、*Rhodococcus* 等，而細菌類對偶氮染料之褪色

能力，通常源於其胞內之偶氮還原酵素之活性 (Zimmermann et al, 1982)。則偶氮還原酵素之作用乃利用 NADH (或 NADPH) 為電子提供者以催化偶氮鍵 (azo bond; $-N=N-$) 之還原反應，使染料之偶氮鍵裂解，形成兩個 aromatic amine 化合物，因而破壞偶氮染料發光團結構，並啟動該染料之降解 (Banat et al, 1996; Zimmermann et al, 1982)。偶氮染料 Reactive Black B 之還原褪色反應式如圖 7 所示。

但 Hu (1994) 與 Chang 等 (2000a) 分別以 *Pseudomonas luteola* 進行偶氮染料 RP2B 與 CI Reactive Red 22 之褪色時，發現該染料之偶氮鍵可能並未完全斷裂，而有部份還原 (partial reduction) 的現象，即 $-N=N-$ 被還原成 $-HN-NH-$ 。偶氮鍵經部份還原後，因 π 鍵遭破壞而產生無色如之中間產物，故亦可造成褪色之現象。

偶氮還原酵素還原偶氮鍵之機制中，溶氧量通常有決定性的影響 (Chung and Stevens, 1993)。當環境中缺氧時，褪色細菌可藉著偶氮還原酵素之作用，選擇偶氮鍵為替代氧氣之電子接受者，而將代謝過程所產生之 electron-rich 化合物 (如 NADH、NADPH 等) 之電子轉移至偶氮鍵，因造成偶氮鍵之斷裂而產生褪色的現象 (Chung and Stevens, 1993; Banat et al, 1996; Zimmermann et al, 1982)；而氧氣的存在則會使細胞內電子之傳遞傾向於以自由氧為終端電子接受者，因而抑制偶氮還原酵素之活性 (Chung and Stevens, 1993)。但亦有些報告指出以細菌類微生物進行喜氣褪色的例子，如 *Streptococcus sp.*、*Proteus sp.*、

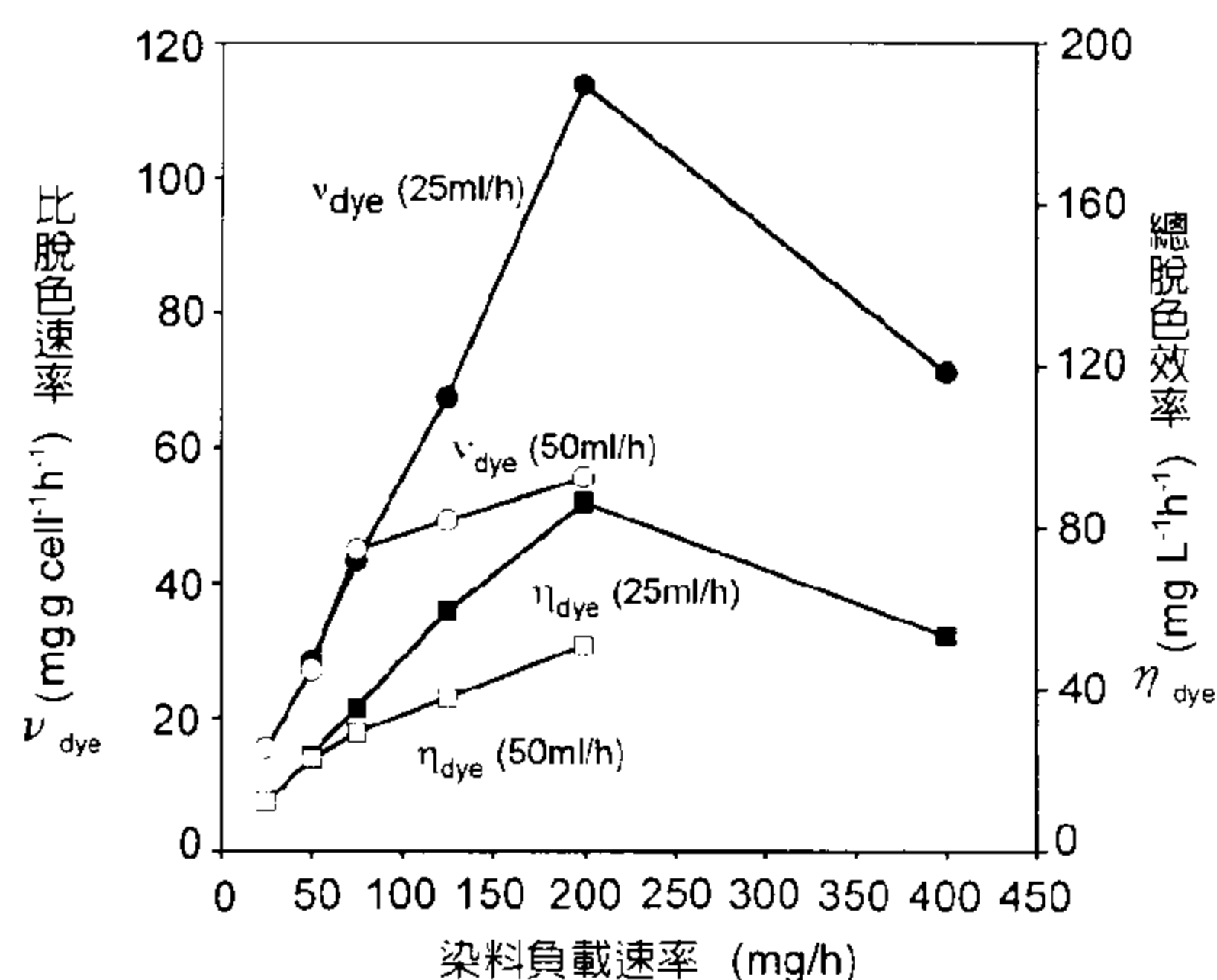


圖8 染料負載速率(dye loading rate)對比褪色速率(specific decolorization rate; v_{dye})與總褪色效率(overall decolorization efficiency; η_{dye})之影響。(體積流量為25 and 50ml/h)。(●: v_{dye} at 25ml/h; ○: v_{dye} at 50ml/h; ■: η_{dye} at 25ml/h; □: η_{dye} at 50ml/h)。(Chang and Lin, 2000)

*Bacillus pyocyaneus*以及*Pseudomonas* sp.等，可在好氧條件下分解偶氮染料(Chung and Stevens, 1993)。

由國內篩選出之染料降解菌*Pseudomonas luteola* (胡與易, 1991)對Reactive Red 22之降解速率可達約40 mg g⁻¹ h⁻¹(林等, 1997)。並發現該菌種在28-32 °C、pH為7~9，而染料濃度為300 ppm時有最佳之褪色速率。最近本實驗室亦篩選出具染料降解能力之大腸桿菌*E. coli* NO3(郭等, 1999; Chang et al., 2000b)，該菌株對偶氮染料Reactive Red 22之褪色速率可高達90 mg g⁻¹h⁻¹以上，且具有極佳之穩定性，在

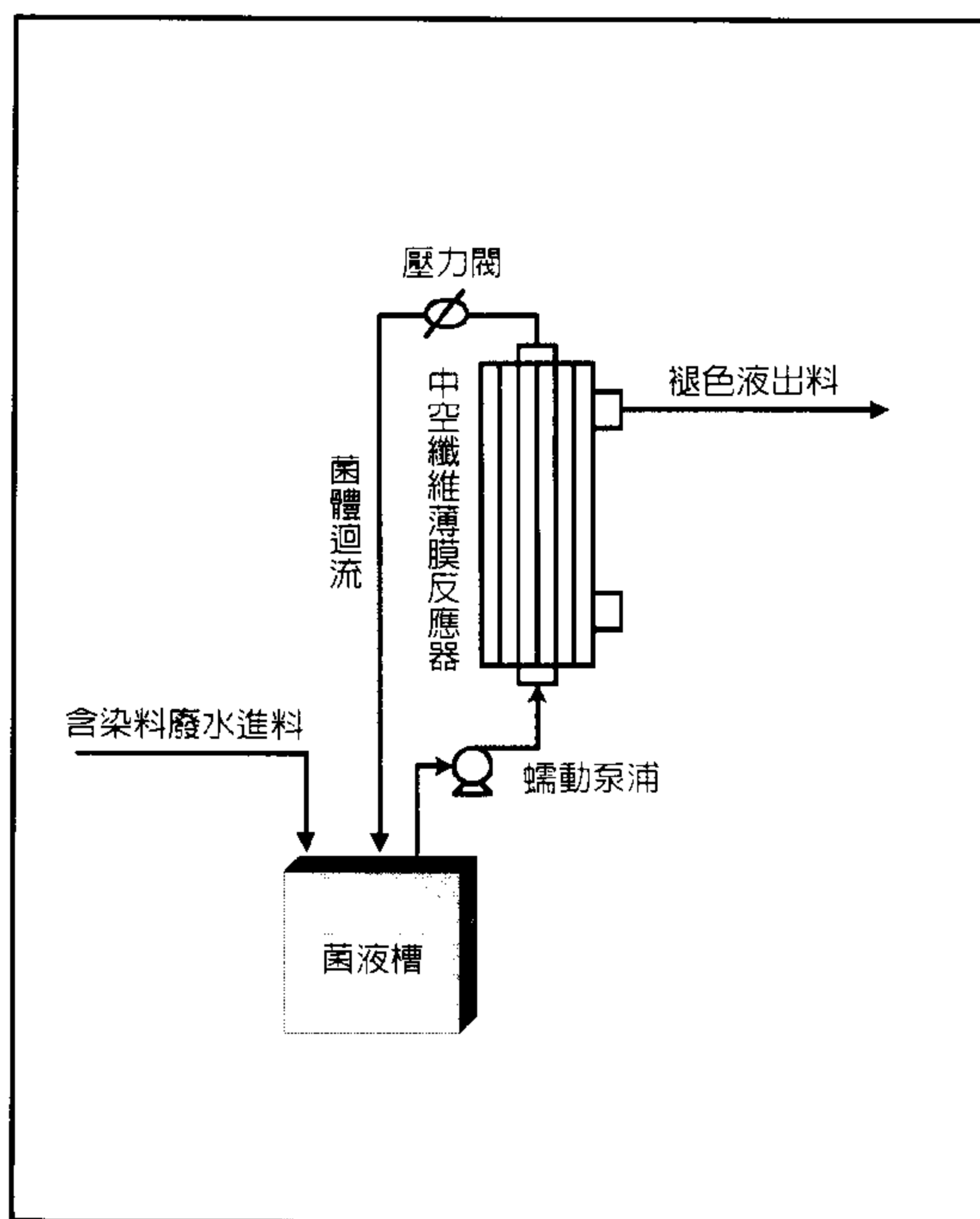


圖9 中空纖維薄膜生物褪色反應器裝置圖(張等, 2000a,b)

重複操作數月後，仍能保持原來的褪色活性(Chang and Kuo, 2000)。Chang等(2000c)亦以固定化細胞進行染料褪色，可提高生物觸媒之機械強度與操作持久性。近年來本實驗室亦嘗試開發以細菌(*P. luteola*)為生物觸媒之褪色程序：如Chang and Lin (2000)以饋料批次策略進行生物褪色反應器之設計，發現其最佳褪色效率可達118 mg/g cell/h，而總褪色效率可達200 mg/L/h，且與染料負載速率略成正比(圖8)。而張等(2000a)則使用中空纖維薄膜反應器(如圖9)進行廢水色度之連續脫色操作，可克服固定化細胞褪色系統之質傳限制，在水力停留時間(HRT)為34 h、染料負載速率為12 mg/h時，其褪色效率達35 mg/L/h

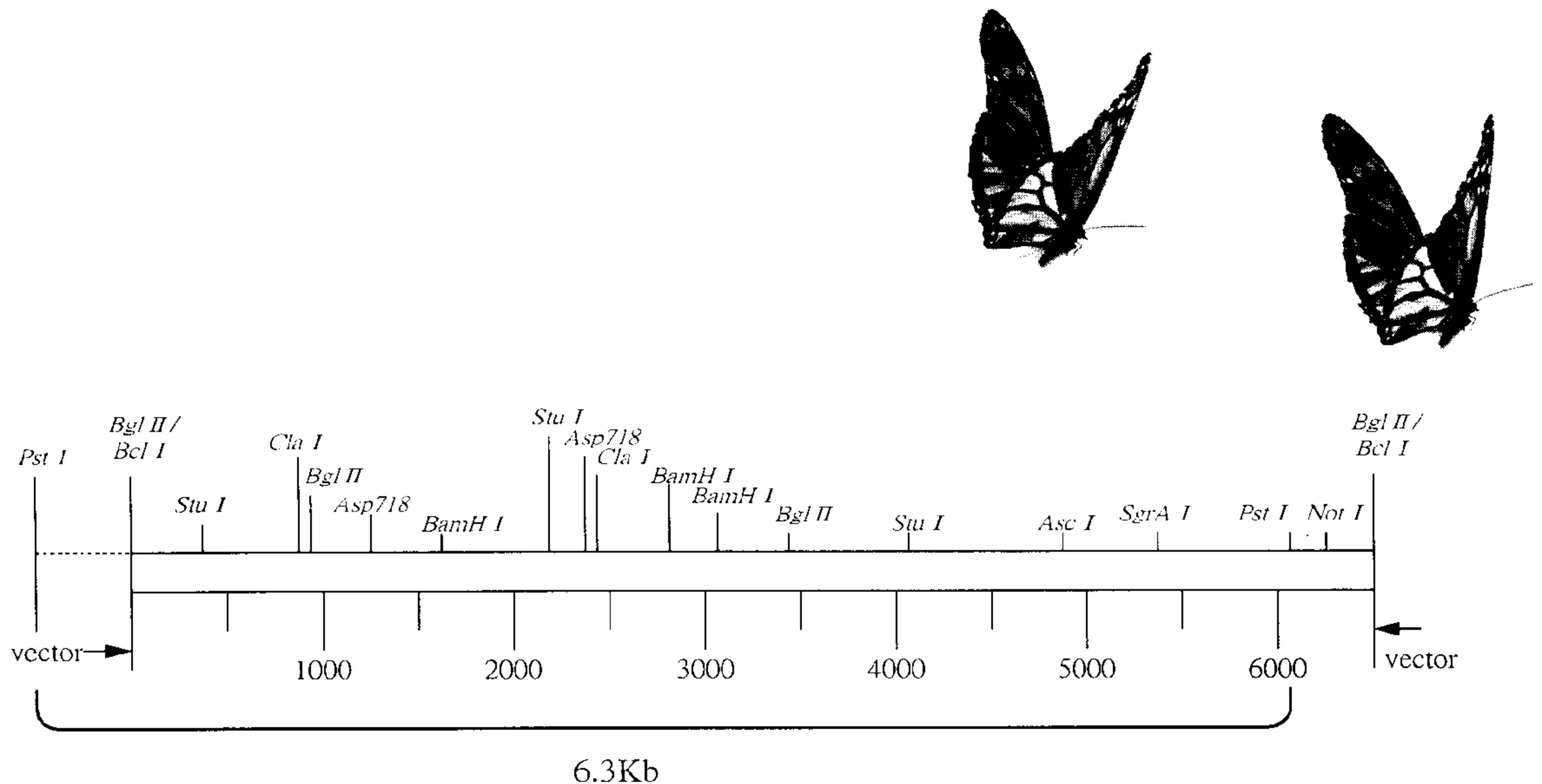


圖10 *Rhodococcus* 染色體中與染料褪色相關之基因片段限制圖(林等，2000)

(張等，2000b)。

欲利用細菌類微生物對染料化合物進行較徹底的分解或礦化，通常混合菌種系統將是較適當的選擇(Haug et al, 1991; Coughlin et al, 1997)。過去曾有學者(Banat et al, 1996)以兩種懸浮態混合菌種PDW與PDC進行多種反應性染料、偶氮染料與分散性染料等之褪色程序，在24小時內可達約70-90%之脫色率，而4天內即可完全褪色。而Nigam與Marchant (1995)以不同載體材料進行混合菌相生物膜褪色程序，針對單偶氮染料Golden Yellow、雙偶氮染料Navy Blue、反應性染料Cibacron Red以及染整業放流水進行色度去除，其效果以利用polyurethane foam chips為擔體時最佳，分別在7~8小時內達到100%之褪色率。此外，尚有利用生物轉盤與連續式培養進行細菌褪色程序之例子(Ogawa and Yatome, 1990; Ogawa et al, 1986)。至於純菌(pure culture)褪色系統之研究，雖直接應用於實際廢水處理之可行性較低，但能被用來鑑定與開發更具效果之褪色菌株，故仍有利於整體微

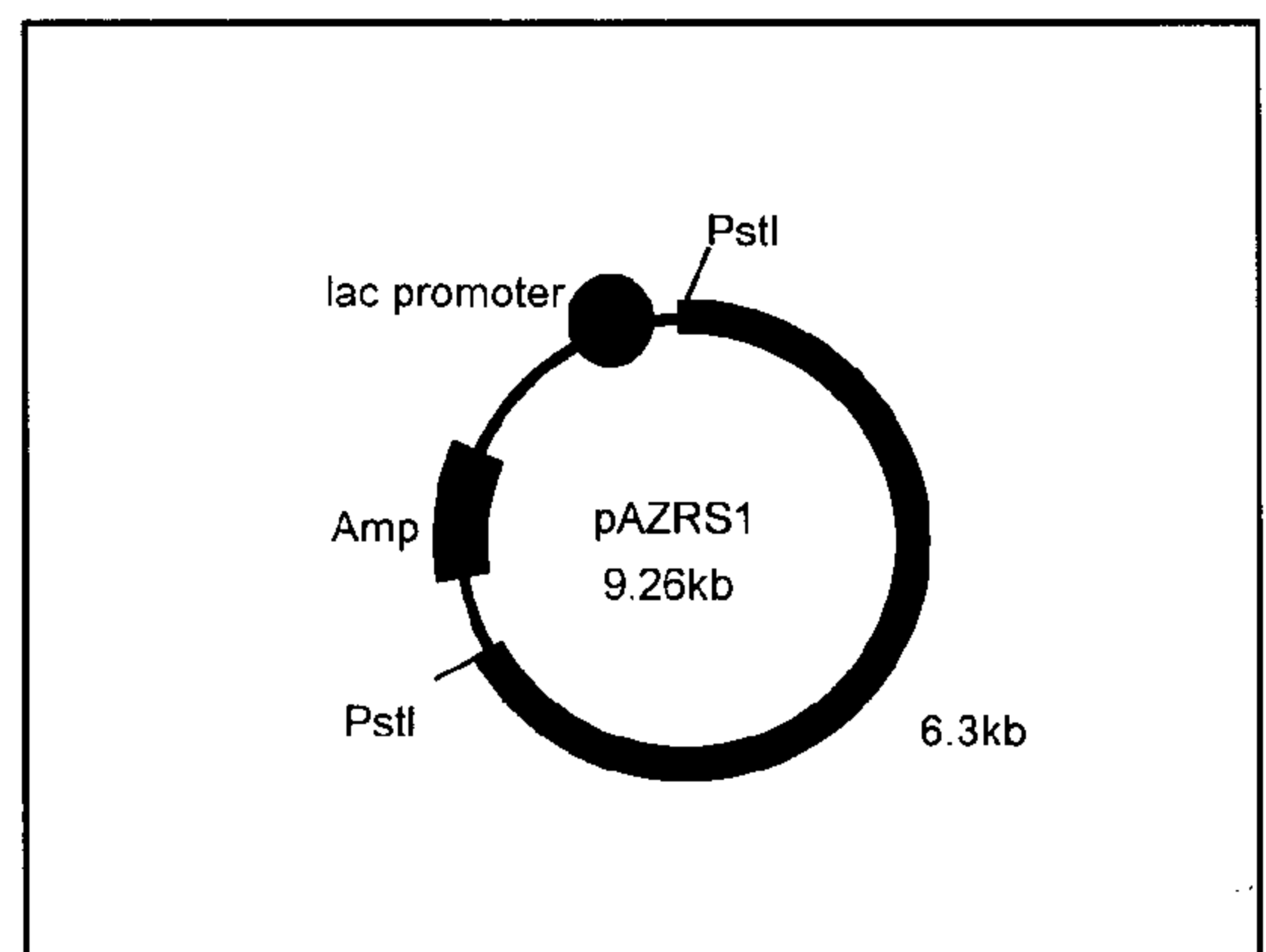


圖11 大腸桿菌(*E.coli* CY1)之質體(pAZRS1)圖

生物染料廢水處理技術之升級。

(三)遺傳工程技術在廢水色度去除之應用

Heiss等(1992)曾以基因重組技術辨識出*Rhodococcus*菌染色體上與染料褪色相關之基因(如圖10)，並將該基因片段(約6.3 kb)重新選殖於不具染料褪色能力之*Rhodococcus*宿主細胞，使其能降解Amido Black及Orange II



(Heiss et al, 1992)。該*Rhodococcus*細胞內之染料降解基因亦由林與張(2000)成功地轉殖至大腸桿菌，所得到之褪色菌體*E. coli* CY1其重組質體 pAZRS1上(如圖 11)含有 lac promoter，故可使用IPTG加以調控，以有效地分解Reactive Red 22與Reactive Black (林等，2000)。*E. coli* CY1在偶氮染料Reactive Red 22起始濃度為200mg/L時之比褪色速率可達8mg/g cell/h，其褪色能力在生理溫度範圍內會隨著溫度增加而提升，但溶氧量之增加則會對褪色作用造成抑制；該重組菌之褪色效果亦會隨著培養基濃度、pH值與染料濃度增加而提升，添加適量之誘導劑(IPTG)亦可將褪色效率提升至2~3倍，同時其重複操作時有優異的穩定性(林等，2000)。最近Rafii與Coleman(1999)成功地利用phage λ gt11建立*Clostridium perfringens* ATCC3626之genomic library，並將其含azoreductase之3.8 kb基因片段轉殖並表現於大腸桿菌中，發現該基因重組菌能有效地將兩種染料FD&C Yellow No.6與FD&C Red No. 4進行褪色。基因工程技術能強化菌體之偶氮還原能力，有助於促進偶氮染料降解之起始步驟，而未來方向可利用基因重組的方式再把蘊含繼續降解還原褪色中間產物(如苯胺類化合物)之基因殖入，以增進染料之降解程度。譬如將aniline oxidase與catechol 2,3-dioxygenase之基因(Fujii et al, 1997)與azoreductase之基因切接於同一質體上並轉型入宿主細胞內，使得偶氮還原活性與苯胺類化合物(aniline)降解活性並存於同一菌株內，而使其具有將染料完全降解之能力。當然，直接使用基因重組微生物於廢水處

理，除了其操作穩定性之考量外，在對自然生態之影響方面，目前仍有爭議；但若朝著大量生產染料褪色用酵素製劑之方向發展，則頗具潛力。

重金屬污染之微生物處理技術

近年來對微生物的重金屬抗性機制的發現與逐漸深入的瞭解，促使學者們對應用微生物技術來處理重金屬污染進行廣泛的研究。重金屬之生物處理基本上可分為生物去毒與生物去除兩類，前者係微生物將重金屬轉換為毒性較小或是無毒性且易於分離的形態，如汞與鉻的酵素性還原去毒，後者係利用微生物生物累積與生物吸附的能力將重金屬從水中去除或回收。其中，重金屬生物去毒的應用尚在起步階段，僅有少數大規模實場操作的案例，如Saouter等(1994)以含抗汞菌株之活性污泥槽，進行有機汞之去毒處理；而利用細菌、真菌、藻類對重金屬之生物吸附作用去除與回收水中重金屬的應用實例則較多，技術亦較為純熟，且部份固定化生物吸附劑(藻類為主)已有商業化產品(徐，1993)。

(一)含汞廢水之微生物去毒程序

微生物將汞還原去毒的機制已被研究得相當透澈(Foster, 1987; Philippidis et al, 1990; Philippidis et al, 1991)，但到目前為止鮮少有文獻進行對於汞去毒生物反應器的探討，而將其實際應用在汞污染處理的例子更少。在

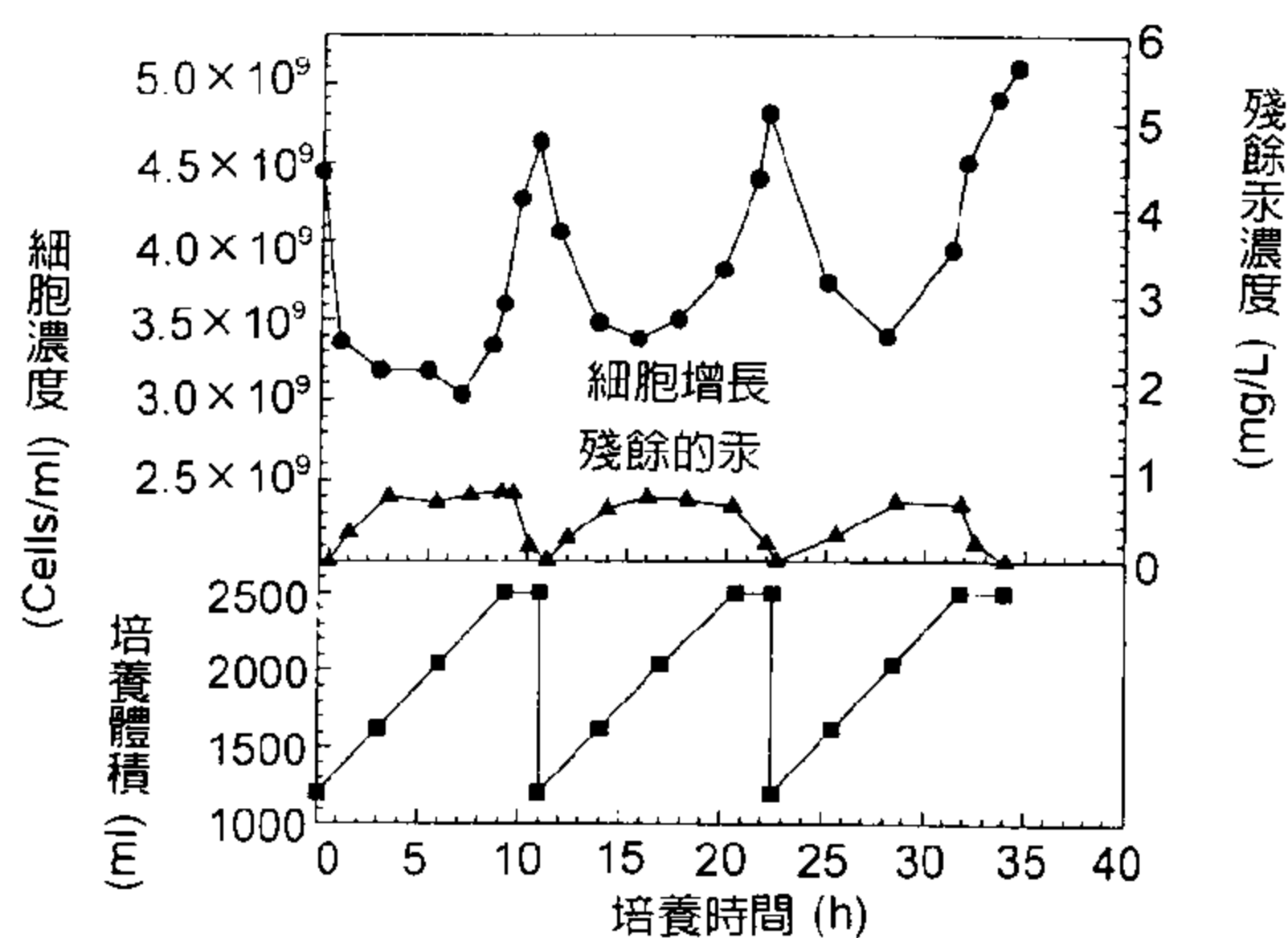


圖 12 以 *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64) 進行重複饋料批次汞去毒程序時細胞濃度、殘餘汞濃度與反應器體積之時間流程。(起始菌體濃度： 4.44×10^9 cells/ml；汞進料流速 16.9 mg Hg/h)。(Chang et al., 1998a)

1968年曾有文獻(Suzuki et al, 1968)提出利用抗汞菌種*Pseudomonas* K62所設計的重複批式生物程序來處理含phenylmercuric acetate之廢水，之後，一直到1990年代才開始有汞廢水生物處理程序的文獻出現；如Saouter等(1994)利用活性污泥程序進行有機汞之去毒處理，而筆者最近亦以高抗汞性細菌*Pseudomonas aeruginosa*與基因重組大腸桿菌(*Escherichia coli* PWS1)為生物觸媒，進行一系列的汞去毒反應器研究(Chang and Law, 1998; Chang et al, 1998a)，並發現重複饋料批次反應器之效果最佳(圖12)，其汞去毒效率高達 5.60 mg Hg/L/h，優於Chemostat反應器的 1.94 mg Hg/L/h，亦遠勝於批次反應器之汞去

毒效率(Chang et al, 1998)。文獻上也有利用固定化細胞進行汞去毒處理的例子，如Ghosh等(1996)以包覆*Azotobacter chroococcum*菌株的藻酸鈣顆粒進行HgCl₂之還原去毒，並發現固定化菌體之汞去毒效率與貯存穩定性皆遠大於未包覆之菌體，且於四次連續24小時之汞去毒操作後，該固定化細胞之汞去毒活性還可維持在90%以上(Ghosh et al, 1996)。除了利用固定化抗汞細菌進行汞去毒處理外，藻酸鈣固定化藻類細胞(*Chlorella emersonii*)也被利用來處理含HgCl₂之廢水(Wilkinson et al, 1989)，且發現該固定化細胞除了可以進行酵素性汞還原反應外，亦可大量吸收累積環境中的汞離子。

除了利用抗汞菌種全細胞來進行汞去毒處理外，也有直接利用汞還原酵素進行汞去毒的例子。該酵素之分離純化技術已十分純熟(Fox and Walsh, 1982)但一直到1992年才由UO等人(1992)將汞還原酵素以共價鍵結的方式固定在多孔玻璃表面來進行批次汞還原作用之測試，但將該固定化酵素應用在含汞廢水之處理上，還在實驗室研究階段。目前僅有Anspach等(1994)及Chang等(1999)將矽藻土載體以各種方法活化後，將由*Pseudomonas putida* KT2442:mer-73(Anspach et al, 1994)與*Escherichia coli* PWS1(Chang et al, 1999)取得之純化汞還原酵素鍵結在該固定化載體上，以批次與固定床方式進行汞廢水之去毒處理，其最佳汞去毒速率分別可達 38 nmol/min(Anspach et al, 1994)與 43 nmol/min(Chang et al, 1999)。以酵素直接進行生物轉換可免除質傳之影響，進而促進汞去毒速

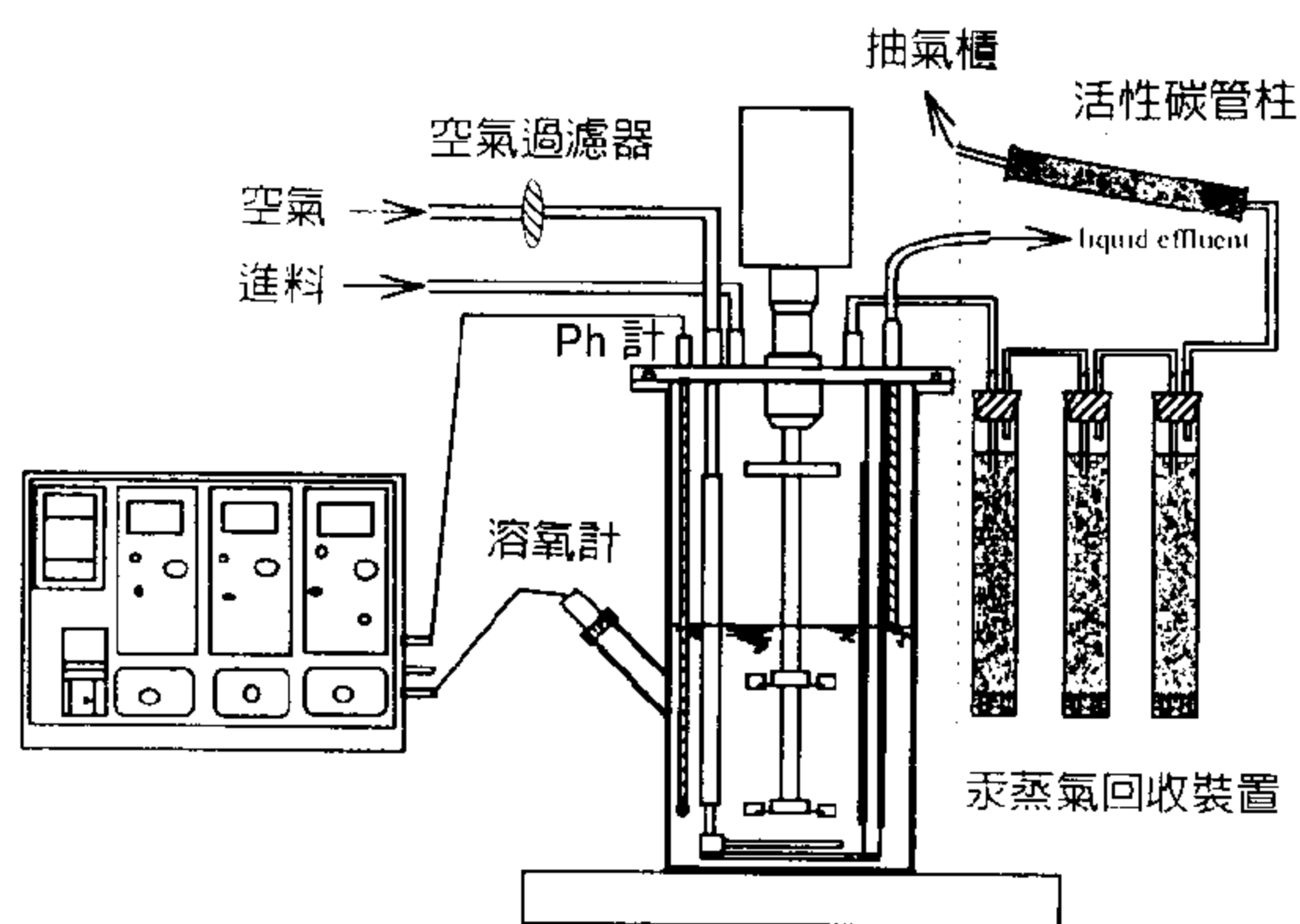


圖13 生物觸媒汞去毒反應器裝置圖(Chang and Law, 1998)

率，但由於汞還原酵素需以價格昂貴的NADPH或NADH為輔因子，因此在實際應用上要先克服需添加輔因子之瓶頸。

在遺傳工程的應用方面，除了在分子遺傳層次改良汞去毒的機制外，還可用在大量製造汞還原酵素，以提供固定化酵素生物觸媒之需，如本實驗室曾建構基因改質大腸桿菌(*E. coli* PWS1)，並以IPTG的誘導來大量生產汞還原酵素(Chang et al, 1998)。在酵素固定化程序的應用上，由於需要外加價格昂貴的輔因子NADPH或NADH來提供電子，因此如何將輔因子再生利用或是研發廉價的輔因子替代品，也將是值得探討的課題。本實驗室曾在固定化汞還原酵素去毒程序中，以分子結構與NADPH類似的染料(如neutral red、azure A等)當作替代電子提供者來進行汞還原實驗，發現汞還原速率可達使用NADPH時的80%以上，其中以neutral red之效果最佳

(Chang et al, 1999)。有關以微生物觸媒進行汞去毒處理之反應器配置圖如圖13所示，其氣體出口需添加汞蒸汽回收裝置，以收集回收汞去毒產物(Hg^0)，並確保該生物程序的安全性。

(二)重金屬之生物吸附與回收

1.重金屬生物吸附劑簡介

生物吸附有代謝相關型(如胞內累積)與代謝無關型(如細胞表面吸附)，即活細胞與死細胞皆具有累積或吸附重金屬的能力(Gadd, 1988)，因此可利用具生長能力之生物體活細胞或是死細胞來製備固定化生物吸附劑。活細胞生物吸附劑兼具細胞表面吸附與胞內外累積重金屬之能力，故其對重金屬之去除容量通常大於僅具表面吸附能力的死細胞生物吸附劑，但由於重金屬之胞內外累積牽涉到金屬離子輸送或是代謝產物之生成，故其重金屬之去除速率反而不如與代謝無關的細胞表面吸附。利用死細胞當作生物吸附劑可免除為維持細胞存活所需要的在成本與硬體上的耗費，且因不受重金屬毒害之影響，故可用在處理高重金屬濃度之廢水，在操作與回收再生處理上都較活細胞生物吸附劑來得簡便，但由於其重金屬去除機制主要是靠細胞表面吸附，因此共存離子效應與pH值之影響頗大。目前已經上市的重金屬生物吸附程序有利用枯草桿菌(*Bacillus*)死細胞為吸附劑的BIOCAIM程序，以矽膠與藻類死細胞製備之固定化生物吸附劑(ALGA SORB程序)，以及使用高溫處理之微生物、苔蘚與藻類粉末之BIO-FIX程序(徐, 1993)。利用活細胞的生物



累積作用來處理重金屬的例子有利用藻類來去除採礦廢水所含重金屬的Natural-Setting系統 (Jackson, 1978)，還有利用微生物胞外高分子聚合物進行金屬在細胞外沉澱累積的例子 (Brierley et al, 1989)。

生物吸附劑對重金屬之吸附容量與傳統的吸附劑(如離子交換樹脂、活性碳等)相當，有些甚至優於傳統吸附劑：如*Pseudomonas aeruginosa* PU21死細胞對汞離子之吸附速率與吸附容量皆大於陽離子交換樹脂AG 50W-X8 resin (Chang and Hong, 1994)。以矽膠製備之固定化海草(seaweed)與地衣(lichen)細胞對多種重金屬(如Cu、Zn、Cd、Pb、Cr、Ni等)之吸附效果亦優於已商業化之iminodiacetate chelating resin(Ramelow et al, 1993)。但Spinti等(1995)則發現以polysulfone多孔性載體包覆苔蘚類細胞之生物吸附劑其對兩價重金屬離子之吸附容量略小於兩種上市的離子交換樹脂。除了吸附容量之外，生物吸附劑因其吸附或累積機制之影響，所以一般而言對重金屬之選擇性較傳統的吸附劑為佳 (Chang and Hong, 1994)，故可應用於高價值金屬之回收(Darnell et al, 1986)。

2.以細菌類細胞進行重金屬生物吸附

細菌類細胞表面含有許多重金屬鍵結位置，可以吸附各種不同種類之重金屬與放射性金屬 (Gadd, 1988)。如 *Bacillus megaterium*、*Micrococcus lysodeikticus*及 *Streptococcus mutans*等能吸附各種重金屬，並對 La、Cd等之吸附容量最佳 (Gadd, 1988)。細菌對重金屬之吸附容量可高達600 mg/g如*Bacillus subtilis* (Volesky and Holan,

1995)，而*P. aeruginosa*對汞離子也有250 mg/g的容量 (Chang et al, 1994)。Nakajima與Sakaguchi (1986)以聚丙烯醯胺固定化32種細菌細胞，並發現其中以*P. stutzeri*對鈾之吸附效果最佳。藻酸鈣或矽膠固定化*Zoogloea*細胞亦對銅、鎘、鋅、鉻(Cu>Cd>Zn>Cr)有優異的吸附能力。*Citrobacter sp.* 能在細胞表面產生大量磷酸根以促進金屬在細胞表面之沉澱累積，故該菌株被固定化在polysulfone (Puranik and Paknikar, 1999)或聚丙烯醯胺 (Yong and Macaskie, 1998)載體上進行對Hg、Pb、Cd、Zn、U、La、Th之去除。聚丙烯醯胺包覆*Enterobacter sp.*對Ni之吸附量，以pH7-8、30°C時最佳(約30 mg/g)；而菌體培養時間、培養基組成與重金屬滯留時間之影響則不大(Wong and Kwok, 1992)。此外，假單胞菌類(*Pseudomonas*)細胞也常被用來製備生物吸附劑(Chang et al, 1997)，如筆者以藻酸鈣、聚丙烯醯胺或中空纖維微過濾膜包覆之*P. aeruginosa* PU21細胞 (Chang and Chen, 1999; Chang et al, 1998c; Chang and Huang, 1998)，可有效地吸附Hg、Pb、Cu、Cd，其最佳吸附容量分別為1250、1500、2500、800 μ mol/g。*P. putida* 5-X細胞也被固定在HCl-treated magnetite上，對100 mg/L的銅具有96%以上之去除率(Chua, 1998)。而聚乙烯醇包覆之*P. putida*菌株 (Ledakowicz, 1995)與以polyurethane包覆之*P. aeruginosa* CSU (Hu and Reeves, 1997)亦分別具優異的汞與鈾去除效果。

3.以真菌與藻類細胞進行重金屬生物吸附

真菌類微生物(如*Rhizopus*與*Penicillium*



等)能吸附或累積大量的重金屬，然其比吸附容量通常不超過100 mg/g (Volesky and Holan, 1995)，比一般細菌類之容量略少，但由於真菌所產生之biomass量遠大於細菌，故其總吸附容量仍大於細菌。真菌類死細胞之生物吸附機制乃由於其細胞壁組成中含有容易與金屬離子鍵結之官能基，如胺基、磷酸基、硫醇基等(Gadd, 1988)。而真菌類活細胞亦能對各種金屬進行與代謝相關的胞內吸收，但為保持細胞活性通常其胞內吸附會受到溫度與能量來源(如葡萄糖)的影響，且會受到環境中其它共存陽離子如(錳、鐵、鈣、鎂)的抑制(Gadd, 1988)。Volesky與Holan (1995)探討固定化*R. arrhizus*細胞對鉛、鎘、銅、鋅之個別離子與共存離子吸附平衡，並以數學模式來描述與預測共存離子競爭吸附之現象。*R. arrhizus*對鈾離子之吸附首先鈾離子會與細胞表面幾丁質所含之胺基錯合，同時有部分鈾離子亦迅速吸附至細胞壁之幾丁質組織內，然後鈾離子進行水合反應形成氫氧化鈾沉澱，其中氫氧化鈾沉澱是速率決定步驟(Tsezos and Volesky, 1982)。Nakajima與Sakaguchi (1993)曾測試46種擔子菌類對鈾的吸附能力，發現各菌株對各重金屬之吸附量各異，其中有三株菌對的鈾累積量最大，並以*Tricholoma conglobactum*對鈾的累積最具有選擇性，且可以1 M的 Na_2CO_3 將鈾脫附回收。Prakasham等(1999)以固定化*R. arrhizus*細胞進行連續式鉻離子吸附程序，其結果顯示流化床程序對鉻之去除較CSTR有效率。以Polysulfone固定化之*Aspergillus niger*細胞曾被填充在固定床管柱以進行重金屬之連續去

除(Kapoor and Viraraghavan, 1998)，該固定化生物吸附劑對Cd、Cu、Pb、Ni之吸附容量分別為 3.60、2.89、10.05、及1.08 mg/g，且吸附後之重金屬可使用0.05 N之硝酸加以回收。Stoll與Duncan (1997)以及Brady等(1994)利用微過濾膜及天然與合成膠體(如聚乙烯醇、藻酸鈣、藻酸鈣加PEI等)包覆酵母菌(*S. cerevisiae*)死細胞，並以各種反應器組態進行對Cu、Cd、Cr、Ni、Zn之連續式生物吸附。並有學者發現而酵母菌細胞經formaldehyde或NaOH處理後對重金屬之吸附速率優於未經處理之酵母細胞(Shumate II et al., 1985; Lu and Wilkins, 1996)。

藻類細胞因具有較大的表面積與生物質量，且較無致病之顧慮，故是最常被商業化的生物吸附劑(徐, 1993)。一般而言，每克藻類細胞對重金屬之吸附容量約在100—400毫克之間，尤以brown algae為佳(Volesky and Holan, 1995)。藻類細胞對重金屬之去除主要以代謝無關之細胞表面鍵結為主。藻類細胞表面吸附之基位通常是一些多醣類、纖維素、uronic acid及蛋白質，重金屬可能由與這些蛋白質與多醣類形成離子親和力或共價鍵，而產生生物吸附的現象(Gadd, 1988)。藻類重金屬吸附劑通常以固定化細胞的方式製備，如以藻酸鈣與瓊脂(agrose)包覆*Chlorella vulgaris*對六價鉻離子與銅離子進行固定床吸附程序(Aksu et al., 1998; 1999)，結果發現以瓊脂固定化細胞之效果較好。Ramelow等(1996)指出以polysulfone等合成高分子固定化之藻類細胞對重金屬之去除效果較固定化苔蘚細胞與植物細胞為佳。其它如*C. emersonii*

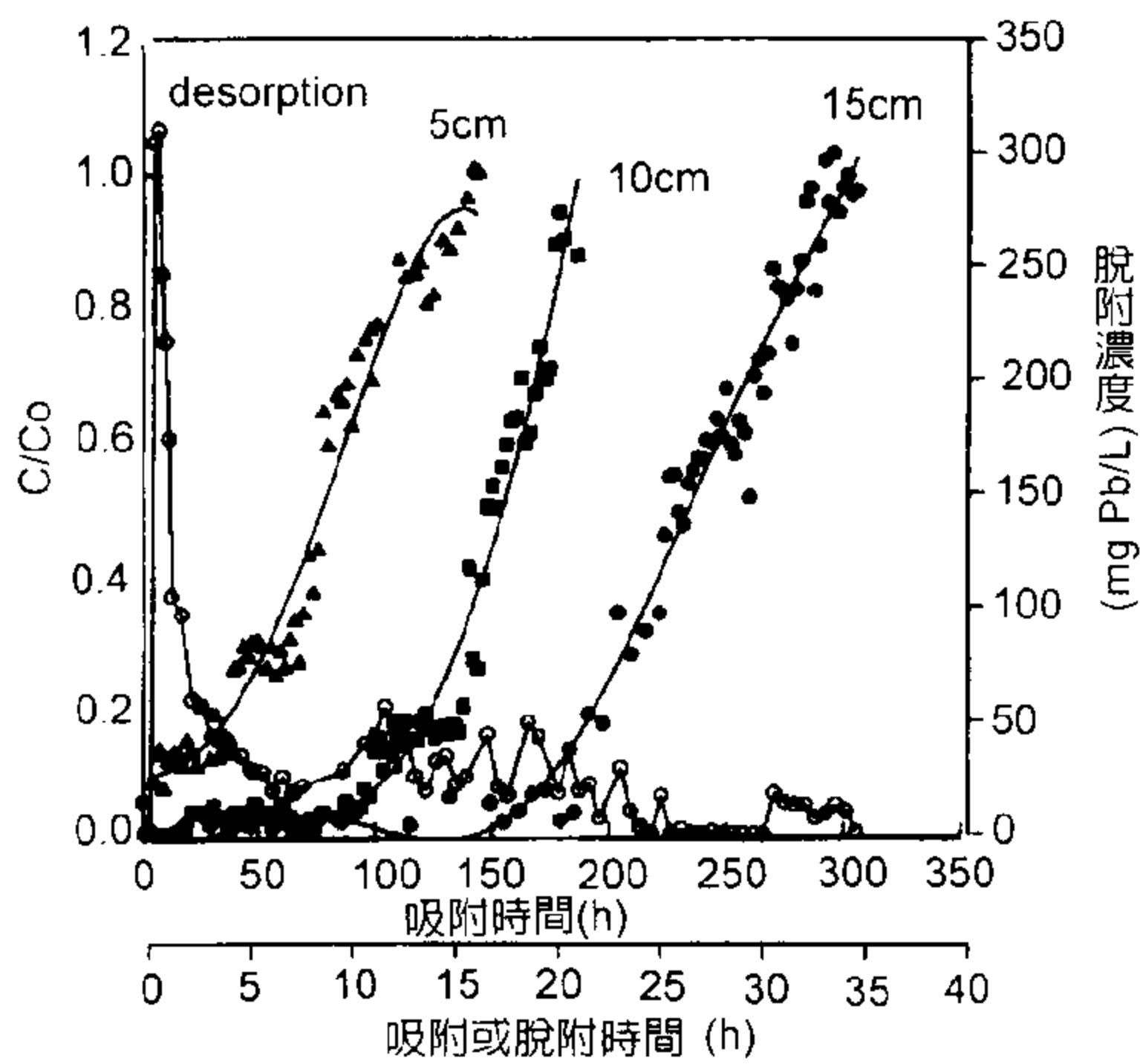
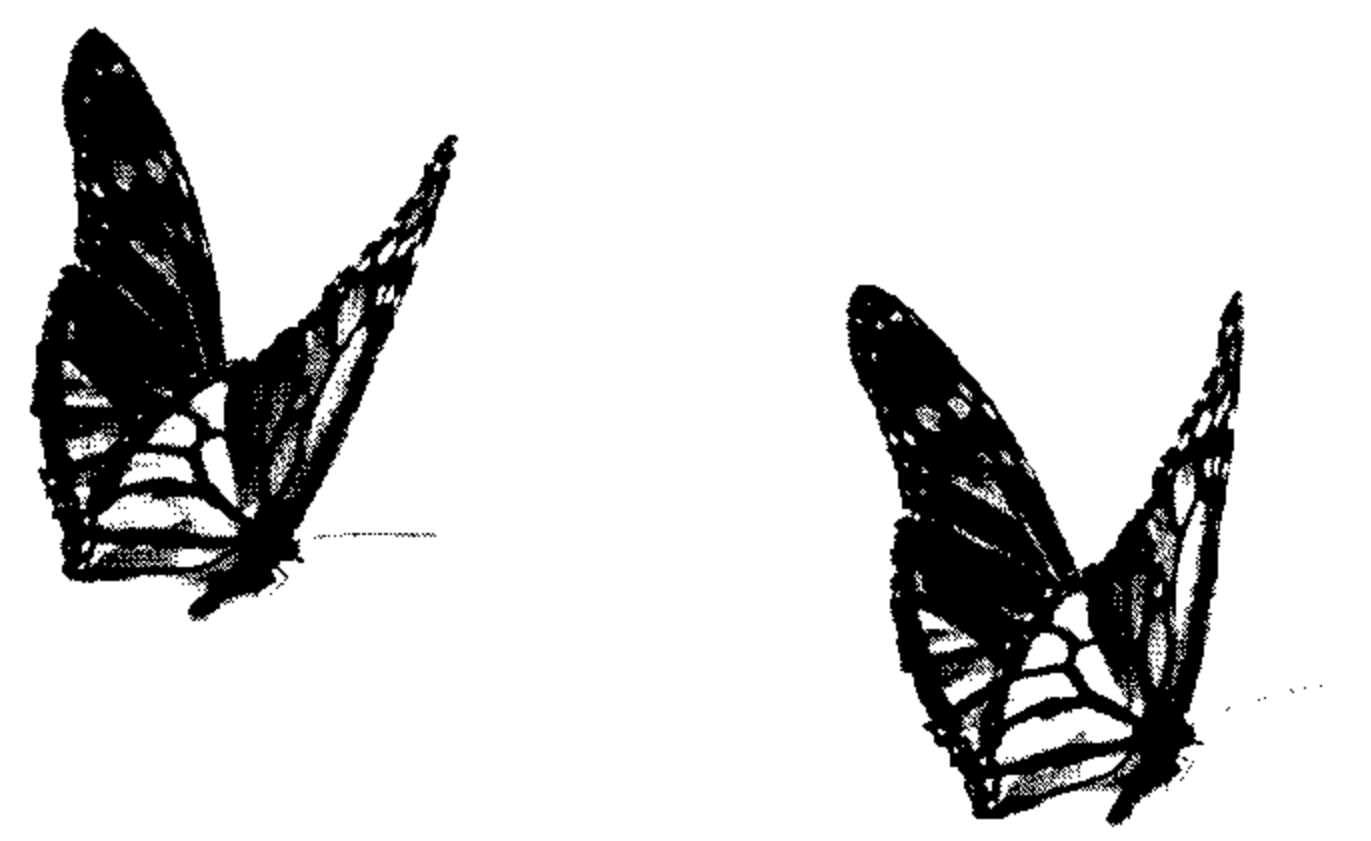


圖14 藻酸鈣固定化細胞填充床對鉛之生物
吸附穿透曲線(Chang et al.,1998c)

(Robinson and Wilkinson, 1994)與*C. salina* (Garnham et al, 1992)亦曾被固定在藻酸鈣與瓊脂膠體，並以固定床方式進行重金屬離子之去除。

4.重金屬生物吸附與回收之程序設計

利用生物吸附劑開發重金屬之吸附與回收程序，通常需將生物體固定化，以簡化生物吸附劑再生使用步驟，並利於連續操作。以固定化細胞設計的連續式重金屬去除程序包括連續攪拌反應器(CSTR)、固定床、流化床、生物膜及微過濾膜反應器等；各反應器組態各有其優缺點，但以實際應用的角度來看，以固定床程序最有潛力也最為普遍。典型的固定床重金屬生物吸附程序，其金屬去除之穿透曲線與金屬進料量、體積流量與床高等參數皆息息相關(如圖14)。若進料中含多

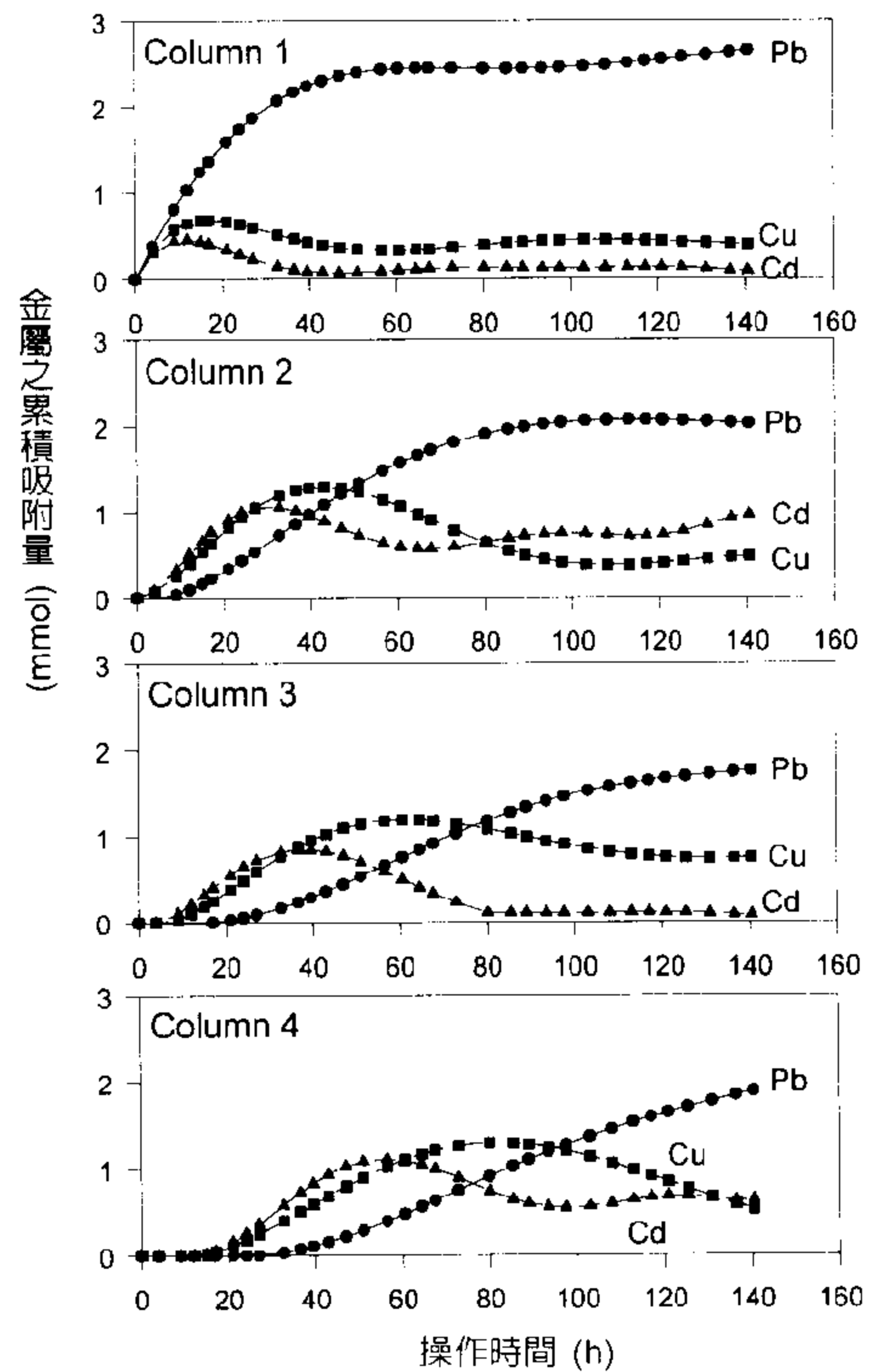


圖15 鉛、銅、鎘以等莫爾濃度(193mM)進料進行多管柱固定化細胞填充床生物吸附程序時各管柱中各重金屬之累積吸附量曲線。(Chang and Huang, 1998)

成分重金屬，則競爭吸附的現象會造成複雜的吸附流程。本實驗室曾利用四個串聯固定化細胞管柱，以含三種與生物吸附劑親和力不同的金屬(Pb、Cu、Cd)為進料，選擇性地將三種金屬分別吸附在不同階段的管柱中，其結果如圖15所示(Chang and Huang, 1998)；其中由於鉛的競爭吸附能力較強，故鉛的吸

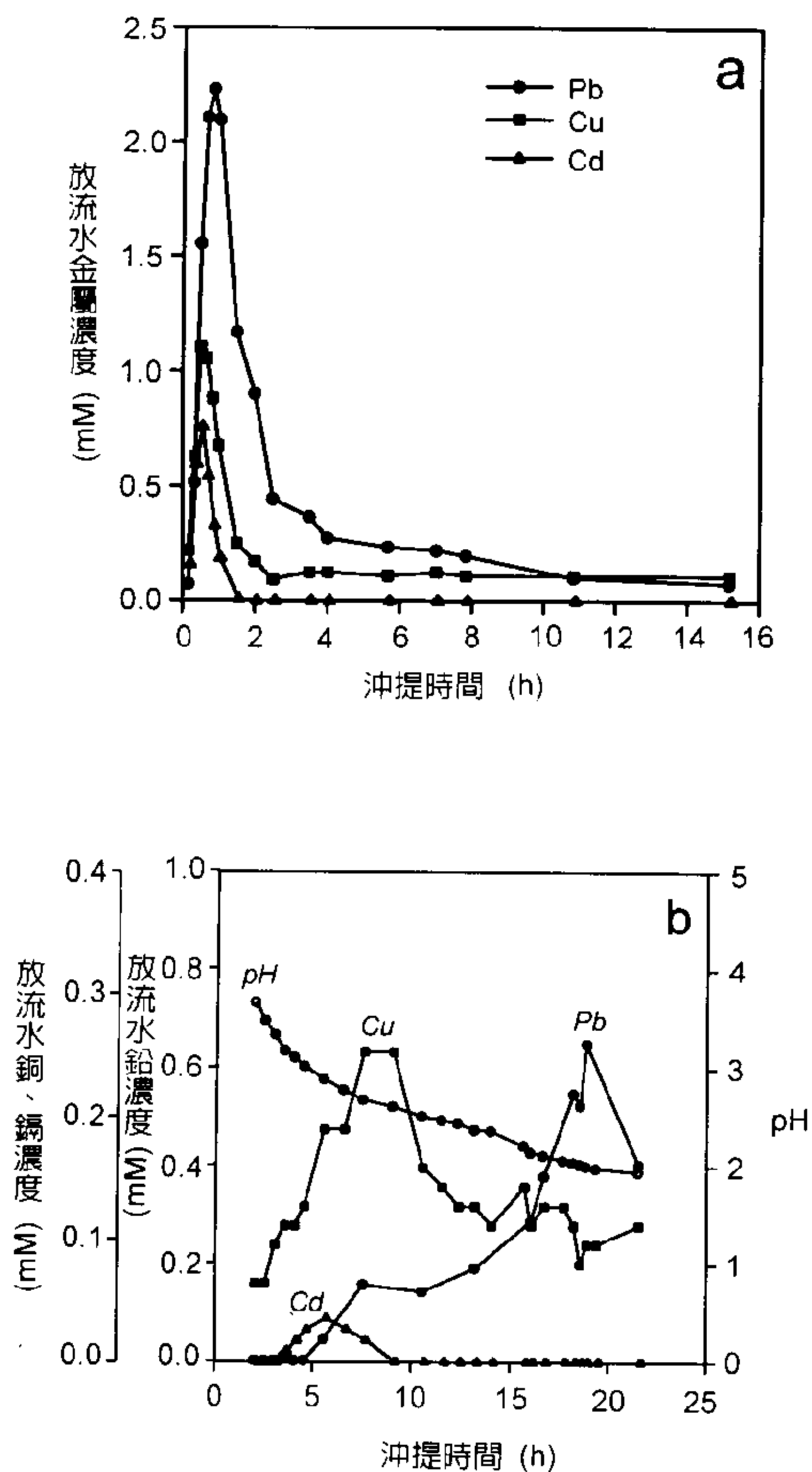


圖16 從重金屬生物吸附管柱進行Pb(●)、Cu(■)、Cd(▲)之脫附回收。(a)固定pH值HCl溶液之脫附曲線(b)梯度脫附(pH 3.8 ~ 1.9)曲線(○：pH profile) (Chang and Huang, 1998)

附會發生在較前面的管柱，而銅與鎘的吸附量則依序出現於較後面的管柱，故可利用此多管柱生物吸附系統，藉著適當的操作策略與管柱數量，將不同的重金屬在不同管柱內

加以回收。

由於低pH值通常不利於重金屬之吸附，因此固定化吸附劑經吸附飽和後，最常用的重金屬脫附回收與吸附劑再生之方式即為酸洗處理，如以HCl (Chang and Chen, 1999; Chang et al, 1998c; Chang and Huang, 1998; Chua et al, 1998; Gardeatorresdey et al, 1996; Wilhelmi and Duncan, 1996)、 H_2SO_4 (Sag et al, 1995)及 HNO_3 (Kapoor and Viraraghavan, 1998)來改變溶液之pH值。酸洗脫附的重金屬回收效果一般均可達90%以上，且由於其脫附速率極快，故能以少量的酸液體積回收大量的重金屬，以達到濃縮的目的。酸洗處理較適合使用於代謝無關型生物吸附劑，因pH過低可能造成細胞死亡，故不利於代謝相關型之生物累積。當在填充床之生物體同時吸附多種重金屬時，以pH遞減之酸液梯度沖提，可將不同的重金屬分離回收(Chang and Huang, 1998; Darnell et al, 1986)。如圖16所示，已吸附Pb、Cu、Cd之固定化*P. aeruginosa* PU21細胞可藉著HCl之梯度沖提，在不同的沖提時間回收三種金屬，且其收集時間依吸附強度之增加(Pb > Cu > Cd)而延長(Chang and Huang, 1998)。除了酸洗脫附外，亦可以 Na_2CO_3 (Nakajima and Sakaguchi, 1993)或螯合劑(Vecchio et al, 1998)來進行脫附回收，其效果雖不如酸洗處理，但卻可避免酸洗處理對細胞之重金屬吸附位置可能造成的破壞。

5.遺傳工程在重金屬生物吸附之應用

欲增進生物吸附在重金屬處理技術之應用，除了需從環境中篩選對重金屬具高吸附



容量或高選擇性之生物體外，亦可經由基因重組技術改良與促進生物吸附劑之吸附容量或專一性。可著手的方向包括以遺傳工程方法來促進細胞表面重金屬鍵結基位成份大量合成以提昇代謝無關型生物吸附之細胞表面吸附容量與專一性，如Chen等(1998)以基因改質的方法大量表現抗汞大腸桿菌之MerT與MerP蛋白質，以增加該菌體細胞表面之重金屬吸附位置，並將該基因重組菌體以中空纖維微過濾膜固定化進行連續式重金屬廢水處理，發現其對汞離子的吸附去除效果可大幅提升。而代謝相關型生物吸收累積之效率，亦可利用基因重組技術大量合成生物體之特定蛋白質，如運輸蛋白、metallothionein(MT蛋白質)或磷酸酶，進而增進重金屬在細胞內外之累積效果(Jeong et al, 1997; Romeyer et al, 1988)；如以能過量生產磷酸酶的基因突變菌種(*Citrobacter sp*)經聚丙烯醯胺固定化進行鈾金屬化合物(UO_2^{2+})大量累積(Jeong et al., 1997)。Romeyer等(1988)將人類肝臟的MT基因轉殖至大腸桿菌中，並大量製造MT蛋白質以促進該菌對鎘之胞內累積；研究結果顯示，該菌體對鎘的吸收量與胞內MT蛋白質的生成量成正比。此外，為克服金屬離子質傳速率之限制(Gadd, 1988)亦可以基因重組技術促進細胞膜金屬離子運輸系統的效率，如加強錳或鎂離子輸送系統或大量表現運輸蛋白質以輔助重金屬離子之輸送。

結 論

在環境污染問題成為全球性危機之際，

除了政府需儘速制定賴以永續生存的環保法規，並以公權力規範人民切實貫徹環保政策及培養環保習慣外，更需加速探討如何運用大自然的力量，將人類對環境所造成的傷害降到最低。因此，對於微生物在生態環境中所扮演的清道夫角色，必須能正確並有效率地運用，使得人類所製造的污染能逐漸與自然環境對污染物的消化容量趨於平衡。此種生物復育的概念需以環保微生物科技作後盾，除了篩選開發能分解各種污染物之微生物外，並以遺傳工程技術促進各污染物之微生物分解者的廣效性與分解效率；此外，更需結合工程技術以設計開發能大規模處理污染物之微生物程序，並以合乎經濟效益的方式實際運用於各污染源之處理。除了消極地以微生物技術進行污染物降解處理外，亦可積極地將污染物之有機與無機物質轉化為有經濟價值的資源。譬如，廢水中重金屬或稀有金屬之回收利用；以微生物厭氣代謝進行甲烷、氫氣或酒精之生成，進而產生能源；以微生物之喜氣代謝進行纖維素與木質素之糖化，以提供生物體生長之碳源或能源。至於微生物分解有機污染物之最終代謝產物—— CO_2 ，亦可藉著光合菌或藻類將其轉換成碳水化合物以再生利用，並降低溫室效應之發生。總而言之，人類長期摧殘自然環境所造成之後果，亦需靠人類對生態保護之覺醒與運用自然力量之智慧來消弭解決。尤其是地狹人稠但工業高度發展之台灣寶島，對環境保護更需加倍努力，期能為後代子孫保留一片適合生存之淨土。



參考資料

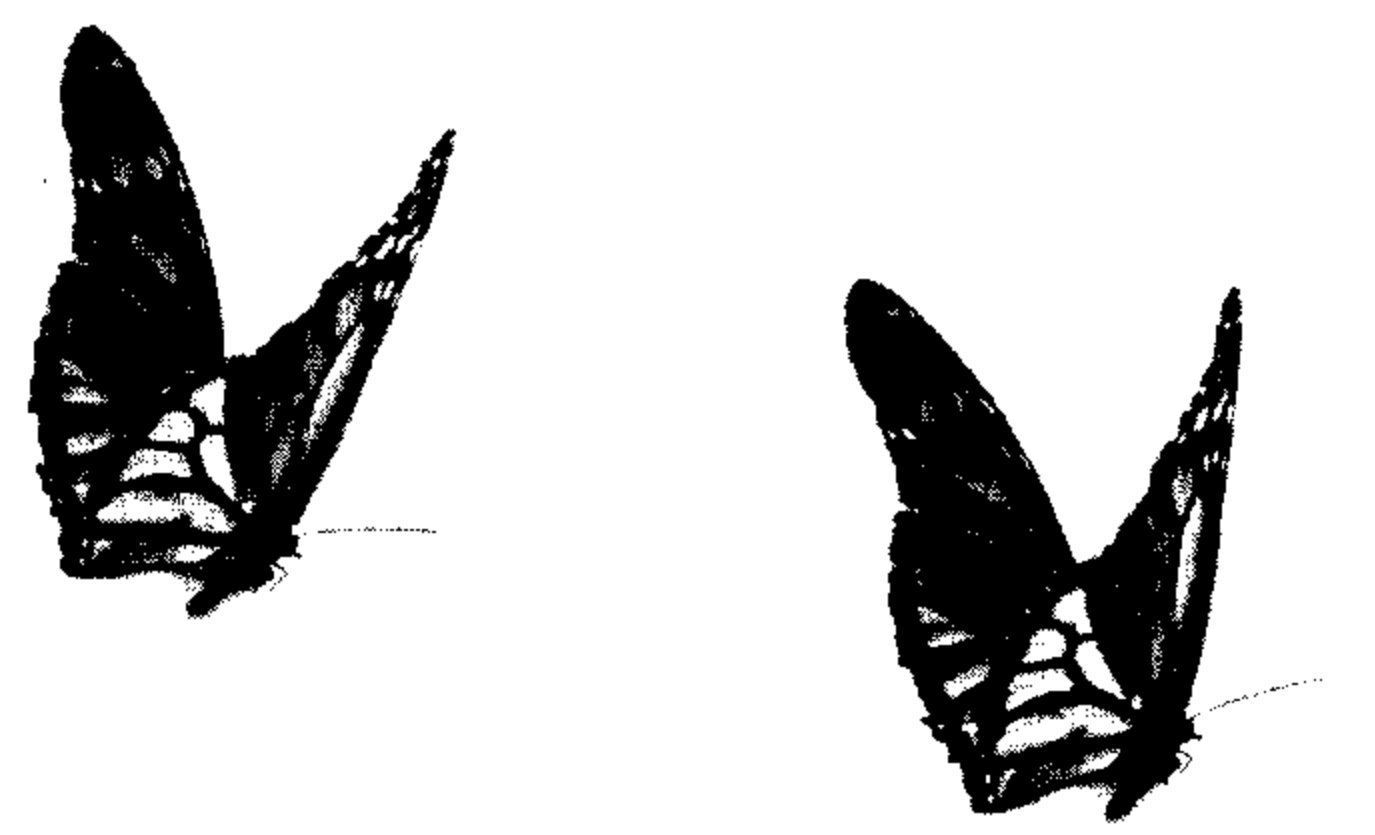
- Aksu, Z., Egretli, G., and Kutsal, T., 1999, A comparative-study for the biosorption characteristics of Chromium(VI) on Ca-alginate, agarose and immobilized *Chlorrella vulgaris* in a continuous packed-bed column. J. Environ. Sci. Health Part A, 34, 295-316.
- Aksu, Z., Egretli, G., and Kutsal, T., 1998, A comparative-study of copper(II) biosorption on Ca-alginate, agarose and immobilized *Chlorrella vulgaris* in a packed-bed column. Proc. Biochem. 33, 393-400
- Anspach, F. B., Huckel, M., Brunke, M., Schutte, H. and Deckwer, W.-D., 1994, Immobilization of mercuric reductase from a *Pseudomonas putida* strain on different activated carriers. Appl. Biochem. Biotechnol. 44, 135-150.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., and Marchant, R., 1996, Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. Biores. Technol., 58, 217-227.
- Belliveau, B. H. and Trevors, J. T. Mercury resistance and detoxification in bacteria. Appl. Organometal. Chem. 1989, 3, 283-294.
- Brady, D., Rose, P.D., and Duncan, J. R., 1994, The use of hollow fiber cross-flow micro-filtration in bioaccumulation and continuous removal of heavy metals from solution by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 44, 1362-1366.
- Brierley, C. L., Brierley, J. A., and Davidson, M. S. Applied microbial processes for metals recovery and removal from wastewater. In: *Metal Ions and Bacteria* (Beveridge, T. J. and Doyle, R. J., Eds.) John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 359-382.
- Brierley, C. L., Kelly, D. P., Seal, K. J., and Best, D. J. In: *Biotechnology* (Higgins, I. J., Best, D. J., and Jones, J., Eds.) Blackwell, Oxford, UK, 1985, 163- 212.
- Bumpus, J. A. and Brock, B. T., 1988, Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol., 54, pp. 1143-1150.
- Chang, J. S. and Kuo, T.-S., 2000, Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. Bioresource Technol. 75, 107-111.
- Chang, J. S. and Lin, Y.-C., 2000, Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain., Biotechnol. Prog. (in press).
- Chang, J.-S., Chou, C., Lin, Y.-C., Lin, P.-J., Ho, J.-Y., and Hu, T. L., 2000a, Kinetics of



- azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. Water Res. (in minor revisions).
- Chang, J. S., Kuo, T.-S., Chao, Y.-P., Ho, J.-Y., and Lin, P. J., 2000b, Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli* strain. Biotechnol. Lett. 22, 807-812.
- Chang, J.-S., Chou, C., and Chen, S.Y., 2000c, Decolorization of azo dye with immobilized cells of *Pseudomonas luteola*. Process Biochem. (in press).
- Chang, J.-S., Hwang, Y.-P., Fong, Y.-M., and Lin, P.-J., 1999, Detoxification of mercury by immobilized mercuric reductase. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74, 1-9.
- Chang, J.-S. and Chen, C.-C., 1999, Biosorption of Lead, copper, and cadmium with continuous hollow-fiber microfiltration processes. Separ. Sci. Technol. 34, 1607-1627.
- Chang, J.-S. and Law, W.-S., 1998, Development of microbial detoxification processes using a mercury-hyperresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Biotechnol. Bioeng. 57, 462-470.
- Chang, J.-S. and Huang, J.-C., 1998, Selective adsorption/recovery of Pb, Cu, and Cd with multiple fixed beds containing immobilized bacterial biomass. Biotechnol. Prog. 14, 735-741.
- Chang, J.-S., Chao, Y.-P., and Law, W.-S., 1998a, Repeated fed-batch operations for microbial detoxification of mercury using wild-type and recombinant mercury-resistant bacteria. J. Biotechnol. 64, 219-230.
- Chang, J.-S., Chao, Y.-P., Fong, Y.-M., Hwang, Y.-P. and Lin, P.-J., 1998b, Cloning of mercury resistance determinants in *Escherichia coli* and analysis of mercury reduction activity *in vivo* and *in vitro*. J. Chin. Inst. Chem. Engrs. 29, 265-274.
- Chang, J.-S., Huang, J.-C., Chang, C.-C., and Tarn, T.-J., 1998c, Removal and recovery of lead by fixed-bed biosorption with immobilized bacterial biomass. Wat. Sci. Technol. 38, 171-178.
- Chang, J.-S., Lo, R., and Chang, C.-C., 1997, Biosorption of lead, copper, and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Water Res. 31, 1651-1658.
- Chang, J.-S. and Hong J., 1994, Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). Biotechnol. Bioeng. 999-1006.
- Chen, S., Kim, E., Shuler, M. L., and Wilson, D. B., 1998, Hg²⁺ removal by genetically engineered *Escherichia coli* in a hollow fiber bioreactor. Biotechnol. Prog. 14, 667-671.
- Chua, H., Wong, P.K., Yu, P.H.F., Li, X.Z., 1998, The removal and recovery of copper(II) ions from wastewater by magnetite immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-X. Wat. Sci. Technol. 38, 315-322.
- Chung, K.T. and Stevens, S. E., Jr., 1993,



- Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, pp. 2121-2132.
- Chung, K. T., Fulk, G. E., and Egan, M., 1978, Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, pp 558.
- Comeau, Y., 1986, *Water Res.*, 20, 1511-1521.
- Coughlin, M. F., Kinkle, B. K., Tepper, A., and Bishop, P. L. (1997) Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 36, 215-220.
- Cripps, C., Bumpus, J. A., and Aust, S. D., 1990, Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by, *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, pp. 1114-1118.
- Darnell, D. W., Greene, B., Henzl, M. T., Hosea, J. M., McPherson, R. A, Sneddon, J., and Alexander, M. D. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 1986, 20, 206-208.
- Fathepure, B. Z. and Vogel, T. M., 1991, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3418-3422
- Feldstein, H., Galun, E., Siegal, S. M., and Siegal, B. Z. Removal of uranium (VI) from solution by fungal biomass and fungal wall-related biopolymers. *Science* 1983, 219, 285-286.
- Flores, E. R., Luijten, M., Donlon, B. A., Lettinga, G., and Field, J. A. (1997) Complete biodegradation of the azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2098-2103.
- Foster, T. J. The genetics and biochemistry of mercury resistance. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1987, 15, 117-140.
- Fox, B. and Walsh, C. T., Mercuric purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 2498-2503.
- Fujii, T., Takeo, M., and Maeda, Y., 1997, Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter sp.* strain YAA. *Microbiology-UK* 143, 93-99.
- Gadd, G. M. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: *Biotechnology Vol 6b* (Rehm, H.-J. and Reed, G., Eds.) VCH Publishers, N.Y., 1988, 401-433.
- Gardeatorresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gonzalez, J.H., Canoaguilera, I., Henning, J.A., and Townsend, M.S. Removal of nickel ions from aqueous solution by biomass and silica-immobilized biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *J. Hazard. Material.* 1996, 49, 205-216.
- Garnham, G.W., Codd, G.A., and Gadd, G.M. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina* immobilized in alginate



- microbeads. *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26, 1764-1770.
- Ghosh, S., Sadhukhan, P. C., Chaudhuri, J., Ghosh, D. K., and Mandal, A. Volatilization of mercury by immobilized mercury-resistant bacterial cells. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 81, 104-108.
- Glazer, A. N. and Nikaido, H., 1994, *Microbial Biotechnology*, W. H. Freeman and Co., New York, pp. 561-620.
- Glick, B. R. and Paternak, J. J., 1998, *Molecular Biotechnology*, ASM Press, Washington, D.C., pp. 311-316.
- Gottschalk, G., 1986, *Bacterial Metabolism*, 2nd ed., Springer-Verlag Inc., New York, pp. 154-157.
- Haug, W., Schmidt, A., Nortemann, B., Hempel, D. C., Stolz, A., and Knackmuss, H.-J., 1991, Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3144-3149.
- Heiss, G. S., Gowan, B., and Dabbs, E. R., 1992, Cloning of DNA from a *Rhodococcus* strain conferring the ability to decolorize sulfonated azo dyes. *FEMS Microbiol. Let.* 99, 221-226.
- Hu T. L., 1994, Decolourization of reactive azo dye by transformation with *Pseudomonas luteola*, *Bioresource Technol.*, 49, pp. 47-51.
- Hu, Z. C. and Reeves, M. Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU immobilized in a novel matrix. *Biotechnol. Prog.* 1997, 13, 60-70.
- Jackson, T. A. The biogeochemistry of heavy metals in polluted lakes and streams at Flin Flon, Canada, and a proposed method for limiting heavy metal pollution of natural waters. *Environ. Geol.* 1978, 2, 173.
- Jeong, B. C., Hawes, C., Bonthron, K. M., and Macaskie, L. E. Localization of enzymatically enhanced heavy-metal accumulation by *Citrobacter Sp.* and metal accumulation in-vitro by liposomes containing entrapped enzyme. *Microbiol.-UK* 1997, 143, 2497-2507.
- Kapoor, A. and Viraraghavan, T. Application of immobilized *Aspergillus niger* biomass in the removal of heavy-metals from an industrial wastewater. *J. Environ. Sci. Health Part A* 1998, 33, 1507-1514.
- Kirk, T. K. and Farrel, R. L., 1987, Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rew. Microbiol.* 41, 465-505.
- Ledakowicz, S. Becker, U., and Deckwer, W.D. Mass-transfer limitations of mercury-bio-transformation in multiphase reactor. *Catal. Today* 1995, 24, 65-71.
- Lu, M and Wilkins, E. Heavy-metal removal by caustic-treated yeast immobilized in alginate. *J. Hazard. Material.* 1996, 49, 165-179.



- Michaels, G. B. and Lewis, D. L., 1986, Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes, *Environ. Toxicol. Chem.* 5, pp. 161-166.
- Misra, T. K., 1992, Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 27, 4-16.
- Nakajima, A. and Sakaguchi, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986, 24, 59-64.
- Nakajima, A. and Sakaguchi, T. Accumulation of uranium by basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 38, 574-578.
- Nigam, P. and Marchant, R., 1995, Selection of a substratum for composing biofilm system of a textile-effluent decolorizing bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 17, 993-996.
- Ogawa, T. and Yatome, C., 1990, Biodegradation of azo dyes in multistage rotating biological contactor immobilized by assimilating bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 561-566.
- Ogawa, T., Yatome, C., Idaka, E., and Kamiya, H., 1986, Biodegradation of azo acid dyes by continuous cultivation of *Pseudomonas cepacia* 13 NA. *J. Soc. Dyers and Colourists*, 102, 12-14.
- Philippidis, G. P., Schottel, J. L., and Hu, W.-S., Kinetics of mercuric reduction in intact and permeabilized *E. Coli* Cells. *Enzyme Microb. Technol.* 1990, 12, 854-859.
- Philippidis, G. P., Schottel, J. L., and Hu, W.-S. A model for mercuric ion reduction in recombinant *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, 37, 47-54.
- Prakasham, R.S., Merrie, J.S., Sheela, R., Saswathi, N., Ramakrishna, S.V. Biosorption of chromium(VI) by free and immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Environ. Pollut.* 1999, 104, 421-427.
- Prouty, A. L., 1990, Bench-scale development and evaluation of a fungal bioreactor for color removal from bleach effluents, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, pp. 490.
- Puranik, P. R. and Paknikar, K. M. Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* strain Mcm B-181 - characterization studies. *Biotechnol. Prog.* 1999, 15, 228-237.
- Rafii, F. and Coleman, T., 1999, Cloning and expression in *Escherichia coli* of an azoreductase gene from *Clostridium perfringens* and comparison with azoreductases genes from other bacteria. *J. Basic Microbiol.* 39, 29-35.
- Ramelow, G.J., Liu, L., Himel, C., Fralick, D., Zhao, Y., and Tong, C., 1993, The analysis of dissolved metals in natural-maters after preconcentration on biosorbents of immobilized lichen and seaweed biomass in silica. *International J. Environ. Anal. Chem.* 53, 219-232.
- Ramelow, U.S., Guidry, C.N., and Fisk, S.D. A kinetic study of metal-ion binding by bio-



- mass immobilized in polymers. *J. Hazard. Material.* 1996, 46, 37-55.
- Robinson, P.K. and Wilkinson, S.C., 1994, Removal of aqueous mercury and phosphate by gel-entrapped *Chlorella* in packed-bed reactors. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 802-807.
- Romeyer, F. M., Jacobs, F. A., Masson, I., Hanna, Z., and Brousseau, R. Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein genes. *J. Biotechnol.* 1988, 8, 207-220.
- Sag, Y., Nourbakhsh, M., Aksu, Z., and Kutsal, T. Comparison of Ca-alginate and immobilized *Z. ramigera* as sorbents for copper(II) removal. *Proc. Biochem.* 1995, 30, 175-181.
- Saouter, E., Turner, R., and Barkay, T. Microbial reduction of ionic mercury for the removal of mercury from contaminated environments. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1994, 721, 423-427.
- Shelley, M. L., Evaluation of chemical-biological and chemical-physical treatment for textile dyeing and finishing waste", *J. WPCF*, Vol.48, No.4. (1976).
- Shumate, S. E. II and Strandberg, G. W. Accumulation of metals by microbial cells. In: *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., Ed.) Pergamon Press, NY., 1985, 235-247.
- Spinti, M, Zhuang, H. N., and Trujillo, E. M. Evaluation of immobilized biomass beads for removing heavy-metals from wastewaters. *Wat. Environ. Res.* 1995, 67, 943-952.
- Stoll, A. and Duncan, J.R. Comparison of the heavy-metal sorptive properties of 3 types of immobilized, nonviable *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Proc. Biochem.* 1997, 32, 467-472.
- Stoll, A. and Duncan, J.R. Implementation of a continuous-flow stirred bioreactor system in the bioremediation of heavy-metals from industrial wastewater. *Environ. Pollut.* 1997, 97, 247-251.
- Suzuki, T., Furukawa, K., and Tonomura, K. Studies on the removal of inorganic mercurial compounds in waste by the cell-reused method of mercury-resistant bacterium. *J. Ferment. Technol.* 1968, 46, 1048-1055.
- Tsezos, M. and Volesky, B. The mechanism of uranium biosorption. *Biotechnol Bioeng.* 1982, 24, 385-401.
- UO, M, Numata, M., Suzuki, M., Tamiya, E., Karube, I, and Maishima, A. Preparation and properties of immobilized mercuric reductase in porous glass carriers. *J. Ceramic Soc. Japan* 1992, 100, 430-433.
- Vandevivere, P. C., Bianchi, R., and Verstraete, W., 1998, Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing



- industry: Review of emerging technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 72, 289-302.
- Vecchio, A., Finoli, C., Disimine, D., and Andreoni, V. Heavy metal biosorption by bacterial cells. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 361, 338-342.
- Volesky, B. and Holan, Z. R. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 1995, 11, 235-250.
- Wilhelmi, B.S. and Duncan, J.R. Reusability of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* with successive copper adsorption-desorption cycles. *Biotechnol. Lett.* 1996, 18, 531-536.
- Wilkinson, S. C., Goulding K. H. and Robinson, P. K., Mercury accumulation and volatilization in immobilized algal cell systems. *Biotechnol. Lett.* 1989, 11, 861-864.
- Wong, P. K. and Kwok, S. C. Accumulation of nickel Ion (Ni^{2+}) by immobilized cells of *Enterobacter* species. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14, 629-634.
- Yang, F. and Yu, J., 1996, Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolourization, Part II: Continuous decolourization tests, *Bioproc. Eng.* 16, 9-11.
- Yatome, C., Ogawa, T., Koga, D., and Idaka, E., 1981, Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomalle* 13NA, *JSDC*, 97, pp. 166.
- Yong, P. and Macaskie, L. E. Bioaccumulation of lanthanum, uranium and thorium, and use of a model system to develop a method for the biologically-mediated removal of plutonium from solution. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1998, 71, 15-26.
- Zhang, F.-M, Knapp, J. S., and Tapley, K. N., 1999, Development of bioreactor systems for decolorization of orange II using white rot fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 48-53.
- Zimmermann, T.; Kulla, H. G.; Leisinger, T., 1982, Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur. J. Biochem.* 129, 197-203.
- Zitomer, D. H. and Speece, R. E., 1993, Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. and Technol.*, Vol. 27, 226-243.
- 林佳渝、張嘉修，June 2000，染料褪色基因重組菌之選殖與褪色動力學研究，*Proceedings of the 5th Conference on Biochemical Engineering*，pp. 611-614。
- 林佳渝、高維忱、張嘉修，Dec. 2000，以基因重組技術建構染料廢水褪色菌種，第25屆廢水處理技術研討會論文集，to appear.
- 林毓智、周劍、張嘉修、胡苔莉，December 1997b，以 *Pseudomonas luteola* 進行染料



生物褪色之動力學研究，第22屆廢水處理技術研討會論文集，pp. 803 - 809。

胡苔莉、易寶珠，1991，染色Red G之生物褪色作用，第十六屆廢水處理技術研討會論文集，中華民國環境工程學會，pp. 477-488。

徐瑞堂，「以微生物去除水中重金屬」，環境工程會刊，1993年，第4卷，第1期，第46-51頁。

曾四恭、鍾如真，1990，利用白腐真菌去除紙漿廢水色度之可行研究，第十五屆廢水處理技術研討會論文集，中華民國環境工程學會，pp. 341-353。

郭泰興、郭承翔、葉茂淞、鐘敏愷、林啓陽、何俊穎、林屏杰、張嘉修，November 1999，基因重組大腸桿菌之染

料褪色動力學研究，第24屆廢水處理技術研討會論文集，pp. 547-552。

張敏超，1992，染整廢水之混凝與脫色，化工資訊，6，pp. 56-65。

張肇栓、林屏杰、張嘉修，2000a，以中空纖維微過濾膜程序進行染料生物褪色，Proceedings of the 5th Conference on Biochemical Engineering，pp. 619-622。

張肇栓、林屏杰、張嘉修，2000b，連續式中空纖維微過濾膜反應器在染料廢水生物處理之應用，第25屆廢水處理技術研討會論文集，to appear.

葉茂淞、陳滄彬、張嘉修，2000，以天然與基因重組菌種進行雙偶氮染料與微溶性染料之生物分解，第25屆廢水處理技術研討會論文集，to appear.

作者簡介：

作者：張嘉修

學歷：美國加州大學Irvine分校化工暨生化工程系博士

經歷：逢甲大學化工系副教授(1993/8～1998/7)；逢甲大學化工系教授(1998/8～迄今)

現職：逢甲大學化工系教授

專長／研究領域：環境生物技術、生化工程、廢水處理、生化分離技術

責任編輯／王心彥