



行政院環境保護署

111 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬 並生產奈米金屬

期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：東吳大學／微生物學系所
專案主持人：張怡塘 教授
專案執行期間：111 年 09 月 01 日起至
112 年 08 月 31 日止

中華民國 112 年 08 月



專案基本資料表

專案性質		☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案類別(單選)		☒ 先導型 ☐ 研究型 ☐ 模場型	
研究主題		☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他					
申請機構系所		東吳大學微生物學系					
機構地址		台北市士林區臨溪路70號，東吳大學微生物學系					
專案主持人		張怡塘		職等／職稱		教授	
協同主持人				職等／職稱			
專案名稱	中文	應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬					
	英文	Removal of heavy metals and biosynthesis of CuO/ZnO nanoparticles by pure bacterial strains isolated in heavy metals-contaminated sediment					
	關鍵字	底泥、微生物、重金屬、奈米金屬					
執行期程		自民國111 年 09月01日起至民國112年08月31日止					
專案主持人		姓名：張怡塘		Email： ytchang@scu.edu.tw		專線：(02)28831193 EXT6862 手機：0922483699	
專兼任人員		姓名：		Email：		專線： 手機：	
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專 案 預 估 經 費		第一年金額	第二年金額	編列說明		
	1.	人事費用	119,305		(1~6 項相加之 50%為限)		
	2.	設備使用含維護費	32,000		(與計畫實驗相關)		
	3.	耗材與主要費用	211,927		(與計畫主體相關)		
	4.	其它研究相關費用	0		(含差旅與租賃費用)		
	5.	雜支費用	5,768		(1~6 項相加之 5%為限)		
	6.	行政管理費	41,000		(1~6 項相加之 10%為限)		
	7.	自籌款	0		(自行籌備款項)		
	申請補助金額(1~6 項)		410,000		總金額：410,000		
計畫總金額(1~7 項)		410,000		總金額：410,000			

專案主持人（簽名及蓋章）：張怡塘 日期：民國 111/11/15



行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐構想書

☐申請計畫書

☐期中報告

☐修正計畫書

☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	■先導型 □研究型 □模場型
計畫類別	□調查 ■整治 □其他		主持人：張怡塘 NO：C10
計畫名稱	應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬		
審查意見		執行單位回覆	
委員一 1. 報告內容成果豐碩但建議計畫執行仍應以未來能實際應用於污染場址之整治為目標。 2. 是否針對 EPS 進行定量。 3. 是否針對胞內與胞外重金屬進行分析與定量比較。 4. 建議應針對本計畫成果產出績效做說明。		1.謝謝委員肯定。本專案為先導型研發，因此執行過程著重於自受重金屬底泥中篩選可耐受重金屬之微生物，並於實驗室規模(lab- scale)嘗試是否生產胞內奈米重金屬顆粒。針對本技術應用之可行性及發展性已於 期末報告 5.8 節 中說明之。後續研究將持續針對去除真實廢水中之重金屬去除及實務量產胞內奈米顆粒為主要目標。 相關說明補充於期末報告定稿本 5.10 建議。 2.謝謝委員意見。本研發專案重點主要討論胞外 EPS 去除廢水中之重金屬。文獻顯示微生物產生之胞外 EPS 具重金屬吸附能力。依及其物理型態，EPS 又分為 total EPS, bound EPS, soluble EPS 等，且其成分十分複雜，包括醣類、蛋白質、脂肪、腐殖酸等，後續可持續分析這些 EPS 之含量及其成分。 本說明補充於期末定稿本 5.10 建議。 3.謝謝委員意見。研發專案受限於執行時間及計畫經費，並未針對所有篩選菌株均進行胞外重金屬及胞內重金屬之分析。 期末報告定稿本 5.8 技術應用之可行性及發展性 已說明細菌吸附重金屬胞外(如細胞壁/細胞膜之 EPS)或是累積在細胞質之比例不相同，在大多數情況下，重金屬之胞外吸附量 >> 胞內吸附量。 4. 謝謝委員意見。本研發已填報於 111 年度專案成果績效自評表及專案執行績效自評表，均符合產出原計畫書之產出績效，請參見 期末報告定稿本附件。	



委員二 1. 本研究為應用綠色整治技術，處理高濃度金屬廢水。以耐受高濃度金屬細菌生理特性，生產胞內奈米金屬顆粒，開發新型態之重金屬循環型資源新技術。為具有前瞻性研究。 2. 研究內容符合原定研究需求。 3. 文獻回顧說明應用技術的機制清楚明確，然而在結果討論部分建議請依不同適用條件的比較具體說明，特別是以前以模擬廢水進行試驗，條件及影響因子較為單純，未來如何運用於模場實際污染底泥與含重金屬廢水的可能影響包含物理化學條件，請提出具體討論 4. 此外回收純度在實驗控制條件尚未達一般再利用純度，預計如何突破？	1.謝謝委員肯定。 2.謝謝委員肯定。 3.謝謝委員意見。本專案主要處理重金屬廢水，並利用微生物生產胞內 NPs。期末報告定稿本 5.8 技術應用之可行性及發展性已補充模廠操作初步規劃，包括：(1)建立大型發酵槽，其可同時去除重金屬廢水及生產 NPs；(2)此法遇到可能之限制條件。 4.謝謝委員意見。本專案為先導型研發，因此執行過程著重於自受重金屬底泥中篩選可耐受重金屬之微生物，並於實驗室規模(lab- scale)嘗試生產胞內奈米重金屬顆粒。本實驗製成之胞內 NP 顆粒為氧化態，即 CuO-NPs 或 ZnO-NPs。後續持續改善 NPs 純化方法，去除顆粒雜質之 EPS 蛋白質、醣類，並且需將顆粒還原成 Cu-NPs, Zn-NPs 並再次分析其特性方能與市售材料之性能互相比較。相關說明補充於期末報告定稿本 5.8 技術應用之可行性及發展性。
委員三 1. 本報告從文獻蒐集、研究方法步驟乃至於結論及建議，皆有完整說明，內容豐富。 2. 依照 P. 80，本計畫所篩選出之細菌菌株，具有 76~80%重金屬銅去除率及 26~33%鋅去除率，係使用濃度為 200mg/L 之廢水測得，該濃度等同於未進行任何前處理之原廢水，如使用於遠低於此濃度之地下水，是否仍可有同等的去除率，仍需進一步討論。 3. 本計畫係研究以菌株吸收重金屬離子進而合成奈米金屬顆粒，具有前瞻性，惟，可討論有關本計畫篩選出之耐受重金屬細菌菌株，其量產之可能性及菌株可吸收離子最大量、使用限制條件及保存方式等？以及預想優於傳統化學法去除水中重金屬之優勢為何？	1.謝謝委員肯定。 2.謝謝委員意見。本專案主要為處理重金屬廢水並利用微生物生產胞內 NPs。依本研發專案蒐集之相關文獻得知，耐受重金屬之微生物分泌之 EPS (胞外)，應可吸附地下水中低濃度之重金屬，但若後續應用於大型發酵槽技術(5.8 節)，可能無法有效生產 NPs。 3.謝謝委員意見。期末報告定稿本 5.8 已說明技術應用之可行性及發展性。包括：(1)建立大型發酵槽，建立其可同時去除重金屬廢水及生產 NPs 之方法；(2)此法遇到可能之限制條件及 NPs 之保存方式。此外，也與傳統化學混凝法相較，說明此法之優點。



委員四 1. 本計畫已完成期末報告之目標。 2. 本計畫已成功篩選出可耐受銅與鋅並產生胞外奈米粒子的微生物，然銅與鋅的去除率並不高。 3. 本計畫標題為去除地下水重金屬，然而本文中卻用含高濃度重金屬廢水來做標的，請說明其中的差異。 4. 台灣土壤及地下水重金屬標準均是全量概念，微生物無法將重金屬元素移除，將來一直存在地下環境中。中文摘要中最後兩行推動銅與鋅等高價值金屬之資源回收與再利用不符。	1. 謝謝委員肯定。 2. 謝謝委員意見。本專案為先導型研發，因此執行過程著重於自受重金屬底泥中篩選可耐受重金屬之微生物，並於實驗室規模(lab- scale)嘗試是否生產胞內 CuO-NPs、ZnO-NPs。後續需建立大型發酵槽，建立相關操作條件(5.8 節)，評估同時去除重金屬廢水效率及 NPs 生產量。本說明補充於期末報告定稿本 5.8 技術應用之可行性及發展性。 3. 謝謝委員意見。本專案主要為處理重金屬廢水並利用微生物生產胞內 NPs，如此可避免重金屬廢水進入環境，達成改善土壤(底泥)、地下水等環境。補充說明於期末報告定稿本 2.1 專案目的。 4. 謝謝委員意見。本專案所篩選之耐受微生物可吸收廢水中之重金屬，另將細菌細胞內之重金屬經由萃取、濃縮、淨化及封端等步驟製成 NPs。CuO/ZnO-NPs 產品之原料來自廢水中之重金屬，達到金屬資源回收與再利用，並非指土壤、地下水中重金屬之移除。相關文字已修正於期末報告定稿本之摘要。
委員五 1. P89 頁附錄二之藥品，本試驗是購買 Sigma-Aldrich，nanopowder, 25nm particle size (TEM)，CAS No.7440-50-8 是為奈米元素銅還是奈米氧化銅請再確認說明。因元素銅與化合物氧化銅催化能力存在差異，請再補充說明相關性。同理亦請補充說明鋅試驗。 2. P71 頁圖 5.21 及 P72 頁圖 5.22 圖形不易分辨，建議若報告採黑白印刷，圖示之標記應用不同形狀區分(例如圓、三角或方形)。 3. P50 頁圖 5.5 菌株 Cu1~Cu6 之吸附曲線 X 座標標示 1~5 其意義為何?通常 Freundlich equation 基本是濃度相對吸附量回歸圖。 4. 續上，P49 頁提到圖 5.5 是使用 0、50、100、150 及 200ppm 等 5 種濃度所做的實驗結果，但圖 5.5 卻有 8 個數值點，請再補充說明。同理請再檢閱鋅試驗。	1. 謝謝委員意見。經重新確認，本專案選用市售奈米銅 (nano-Cu, 25nm)與奈米鋅 (nano-Zinc, 40-60 nm) 作為催化反應及抑菌實驗之對照組。相關文獻顯示，元素銅、鋅之催化能力以及殺菌能力均較氧化銅、鋅為佳。相關說明補充於期末報告定稿本 5.6、5.7 及其他說明。 2. 謝謝委員意見。修正圖(圖 5.21、圖 5.22)重新繪製修正於期末報告定稿本 5.6。 3. 謝謝委員意見。本吸附曲線並不是 Freundlich equation，而是表示菌株 biomass 可吸附不同濃度重金屬之絕對重量。此吸附曲線 X 軸橫座標是指菌株 biomass 吸附重金屬離子(Cu, Zn)之絕對重量(mg)，Y 軸是菌株吸附重金屬離子(Cu, Zn)之絕對吸附量(mg)。相關說明修正於期末報告定稿本 5.3。 4. 謝謝委員意見。銅使用為 0、25、50、75、100、125、150、200 ppm 進行測試。相關文字已修正



	於 期末報告定稿本 5.3 。
委員六 1. Zn 菌株（除 Zn1）的吸附曲線與實際結果偏差較大，原因為何，是否表示菌株吸附能力較不穩定。 2. 菌株 CU2 及 CU3 生產之 CuO-NPs，催化能力較市售 CuO-NPs 差，抗菌能力於濃度 1.25µg/mL 以下亦較市售 CuO-NPs 差，惟抗菌能力於濃度 1.25µg/mL 以上時較市售 CuO-NPs 佳的原因為何，是否可能有其他因素影響。	1.謝謝委員意見，除細菌菌體細胞壁及胞外 EPS 對 Zn²⁺ 具一定吸附能力外，Zn²⁺ 還能做為細菌代謝反應之輔酶因子(cofactor)。因此 Zn 菌株(除 Zn1) 的等溫吸附曲線與實際結果偏差較大，吸附曲線不穩定，推測可能原因為不同菌株對 Zn²⁺ 高低濃度有不同親合力與利用能力所致。’ 相關說明補充於期末定稿本 5.3。 2.謝謝委員意見。本研發專案使用之對照組為市售 Cu-NPs 而非 CuO-NPs (已於期末報告定稿本中修正) 與生產之 CuO-NPs 催化能力及抗菌機制不同。推測可能原因是市售 Cu-NPs 低濃度時其抗菌能力佳；但市售 Cu-NPs 在高濃度下(>1.25 µg/mL) 可能形成團聚顆粒 (aggregates)，其抗菌能力因此降低。相關說明補充於期末定稿本 5.7。



行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐構想書 ☐申請計畫書 ☒期中報告
(階段成果審查) 審查意見回覆對照表
☐修正計畫書 ☐期末報告

計畫年度	111 年度	計畫類型	■先導型 □研究型 □模場型
計畫類別	□調查 ■整治 □其他		主持人：張怡塘
計畫名稱	應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬		
審查意見		執行單位回覆	
1. Cu 菌株銅去除率及培養時間差異不大，是否有其他項目可以比較差異性，或是比較不同銅濃度液體之去除率。		1.本研究所篩選分離出之耐受重金屬銅菌株中，選擇 n 值最大之前三者作為後續生產 NPs 對象，分別為編號 Cu2、Cu3 以及 Cu4。 2.經計算三株菌胞內 CuO-NP 之產率 (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg)，比較為編號 Cu4 (0.755)>編號 Cu3 (0.229) >編號 Cu2 (0.111)。	
2. Zn 菌株鋅去除率除編號 3A、7、8 達 50%以上，其餘是否已表示其他編號菌株去除率較差，可以排除為研究對象。		1.本研究所篩選分離出耐受重金屬鋅菌株中，選擇 n 值最大之前三者作為後續生產 NPs 對象，分別為編號 Zn1、Zn3B 以及 Zn6。 2.經計算三株菌胞內 ZnO-NP 之產率(NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg)，比較為編號 Zn3B (0.271) >編號 Zn6 (0.074) >編號 Zn1 (0.013)。	



土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

111 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期: 112 年 07 月 15 日

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質	專案類別	☒ 先導型 ☐ 研究型 ☐ 模場型
研究主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其他		
執行機構	東吳大學微生物學系	專案主持人	張怡塘
專案名稱	應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬		
專案執行期程	☐ 申請階段 ☐ 期中 ☒ 期末		

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於欄位中。

(一) 學術面

目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後 半年 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表名稱)
項目							
A 學術 產出 及活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	1		1	100%	張怡塘*、袁輔瑩 (2023/11)，「應用底 泥環境微生物生產 奈米金屬顆粒」，中 華民國環境工程學 會，2023 廢水處理 技術研討會，宜蘭。 (已投稿)
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文					
		(2)國際研討會 論文發表	1		1	100%	Fu-Ying Yuan, Hsin-Yin Tsai, Zi-Yi Li, Yun-Hsuan Chang, Yi-Tang Chang*, Biosynthesis of intracellular metal nanoparticles using bacteria isolated by river sediment, The 11th World Gene Congress-2023 (WGC-2023), Osaka,



項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後 半年 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表名稱)
							Japan. May, 15-17, 2023.
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	1		1	100%	張怡塘等 (2023/07)，應用底泥 微生物同時去除地 下水重金屬並生產 奈米金屬，行政院環 保署土基會，結案報 告。
		(2)研究報告					
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
	B 人才 培育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	1		1	100%
(2)博士							
8.研究團隊 (個數)		(1)跨領域團隊	1		1	100%	
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中 心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原 因或專利、技術轉 移相關詳細資料)
A 智慧 財產權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申 請 中	發明					
			新型/設計					
			合計					
B 研發	2.先期技術	件數						



項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、技術轉移相關詳細資料)
技術轉移	成果移轉	授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	3.技術移轉 (專利)	件數					
		授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	4.技術移轉 (應用技術)	件數					
		授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)					
		(2)品種/系 (件數)					
C 產學研 合作	6.促成合作 研究	件數					
		金額(仟元)					
	7.促成投資	件數					
		投資金額 (仟元)					
	8.促成取得 業界科專	件數					
		業界投資金額 (仟元)					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

(三) 政策面

項目 \ 目標達成程度			申請預 估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					



B 政策 推動	3.協助政府推動 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
C 技術 效益	4.整治技術提升 (%)		1		1	100%	
	5.整治成本降低 (%)						
	6.提升能源效率 (%)						
7.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

三、請依前述學術面、產業面、政策面等預期量化成果，具體敘明研究成果對本署政策推動之助益。（200 字為限）

學術面(如國內外研討會、期刊投稿件數、或人才培育碩博士生說明)
1.國際研討會論文 1 篇。Fu-Ying Yuan, Hsin-Yin Tsai, Zi-Yi Li, Yun-Hsuan Chang, Yi-Tang Chang*, Biosynthesis of intracellular metal nanoparticles using bacteria isolated by river sediment, The 11th World Gene Congress-2023 (WGC-2023), Osaka, Japan. May, 15-17, 2023. 2.國內研討會論文 1 篇：張怡塘*、袁輔瑩、蔡欣穎 (2023/11)，「應用底泥環境微生物生產奈米金屬顆粒」，中華民國環境工程學會，2023 環境工程學會，廢水處理技術研討會 3.培育 1 名碩士生 (東吳大學微生物系)，2 名大專生 (東吳大學微生物系)。
產業面(如合作研發產業、申請專利、洽談技術移轉廠商件數說明)
政策面(如整治費用降低、特定污染物整治效益提升、或提供政府作為監測/管制標準、污場址管理等政策及法規研訂之參考)
1.建立同時以微生物處理重金屬廢水及合成奈米金屬顆粒之資源循環程序。 2.對提高廠商積極處理重金屬廢水有正面助益。



中文摘要

微生物製作金屬奈米顆粒 (nano particles, NPs) 製作成本低且對環境友善，符合當今綠色化學及低碳足跡產品之要求。本研發專案以循環經濟為構想，建立重金屬循環型資源新技術。首先篩選受重金屬污染河川底泥細菌做為 NPs 製造工廠，成功選出可耐受銅、鋅之菌株。這些菌株產生之胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 可吸附廢水中之銅、鋅，並符合 Freundlich Equation 等溫吸附模式。將吸附重金屬後之菌液透過萃取、濃縮、淨化、封端等步驟，產生胞內奈米氧化銅 (CuO-NPs) 及奈米氧化鋅顆粒 (ZnO-NPs)。實驗結果顯示，篩選耐受金屬菌株對含重金屬銅廢水去除率為76.36-79.49%；對含重金屬鋅廢水之去除率為26.35-33.16%。菌株同時產出符合奈米尺度 (100nm) 之胞內 NPs，產率 (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg) 最高為 Cu4 菌株 (*Klebsiella pneumonia*，菌種鑑定率 100%) 為0.755；Zn3B 菌株 (*Bacillus thuringiensis*，菌種鑑定率 100%) 為0.271。雖受限於顆粒尺度及純度，胞內 CuO/ZnO-NPs 具有催化能力及抑菌能力等特性，其中 Cu3 菌株生產之 CuO-NP 催化能力為 0.106 min^{-1} 及對 *E coil* (BCRC 11848) 之抑菌能力為76.82% ($2.5 \mu\text{g/mL}$)；Zn3B 菌株生產之 ZnO-NP 催化能力為 0.108 min^{-1} 及對 *E coil* 之抑菌能力為71.65% ($2.5 \mu\text{g/mL}$)。本專案技術可促進廢水中重金屬之循環，有效降低重金屬進入土壤、地下水等環境汙染，並同時生產胞內 NPs，推動金屬資源回收與再利用，符合聯合國 SDGs 永續發展指標，促進綠色經濟，確保永續消費及生產模式。

關鍵字: 微生物、奈米金屬顆粒、循環經濟、底泥、胞外聚合物



Abstract

The production of nanoparticles (NPs) metals by microorganisms is a low-cost and environment-friendly process, which conforms to a requirement of green chemistry and low carbon footprint products. This project takes in the view of circular economy as a major concept and establishes a new technology for recycling heavy metal from waste. Firstly, bacterial strains from river sediment contaminated by heavy metals were selected as NPs production plants. These strains that can tolerate high amounts of copper and zinc were successfully isolated. The extracellular polymer substrates (EPS) produced by these strains adsorbs copper and zinc in artificial industrial wastewater and conforms to the Freundlich isotherm model. The metals-absorbed bacterial solution goes through the following steps: extraction, concentration, purification, and capping to produce intracellular nano-copper oxide (CuO-NPs) and nano-zinc oxide (ZnO-NPs) particles. The results showed that these metal-tolerant bacterial strains had removal rates of 76.36-79.49% for copper-containing wastewater; removal rates of 26.35-33.16% for zinc-containing wastewater. Nanoscale (100nm) NPs also can be produced. Calculate the NPs yield (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg), the highest rate of production is 0.755 of strain Cu4 (*Klebsiella pneumonia*, strain identification 100%); strain Zn3B (*Bacillus thuringiensis*, strain identification 100%) is 0.271. Although these intracellular NPs are limited by particle size and purity, their characteristics are not as good as those of commercially available NPs particles. Intracellular NPs are still presented abilities of high oxidation and antibacterial reaction. Among them, Cu3 strain is calculated as 0.106 min^{-1} and 76.82% ($2.5 \mu\text{g CuO-NPs/mL}$) respectively; Zn3B strain is calculated as 0.108 min^{-1} and 71.65% ($2.5 \mu\text{g ZnO-NPs/mL}$). This project has successfully developed a technology that promotes the recycling of heavy metals in heavy-metal wastes. A strategy is effective in that recycling and reuse of high-value heavy metals such as copper and zinc, which complies with the UN Sustainable Development Index (SDGs) 12: promoting a green economy and ensuring sustainable consumption and production.

Keywords: microorganisms, nanoparticle, circular economy, sediment, extracellular polymer substrate



目錄

專案基本資料表..... i

期末報告審查意見回覆對照表..... ii

期中報告審查意見回覆對照表..... vi

111 年度專案成果績效自評表..... vii

專案執行自評表..... xi

中文摘要..... xii

Abstract..... xiii

目錄..... xiv

圖目錄..... xvii

表目錄..... xix

一、前言..... 1

二、研究目的..... 2

2.1 專案目的..... 2

2.2 專案重要性..... 2

三、文獻探討..... 3

3.1 重金屬污染..... 3

3.1.1 重金屬來源及毒性表現..... 3

3.1.2 重金屬汙染處理方法..... 5

3.2 國內重金屬污染現況..... 8

3.2.1 地下水重金屬汙染現況及其標準..... 9

3.2.2 土壤重金屬汙染現況及其標準..... 10

3.2.3 台灣河川底泥重金屬汙染現況..... 11

3.3 重金屬資源循環與回收再利用..... 12

3.3.1 國內推動資源循環與零廢棄之相關政策..... 13

3.3.2 重金屬回收再利用應用實例..... 15

3.4 微生物吸附重金屬機制..... 19

3.4.1 原理..... 19

3.4.2 微生物吸附重金屬位置..... 21

3.5 重金屬對微生物之吸附動力學..... 24



3.5.1	Langmuir 等溫吸附模式.....	24
3.5.2	Freundlich 等溫吸附模式.....	24
3.6	微生物合成奈米金屬顆粒.....	25
3.6.1	胞外合成機制.....	25
3.6.2	胞內合成機制.....	26
3.7	奈米金屬.....	27
3.7.1	定義及合成方法.....	28
3.7.2	奈米金屬之催化機制.....	28
3.7.3	奈米金屬之殺菌機制.....	29
四、	研究方法與過程（含工作進度甘特圖）.....	30
4.1	本研發專案流程圖.....	30
4.2	耐受受重金屬菌珠之篩選、分離與鑑定.....	31
4.2.1	耐受重金屬微生物之採樣.....	31
4.2.2	耐受重金屬微生物之篩選、分離與培養.....	31
4.2.3	耐受重金屬分離菌株之生長曲線.....	32
4.2.4	革蘭氏染色 (Gram Stain)	32
4.2.5	菌種鑑定.....	33
4.3	耐受重金屬菌株對重金屬銅、鋅之吸附能力分析.....	33
4.3.1	重金屬銅、鋅分析方法建立.....	33
4.3.2	菌株對重金屬銅、鋅之吸附實驗.....	33
4.4	胞內奈米金屬製作及其特性分析.....	35
4.4.1	胞內奈米金屬顆粒之萃取、分離與純化.....	36
4.4.2	胞內奈米金屬顆粒特性分析.....	37
4.5	研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）.....	39
五、	結果與討論（含結論與建議）.....	40
5.1	耐受重金屬銅菌株之篩選與鑑定.....	40
5.1.1	耐受銅重金屬菌株生長特徵及革蘭氏染色.....	40
5.1.2	耐受重金屬銅菌株之生長曲線.....	40
5.1.3	耐受重金屬銅菌株之菌種鑑定.....	40
5.2	耐受重金屬鋅菌株之篩選與鑑定.....	40
5.2.1	耐受鋅重金屬菌株生長特徵及革蘭氏染色.....	40



5.2.2	耐受鋅重金屬菌株之生長曲線.....	47
5.2.3	耐受重金屬鋅菌株之菌種鑑定.....	47
5.3	耐受重金屬菌株對重金屬(銅、鋅)之等溫吸附模式.....	48
5.3.1	耐受銅重金屬菌株等溫吸附曲線.....	48
5.3.2	耐受鋅重金屬菌株等溫吸附曲線.....	51
5.4	耐受重金屬菌株對含重金屬(銅、鋅)廢水之處理效率評估.....	56
5.4.1	耐受銅重金屬菌株對含銅廢水之處理效率.....	56
5.4.2	耐受鋅重金屬菌株對含鋅廢水之處理效率.....	57
5.5	胞內奈米金屬顆粒特性分析.....	58
5.5.1	掃描電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, FE-SEM)分析.	58
5.5.2	光能量散佈光譜 (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)分析.....	65
5.5.3	奈米金屬顆粒粒徑分析.....	65
5.6	胞內奈米金屬顆粒催化能力分析.....	70
5.6.1	胞內奈米氧化銅之催化能力.....	70
5.6.2	胞內奈米氧化鋅之催化能力.....	71
5.7	胞內奈米金屬抗菌能力分析.....	72
5.7.1	奈米氧化銅抗菌能力分析.....	72
5.7.2	奈米氧化鋅抗菌能力分析.....	74
5.8	技術應用之可行性及發展性.....	76
5.8.1	胞內 CuO-NPs 與 ZnO-NPs 之產量計算.....	77
5.8.2	製作 NPs 模廠試驗之初步規劃.....	78
5.9	結論.....	79
5.10	建議.....	80
六、	參考文獻.....	82
附錄		88
附錄一、	本研發專案使用之儀器設備.....	88
附錄二、	本研發專案使用之培養基、藥品等實驗材料.....	89
附錄三、	耐受重金屬菌株定序結果.....	91



圖目錄

圖 2.1、	本研發專案構想.....	2
圖 3.1、	常見重金屬廢水去除方法.....	6
圖 3.2、	物理及化學吸附示意圖.....	8
圖 3.3、	河川底泥形成示意圖.....	12
圖 3.4、	污染物在水體底泥中及食物鏈傳輸示意圖.....	12
圖 3.5、	環保署資源回收再利用推動計畫策略.....	14
圖 3.6、	環保署資源回收再利用技術推動架構.....	14
圖 3.7、	電子廢棄物中貴金屬回收之流程.....	15
圖 3.8、	生物材料(包括微生物)對染料及重金屬吸附之原理.....	19
圖 3.9、	細菌吸附重金屬之主要機制.....	20
圖 3.10、	細菌吸附重金屬之代謝反應.....	20
圖 3.11、	胞外聚合物(EPS)型態示意圖.....	22
圖 3.12、	鐵離子在革蘭氏陰性細胞內封存示意圖.....	23
圖 3.13、	微生物合成奈米顆粒機制圖.....	25
圖 3.14、	重金屬離子於胞內及胞外合成 NPs 機制圖.....	26
圖 3.15、	重金屬離子運送至革蘭氏陰性菌細胞質之機制圖.....	27
圖 3.16、	不同 NPs 抗菌機制之示意圖.....	29
圖 4.1、	本研發專案流程圖.....	30
圖 4.2、	本研發專案團隊於南崁溪河川底泥採樣.....	31
圖 4.3、	耐受重金屬(Cu/Zn)菌株之篩選、分離與純化流程.....	32
圖 4.4、	重金屬離子校正濃度檢量線.....	34
圖 4.5、	本專案奈米金屬萃取、分離與純化步驟.....	36
圖 5.1、	耐受重金屬銅菌株之革蘭氏染色結果.....	41
圖 5.2、	耐受重金屬銅菌株之 16S rDNA 電泳圖.....	43
圖 5.3、	耐受重金屬鋅菌株之革蘭氏染色結果.....	46
圖 5.4、	耐受重金屬鋅菌株之菌種鑑定電泳圖.....	48
圖 5.5、	菌株 Cu1~Cu6 之吸附曲線.....	49
圖 5.6、	菌株 Cu1~Cu6 之 Freundlich Equation 吸附模式.....	50
圖 5.7、	不同菌株 Zn1~Zn9 之吸附曲線.....	52
圖 5.8、	不同菌株 Zn1~Zn9 之 Freundlich Equation 吸附模式.....	54



圖 5.9、	耐受銅菌株在含 200ppm Cu ²⁺ TSB 對銅之去除率.....	56
圖 5.10、	耐受鋅菌株在含 200ppm Zn ²⁺ TSB 對鋅之去除率.....	57
圖 5.11、	菌株編號 Cu2 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態.....	59
圖 5.12、	菌株編號 Cu3 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態.....	60
圖 5.13、	菌株編號 Cu4 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態.....	61
圖 5.14、	菌株編號 Zn1 生產之 ZnO-NPs 於 SEM 下之型態.....	62
圖 5.15、	菌株編號 Zn3B 生產之 ZnO-NPs 於 SEM 下之型態.....	63
圖 5.16、	菌株編號 Zn6 生產之 ZnO-NPs 顆粒於 SEM 下之型態.....	64
圖 5.17、	胞外 CuO-NPs 之 EDS 訊號圖.....	66
圖 5.18、	胞外 ZnO-NPs 之 EDS 訊號圖.....	67
圖 5.19、	胞外 CuO-NPs 粒徑分析.....	68
圖 5.20、	胞外 ZnO-NPs 粒徑分析.....	69
圖 5.21、	胞內 CuO-NPs 之催化能力.....	70
圖 5.22、	胞內 ZnO-NPs 之催化能力.....	71
圖 5.23、	胞內 CuO-NPs 抗菌能力分析.....	73
圖 5.24、	胞內 ZnO-NPs 抗菌能力分析.....	75
圖 5.25、	細菌合成奈米金屬顆粒之可能方式.....	77
圖 5.26、	金屬離子(Pb, Zn)在細菌結構上之分佈情形.....	77
圖 5.27、	本研發專案製作之胞內奈米金屬成品片.....	78



表目錄

表 3.1、	地下水污染物之管制項目及監測/管制標準值 (mg/L).....	9
表 3.2、	土壤污染物之管制項目及管制標準值 (mg/kg).....	10
表 3.3、	總量管制區-以桃園市為例.....	11
表 3.4、	河川底泥污染物之管制項目及管制標準值 (mg/kg).....	12
表 3.5、	重金屬污泥資源化技術.....	17
表 3.6、	微生物合成胞外 NPs 之相關研究.....	26
表 3.7、	微生物合成胞內奈米金屬之相關研究.....	27
表 4.1、	桃園市南崁溪主流之底泥重金屬檢測值 (2022/07/03 檢索).....	31
表 5.1、	耐受重金屬銅菌株(編號 Cu1~Cu6)之菌落特徵.....	41
表 5.2、	耐受重金屬銅菌株(編號 Cu1~Cu6)之革蘭氏染色與菌株長度.....	43
表 5.3、	耐受 Cu ²⁺ 分離菌株對銅最佳吸附量之培養時間 (hr).....	43
表 5.4、	耐受重金屬鋅菌株(編號 Zn1~Zn9)之菌落特徵.....	44
表 5.5、	耐受重金屬銅鋅株(編號 Zn1~Zn9)之革蘭氏染色與菌株長度.....	47
表 5.6、	耐受 Zn ²⁺ 分離菌株對鋅最佳吸附量之培養時間 (hr).....	47
表 5.7、	菌株編號 Cu1~Cu6 之 Freundlich Equation 及其參數.....	51
表 5.8、	菌株編號 Zn1~Zn9 之 Freundlich Equation 及其參數.....	55
表 5.9、	耐受銅菌株在含 200ppm Cu ²⁺ TSB 對銅之去除率.....	56
表 5.10、	耐受鋅菌株在含 200ppm Zn ²⁺ TSB 對鋅之去除率.....	57
表 5.11、	胞外 CuO-NPs 之 EDS 訊號.....	66
表 5.12、	胞外 ZnO-NPs 之 EDS 訊號.....	67
表 5.13、	胞內 CuO-NPs (10 mg/L)催化反應擬一階反應參數(<i>k</i>).....	71
表 5.14、	胞內 ZnO-NPs(10 mg/L)催化反應擬一階反應參數(<i>k</i>).....	72
表 5.15、	胞內 CuO-NPs 在不同濃度之抗菌能力.....	74
表 5.16、	胞內 ZnO-NPs 在不同濃度之抗菌能力.....	76
表 5.17、	菌株製造 CuO-NPs 之產率.....	78
表 5.18、	菌株製造 ZnO-NPs 之產率.....	78



(一)、前言

奈米科技(Nanotechnology)涵蓋生物學、化學、生物醫學、材料學...等多項領域。奈米金屬顆粒如奈米銅(Nano-CuO particles, CuO-NPs)已成功用於各種應用，例如做為催化劑、抗菌劑、熱轉移流體等 (Nagar N et al., 2018)，也可用做為癌症標靶藥物；奈米氧化鋅 (Nano-ZnO particles, ZnO-NPs) 則是具抗細菌、抗真菌、抗發炎，促進傷口癒合之應用潛力。

奈米顆粒(NPs)形成方法可分為化學方法、物理方法和生物方法，其中化學方法和物理方法合成 NPs 成本較高，其過程使用大量能量與有機溶劑，並同時會產生許多有毒副產物 (Siddiqi et al., 2018; Haq et al., 2017)。近年國際局勢劇變，市場上貴重金屬如銅、鋅價格飆漲。使得製作 NPs 所需成本以及銷售價格明顯增加。為符合綠色化學及低碳足跡產品之要求，生物法合成(biological synthesis) NPs，其優點為製作成本較低，且對環境較為友善(Hulkoti & Taranath, 2014)。許多微生物如細菌、真菌(酵母菌、黴菌等)及其產物對溶解態金屬具很強的吸附能力(Rai, et al. 2021)，可與微生物胞外(或胞內)蛋白質與肽聚糖(polysaccharide)成分形成穩定的相容性結構，處理含高濃度重金屬廢水。這些微生物可以三種方式：胞外 EPS 吸附、細胞壁吸附和胞內封存吸附重金屬離子，其中胞內封存方式同時可生產奈米金屬顆粒。

本研究利用微生物產生之 EPS 吸附重金屬離子，用於處理重金屬廢水，並嘗試以微生物作為工廠，利用微生物在胞內封存之特性生產 CuO-NPs 及 ZnO-NPs。微生物來源為受重金屬污染之河川底泥，取自南崁溪底泥樣本中篩選耐受重金屬銅、鋅能力之微生物。添加定量微生物於含高濃度重金屬(Cu 100 mg/L 或 Zn 100 mg/L) 之 Tryptone soy broth (TSB) 培養基，在固定溫度下，以固定轉速下進行培養，再利用個別菌株之細菌生長曲線，選擇最佳培養時間(對數生長期後期)菌液，經萃取、分離、濃縮與淨化等步驟後，產出胞內奈米金屬顆粒，並以冷凍乾造技術製成粉體。為確定產生之 NPs 符合定義 (奈米級顆粒為 100nm 下)，以及具有催化反應與殺菌能力，另針對其特性進行分析，與市售相似之奈米產品 (奈米銅、奈米鋅) 性能比較。本專案技術可促進廢水中重金屬之循環，間接降低重金屬進入土壤、地下水等環境之健康風險。利用生產胞內 NPs，推動金屬資源回收與再利用，符合聯合國多項 SDGs 永續發展指標，促進綠色經濟，確保永續消費及生產模式。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(二)、研究目的

2.1 專案目的

台灣地區自然資源不足，其中貴金屬礦幾乎達 100%進口，資源供應屬於高風險，一旦供應鏈出現問題，將可能影響經濟發展。本研究以循環經濟為構想，建立新重金屬循環型資源技術。亦即利用微生物（細菌）產生之 EPS 具備生物吸附特性處理工業製造過程產生之重金屬廢水，如此可避免重金屬進入天然水體，達成改善土壤(底泥)、地下水等環境，降低底泥高風險危害，另一方面，重金屬廢水成為製作 NPs 顆粒之原料，將細菌視為生物合成 NPs 之工廠，將其細胞內封存之重金屬銅、鋅離子合成奈米金屬顆粒。分析奈米金屬顆粒粒徑大小、表面特性及其奈米性質，達到同時去除水體中之重金屬污染及生產 NPs 之雙重目標(圖 2.1)。

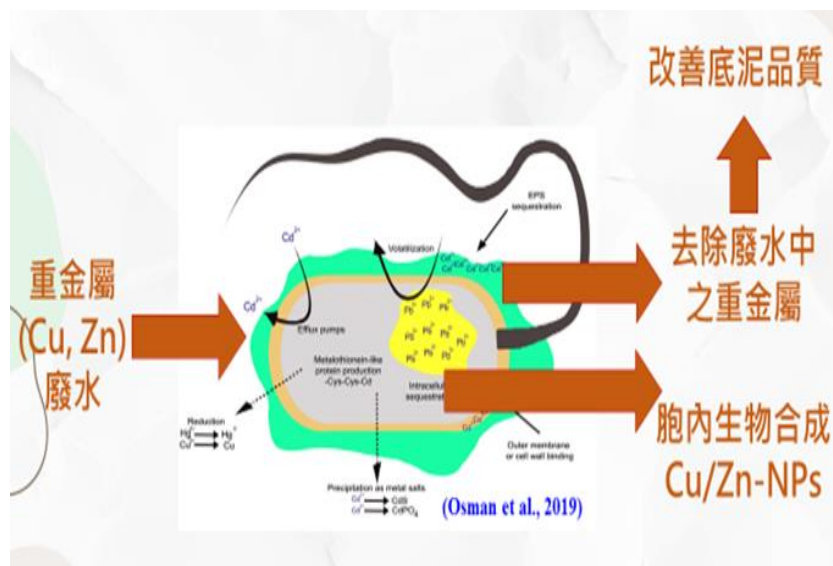


圖 2.1、本研發專案構想

2.2 本專案重要性

本研發專案之重要性如下：

1. 建立綠色整治技術，利用耐受高濃度金屬細菌菌株處理重金屬廢水。
2. 應用耐受高濃度金屬細菌生理特性，生產胞內奈米金屬顆粒。
3. 開發新型態之重金屬循環型資源新技術。



(三)、文獻探討

3.1 重金屬污染

重金屬如鉛、鎘、銅和鋅等經常用在造紙工業、皮革鞣製、塑料穩定劑、照相材料、化學肥料、染料及電池等工業製造過程。這些製造過程產生之工業廢水若未經處理或處理效率不佳，排放進入環境中促使水體及土壤中之重金屬含量增加，影響環境生態系統與農作物生長 (Paul et al., 2017)。研究顯示，生物若長期接觸重金屬，會使其毒素累積在身體中，破壞神經系統及其器官，對健康產生不利影響 (Abu-El-Halawa et al., 2017)。舉例而言，鋅雖然是人體代謝途徑中不可缺少的金屬元素之一，但是當人體內平衡被破壞時，鋅具有毒性，同樣會對人體產生傷害 (Agnew et al., 2022)；銅可維持身體細胞之生理機能，例如銅藍蛋白 (ceruloplasmin)，然而過量銅會造成人體肝癌以及 DNA 損傷 (Royer et al., 2020)；鎳主要為工作環境所造成之職業暴露，會使呼吸系統受損及造成肺部纖維化 (Das et al., 2019)。由上述說明可知，人體無法容忍過量重金屬之存在，因此環境中若有重金屬污染應進行處理。

3.1.1 重金屬來源及毒性表現

許多重金屬是人體所需之微量元素，例如：銅為人體多種氧化酵素之輔酶 (coenzyme)，但過量會對人體健康造成影響(例如：組織受損、細胞受損凋亡)。一般而言，重金屬污染水源後多從飲用水進入人體。常見於環境中之重金屬毒性表現說明如下：

(1) 砷 (As)

砷在天然水體中的濃度低於 10 µg/L，但在天然礦區中濃度會暴增，當人體暴露於過量砷造成心血管疾病、發育異常以及神經系統病變等，甚至誘發癌症，台灣著名案例為烏腳病。食品相關案例如布袋、安平、七股、大鵬等地區之牡蠣含砷 (羅筱玫，2015)。

(2) 鎘 (Cd)

鎘具有防鏽功能，多用於工業上電鍍、漆料、塑膠等用途，且經常存在於鋅礦及銅礦中，是提煉時產生的副產物。鎘主要污染來源為熔煉時產生之大量廢液，造成河川污染，當含鎘廢水流入農田，使農作物受到鎘污染。台灣曾經出現的案例為桃園觀音、蘆竹之鎘米污染，日本 1950 年富山縣鎘米中毒造成之痛痛



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

病。

人體接觸鎘的主要途徑包括食用受污染的食物、吸煙以及在受鎘污染的工作場所工作，其中吸煙是主要接觸原因，過量鎘造成的病理情況為腹痛、燒灼感、噁心、嘔吐、流涎、肌肉痙攣、眩暈、休克、意識喪失和抽搐等症狀，嚴重會誘發腎癌 (Tchounwou et al., 2012)。

(3) 鉻 (Cr)

人體接觸重金屬鉻之原因主要為職業暴露，通常為皮膚吸收或呼吸道吸入，吸入會刺激鼻黏膜造成鼻潰瘍，進入體內會導致生殖系統損傷 (Tchounwou et al., 2012)。

(4) 鉛 (Pb)

重金屬鉛接觸原因為油漆、瓷器或兒童玩具塗料成分。妊娠中女性若吸收鉛，會容易轉移至胎兒，造成胎兒出生後體重下降及早產，後期嬰兒神經發育異常，智力下降、行為發育延遲或受損、聽力敏銳度下降、言語和語言障礙、生長遲緩及注意力不集中 (Tchounwou et al., 2012)。

(5) 汞 (Hg)

汞是一種廣泛存在的環境毒物和重金屬污染物，它會引起身體組織的嚴重改變，並對健康造成廣泛的不良影響。人類和動物都會接觸到環境中各種化學形式的汞。這些包括元素汞蒸氣 (Hg_0)、無機汞 (Hg^{+1})、汞 (Hg^{+2}) 和有機汞化合物。

汞被用於電氣工業（開關、恆溫器、電池）、牙科（牙科汞合金）和許多工業過程，包括燒鹼生產、核反應堆、木材加工之抗真菌劑、活性和貴金屬之溶劑金屬，醫藥產品之防腐劑。工業對汞的需求在 1964 年達到頂峰，1980-1994 年開始禁止在油漆、殺蟲劑中使用汞添加劑，減少其在電池中的使用後，開始急遽下降。人類可通過環境污染、食品污染、牙科保健以及職場作業接觸到各種形式的汞，其中吸收率最高的是元素汞 (Hg_0) 和甲基汞 (MeHg)。元素汞蒸氣具有高度脂溶性，可通過肺部和口腔內壁組織有效吸收。 Hg_0 進入血液後，會迅速通過細胞膜，包括血腦和胎盤屏障；魚肉中的甲基汞則很容易被腸胃道吸收，並且由於其脂溶性，同樣很容易穿過血腦和胎盤屏障造成神經毒性，人體極難代謝 (Tchounwou et al., 2012)。

(6) 銅 (Cu)



銅是人體微量元素（成年人每天需要 1 到 100 mg）之一，在大腦、肝臟和腎臟中含量很高。銅會與人體肝臟中的銅藍蛋白（ceruloplasmin）結合，將銅從肝臟轉運至周圍組織。大約 50% 的銅會在膽汁中排出，其餘 50% 通過其他胃腸道分泌物排出，因此胃腸道是促使銅能在人體中恆定的主要調節者。許多銅中毒的情況通常是由於意外飲用受污染的水源、使用治療燒傷的外用乳膏（含銅鹽類成分）無塗層的銅製鍋具中烹煮酸性食物或自殺。過量的銅會造成 DNA 損傷和減少細胞複製，人體攝入超過 1 g 硫酸銅會導致中毒，攝入銅之致死劑量為 10-20g (Royer et al., 2020)。

(7) 鋅 (Zn)

重金屬鋅對人體是一種必須的微量元素，是人體產生數百種酵素的輔酶。人體每日攝取鋅含量因人而異，成人鋅攝取量為每日 15 mg，血清含鋅之濃度為 109-130 $\mu\text{g/L}$ ，其功能 DNA 表達、細胞膜穩定、維生素 A 代謝及味覺、嗅覺系統中之輔酶，有助幫助胎兒成長。鋅過量攝取來自攝食保健品過量。另吸入含氯化鋅的煙霧彈會導致胸痛、呼吸道刺激，甚至臨床出現類似急性呼吸窘迫綜合症 (ARDS)，導致肺部纖維化(後遺症)(Agnew et al., 2022)。

(8) 鎳(Ni)

重金屬鎳通常為暴露於職業環境所致，其可通過胃腸道吸收或肺部吸入引起人體急毒性。鎳中毒造成症狀分為急性以及延遲症狀。急性中毒的症狀包括噁心、嘔吐、眩暈、刺激等，這些症狀會持續數小時至數天。延遲症狀如胸部僵硬、持續咳嗽、呼吸困難、紫紺、心搏過速、心悸、出汗、視力障礙和虛弱等(Das et al., 2019)。

3.1.2 重金屬汙染處理方法

含重金屬廢水處理的方法包括：化學沉澱、擴散透析、電解沈積、薄膜過濾、物理/化學吸附、生物吸附等處理技術等 (圖 3.1)，說明如下：

(1) 化學沉澱 (Chemical Precipitation)

化學沉澱法對重金屬廢水的去除機制主要利用添加沉澱劑，將可溶性化合物(溶解態離子)轉化為不溶性化合物(沉澱物)發生之化學反應。化學沉澱反應後可接續進行之分離技術包括凝集或過濾除去沉澱物，有時也需額外添加



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

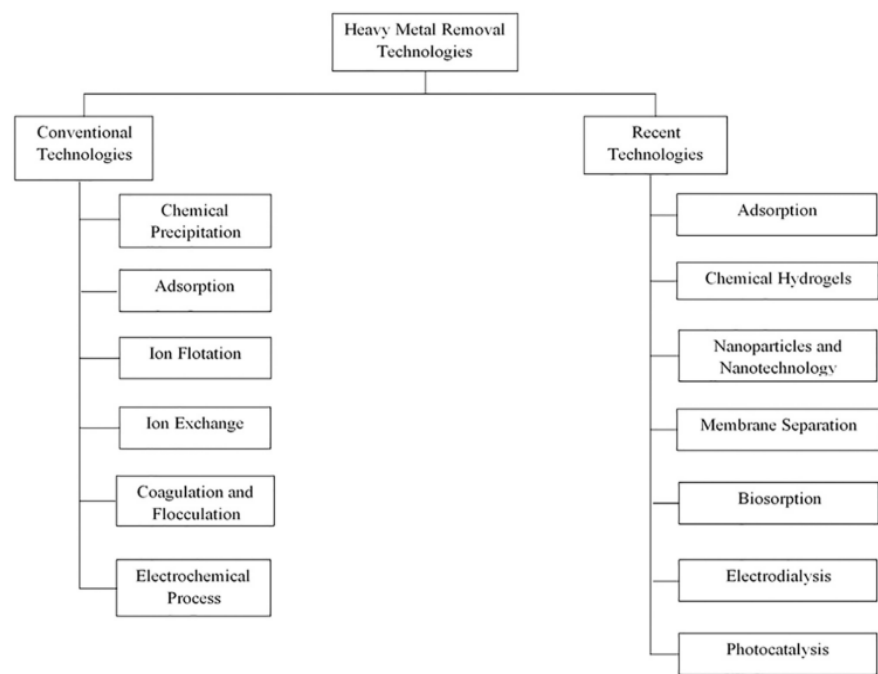


圖 3.1、常見重金屬廢水去除方法 (Shrestha et al., 2021)

助凝劑，用於強化膠羽強度，提昇固液分離之效能。大部分金屬沉澱物為氫氧化物，硫化物和碳酸鹽沉澱也很常用此方法。化學沉澱機制如下：



化學沉澱技術成本較低，設備簡易且容易操作，但對處理低 pH 廢水不是很有效，還會產生大量有毒污泥，還需使用相關穩定劑防止反應發生以及妥善處置。有些金屬鹽類不溶於水，還需加入使其沉澱之陰離子，如此會產生高含水量污泥，增加處理成本。重金屬污泥因處理過程中添加多量的藥劑，使得放流水中總溶解固體物 (total dissolved solids, TDS) 及鹽類濃度增高，亦無法回收再利用 (Wang et al., 2005)。

(2) 擴散透析 (Ion Exchange)

擴散透析法(diffusion dialysis)是應用陰離子交換膜的分離技術。由於陰離子交換膜對於離子具有選擇性通透(permselectivity)。此法原理主要是利用溶質濃度差使其由高濃度往低濃度方向移動，且藉由離子交換膜對不同溶質之通透性(如只允許陰離子通過)使其穿透薄膜。此法經常用於廢酸蝕業中之重金屬回收。

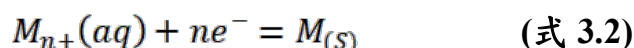
Shi 等人研究結果表明，利用陰離子交換樹脂材料 (D301 和 D314)，在 pH 1-5 範圍內，Cr⁶⁺去除率高於 99.4%；室溫下 D301 表現出比 D314 有更高吸附量，當



溫度提高為 60°C 時，交換膜容易堵塞(fouling)及結垢 (scaling)，在使用時需要定期更換 (Shi et al. 2009)。

(3) 電解沈積 (Electrochemical Process)

電沉積是指在水溶液、非水溶液或熔融鹽體系中，將電流引入電極時陽極發生氧化反應和陰極發生還原反應之過程。系統中重金屬離子在陰極被還原成元素態，並且由於化學反應會沉澱在陰極表面，從而達到去除和回收之目的。主要反應是重金屬離子在陰極的還原作用，其反應如下所示：



有研究顯示在 pH=1 和電流 0.25 A 條件下，重金屬鉻可在 5 小時全部還原；pH=5.5 下，電解 8 小時其去除率為 98.6%。然而此法缺點為成本過高、對 pH 值高敏感且需長期更換電極 (Shrestha et al., 2021)。

(4) 薄膜過濾 (Membrane separation)

此法依薄膜孔洞大小分成微米過濾 (Microfiltration, MF)、超過濾 (Ultrafiltration, UF)、薄膜蒸餾 (Membrane distillation, MD)、奈米過濾 (Nanofiltration, NF)、逆滲透 (Reverse osmosis, RO)及正滲透 (Forward osmosis, FO)等程序。分子或離子通過擴散和擴散速率取決於壓力、溫度、膜的滲透性以及溶液中存在之分子或離子濃度。薄膜過濾過程主要為三個基本原則：吸附、篩選分離和靜電現象。吸附機制基於薄膜與溶質的疏水性相互作用；溶質分離取決於薄膜孔徑和溶質大小。此法主要應用於取代傳統重金屬廢水處理方法之沉澱反應，可用在加強固液離效率。然而此法須注意廢水中不能含有油脂，易使薄膜堵塞。薄膜也需定期清理，否則容易破裂導致處理失效 (卓裕盛，2008)。

(5) 物理/化學吸附 (Adsorption)

吸附被定義為特定化合物通過物理或化學方式附著在固體物體表面。圖 3.2 說明兩種類型不同之吸附機制。附著在固體表面化合物(污染物)稱為吸附質，固體表面稱為吸附劑。重金屬吸附主要為三個連續步驟：首先重金屬從溶液傳送到吸附劑表面，然後吸附在顆粒表面，最後在吸附劑顆粒內流動。影響吸附的因素有溫度、吸附質和吸附劑性質、其他污染物存在及實驗條件 (pH 值、污染物濃度、接觸時間和吸附劑的粒徑大小)。懸浮顆粒和油脂的存在會降低吸附過程的效率，因此，此法可能需要進行預先過濾。目前石墨烯、活性炭、稻殼、界面活性劑、咖啡渣等是研究最多的吸附劑。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

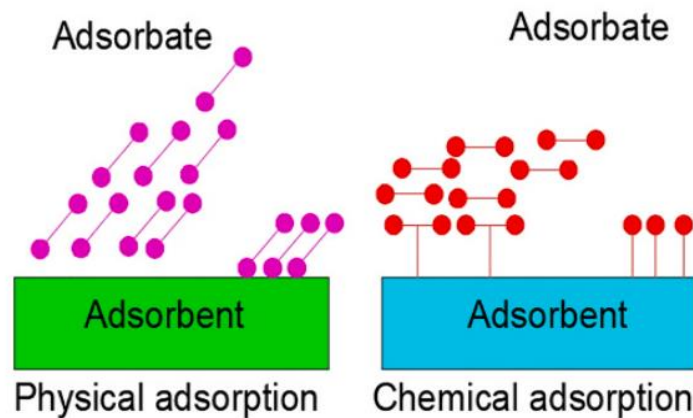


圖 3.2、物理及化學吸附示意圖 (Shrestha et al., 2021)

(6) 生物性吸附 (Biosorption)

此法是由微生物通過細胞膜轉運、細胞壁生物吸附和胞外聚合物包覆、沉澱和氧化還原反應等過程對重金屬作出反應之各種措施。與傳統技術相比，生物性吸附具有以下優勢：成本低、效率高、化學或生物污泥最少化、不需要額外營養。生物吸附劑可再生及進行金屬回收，其過程涉及固相（吸附劑或生物吸附劑、吸附劑、生物材料）和液相（溶劑，通常是水）含有待溶解的物質（吸附物，金屬）。由於吸附劑對被吸附物質親和力較高，後者通過不同機制被吸引和結合，直到固體結合之吸附物量與其保留在溶液中部分之間達成平衡 (Shrestha et al., 2021)。

許多研究證明微生物能夠從水溶液中吸收重金屬，例如: *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 在 pH 值為 7 時，對鎳和鉻的吸附能力較佳；pH 值為 6 時，對鈣、銅及鉛吸附能力較佳。當環境溫度為 $32 \pm 2^\circ\text{C}$ ，吸附時間 30 分鐘條件下，*Bacillus thuringiensis* strain OSM29 對重金屬吸附能力以 Ni 最高 (94%)，其次為 Cu (91.8%) (Oves et al., 2013)。

3.2 國內重金屬污染現況

台灣工業與商業之高速發展，工業聚落及都市發展逐漸擴張至農業區域，導致國土使用規劃趨於紊亂，公共排水及下水道設施建設不及，伴隨而來許多環境污染。許多工廠活動會產生大量的重金屬廢水，若未經過妥善處理排放到環境中，會造成水體及底泥之重金屬污染，影響環境生態。這些污染亦影響人類所需之飲用水及農作物灌溉等，造成經濟損失並影響人類健康。僅管國內有嚴格的放流水標準，但是含重金屬(例如銅、鎳、鋅等)的工業廢水經由電鍍工廠、金屬冶煉加工廠、化學工業製造工廠等排放至河川水體，造成土壤中重金屬污染。環保署民國109年度



曾調查台灣運作工廠，共計有 559 家工廠現勘及 91 家進場調查，其中土壤及地下水污染超過管制標準者共 51家，污染超標率為 56%。91家進場調查工廠所屬業別種類主要有16類，其中又以「金屬品製造業」為最多，占有業別總數之44%，超過管制標準化合物種類也以重金屬為最大宗 (43家)。

3.2.1 地下水重金屬污染現況及其標準

台灣地區地下水污染多集中於工業區廢水排放區，工廠產生的廢棄物及廢水，或石化業及廢五金燃燒產生的排煙及落塵等問題，均可能造成水源不同程度的污染，其中含重金屬的工廠廢水隨著灌溉水流進農地，造成地下水、農地以及人體健康之危害。行政院環保署土壤及地下水基金會公告之污染物管制項目及監測/管制標準分為兩類 (表 3.1)。

表 3.1、地下水污染物之管制項目及監測/管制標準值 (mg/L)

重金屬種類	監測標準值		管制標準值	
	第一類 ¹	第二類 ²	第一類 ¹	第二類 ²
砷 (As)	0.025	0.25	0.05	0.5
鎘 (Cd)	0.0025	0.025	0.0050	0.050
鉻 (Cr)	0.025	0.25	0.050	0.50
銅 (Cu)	0.50	5.0	1.0	10
鉛 (Pb)	0.005	0.05	0.010	0.10
汞 (Hg)	0.0010	0.010	0.0020	0.020
鎳 (Ni)	0.05	0.5	0.10	1.0
鋅 (Zn)	2.5	25.0	5.0	50
銦 (In)	0.035	0.35	0.07	0.7
鉬 (Mo)	0.035	0.35	0.07	0.7

- 1: 飲用水水源水質保護區內之地下水。
- 2: 第一類以外之地下水。

台灣地區仍有許多工業廢水未依規定管制排放，導致水源受到重金屬污染之案例。例如:台南永康煜林企業造成的鉻、鎳污染、桃園楊寶石業之銅污染，高雄永安佑盟工業的鋅、鎳污染等 (程淑芬，2019)。受限於無法分解且擴散很快，受重金屬污染地下水之復育極為棘手，可應用之處理技術相當有限。

3.2.2 土壤重金屬污染現況及其標準

土壤中重金屬多以礦物型式存在，會以不同百分比濃度存在於硫化物、氧化物等礦物中。地殼岩石中還有許多含重金屬的礦物。地質環境中也會存在濃度較



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

高的重金屬，以頁岩沖積土為例，其含有砷、汞、鎘、鉻、鋅等重金屬。台灣地區因為地質條件關係，造成土壤中重金屬天然背景值偏高，主要代表性重金屬為砷、鉻、鎳；嘉南平原以及蘭陽平原的頁岩與黏板岩沖積物含較高濃度砷的氧化鐵，經過雨水沖刷或自然環境的改變，很容易被帶入至地下水並灌溉農作物，造成土壤中含有高濃度砷；北投、士林地區，因受安山岩質火山灰母質的影響，造成砷濃度偏高（許正一，2011）。根據行政院環保署公告之土壤污染管制標準，台灣地區之土壤中重金屬管制如表 3.2。

表 3.2、土壤污染物之管制項目及管制標準值 (mg/kg¹)

重金屬種類	管制標準值	食用作物農地之管制標準值
砷 (As)	60	-
鎘 (Cd)	20	5
鉻 (Cr)	250	-
銅 (Cu)	400	200
鉛 (Pb)	2000	500
汞 (Hg)	20	5
鎳 (Ni)	200	-
鋅 (Zn)	2000	600

¹: 指每公斤土壤中（乾基）所含污染物之毫克數。

目前台灣地區仍有許多工業廢水未依規定管制排放，導致水源受到重金屬污染之案例。例如:台南永康煜林企業造成的鉻、鎳污染、桃園楊寶石業之銅污染，高雄永安佑盟工業的鋅、鎳污染等(程淑芬，2019)。受限於無法分解且擴散很快，受重金屬污染地下水之復育極為棘手，可應用之處理技術相當有限。

在土壤污染現況方面，環保署 109 年公告列管之各類型場址（包含整治、控制、地下水限制區及限期改善類型）共計 127 處，其中以農地 59 處最多，其次為工廠 51 處、其他 11 處、加油站 4 處及儲槽 2 處。其中農地污染主要來自灌溉水源受工廠放流水污染，105 年起調查桃園市、臺中市及彰化縣受污染農地面積最大、高污染潛勢圳路水質超標，因此桃園市、臺中市及彰化縣為示範縣市，督導地方政府劃設總量管制區（表 3.3）。目前全國總計公告水體劃定總量管制區 9 處或及水體加嚴放流水標準區 6 處，主要管制項目為重金屬。若能從源頭事業端加嚴管制重金屬排放總量，可降低對水體之污染負荷，進而減低許多土壤重金屬污染。

表 3.3、總量管制區-以桃園市為例



水體	管制項目	管制原因
新街溪、 埔心溪	鎘、總鉻、六價鉻、銅 鋅、鎳等重金屬	新街溪及埔心溪流域周圍區域經調查列為高污染潛勢灌溉水利小組，渠道監測水質有不符灌溉用水水質標準之情況，故推動總量管制作業。
南崁溪	銅	南崁溪屬桃園市市管河川，主要流經龜山、桃園、蘆竹、大園等區域，主要匯集市鎮污水及部分工業廢水，因同時為附近農田之灌溉水來源，造成工業廢水所含重金屬因引灌而蓄積於農地土壤中。為改善水體污染情形，故推動銅排放總量管制作業。

3.2.3 台灣河川底泥重金屬汙染現況

底泥指因重力而沉積於地面水體底層之物質，由砂粒、黏土、坩土或其它物質混合並沉降在水體底層的軟質混合物。來自受侵蝕的土壤礦物及經分解的動植物碎屑等天然有機物或人為污染物，藉由風、水及冰雪帶到水體底部。圖 3.4 為河川底泥形成示意圖。河川底泥對於生態系具有非常重要的功能，河川底泥能幫助河川進行自淨功能、給予浮游生物以及底棲生物生存棲息地，因此當河川底泥受到重金屬的汙染，便會使重金屬進入生態食物鏈從而進入人體，造成大眾健康危害；除此之外，重金屬進入生態鏈後會有累積性，也就是生物放大作用 (Biomagnification)，一旦超過生態中各生物之重金屬耐受量，便會對生物族群甚至群集造成不可回復之傷害 (Paquin et al., 2000)。圖 3.5 為污染物在水體底泥中及食物鏈傳輸示意圖。

目前環保署底泥品質規範共有 41 種指標，重金屬項目共有 8 種，包括砷(As)、鎘(Cd)、鉻(Cr)、銅(Cu)、汞(Hg)、鎳 (Ni)、鉛(Pb)、鋅(Zn)等，這些重金屬毒性皆很高，一旦進如人體便很難排出，微生物在水體中也很難利用降解來降低毒性，嚴重破壞水域環境與生態系統的平衡。參考行政院環境保護署公告底泥品質



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

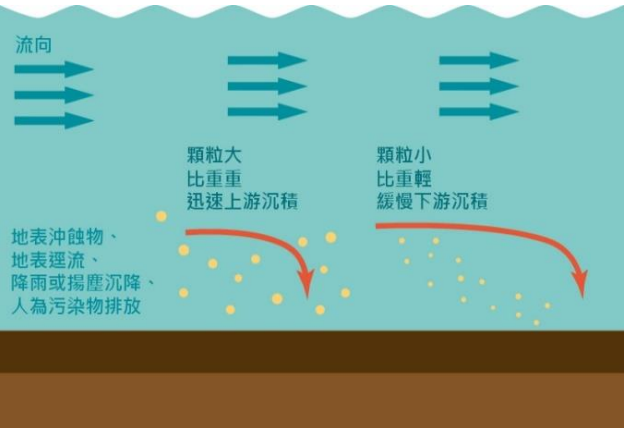


圖 3.3、河川底泥形成示意圖

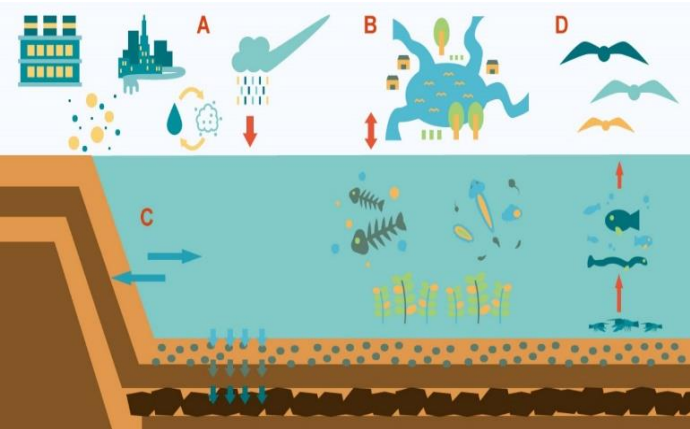


圖 3.4、污染物在水體底泥中及食物鏈傳輸示意圖：(A)水體底泥污染來源；(B)污染物附著、沉降與積累過程；(C)污染物固液相交換作用；(D)污染物進入食物鏈。

指標之分類管理及用途限制辦法，對底泥中之重金屬管制如表 3.4，各有其風險評估啟動值(簡稱為上限值)與增加檢測頻率值 (簡稱為下限值)。

表 3.4、河川底泥污染物之管制項目及管制標準值 (mg/kg³)

重金屬種類	管制標準值	
	上限值 ¹	下限值 ²
砷 (As)	33.0	11.0
鎘 (Cd)	2.49	0.65
鉻 (Cr)	233	76.0
銅 (Cu)	157	50.0
汞 (Hg)	0.87	0.23
鉛 (Pb)	161	48.0
鎳 (Ni)	80	24.0
鋅 (Zn)	384	140

¹: 風險評估啟動值(簡稱為上限值)：指底泥品質分類時，底泥品質指標項目之高濃度限值。

²: 增加檢測頻率值(簡稱為下限值)：指底泥品質分類時，底泥品質指標項目之低濃度限值。

³: 每 kg 底泥中 (乾基) 所含污染物 mg。

3.3 重金屬資源循環與回收再利用



考量國外管制標準與國內相關研究，環保署 2021-2027 將逐步加嚴事業單位放流水標準並新增管制項目。針對製程運作重金屬且排放量達一定規模之晶圓製造及半導體製造業、光電材料及元件製造業、化工業、金屬基本工業、金屬表面處理業、電鍍業、印刷電路板製造業等事業、科學工業園區、石油化學專業區和其他工業區專用污水下水道系統，逐年加嚴鎘、鉛、總鉻、六價鉻、銅、鋅、鎳、硒和砷等 9 項重金屬之管制限值(限值加嚴為 50%或 70%)，並新增“錫”管制項目(限值 2.0 或 1.0 mg/L)，可知各類工廠仍需持續加強處理重金屬廢水及加強管制放流水之重要性，嚴格控制 (亦即有效處理) 工廠排放重金屬廢水 (陳等，2009；Lakherwal et al., 2014)。

許多重金屬對微生物具有高毒性，因此重金屬廢水並不適合採用生物處理方法進行，污水處理廠多採用物理及化學處理方法進行之。如化學沉澱法 (chemical precipitation)、電化學處理法等，這些方法操作成本相對較高，且去除效率隨廢水中重金屬種類及濃度不同，處理效率亦不相同。舉例而言，化學沉澱法是藉由化學反應使廢水中溶解態重金屬轉變為重金屬沉澱化合物，再利用過濾與分離使重金屬去除。受到沉澱藥劑和環境條件影響，處理後之水質通常無法達到放流水標準，造成土壤及地下水污染，因此還配合其他高級程序處理後才能符合放流水標準，釋放水體環境。化學處理法會同時產生具化學物質之沉澱物，需以(有害)事業廢棄物方式進行處置，因此仍需要開發有效重金屬處理技術。

傳統工業體系主要是發展物料思維，透過原生物料生產製造產品、經消費後廢棄，然而受到國內外資源稀缺與環境衝擊，限制產業永續發展，因此全世界開始以永續材料思維，發展循環經濟架構下的工業體系，即高性能、低能耗、無毒性、零廢棄。為配合加速產業轉型升級，政府提出5+2產業創新計畫-「循環經濟」作為驅動台灣下世代產業成長的核心，為經濟成長注入新動能。

3.3.1 國內推動資源循環與零廢棄之相關政策

環保署以「資源循環零廢棄」為願景，積極落實減廢及資源循環，廢棄物資源化及妥善運用，計畫依物質生產、消費、廢棄物管理及二次料市場再生等4大面向，推動相關策略措施 (圖3.6)。環保署亦針對這些面向訂定對應之關鍵績效指標，並持續藉由跨部會力量推動資源循環，以達資源使用效益極大化與環境衝擊影響極小化之目標，由生產、消費、廢棄物管理及二次料市場四個面向訂定12項推動策略，並請各目的事業主管機關共同推動資源循環，並以塑膠、金屬、營建廢棄物、廚餘作為優先推動項目，技術推動架構如圖3.7所示，包括有機生物資源、有機化學資源、非金屬殘渣資源、金屬資源循環等重點工作，其中金屬資源循環如回收銅及稀

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬
貴金屬為推動資源回收再利用技術主要架構之一。

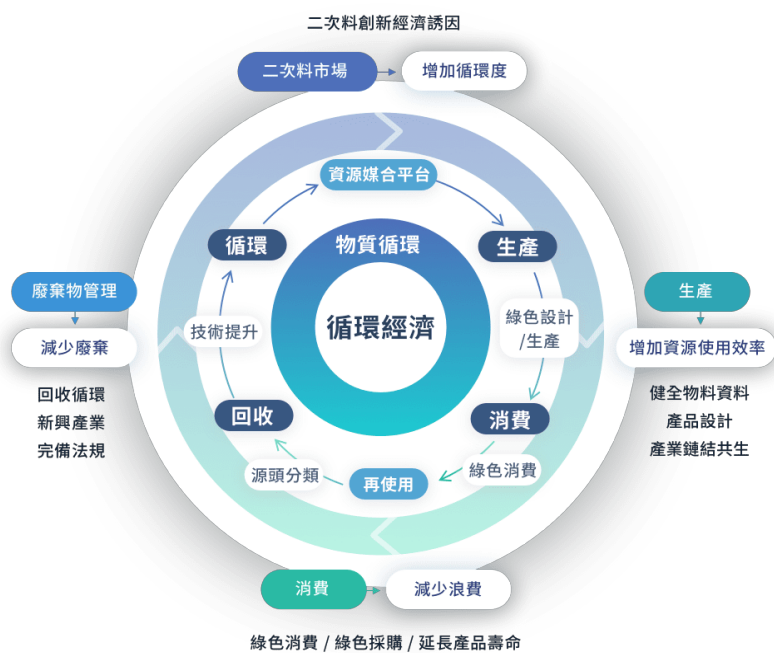


圖3.5、環保署資源回收再利用推動計畫策略 (環保署，2020)

<https://smmdb.epa.gov.tw/circulation/index>



圖 3.6、環保署資源回收再利用技術推動架構 (環保署，2020)

3.3.2 重金屬回收再利用應用實例



人類進行各種工業活動需要大量礦物，例如金、銀、銅等。世界上銅礦源 90 % 分布於全世界四大地區：洛杉磯山區、大湖區、安地斯山脈及薩伊的上喀；黃金礦 50 % 來自於南非，其供應量更是達到全球 79 %。此礦物之供給量遠小於需求量，其生成速度與人類消耗相比更慢，屬於枯竭性資源，也使得貴金屬價格逐漸攀升，對重金屬回收也更加重視。目前重金屬回收主要以貴金屬作為目標，根據統計，城市產生之電子廢棄物中，總體含量遠大於現存原礦之含量，例如：IC 板中黃金含量為 0.5 g~2 g/Kg；PARTS 檔板洗淨後含金量高於 75 %；鍍金 PC 板黃金含量 2 g~3g/Kg；銅鍍金中，銅佔 90 %、黃金佔 0.2~1 g/Kg；廢印刷電路板中硬板之含銅量約 10~15 %，軟板含銅量約 40~50 %，裁板邊料含銅量約 25 %~30 %。相較於製程，二次資源回收與再利用所投資的設備、汙染及耗能較少，因此將貴金屬進行回收及二次使用是絕對必要的手段（金益鼎企業集團，2011）。目前回收之電子廢棄物後多為收取貴金屬進行二次售賣或重回到電子生產鏈中，其貴金屬回收之流程如圖 3.8。

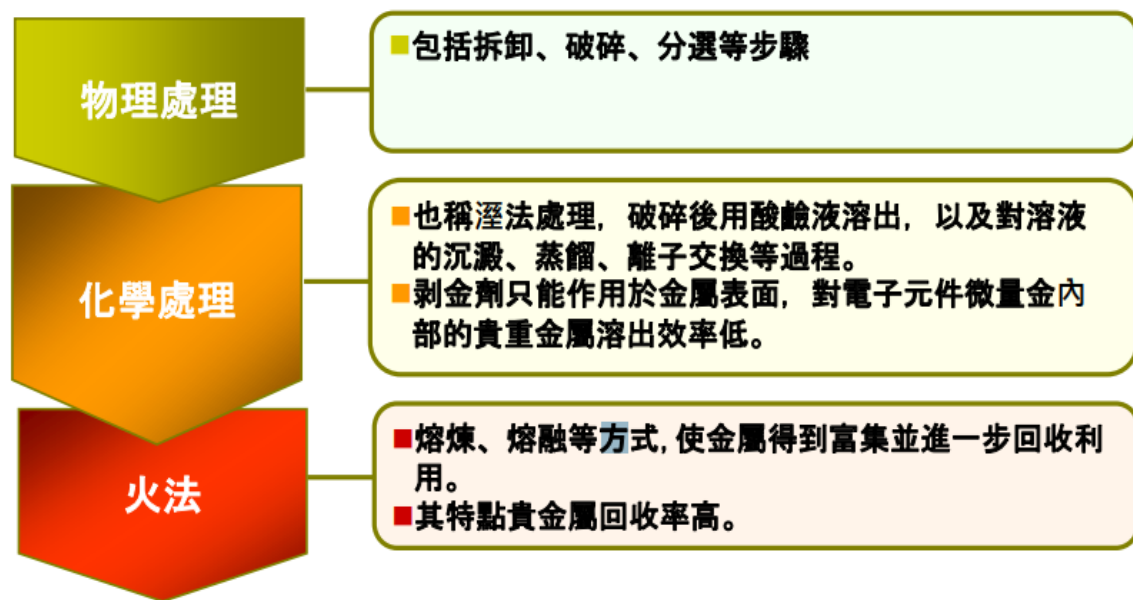


圖 3.7、電子廢棄物中貴金屬回收之流程（金益鼎企業集團，2011）

除電子廢棄物外，國內印刷電路板業、電鍍業及金屬表面處理業等產業製程廢水經廢水處理系統處理後會產生許多(無機性)重金屬污泥，其中重金屬成份大多以銅、鎳和鉛為主，例如電鍍製程廢水處理污泥、污染防治設施或製程產生之含銅污泥等，屬有害事業廢棄物。若使用固化方式處理，除固化作業成本外，再加上後段安定化掩埋成本，其處理費用十分高昂，因此若能將這些重金屬污泥進行回收並進行資源再利用，可促進其廢棄物循環利用。舉例而言，印刷電路板業含銅污泥，因其具有高含銅量和單一性，適合提煉金屬銅或結晶硫酸銅之資源化



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

作業，經濟效益甚高。重金屬汙泥資源化技術如下表所示(表 3.5) (林冠嘉，2004)。

除回收貴金屬，也有前人研究將金屬廢棄物回收再利用於合成觸媒，將其價值再提高。林等人將不同金屬廢棄物回收後，合成觸媒並評估對 C_3H_6 、VOC、CO、NO 等不同汙染物之催化效果，顯示廢鋰電池回收合成的鋰鈷觸媒對 VOC、CO、NO 等不同汙染物具催化效果，200-300°C 反應溫度下，三種氣體汙染物之轉化率>99%。廢錳鋅電池合成的 $MnO-ZnO/Al_2O_3$ 觸媒在 300°C 對 C_3H_6 之去除率達 98%，200°C 時 CO 去除率達 98%。印刷電路板廢液與廢料所合成 CuO/AC 觸媒，300°C 反應條件下，對於 C_3H_6 與 NO 之去除效率可達到 85~95% (林等人，2018)。

不僅僅電子廢棄物可用於回收金屬及再利用，處理重金屬廢水同時也能從材料中回收金屬，此部分通常是用生物材料進行之。例如酚類化合物之高親核性質 (high nucleophilic) 可通過螯合，使金屬離子失去活性，植物中恰好有許多這類化合物 (如生物鹼、黃酮類、皂苷、類固醇、單寧、酚酸等)，其捕捉到金屬離子後，就可以將其還原，經過燒結和熔煉後形成納米顆粒。例如 *Tabebuia berteroi* 葉子提取物富含酚類，可將 Fe^{2+} 和 Pd^{2+} 離子一起還原為其各自金屬 NPs；銀杏葉萃取物中的槲皮素可還原 Cu^{2+} 離子生成 $CuNPs$ ，甚至不需添加任何封端劑。真菌和細菌具有製作 NP 之潛力，甚至可同時去除廢水中之重金屬，如 *Aspergillus clavatus* 可合成胞外奈米銀 (Ag-NPs)；*Candida albicans* 可合成胞外奈米金 (Au-NPs)。這些合成後的奈米金屬，奈米銀 (Ag-NPs) 具高抗菌特性，在醫學、工業、畜牧業、化粧品製造皆可大量運用；奈米金 (Au-NPs) 則可用於免疫測定、蛋白質測定等，可做為生物篩選試驗之標記物 (Ahmad et al., 2015)。



表 3.5、重金屬污泥資源化技術 (林冠嘉，2004)

類別	原理簡介
溶提-置換電解 (含鋅之多種金屬污泥)	本法是利用鹼性消化來溶解鋅、鉛及鎘，而銅、鎳、鐵與鉻則不溶。當反應完成，污泥經過濾後，不可溶部分(濾渣)送往不含鋅污泥之處理系統，濾液則送往置換系統。在置換系統內，加入足量鋅粉，使鉛、鎘等陰電性較鋅高之金屬沉澱出來，再經乾燥後即可出售。此時溶液中僅剩鋅且以鋅酸鈉形態存在，再以電解法處理後即可回收鋅，剩餘鹼性溶液則可回收再利用。
溶提-置換電解-結晶 (不含鋅之多種金屬污泥)	利用硫酸浸洗，將污泥中之銅、鎳、鉻與其他金屬溶解，亦可同時施行充氣、加溫等程序加速反應進行。反應完成後，加入足量銅粉可將貴金屬(尤其是銀)沉澱出來，再經過濾後，不溶物(硫酸鈣、硫酸鉛、銀)經乾燥後可出售給貴金屬精製商。濾液中含有銅、鎳、鐵、鉻等金屬，經蒸餾程序後，濾液中之氯化物、硼酸鹽以 HCl 及 HBO ₃ 形態回收，硝酸鹽則被分解為氮與水等物質，經加水過濾後送往鐵回收系統，其中鐵被轉化成硫酸亞鐵之形態回收後可售予肥料製造商或水處理公司；鉻則以 Cr(OH) ₃ 之形態回收並出售給不鏽鋼工業。鐵鉻回收系統後之殘餘濾液中僅剩銅及鎳，利用電解法回收銅，純度可達 99%。含鎳之殘餘液利用蒸發結晶法，蒸發去除濾液中之水份可提高 H ₂ SO ₄ 濃度，NiSO ₄ 因此得以結晶析出。鎳在其鹽類中含量約 23~25%，可出售給鎳製造商，剩下濾液為不含金屬之硫酸溶液，濃度達 75%，可以回收利用。
氨浸	含氨之碳酸鹽溶液作為浸漬劑，將氫氧化物污泥中之鎳、銅、鋅等金屬形成可溶性錯銨碳酸鹽，被浸漬至溶



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(多種金屬污泥)	液中。鉻與鐵在形成錯鉍酸後會繼續水解，再度形成氫氧化物沉澱而留在污泥中，因此系統中可溶性鐵、亞鐵及三價鉻之含量極低。可溶性錯鉍酸鹽經過濾後，浸漬殘渣部分可經乾燥、煅燒、萃取而資源化成鉻黃與鐵黑產品；濾液主要是銅、鎳、鋅之錯鉍酸，經通入蒸氣解離後會形成鹼式碳酸鹽沉澱並回收氨，之後加入硫酸溶解形成銅、鎳、鋅之硫酸鹽溶液，再利用已商業化有機溶劑進行重金屬溶劑萃取，再將銅、鎳、鋅予以分離純化，成為各單金屬的硫酸鹽溶液。最後再應用結晶技術，將其製成資源化產品。
酸溶提 (單一銅污泥)	利用酸在溶提槽中與污泥充份攪拌混合，藉由酸之溶提能力，將污泥中之重金屬由固相轉移到液相。完全溶提後，將過濾後之酸溶液置換。因銅離子還原電位甚高，故加入鐵粉將其還原出來。待完全置換後加入沈澱劑，沉澱鉛、鎳、鋅等離子。過濾後污泥仍有重金屬殘留其中，故須進行反沖洗。最後利用清水反洗污泥餅，以充份達到污泥無害化。
熔煉(含銅污泥)	利用 600~750℃ 將污泥中水份完全蒸乾，並使污泥中之金屬氫氧化物轉化成金屬氧化物，再於 1,300~1,600℃ 高溫下，加入焦炭進行熔煉，使金屬氧化物還原為金屬。熔煉過程中，加入含矽化物之造渣材料，結合鐵氧化物成為熔點較高之複合物，以提高銅之純度 (約為 90%左右)。為再提高銅含量，可再以電解方式進行精鍊工程。



3.4 微生物吸附重金屬機制

3.4.1 原理

生物吸附法 (biosorption) 是利用生物體本身的化學結構及成分特性，通過各種物理、化學等機制包括通過生物材料進行離子交換、吸附、螯合、微沉澱等來吸附溶於水中之重金屬離子，再經由固液分離去除之。圖3.9為各種生物材料(包括微生物)對染料及重金屬吸附之主要原理。

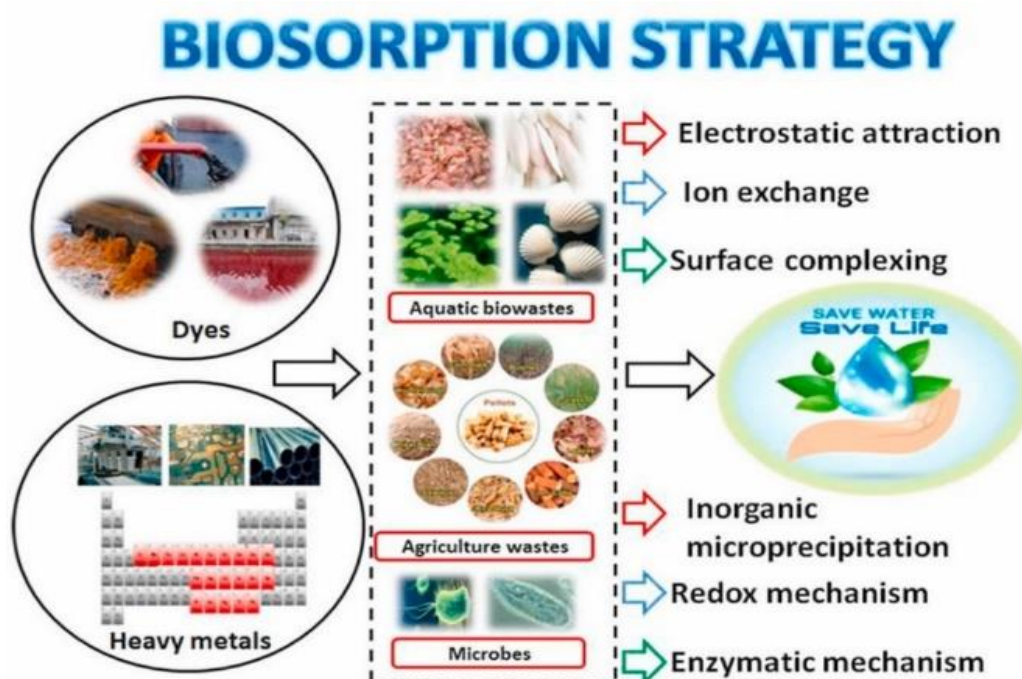


圖3.8、生物材料(包括微生物)對染料及重金屬吸附之原理
(Elgarahy, A.M. et al., 2021)

細菌、藻類、真菌、酵母菌等不同微生物種類及其產物均可做為生物吸附劑，對溶解態金屬具很強之吸附能力 (Rai et al., 2021)，可與微生物胞外(或胞內)蛋白質與肽聚糖(polysaccharide)成分形成穩定的相容性結構，用於處理重金屬廢水。若以細胞壁結構不同區分，大部分革蘭氏陽性細菌中，細胞壁為主要金屬螯合劑；革蘭氏陰性菌細胞膜則由 outer membrane 和 cytoplasmic membrane 組成，其周質空間有薄薄一層肽聚糖，微生物會在細胞膜極性區域或沿著肽聚糖累積重金屬。然而細菌吸附重金屬能力會受環境因子所影響，如溶液初始 pH、離子強度、營養條件、溫度等。圖 3.10 為細菌吸附重金屬之主要機制示意圖。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

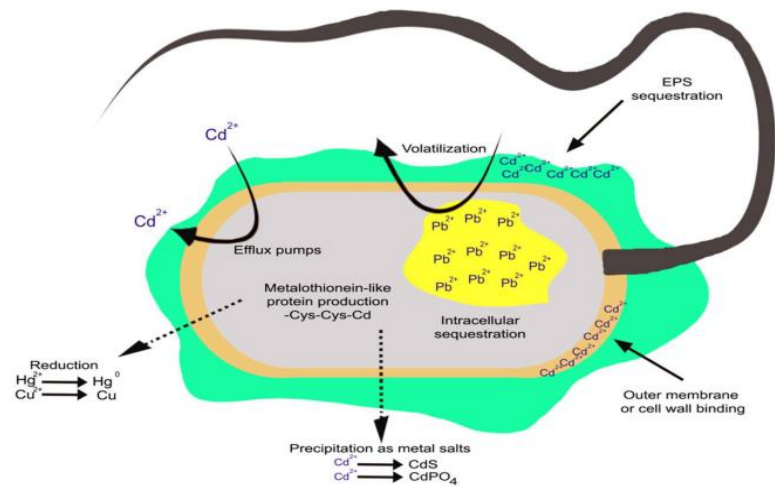


圖3.9、細菌吸附重金屬之主要機制 (Osman et al., 2019)

細菌對重金屬之吸附機制可依據是否進入細胞發生代謝作用分成三類 (圖 3.11)，說明如下。

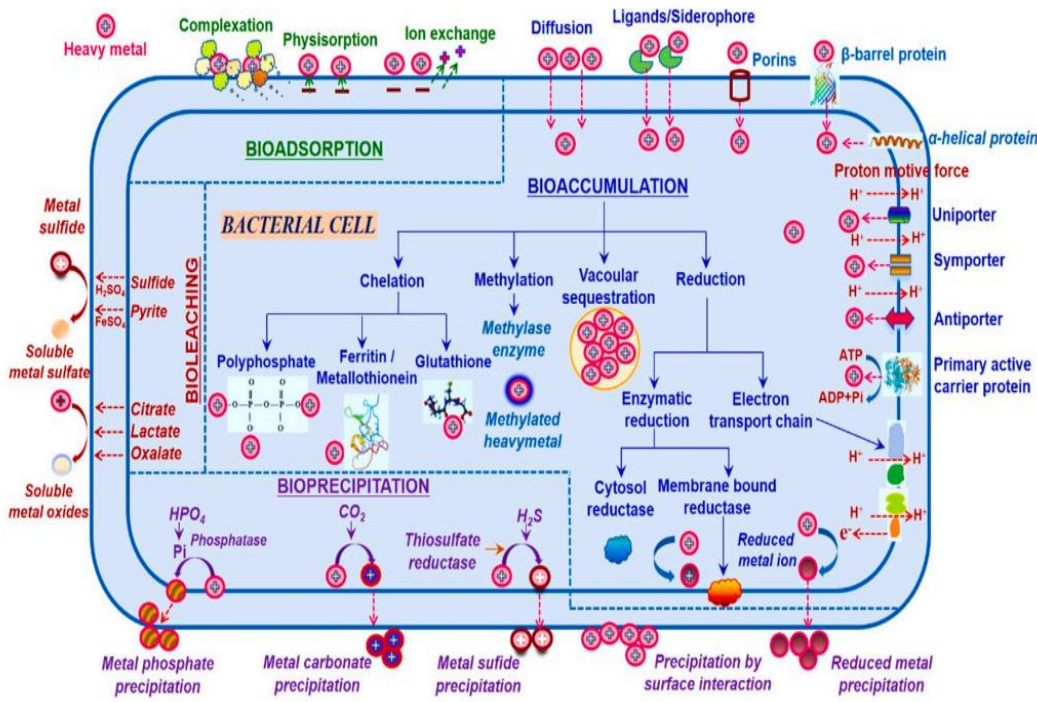


圖 3.10、細菌吸附重金屬之代謝反應 (Sreedevi et al., 2022)



1. Bioadsorption (生物吸附作用)

微生物細胞具有吸附重金屬之能力，主要機制包括胞外沉澱反應、物理性吸附 (凡得瓦爾力)、化學性吸附 (離子鍵結及共價鍵結)、離子交換、靜電吸引力、複合反應(complexation)等，將其金屬顆粒吸附到細菌基質上，其與代謝反應無關。細菌細胞壁主要由肽聚醣構成，其成分中的 disaccharide N-acetylglucosamine β 1-4-N-acetylmuramic acid 與 peptide 相連，肽鏈是由 L-alanine、D-glutamic acid、D-amino pimelic acid 或 L-lysine 以及 L-alanine 形成的四聚體皆使細胞壁電荷為負。除外，革蘭氏陽性細菌細胞壁中的 glycopolymer teichoic acid，也增加其總負電荷。另外，與革蘭氏陽性菌相比，革蘭氏陰性菌的細胞壁是由較薄的肽聚醣組成，所以革蘭氏陰性菌利用由脂多醣 (LPS)、脂蛋白和磷脂質形成的外膜與重金屬結合。總體而言，革蘭氏陽性細菌細胞壁因其外側含有糖蛋白，比革蘭氏陰性菌的 LPS 和磷脂更容易與重金屬結合 (Sreedevi et al., 2022)。為提高微生物吸附劑之容量及其特異性，許多學者亦對微生物進行基因工程改造，使其在細胞外表面具有更多的重組金屬結合蛋白和肽鏈 (Kuroda and Ueda, 2014)。

2. Bioaccumulation (生物累積作用)

生物累積作用是微生物吸收非必須代謝金屬時，該重金屬會通過與必需代謝金屬相同之運輸途徑吸收這些必須非代謝金屬，導致非必須代謝金屬在細菌細胞內的流入和積累。當反應發生時，金屬離子會與細菌細胞壁外表面自由基結合，藉由 energy independent mechanism 至內部區域。金屬接著通過 energy dependent/independent process 擴散到細胞質中。接著通過鈉 (Na^+)、鉀 (K^+)、鎂(Mg^{2+}) 等代謝關鍵離子的轉運途徑，進入微生物 inner membrane，並積累在細胞中(Sreedevi et al., 2022)。

3. Bioprecipitation (生物沉澱作用)

溶液中金屬通過細菌胞內防禦機制產生沉澱反應。細菌細胞表面和金屬離子的化學作用導致金屬沉澱，該沉澱方式為還原反應、形成硫化物和磷酸鹽，其沉澱形式取決於細菌種類和環境 (Sreedevi et al., 2022)。

3.4.2 微生物吸附重金屬位置

細菌吸附重金屬離子之主要三種位置，包括吸附在胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substance, EPS)、細胞壁吸附、胞內封存 (Zang et al., 2009; Mikutta et al., 2012)。分別說明如下。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

1. EPS 吸附

胞外聚合物 (EPS) 是微生物進行有機物水解及其代謝過程產生之細胞外部物質，EPS 成分中具羧基、酰胺、氨基、羥基等多種官能基，對重金屬具有高親和力且吸附作用可重複進行。EPS 可分為附著型 EPS (Bound EPS) 及可溶性 EPS (dissolved EPS)。附著型 EPS 包括莢膜聚合物、鬆散結合的聚合物、凝聚之凝膠及和附著之有機材料 (Li and Yang, 2007)；可溶性 EPS (Soluble EPS) 包括可溶性大分子、黏液和膠體 (Comte et al., 2007)。圖 3.11 為胞外聚合物(EPS)分類示意圖。

EPS 通常覆蓋於細菌外圍，有些依附於細胞壁形成莢膜，稱為莢膜多醣 (capsular polysaccharides)；有的形成黏液，稱為黏液多醣 (mucopolysaccharides)。EPS 結構和成分組成有利於與金屬離子螯合，並阻礙他們穿透細胞表面 (Gupta and Diwan, 2017)。生物性吸附是帶正電荷金屬離子和負電荷 EPS 與微生物細胞表面間之相互作用造成。

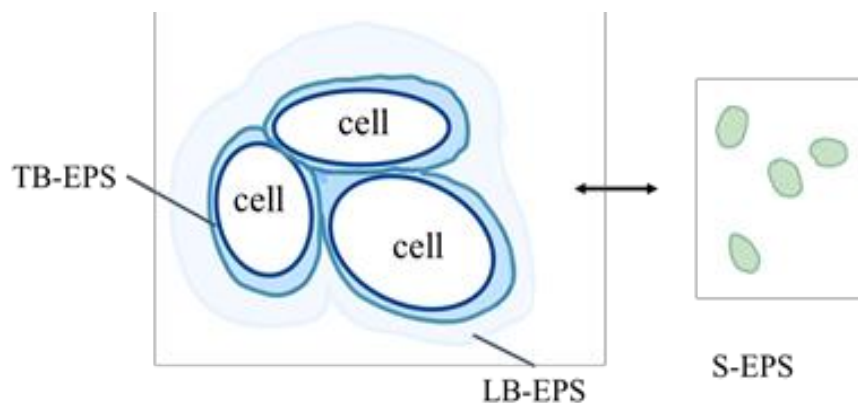


圖3.11、胞外聚合物(EPS)型態示意圖 (Wu et al., 2022)

2. 細胞壁吸附

細胞壁吸附主要是細菌細胞壁之肽聚醣，或真菌具有之厚細胞壁，所含之幾丁質(chitin)、葡聚糖(glucan)和甘露聚糖(mannan)等，以各種方式包括固定化 (immobilization)、吸附(adsorption)和吸收(uptake)等與金屬離子結合。其中金屬離子結合可能因為環境中 pH 變化而發生改變 (Boriová et al., 2019)。

3. 胞內封存

胞內封存是金屬離子與各種細胞質化合物形成複合物的過程，稱為金屬細胞內螯合。不同重金屬離子進入細菌菌株後，會經由轉移、附著或嵌入細胞胞器中。首先重金屬離子經由微生物細胞膜脂質雙層進入細胞，一旦進入細胞內空間，重



金屬離子就會被扮演儲存重金屬功能之蛋白質和肽配體(peptide ligands)所封存。

細胞質中金屬螯合作用主要由金屬硫蛋白 (cysteine、 γ -glutamylcysteine 及存在於嗜鹽古菌中的 glutathione analogue、聚磷酸鹽等) 以及嗜鹽性細菌和古菌中產生之螯合分子進行螯合作用。例如儲鐵蛋白鐵蛋白 (Iron-storage protein ferritin)、銅和儲鋅金屬硫蛋白(copper and zinc-storing metallothioneins)是細菌細胞中常見的金屬螯合蛋白。金屬進入細菌細胞時，會因此誘導金屬硫蛋白基具高表現量並生成過量，如此加強對金屬之結合和螯合反應 (Sreedevi et al., 2022)。圖 3.12 為鐵離子胞內封存示意圖。

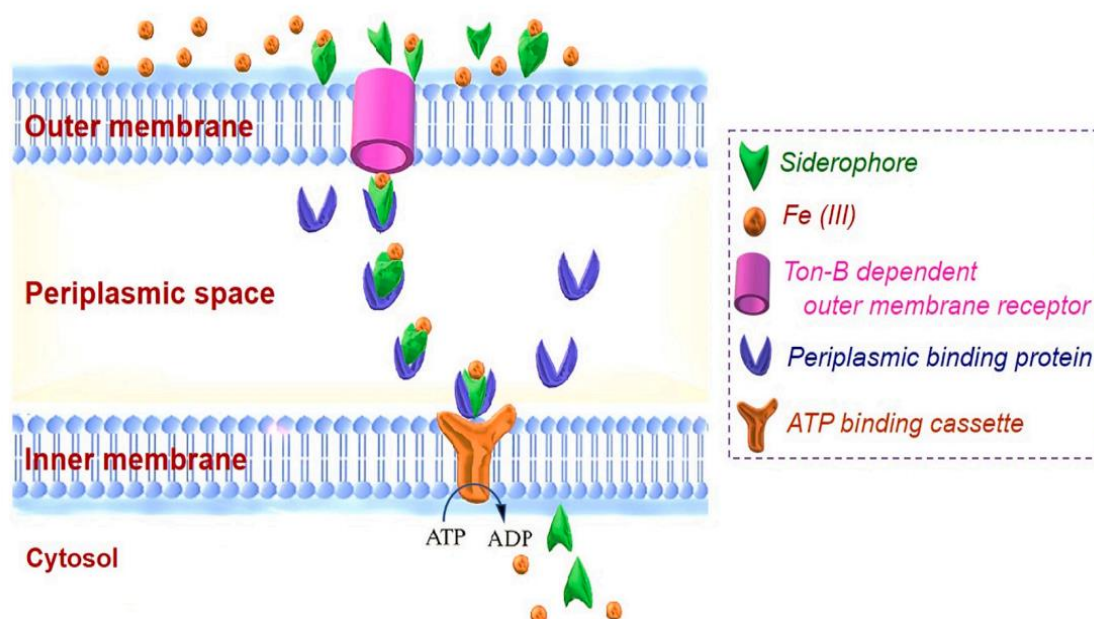


圖3.12、鐵離子在革蘭氏陰性細胞內封存示意圖 (Sreedevi et al., 2022)



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

3.5 重金屬對微生物之吸附動力學

一般而言，重金屬之吸附動力學可分為兩種，以下分別說明之。

3.5.1 Langmuir 等溫吸附模式

Langmuir 模式是假設表面結合位點是均勻分佈，吸附劑表面位置都只可吸附一個分子，吸附過程直到該表面上的單層重金屬出現為平衡，當表面被完全覆蓋時發生最大吸附。所有吸附位置對被吸附分子具有相同之親和力且每個位置上被吸附分子之存在，並不影響其餘位置之吸附效應，表示此等溫線為理想的單層均質吸附模式 (Tripathi et al., 2019)。公式如下：

$$Q_e = \frac{(Q_{max} * b C_e)}{(1 + b C_e)} \quad (\text{式2.3})$$

式中

Q_e : 吸附在吸附劑表面的吸附質 (mg/g)；

C_e : 平衡條件下溶液中存在的吸附質 (mg/L)；

Q_{max} : 吸附劑對吸附質的最大吸附量 (mg/g)；

b : Langmuir 常數，表示結合位點的親和力（吸附/脫附）(L/mg)。

3.5.2 Freundlich 等溫吸附模式

Freundlich 模式最早用於描述氣相吸附和溶質吸附，假設為吸附劑表面具有各種不同吸附位置，而每一位置上之吸附均依循 Langmuir 等溫模式，是一種異質吸附的模式 (DeMessie et al., 2022)。與 Langmuir 模式不同的是：

(a) Freundlich 等溫吸附曲線模型假設具有不同親和力的異質表面具有多層吸附；

(b) 平衡時為不同表面皆完全吸附溶質。

Freundlich 模式公式如下：

$$Q_e = K_f C_e^{\frac{1}{n}} \quad (\text{式 2.4})$$



式中

Q_e : 反應達平衡之吸附量，重金屬(吸附質)mg/(生物)吸附劑 mg;

C_e : 吸附平衡後，液相中之重金屬(吸附質)濃度 mg/L；

K_f : 為經驗常數，與吸附容量相關之吸附反應常數。

n : 為經驗常數，與吸附強度相關之吸附反應常數。

前人研究已證實微生物進行對重金屬之生物吸附行為為多層吸附，本研發專案因此以 Freundlich 等溫吸附模式作為依據。

3.6 微生物合成奈米金屬顆粒

微生物合成 NPs 被認為是一種對環境生態友善之綠色合成方法，其具有控制 NPs 顆粒大小與形狀之潛力(Priyadarshini et al., 2013)。微生物合成奈米顆粒之主要方式為:金屬離子在微生物細胞表面或內部被捕獲，接著在酵素(酶)作用下將捕獲之金屬離子還原為奈米顆粒 (Li et al., 2011)。不同微生物形成 NPs 之機制不盡相同，如金屬捕獲 (heavy metal ions trap)、酶還原 (reduction of metal ions)和封端 (capping)等。此外，微生物生長過程產生之生物有機分子，如蛋白質、氨基酸和多醣等常用為奈米顆粒之封端劑和穩定劑，有助於穩定溶液中 NPs 之分散，避免發生團聚現象 (Ghosh et al., 2021)。圖 3.13 為微生物合成奈米顆粒機制圖。

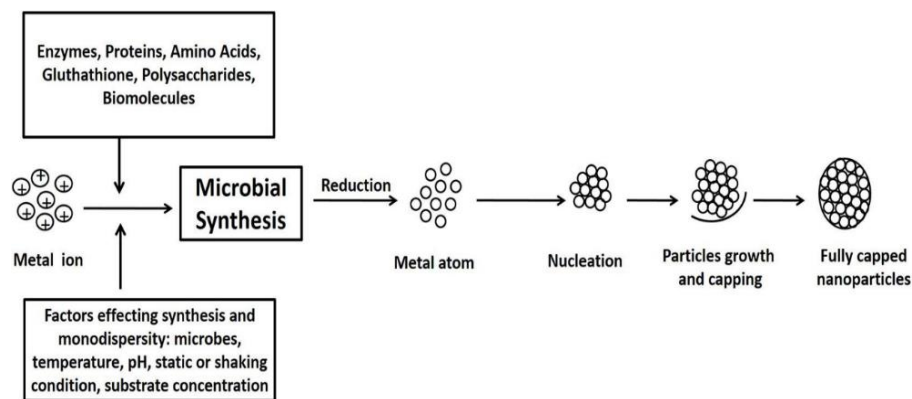


圖 3.13、微生物合成奈米顆粒機制圖 (Ghosh et al., 2021)

3.6.1 胞外合成機制

胞外合成奈米金屬顆粒過程是透過 EPS 之吸附作用進行(圖 3.14)。由於細菌細胞壁具有負電荷，可和金屬離子結合，誘發催化反應。這些催化反應除氧化還

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

原反應外，也涉及釋放特定酵素，例如微生物分泌的還原酶，作為其防禦機制的一部分 (Jacob et al., 2015)。胞外合成方法可控制奈米顆粒大小，合成過程中，蛋白質可作為奈米顆粒之封端劑，控制奈米顆粒大小，同時亦兼具生物相容性。表 3.6 為利用微生物胞外合成奈米金屬之相關研究。

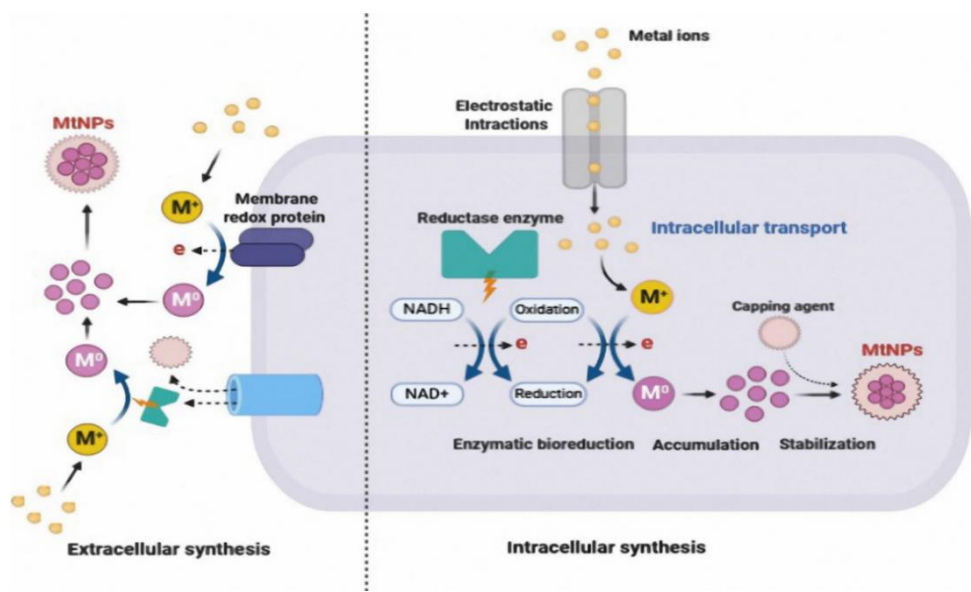


圖 3.14、重金屬離子於胞內及胞外合成 NPs 機制圖 (Bahrulolum et al., 2021)

表 3.6、微生物合成胞外 NPs 之相關研究

微生物	奈米金屬	粒徑	出處
<i>Bacillus subtilis</i>	Au-NPs	180-250 nm	Beveridge et al., 1980
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AG259	Ag-NPs	200 nm	Joerger et al., 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SM ₁	Fe-NPs	< 30 nm	Srivastava et al., 2012
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CuO-NPs	150 nm	Varshney et al., 2011
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ZnO-NPs	57.7 nm	Jayaseelan et al., 2019

3.6.2 胞內合成機制

胞內合成 NPs 過程如圖3.14，主要是透過細胞壁捕獲金屬離子(M⁺)，先轉移 (intracellular transport)到細胞質，將其金屬離子和酵素(如硝酸還原酶)或代謝物反應還原成奈米顆粒(M₀) (Bahrulolum et al., 2021)。例如有研究利用 *Pseudomonas stutzeri* AG259 之 NADH-dependent reductase enzyme 其自身提供電子並將其氧化



成 NAD^+ ，釋放出的電子轉移可將金屬離子藉由生物還原反應還原成金屬奈米顆粒 (Klaus-Joerger et al., 2001)。圖3.15 為革蘭氏陰性菌將重金屬離子運送至細胞質之機制圖，通過轉運蛋白(transporters)(紫色箭頭)穿過脂質膜，轉運到細胞質並由金屬結合實體(metal-binding entities)(綠色箭頭)所封存，淺紫色箭頭指革蘭氏陰性菌攝取重金屬離子時所需的能量來源 (Diep et al., 2018)。

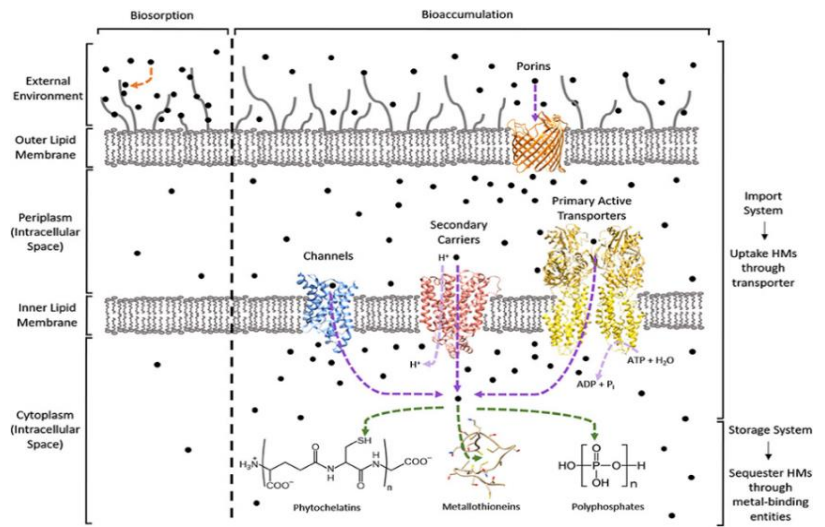


圖3.15、重金屬離子運送至革蘭氏陰性菌細胞質之機制圖 (Diep et al., 2018)

胞內合成奈米金屬顆粒需要建立生長最佳參數 (optimized parameters)，因此過程需控制微生物生長環境條件，例如:溫度、時間、pH 值、壓力、重金屬濃度等。培養後取出細菌並破碎細胞，以取得內部合成 NPs，利用實驗前/後含重金屬培養基濃度來計算生成 NPs 數量，利用 SEM、EDX、XRD、XRF 等儀器驗證胞內合成顆粒為奈米尺度，同時分析其特性。表 3.7 為胞內合成奈米金屬之相關研究。

表 3.7、微生物合成胞內奈米金屬之相關研究

微生物	奈米金屬	粒徑	出處
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Au-NPs	532	Sheikhloo et al., 2011
<i>Streptomyces</i>	Au-NPs	18-20 nm	Balagurunathan et al., 2011
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Ag-NPs	50-100 nm	Rajeshkumar et al., 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ag-NPs	-	Amin et al., 2016
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CdS-NPs	-	Amin et al., 2016

3.7 奈米金屬



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

3.7.1 定義及合成方法

金屬奈米顆粒(NPs)因其尺寸小，化學反應能力強，在環工領域上經常用在分解環境污染物，如處理污水中難分解之有機物、空氣粒狀污染物(PM_{2.5}, PM₁₀)等。二氧化鈦(TiO₂)由於氧化能力強、物理及化學性質穩定、耐酸鹼，具耐光性、價格便宜、製備容易、相對低毒性等優點，為目前應用最廣之光觸媒材料(photocatalyst)。光觸媒材料是一種光誘發催化劑，它能有效降低化學反應能量，促進化學反應發生或加速反應進行，此種催化劑本身不因反應發生而變化或破壞自身結構，主要原理是利用 UV 光激發產生電子電洞對，產生高度氧化能力之激發物質：氫氧自由基與超氧離子，可對化學物質進行光催化氧化還原反應。本研發專案產生之奈米氧化銅(nano-CuO) 廣泛應用在導電油墨、冷卻液、化學催化劑及生醫領域，。以及作為抗菌材料及飼料添加劑(改善家畜生長)，其需求量持續增加。

NPs 合成方法主要有兩種 (Jamkhande et al., 2021)，一種為 *Top down methods* (精密加工法)，如 mechanical milling, laser ablation, sputtering；另一種為 *Bottom up methods*：利用各種合成技術 (如 Solid state methods, liquid state, synthesis methods, gas phase methods, biological methods, etc.)，在不同環境下自我組織(self-assembly monolayer)，使原子/分子團由小變大，形成 NPs。這些化學合成(chemical synthesis)方法，往往需要大量能源及有機溶劑，其製作過程可能同時產生高毒性副產物，若不當棄置將會影響環境生態 (Dhand, et al. 2015)。生物合成 (biological synthesis) 奈米金屬顆粒(nano-particles, NPs)製作成本低、實驗步驟簡單、對環境友善，符合當今綠色化學以及 SDGs 永續指標對產品低碳足跡產品之要求 (Nasreen et al., 2014)。近年因國際局勢變化，銅、鋅等貴金屬價格持續攀高，製造 NPs 成本也因此增加，利用生物合成量產 NPs 成為另一種新選擇。

3.7.2 奈米金屬之催化機制

奈米金屬的催化活性取決於尺寸、形狀和分散度，因為它們會影響表面結構、電子和氧化態。因為奈米金屬增加反應物表面積與體積比，所以奈米金屬顆粒通常具有非常顯著的催化性能。先前的研究表明，具有球形形狀的較小奈米顆粒與較大的奈米顆粒進行比較的話，較小尺寸的奈米金屬具有更高的活性。Zhou 等人利用單分子螢光顯微鏡 (Single-Molecule Fluorescence Microscopy) 發現奈米金的催化活性主要取決於其顆粒尺寸 (Ahmad et al., 2015)。NPs 之催化反應可幫助降解許多污染物，如 ZnO-NP 可降解亞甲基藍；TiO₂-NP 可去除水中有毒物質、分解空氣中之污染物 (如甲醛、氨氣)。

3.7.3 奈米金屬之殺菌機制



奈米金屬顆粒，因 NPs 粒徑較小，可阻止生物膜的形成，並應用在抗菌領域。舉例來說，奈米銀 (5、9、10、12 和 13.5 nm)、奈米金 (8.4 nm)、奈米氧化鋅 (12 nm) 和奈米氧化鈦 (12 和 17 nm) NPs 皆具有較高之抗菌活性，不過這些顆粒僅在與細菌細胞壁接觸時才起作用，因此有許多促進 NP 與細菌接觸的方法，例如靜電引力(electrostatic attraction)、凡德瓦力(Vander Waals forces) 和疏水性相互作用(hydrophobic interactions)。當 NP 與細菌兩者接觸後，奈米粒子便會穿過細胞膜，干擾其代謝途徑，促使細胞膜形狀和功能發生變化，甚至與微生物細胞相互作用，使蛋白質變性，誘導微生物氧化壓力 (oxidative stress) 增加及電解質失衡，改變基因表現量。

Rai 等人將 Au-NPs 與 cefaclor 結合對細菌進行抗菌測試，發現 Au-NP 與 cefaclor 為協同作用，其中 cefaclor 會增加細胞膜的孔隙率，而 Au-NP 會對細胞膜進行穿孔，並進入細胞內部與其 DNA 相互作用後，阻止 DNA 解旋和轉錄作用 (Rai et al., 2010)。McShan 等人發現 tetracycline-AgNPs 和 neomycin-AgNPs (分別為 0.07 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.43 $\mu\text{g/mL}$) 發生協同作用，有效抑制 *Salmonella typhimurium* 生長(半數抑制濃度, IC_{50})，AgNPs 還可降低抗藥性細菌 MRSA 之生存能力 (McShan et al., 2015)。Huang 等人研究中發現 ZnO-NPs 懸浮液會產生大量 ROS，也是奈米粒子具有毒性原因之一 (Huang et al., 2008)；Raghupathi 發現 ZnO-NPs 經紫外光照射會增加 ROS，對脂質、核酸、蛋白質等細胞成分造成損傷 (Raghupathi et al. 2011)。圖 3.15 為各種 NPs 抗菌機制示意圖。

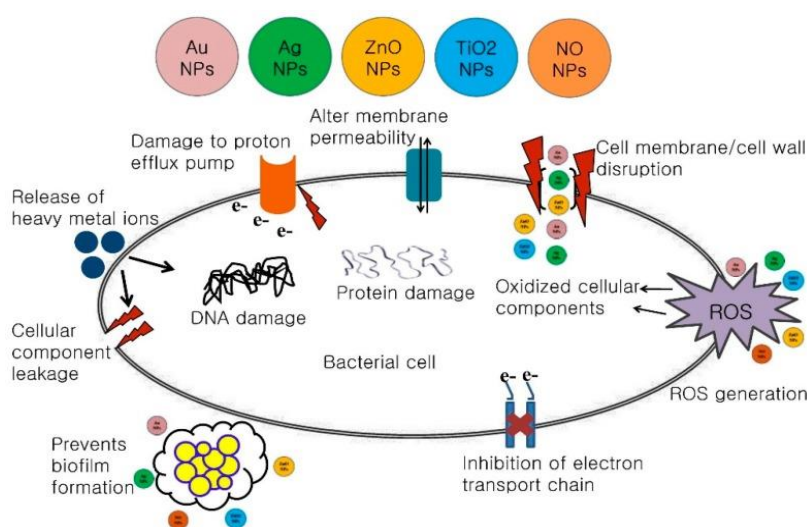


圖 3.16、不同 NPs 抗菌機制之示意圖 (Shaikh et al., 2019)



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(四)、研究方法與過程（含工作進度甘特圖）

4.1 研究流程

本專案研究流程如圖 4.1。首先篩選受重金屬污染之河川底泥微生物，分離具有耐受高濃度重金屬特性之細菌菌株，嘗試以生物吸附法處理重金屬廢水，亦即利用胞外 EPS 吸附廢水中重金屬(銅、鋅)；接著利用重金屬廢水為原料，將細菌視為生物合成 NPs 之工廠，將胞內封存之重金屬銅/鋅離子藉超音波打破細胞壁，製成胞內奈米金屬顆粒，再此顆粒經由 PVP 進行封端，於溶液中形成穩定之相容性結構。再將其大量生產後進行特性分析，分析 NPs 粒徑大小及其表面特性，另同時測試其催化能力。

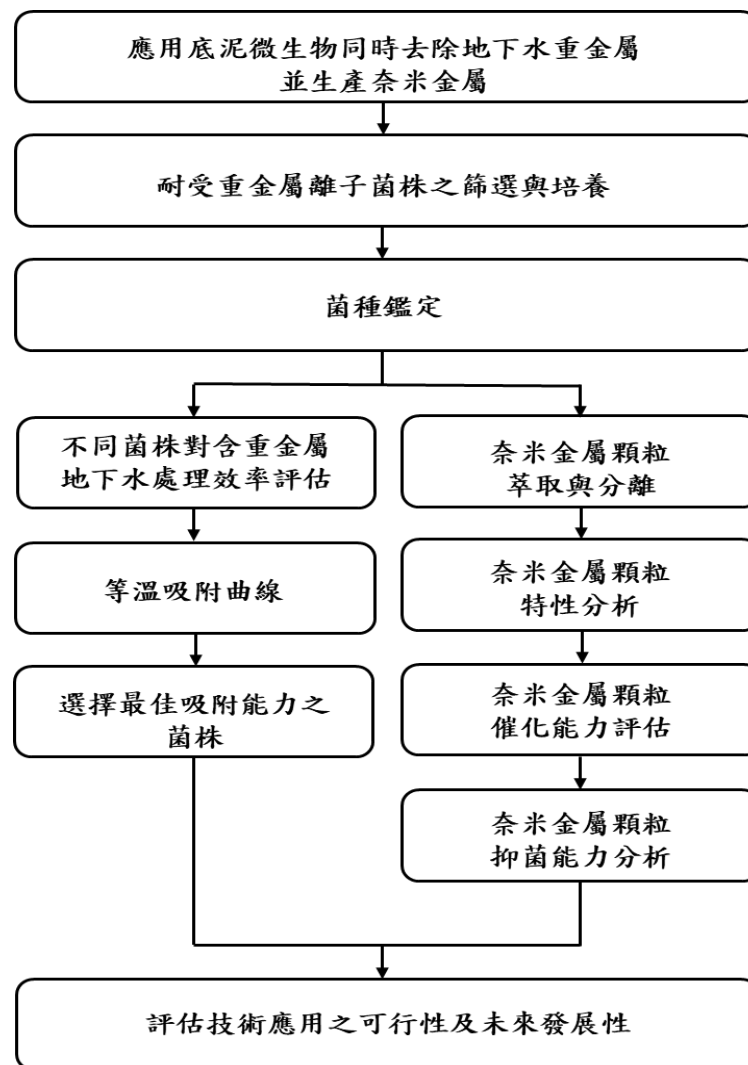


圖 4.1、本研發專案流程圖



4.2 耐受受重金屬菌珠之篩選、分離與鑑定

4.2.1 耐受重金屬微生物之採樣

本專案微生物採樣地點為桃園市南崁溪中游(振興路 1048 巷 25° 01'28.2"N/121°22'09.0"E)及南崁溪下游(經國橋 25°01'35.9"N/121°17'51.8"E)河川底泥為菌種來源。查詢環保署底泥品質網(表 4.1)，桃園市南崁溪河川主流三處重金屬調查結果(2018/03)，多項重金屬如銅、鎘、鋅都高於增加檢測頻率值，其中有二處銅濃度甚至高於(或接近)風險評估啟動值。樣本經過採集後帶回實驗室，將其混合為底泥樣本。圖 4.2 為本專案研究團隊南崁溪採樣照片。

表4.1、桃園市南崁溪主流之底泥重金屬檢測值 (2022/07/03檢索)

序號	採樣時間	水體名稱	採樣點名稱	採樣點位置	X TM2 97	Y TM2 97	重金屬							
							砷(As)	鎘(Cd)	鉻(Cr)	銅(Cu)	汞(Hg)	鎳(Ni)	鉛(Pb)	鋅(Zn)
							mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
底泥品質指標上限值(風險評估啟動值)							33	2.49	233	157	0.87	80	161	384
底泥品質指標下限值(增加檢測頻率值)							11	0.65	76	50	0.23	24	48	140
2	2018-03-27	南崁溪	大樹溪橋	河川主流	281202	2767104	3.87	ND	44.8	177	ND	40.0	36.6	260
3	2018-03-27	南崁溪	南崁溪橋	河川主流	278345	2771984	3.34	ND	27.6	152	ND	28.5	26.2	204
6	2018-03-28	南崁溪	竹圍大橋	河川主流	274976	2777767	4.63	ND	23.3	82.2	ND	24.7	18.4	117

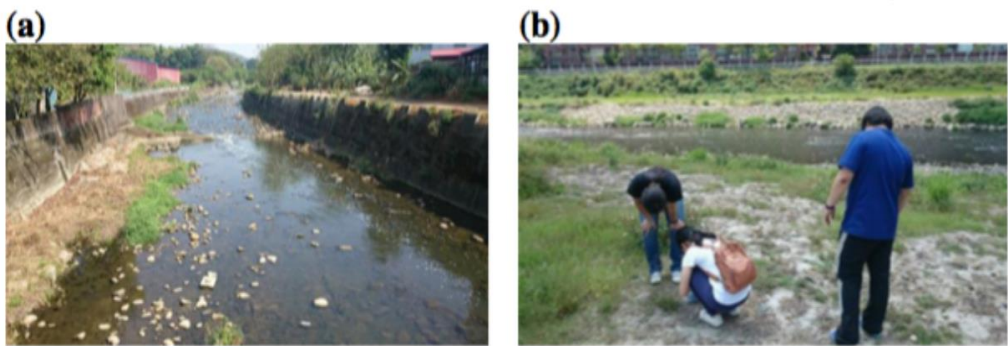


圖4.2、本研發專案團隊於南崁溪河川底泥採樣：
(a)南崁溪中游；(b)南崁溪下游

4.2.2 耐受重金屬微生物之篩選、分離與培養

將底泥雜質去除並且秤取 100 g，加入 100 ml 2.5 %(w/v)胰蛋白酶(Trypsin)，以 150rpm、37°C、震盪 1 小時。取出後靜置 30 分鐘，分離出上清液(范等, 2003)。將分離出之上清液加入含 100 ppm Zn²⁺之 TSB 中，以 150rpm、37°C 培養 24 hr，取出 10 ml 菌液重複上述實驗三次。再將菌液以四區劃線至含 100 ppm Zn²⁺ TSA 進行分離，以 37°C 培養 14-36 hr。分離出之單一菌落以無菌 50 %甘油(Glycerol)和 TSB 混合液(1:2(v/v)) 於-20°C冷凍保存。篩選與純化流程如下圖(圖 4.3)。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

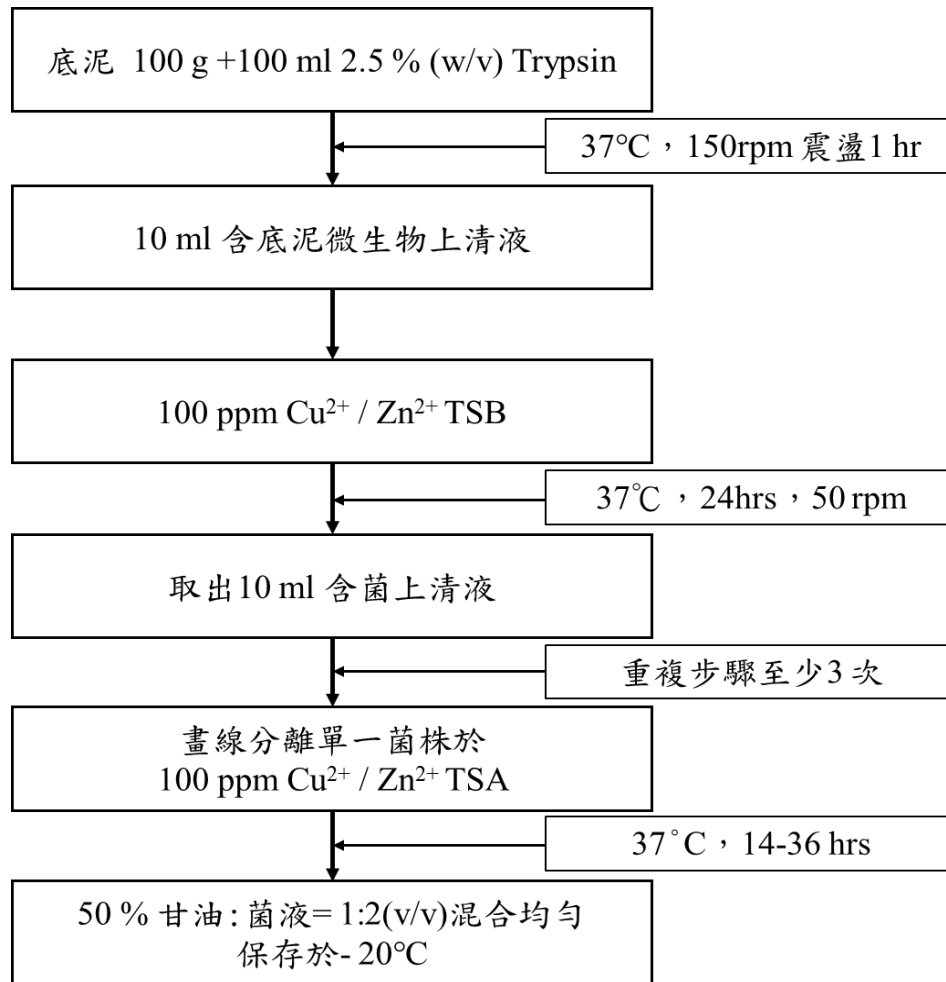


圖 4.3、耐受重金屬(Cu/Zn)菌株之篩選、分離與純化流程

4.2.3 耐受重金屬分離菌株之生長曲線

將以篩選純化後之菌株接入含有 100 mg/L 金屬銅及鋅之 250 ml TSB 中，以 150rpm，37°C 培養，菌株每小時取 1ml 菌液至比色管 cuvette 測其 Abs (OD₆₀₀)，當菌株生長至對數生長期 (log phase) 末期，製作生長曲線圖。挑選對數生長期趨近平緩生長時間，作為後續養菌之培養時間。

4.2.4 革蘭氏染色 (Gram Stain)

取少量菌塊均勻塗抹於玻片上，並置於酒精燈上進行熱固定。將結晶紫滴於玻片上，靜置一分鐘後用蒸餾水洗去多餘的結晶紫。將碘液滴於玻片上進行染料顏色加強，靜置一分鐘後，用蒸餾水洗去多餘的碘液。使用酒精脫色，直至無結晶紫的顏色流出為止。再以番紅進行複染，約 45 秒後用蒸餾水洗去。用吸水紙將多餘的水吸乾後，放置 45°C 加熱板上進行乾燥，完成後即可置於顯微鏡下觀察並拍照。



4.2.5 菌種鑑定

本研發專案選擇對金屬銅及鋅符合等溫吸附曲線參數較佳之耐受銅、鋅菌株(各3株)進行菌種鑑定。利用 PCR primer 27 F 以及 1492 R (V1-V9 region) 抽取純菌株之 16S rDNA，並利用 PCR 產生足夠的產物濃度後，送至明欣公司進行定序。將定序資料，以 Mega 7.0 進行 Alignment，並上傳 NCBI 的 Blast nucleotide 分析，比對出可能之菌種名稱。

4.3 耐受重金屬菌株對重金屬銅、鋅之吸附能力分析

4.3.1 重金屬銅、鋅分析方法建立

樣本首先用重金屬消化套組 (CS10, Merck) 對樣本進行消化，其條件為 60 min，120°C。再以火焰式原子吸收光譜儀(Flame Atomic Absorption Spectrometry, AA, GBC, XplorAA)進行分析，其中 Cu^{2+} 分析燈管條件為 Lamp current: 4.00 mA，波長 324.80nm； Zn^{2+} 分析燈管條件為 Lamp current: 5.00 mA，波長 213.90 nm；選擇空氣-乙炔火焰模組，其空氣:乙炔氣壓比為 1:5，Slit width: 0.5nm，Slit Height: Normal。以標準品進行校正後，檢測溶液中所含重金屬之濃度。圖 4.4 為銅、鋅校正濃度之檢量線。

4.3.2 菌株對重金屬銅、鋅之吸附實驗

實驗步驟說明如下：

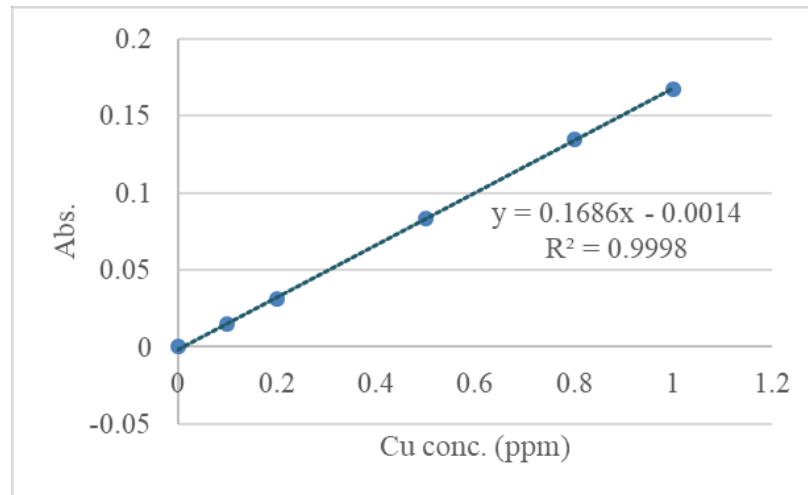
1. 微生物對重金屬銅/鋅吸附實驗

將 4.2.2 篩選之耐受重金屬銅/鋅之菌株以 100ml TSB 培養液於 150rpm、37°C 恆溫培養活化一天，取適量菌液，分別培養於含有 0、25、50、75、100、125、150、175、200 mg/L 含銅 TSB 100 ml 或 0、50、100、150、200、250、300、350 mg/L 含鋅 TSB 100 ml 培養液中，以 150rpm、37°C 恆溫培養至各菌株之最適吸附量時間點。取 20ml 菌液分裝至無菌塑膠離心管中進行高速離心 (12,000rpm、4°C 離心，10 分鐘)。取上層液 10 ml 作為樣本，使用 Merck® Crack set 10 消化套組於 120°C 消化 60 分鐘，將消化液以 0.22 μm nylon 濾膜過濾至少 2 次，接著以火焰式原子光譜儀(GBC Xplor Atomic Absorption Spectrometer AAS) 測量溶液內重金屬銅/鋅離子含量。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a)



(b)

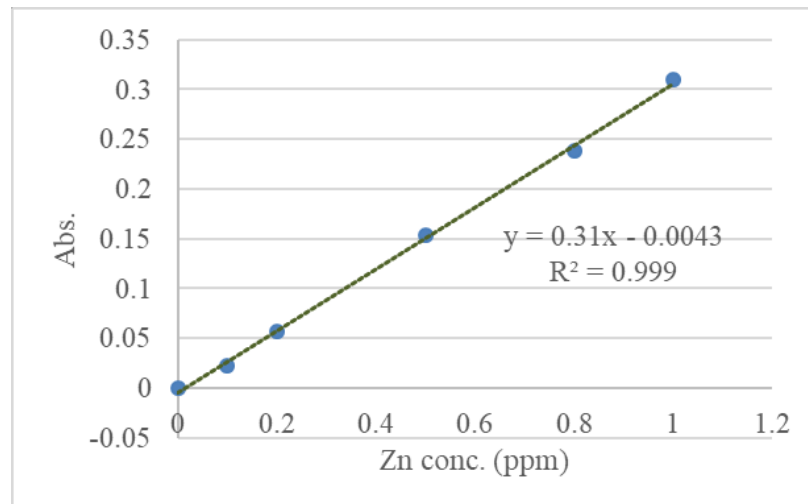


圖4.4、重金屬離子校正濃度檢量線: (a) Cu^{2+} ; (b) Zn^{2+}

2.等溫吸附曲線之建立

本研究以 Freundlich equation 做為等溫吸附曲線。

$$q_e = K_f C_e^{(1/n)} \quad (4.1)$$

將(4.1)式取自然對數後轉換為式(4.2)

$$\ln (x/m) = (1/n) \ln C_e + \ln K_f \quad (4.2)$$



式中 $q_e(x/m)$: 反應達平衡之吸附量，重金屬(X, 吸附質)mg/(生物)吸附劑(m) mg;
Ce: 吸附平衡後，液相中之重金屬(吸附質)濃度 mg/L； K_f , n : 為經驗常數，其與
吸附劑及吸附質的性質及濃度相關，分別代表吸附容量與吸附強度。 $n > 1$ 吸附行
為為有利性吸附； $n = 1$ 吸附行為為線性吸附； $n < 1$ 吸附行為為不利性吸附，用
以選擇吸附銅/鋅離子能力最佳之菌株。

3. 菌株對重金屬廢水之處理效率評估

將 4.2.2 篩選之耐受重金屬銅/鋅菌株分別接種入濃度 200 mg/L Cu^{2+}/Zn^{2+} 離子
(分別以硫酸銅/硫酸鋅配置) 之 100 ml TSB，用以模擬含銅及鋅廢水，以 150
rpm、37°C 培養至菌株之最適吸附量時間 (表 5.2、表 5.4)。將菌液分裝至 PTFE
鐵氟龍離心管，以 12,000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，取上清液 10ml，以 Crack set 10
消化試劑套組於 120°C 消化 60 分鐘，接著用 0.22 μ m nylon 濾膜過濾 2 次，以火焰
式原子吸收光譜儀(AA)檢測溶液中的 Cu^{2+}/Zn^{2+} 濃度。將 TSB 理論含銅/鋅之濃度
扣除上清液中 Cu^{2+}/Zn^{2+} 濃度及培養基原始含銅/鋅量，即為菌株吸附銅/鋅離子的
含量。處理效率是將含重金屬 TSB 之理論值總量扣除上層液中重金屬含量及原
TSB 培養基中之重金屬總量，即為該菌株吸附重金屬離子之能力。菌株對含銅、
鋅廢水之處理效率公式如下(式 4.3):

$$\text{個別菌株對廢水中重金屬(銅、鋅)之去除能力(\%)} D = \frac{[A-(C-B)]}{A} \times 100\%$$

(4.3)

式中 A: TBS 理論銅、鋅含量(mg); B: TSB 中銅、鋅含量(mg); C: 培養後 TSB 上
層液的銅、鋅含量(mg); D: 菌株對銅、鋅之去除率(%)。

4.4 胞內奈米金屬製作及其特性分析

為使胞內奈米金屬產量穩定並兼顧 NPs 產品之品質，本研發專案實驗設計如
下，添加定量微生物於含高濃度重金屬(Cu 100 mg/L 或 Zn 100 mg/L)之 TSB 培養
基，固定溫度下，選擇吸附效率最佳之重金屬濃度培養基 (耐受銅菌株使用 200
ppm Cu^{2+} TSB，耐受鋅菌株使用 300 ppm Zn^{2+} TSB)，在固定轉速下進行培養，利
用個別菌株細菌生長曲線選擇最佳培養時間(對數生長期後期，表 5.3、表 5.6)，
取出菌液，經萃取、分離、濃縮與淨化後產出胞內金屬 NPs，最後利用冷凍乾燥
法製成奈米顆粒粉末。淨化步驟是先將 NPs 顆粒進行分光光度計進行全波長掃描
(190nm ~1,100nm)，確認蛋白質含量，接著將 NPs 溶液和 Trypsin 溶液以 1:1 (v/v)



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

混合，150 rpm，37°C 震盪 1hr 後，再以分光光度計進行全波長掃描，確認去除蛋白質。為降低顆粒團聚，再加入 2ml 2% PVA 溶液至上述溶液中，持續攪拌 1hr 使 NPs 封端

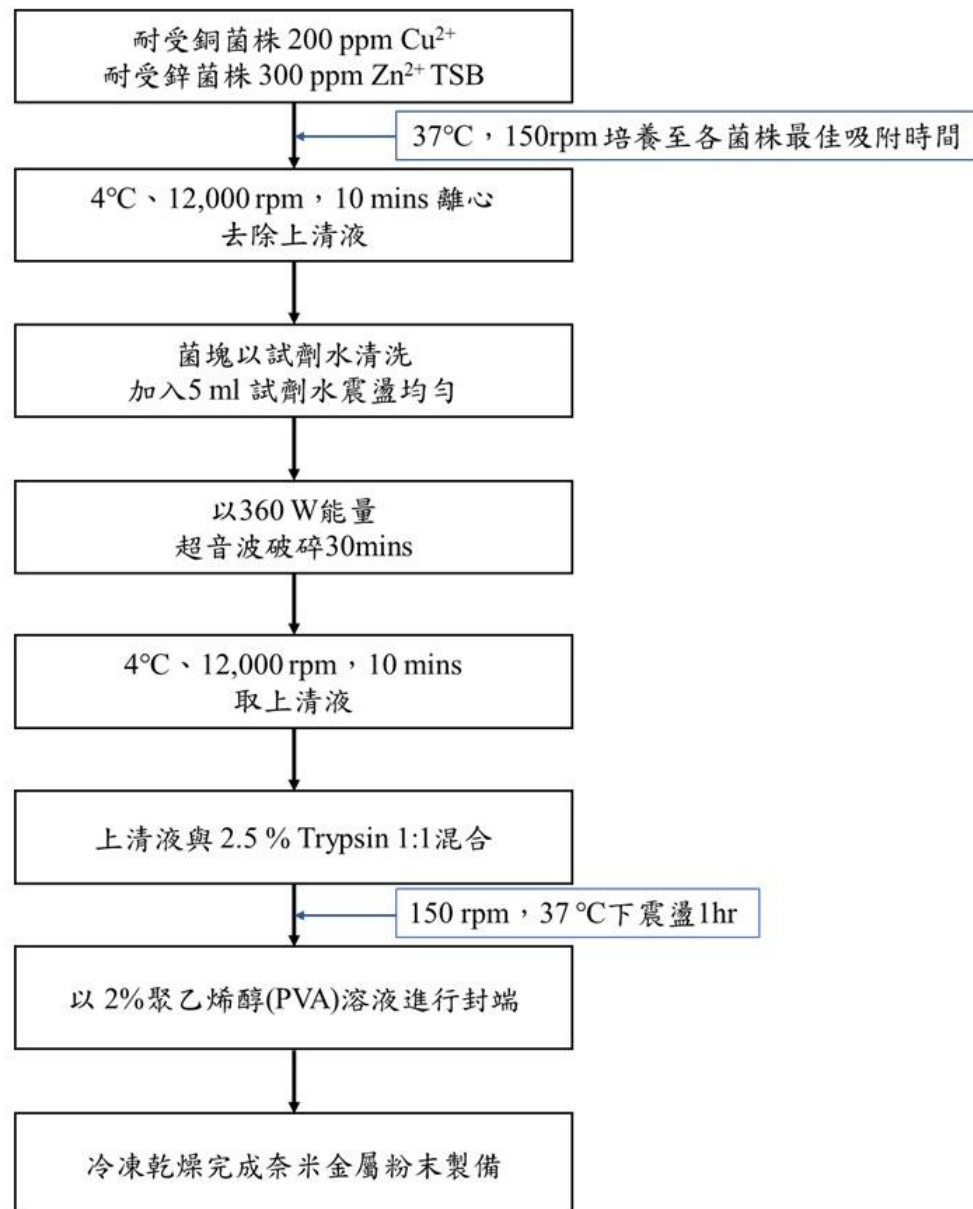


圖 4.5、本專案奈米金屬萃取、分離與純化步驟

4.4.1 胞內奈米金屬顆粒之萃取、分離與純化

胞內奈米金屬之萃取與分離採用超音波破菌法進行 (Ho et al., 2006)。實驗流程如下圖(圖 4.5)。將純菌株培養在含有重金屬之菌液，以高速離心方式分離，其操作條件為 4°C、12,000 rpm，10 mins。移除上清液，將胞內奈米金屬菌塊(pellet)以試劑水清洗後，去除上清液。加入 5 ml 試劑水，利用超音波破碎機 (能量設定



為 360W), 30mins 將細胞壁破碎，完成後菌液再以 4°C, 12,000 rpm 離心 10 mins，使破碎後之細菌細胞殘體與胞內奈米金屬分離，完成後收集上清液即為胞內奈米金屬。

4.4.2 胞內奈米金屬顆粒特性分析

本專案為確定產生之奈米金屬符合定義(奈米級顆粒)並具有與市售商品相同之催化反應與殺菌能力，本研發專案針對其特性進行分析，並與市售相似之奈米產品進行比較。首先將胞內奈米金屬顆粒溶液進行特性分析，確認胞內金屬顆粒符合奈米顆粒性質，包括以高解析熱場發射掃描式電子顯微鏡(FE-SEM)搭配元素分析儀 EDS (JEOL JSM-7600F) 進行顆粒表面特性觀察、分析元素組成及粒徑；此外，也針對胞外奈米金屬顆粒是否具有抑菌能力及催化能力等特性進行測試。

1. 奈米金屬表面特性

本研發專案生產之胞內奈米氧化銅以及奈米氧化鋅以高解析熱場發射掃描式電子顯微鏡(FE-SEM)搭配元素分析儀 EDS (JEOL JSM-7600F) (中原大學，國科會貴重儀器中心) 觀察其表面特性，同時以 SEM 上之尺規分析 NP 粒徑。元素分析儀 (Energy Dispersive X-Ray Microanalysis, EDS) 用於分析胞內 CuO-NP 及 ZnO-NP 之組成。

2. 胞內奈米金屬催化能力分析

金屬奈米金屬顆粒需測試催化還原能力，本研發專案是採用對硝基苯酚 (4-Nitrophenol, 4-NP) 催化還原反應，原理為利用硼氫化鈉(NaBH_4)和銀催化下在水溶液中產生 OH^- ，此 OH^- 會讓 4-壬基酚 (4-Nonylphenol, 4-NP) 上之 $-\text{OH}$ 失去 H^+ ，產生可在 317nm 吸收之中間產物 4-AP，因此可透過吸光值變化探討此反應之催化能力 (Du et al., 2014)。實驗步驟是將 15 mM NaBH_4 5 ml 與 0.15 mM 5 ml 4-NP 混合，加入裝有 100 μL 10 ppm 之奈米金屬溶液樣本之棕色瓶中，攪拌混合均勻，每分鐘取出 200 μL 之棕色瓶內溶液與 4°C、1.8ml Q 水混合，將混合液於 384 nm 波長下測其 NaBH_4 吸光值，當吸光值持續下降，代表具有催化活性。催化能力之擬一階反應公式如下：

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - kt \quad (4.4)$$

式中: q_e : 催化反應終點吸光值; q_t : 催化反應時間(t)之吸光值變化量; k : 擬一階反應速率(min^{-1}); t : 時間(min)

3. 胞內奈米金屬抗菌能力分析



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

本研發專案以革蘭氏陰性大腸桿菌(*E. coli*)作為抗菌能力測試菌株，實驗進行前先將大腸桿菌活化，培養 24 hr，爾後重新移植入新鮮培養基中，再次培養 24 hr 即可進行本測試。活化完成之菌液先調整菌液濃度(OD_{600})為 0.5。取適當體積菌液與適當預先稀釋好的胞內奈米金屬系列稀釋溶液 (0、0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$) 進行混合，混合後體積保持在 1,000 μL ，濃度設定為 0、0.0125、0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1.25、2.5、5 以及 10 $\mu\text{g/mL}$ ；將菌液與奈米金屬之混合液置於馬槽中，與正確比例之 XTT assay kit 之 Reagent 混合均勻之後取 100 μL 至 96 孔盤中，將 96 孔盤放置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱培養至隔天，最後以 ELISA reader 進行波長 475nm 及 660 nm 吸光值測定孔盤中孔洞之吸光值，最後進行數據分析 (Dhawan et al., 2010; Ali et al., 2021)。式(5)為計算抑菌能力之公式：

$$\text{抑菌率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{測試組吸光值平均值}}{\text{對照組吸光值平均值}}\right) * 100 \% \quad (4.5)$$

式中：

對照組吸光值計算: $A_{475\text{nm}}(\text{Blank}) - A_{660\text{nm}}(\text{Blank})$ ；

測試組吸光值計算: $A_{475\text{nm}}(\text{Test}) - A_{475\text{nm}}(\text{Blank}) - A_{660\text{nm}}(\text{Test})$



4.5、研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月	9	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	備註
工作項目													
耐受重金屬純菌株之篩選與培養													
分離與純化耐受重金屬之純菌株													
耐受重金屬菌株處理重金屬廢水效率評估													
選擇最佳吸附效率之菌株													
胞內奈米金屬萃取與濃縮													
胞內奈米金屬純化													
胞內奈米金屬粒徑分析													
胞內奈米金屬催化能力分析													
胞內奈米金屬抑菌能力分析													
生產胞內奈米金屬細菌之菌種鑑定													
期末報告 (含評估本技術之未來發展性與應用)													※
工作進度估計百分比 (累積數)	8%	16%	24%	32%	40%	50%	58%	66%	74%	82%	91%	100%	
預定查核點	期中		先導型計畫無需繳交期中報告										
	期末		1.應用底泥微生物菌株處理重金屬廢水。 2.應用底泥微生物菌株生產胞內奈米金屬顆粒 3.金屬顆粒經過測試符合奈米金屬之各項條件。										
說明：													
1、工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。													
2、「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1)工作天數，(2)經費之分配，(3)工作量之比重，(4)擬達成目標之具體數字。													
3、「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。													
4、以12個月作規劃，其中期中報告書提送要件需達計畫執行進度50%以上，期末報告書需於計畫結束前1.5個月提送。													



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(五)、結果與討論（含結論與建議）

5.1 耐受重金屬銅菌株之篩選與鑑定

5.1.1 耐受銅重金屬菌株生長特徵及革蘭氏染色

本研發專案共篩選出六株菌落特徵不同之耐受重金屬銅菌株，分別命名為 Cu1、Cu2、Cu3、Cu4、Cu5 以及 Cu6，分別記錄其菌落特徵以及革蘭氏染色情形。將各菌株進行革蘭氏染色，染色後之載玻片置於顯微鏡下進行觀察，得知菌株編號 Cu1、Cu2、Cu3、Cu4、Cu5 皆為革蘭氏陰性桿菌，長度分別約 10μm、10μm、20μm、5μm 及 10μm，編號 Cu6 為革蘭氏陽性菌，長度約為 35μm。菌落特徵如表 5.1，革蘭氏染色結果如圖 5.1。表 5.2 為菌株編號 Cu1~Cu6 之革蘭氏染色結果及菌株長度。

5.1.2 耐受重金屬銅菌株之生長曲線

由於各菌株生長速率不同，連帶會影響 NPs 之生成效率。因此本研發專案建立菌株利用 TSB 培養基之細菌生長曲線。先前文獻顯示，當微生物生長達對數生長期(log-phase)至穩定期(steady phase)間，其吸附重金屬能力為最佳。本研發專案將此時間設定為微生物生產 NPs 之最佳時間，並用於後續製作金屬奈米顆粒。表 5.3 為本專案耐受銅菌株之培養時間，其介於 4-6 小時之間。

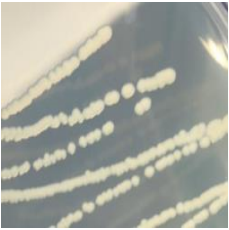
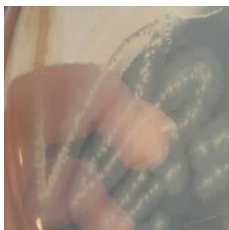
5.1.3 耐受重金屬銅菌株之菌種鑑定

選取可生產較多 CuO-NPs 三株菌株(編號 Cu2、Cu3 以及 Cu4)進行菌種鑑定。先以 27F/1492R primer 確認 16S rDNA 電泳大小(圖 5.2)，並利用 PCR 大量製作產物後，送交明欣生物科技有限公司進行定序。將定序資料，以 Mega 7.0 進行 Alignment，上傳 NCBI 的 Blast nucleotide 分析後，比對出可能之菌種。菌種鑑定結果，編號 Cu2、Cu3 均為 *Acinetobacter* sp.，per identity 分別為 99.42%及 98.69%，Query cover 均為 100%，但因為 per identity 數值不夠高，導致無法斷定種名。編號 Cu4 為 *Klebsiella pneumoniae*，per identity 為 100 %，Query cover 為 100%。

5.2 耐受重金屬鋅菌株之篩選與鑑定

5.2.1 耐受鋅重金屬菌株生長特徵及革蘭氏染色

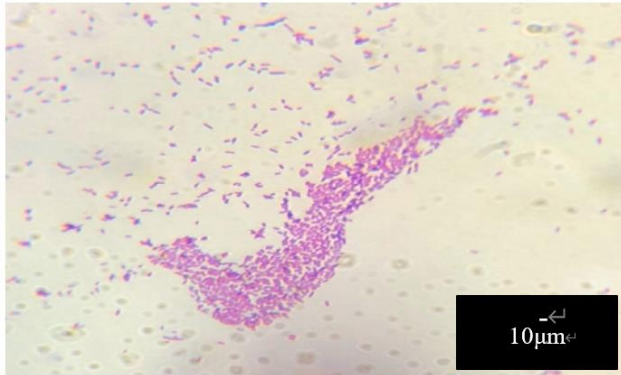
表 5.1、耐受重金屬銅菌株(編號 Cu1~Cu6)之菌落特徵

Medium	Tryptic soy agar					
Culture	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Cu5	Cu6
Figure						
Size	Medium	Medium	Medium	Large	Small	Medium
Pigmentation	乳白	乳白	乳白	乳白	乳白	黃白
Form	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Undulate	Entire
Elevation	Flat	Raised	Raised	Raised	Raised	Flat

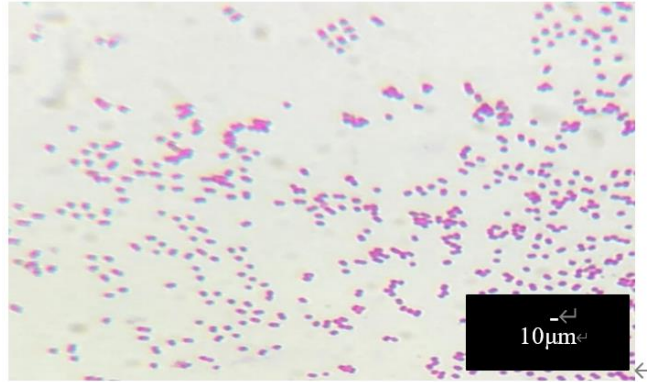


應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

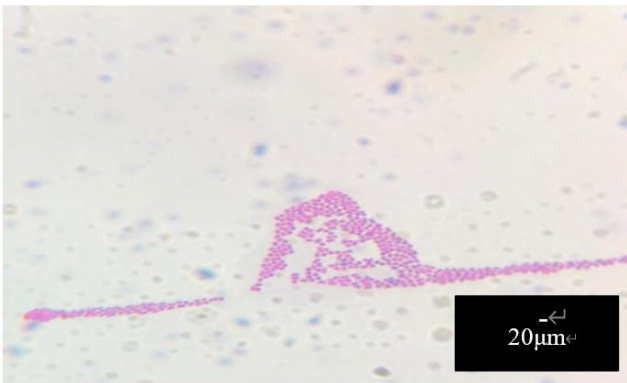
(a)



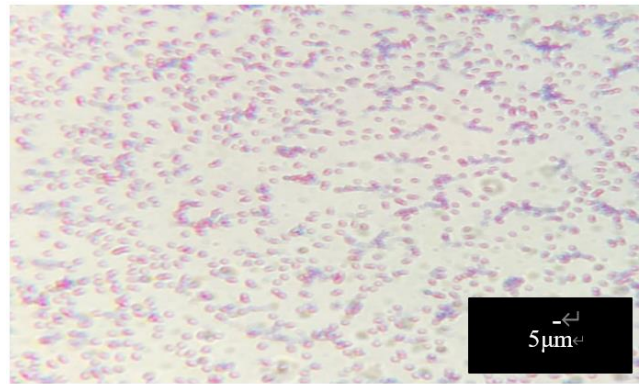
(b)



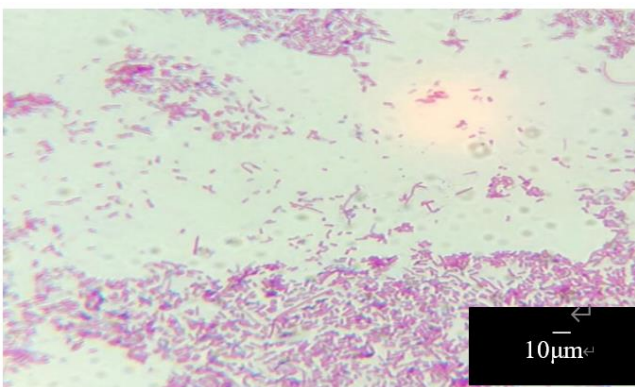
(c)



(d)



(e)



(f)

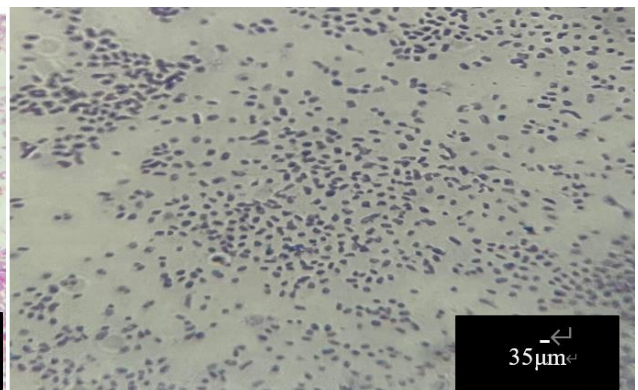


圖 5.1、耐受重金屬銅菌株之革蘭氏染色結果: (a) Cu1 ; (b) Cu2 ; (c) Cu3 ; (d) Cu4 ;
(e) Cu5 ; (f) Cu6



表5.2、耐受重金屬銅菌株(編號 Cu1~Cu6)之革蘭氏染色與菌株長度

菌株編號	Gram(+)/Gram(-)	菌株長度(μm)
Cu1	Gram (-)	10
Cu2	Gram (-)	10
Cu3	Gram (-)	20
Cu4	Gram (-)	5
Cu5	Gram (-)	10
Cu6	Gram (+)	35

表 5.3、耐受 Cu²⁺分離菌株對銅最佳吸附量之培養時間 (hr)

菌株編號	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Cu5	Cu6
最佳培養時間	5	6	4	4	4	6

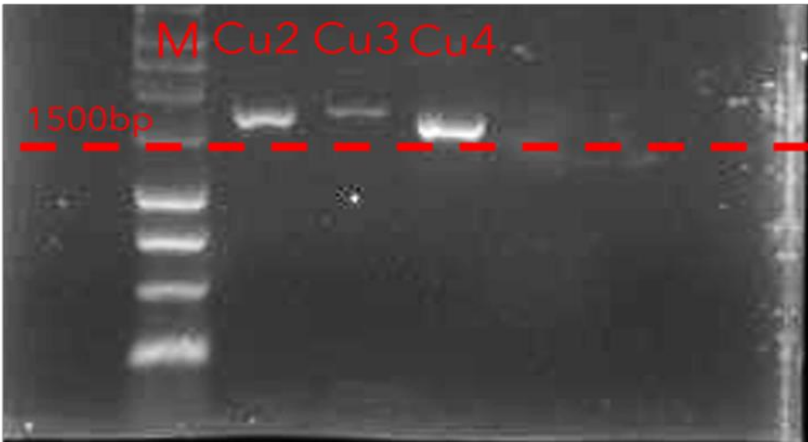


圖 5.2、耐受重金屬銅菌株之 16S rDNA 電泳圖 (M: Marker)

本研發專案篩選之共十株不同菌落型態耐受重金屬銅菌株，分別命名為 Zn1、Zn2、Zn3A、Zn3B、Zn4、Zn5、Zn6、Zn7、Zn8、Zn9，分別記錄其菌落特徵以及革蘭氏染色情形。將各菌株進行革蘭氏染色，染色後之載玻片置於顯微鏡下觀察，得知所有菌株皆為革蘭氏陽性桿菌，長度約落在 8-15 μm。菌落特徵如表 5.4，革蘭氏染色結果如圖 5.3。表 5.5 為菌株編號 Zn1~Zn9 之革蘭氏染色結果及菌株長度。

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

表 5.4、耐受重金屬鋅菌株(編號 Zn1~Zn9)之菌落特徵

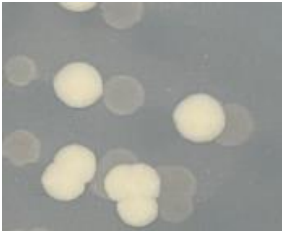
Medium	Tryptic soy agar				
Strain No,	Zn1	Zn2	Zn3A	Zn3B	Zn4
Figure					
Size	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
Pigmentation	白	乳白	乳白	黃	黃白
Form	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Elevation	Raised	Raised	Raised	Raised	Raised

表 5.4、耐受重金屬鋅菌株(編號 Zn1~Zn9)之菌落特徵 (續)

Medium	Tryptic soy agar plate				
Strain No.	Zn5	Zn6	Zn7	Zn8	Zn9
Figure					
Size	Small	Medium	Medium	Medium	Small
Pigmentation	白	黃	乳白	黃	白
Form	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Elevation	Flat	Raised	Raised	Raised	t

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

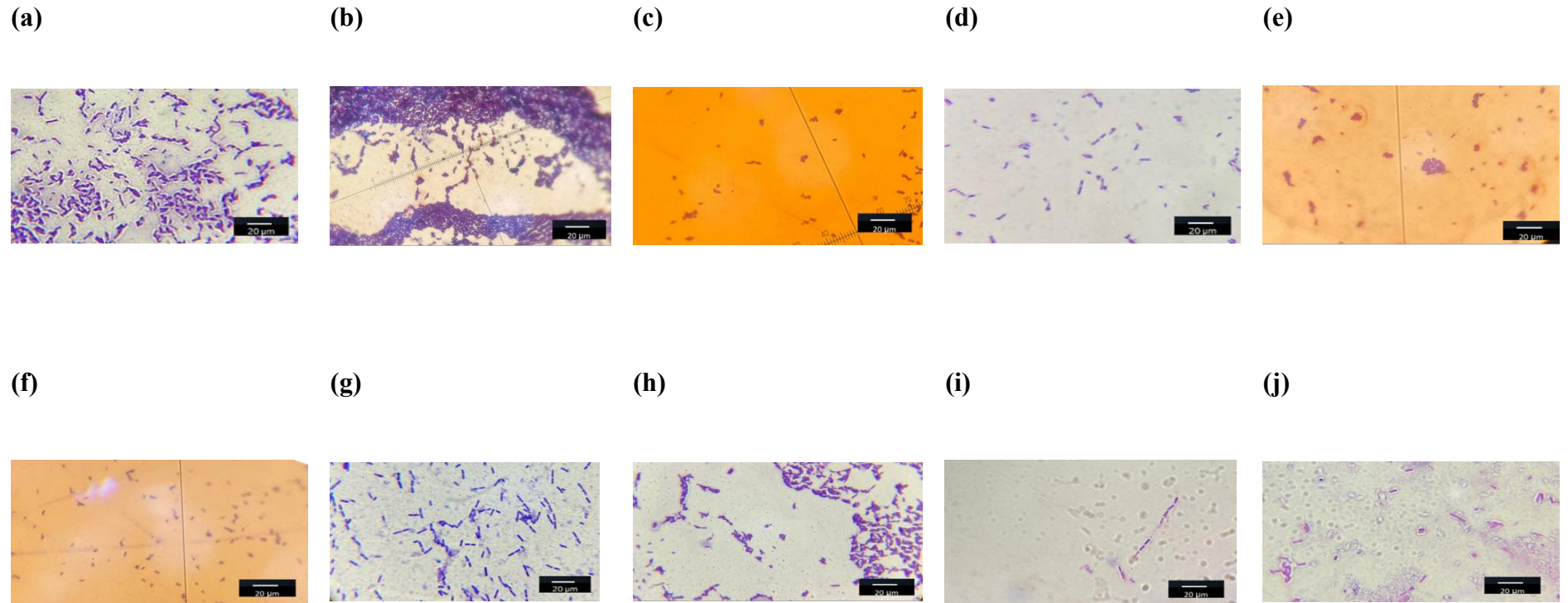


圖5.3、耐受重金屬鋅菌株之革蘭氏染色結果: (a) Zn1 ; (b) Zn2 ; (c) Zn3A ; (d) Zn3B ; (e) Zn4 ; (f) Zn5 ; (g) Zn6 ; (h) Zn7 ; (i) Zn8 ; (j) Zn9



表 5.5、耐受重金屬鋅菌株(編號 Zn1~Zn9)之革蘭氏染色與菌株長度

菌株編號	Gram(+)/Gram(-)	菌株長度 (μm)
Zn1	Gram (+)	12
Zn2	Gram (+)	10
Zn3A	Gram (+)	8
Zn3B	Gram (+)	15
Zn4	Gram (+)	10
Zn5	Gram (+)	10
Zn6	Gram (+)	8
Zn7	Gram (+)	10
Zn8	Gram (+)	10
Zn9	Gram (+)	10

5.2.2 耐受鋅重金屬菌株之生長曲線

菌株生長速率不同，連帶影響 NPs 之生成效率。因此本研發專案建立菌株利用 TSB 培養基之細菌生長曲線。先前文獻顯示，當微生物生長達對數生長期(log-phase)至穩定期(steady phase)，其吸附重金屬能力為最佳。本專案將此時間設定為微生物生產 NPs 之最佳時間，並用於後續製作奈米金屬顆粒。表 5.6 為本專案各耐受鋅菌株之培養時間，其介於 5.5-7.5 小時之間。

表 5.6、耐受 Zn²⁺分離菌株對鋅最佳吸附量之培養時間 (hr)

菌株編號	Zn1	Zn2	Zn3A	Zn3B	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7	Zn8	Zn9
最佳生長時間(hr)	6	6.5	6	6	7.5	5.5	5.5	6.5	5.5	7

5.2.3 耐受重金屬鋅菌株之菌種鑑定

選取可生產較多 ZnO-NPs 之三株菌株 (編號 Zn1、Zn3B 以及 Zn6) 進行菌種鑑定。首先以 27F/1492R primer 確認 16S rDNA 電泳大小(圖 5.4)，接著利用 PCR 大量製作產物後，送交明欣生物科技有限公司進行定序。將定序資料，以 Mega 7.0 進行 Aligmmment，上傳 NCBI 的 Blast nucleotide 分析後，比對出可能之菌種。菌種鑑定結果，編號 Zn1 經菌種鑑定為 *Bacillus albus* (NCBI per identify, 100%; Query Cover, 100 %), 編號 Zn3B 為 *Bacillus thuringiensis* (NCBI per identify, 100 %; Query Cover, 99 %); 編號 Zn6 為 *Bacillus cereus* (NCBI per identify, 99.64 %; Query Cover, 100 %)。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

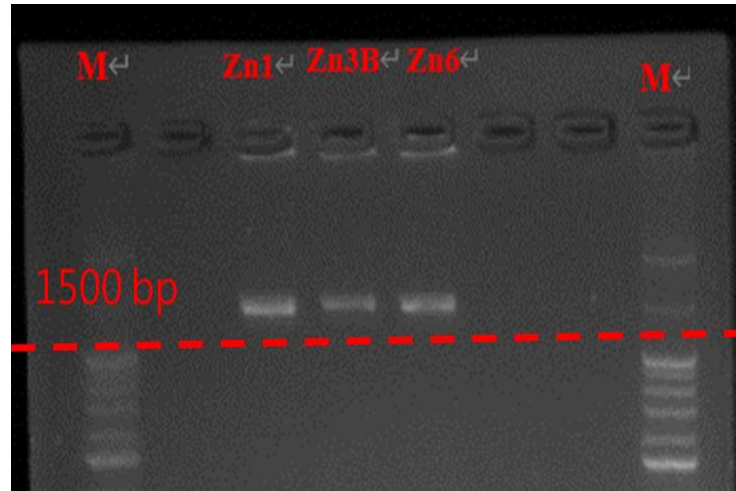


圖 5.4、耐受重金屬鋅菌株之菌種鑑定電泳圖 (M: Marker)

5.3. 耐受重金屬菌株對重金屬(銅、鋅)之等溫吸附模式

5.3.1 耐受銅重金屬菌株等溫吸附曲線

為評估耐受重金屬銅菌株對含銅廢水之處理效率，本研究建立 6 株菌之等溫吸附曲線。根據表 5.3 耐受重金屬銅菌株之培養時間，紀錄各菌株對 0 ppm、25 ppm、50 ppm、75 ppm、100 ppm、125 ppm、150 ppm、200 ppm 進行測試。含銅廢水中銅離子之吸附量，並建立編號 Cu1~Cu6 菌株 37°C 之等溫吸附曲線(圖 5.5) 此吸附曲線 X 軸橫座標是指菌株 biomass 吸附重金屬離子(Cu)之絕對量(mg)，Y 軸是菌株吸附重金屬離子(Cu)之絕對吸附量(mg)。另計算出各菌株(Cu1~Cu6)之 Freundlich equation (圖 5.6)。表 5.7 為 Cu1~Cu6 菌株 Freundlich equation 之各項參數。

依據表 5.7 之 Freundlich equation 參數 n 值，當 $n > 1$ 為有利性吸附，表示該菌株對重金屬吸附能力最佳。相比於其他菌株，這些菌株合成胞內 NPs 產量較佳，有利取得胞內 NPs。本研究所篩選分離出之耐受重金屬銅菌株中，選擇 n 值最大之前三者作為後續生產 NPs 對象，分別為編號 Cu2、Cu3 以及 Cu4，其 n 值依序為 1.1719、1.9778 以及 0.9994。

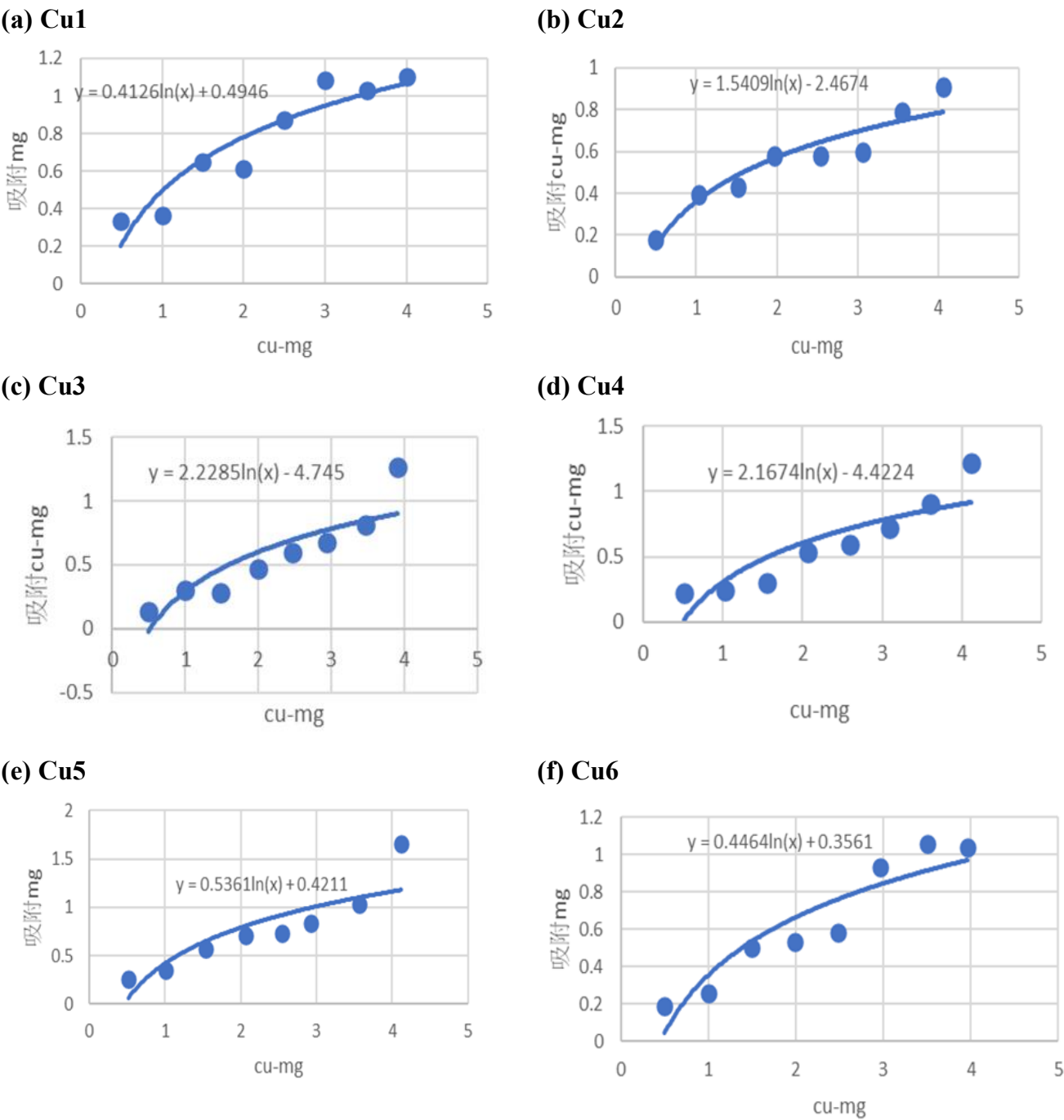
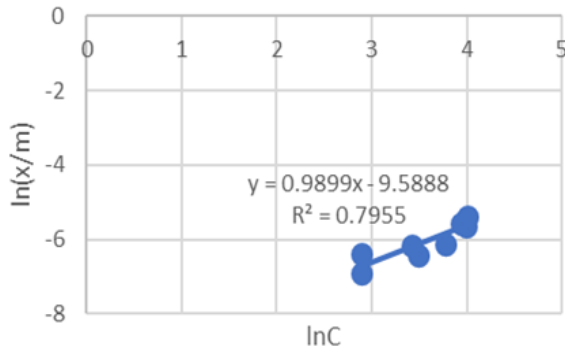


圖 5.5、菌株 Cu1~Cu6 之吸附曲線

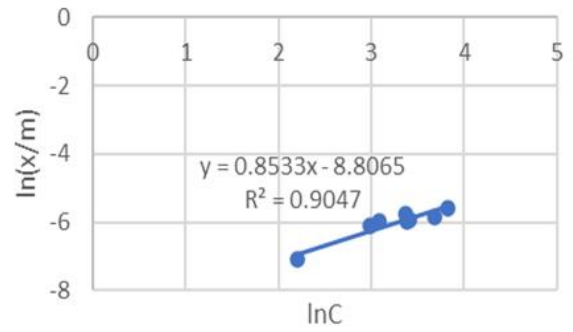


應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

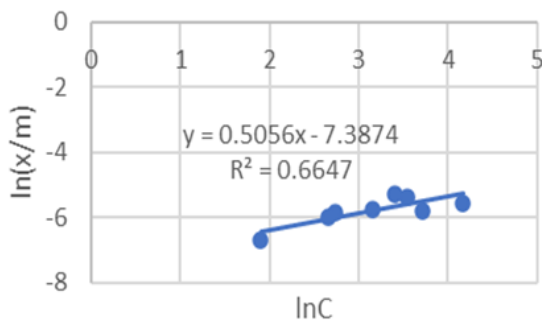
(a) Cu1



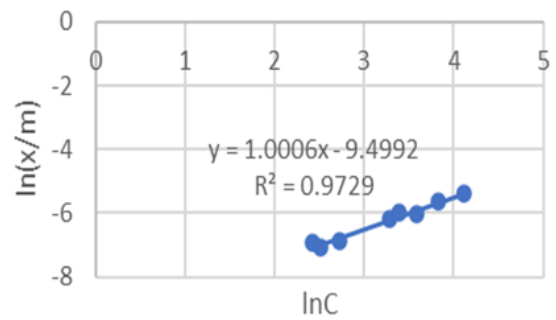
(b) Cu2



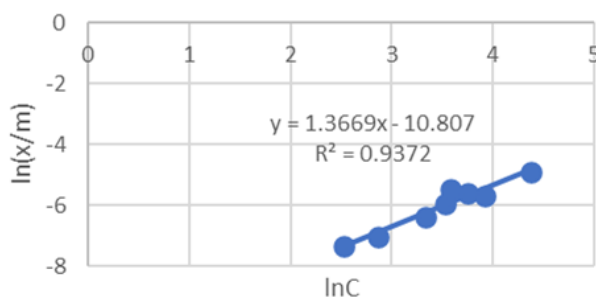
(c) Cu3



(d) Cu4



(e) Cu5



(f) Cu6

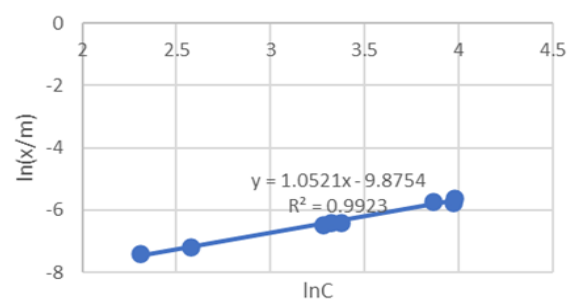


圖5.6、菌株Cu1~Cu6之Freundlich Equation 吸附模式



表 5.7、菌株編號 Cu1~Cu6 之 Freundlich Equation 及其參數

菌株編號	Freundlich Equation $\ln(x/m)=(1/n)\ln C + \ln K$	R^2	k	n
Cu1	$y = 0.9899x - 9.5888$	0.7955	6.85×10^{-5}	1.0102
Cu2	$y = 0.8533x - 8.8065$	0.9047	1.49×10^{-4}	1.1719
Cu3	$y = 0.5056x - 7.3874$	0.6647	6.19×10^{-4}	1.9778
Cu4	$y = 1.0006x - 9.4992$	0.9729	7.49×10^{-5}	0.9994
Cu5	$y = 1.3669x - 10.807$	0.9372	2.03×10^{-5}	0.7316
Cu6	$y = 1.0521x - 9.8754$	0.9923	5.14×10^{-5}	0.9505

5.3.2 耐受鋅重金屬菌株等溫吸附曲線

為評估耐受重金屬鋅菌株對處理含鋅廢水之處理效率，本研究建立 10 株菌之等溫吸附曲線。根據表 5.6 耐受重金屬鋅菌株之培養時間，紀錄各菌株對 0 ppm、50 ppm、100 ppm、150 ppm、200 ppm、250 ppm、300 ppm 及 350 ppm 含鋅廢水中鋅離子之吸附量，並建立編號 Zn1~Zn9 菌株 37℃ 之等溫吸附曲線(圖 5.7)，此吸附曲線 X 軸橫座標是指菌株 biomass 吸附重金屬離子(Zn)之絕對量(mg)，Y 軸是菌株吸附重金屬離子(Zn)之絕對吸附量(mg)。

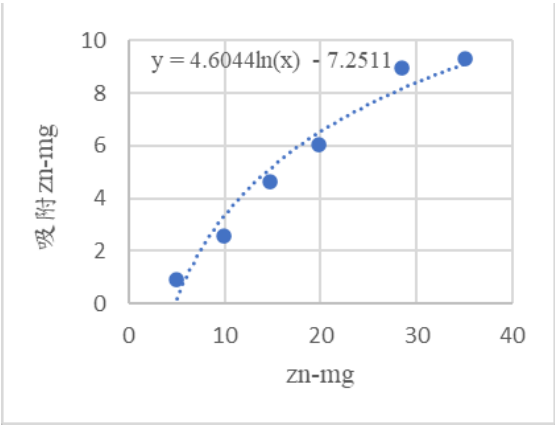
耐受 Zn 菌株 (除 Zn1 外) 之等溫吸附曲線與實際結果偏差較大，吸附曲線較不穩定。推測可能原因為除細菌菌體細胞壁及胞外 EPS 對 Zn^{2+} 具一定吸附能力外， Zn^{2+} 還能做為細菌代謝反應之輔酶因子(cofactor)，因此不同菌株對 Zn^{2+} 不同濃度其親合力與利用能力不同。另計算出 Freundlich Equation (圖 5.8)。表 5.8 為編號 Zn1~Zn9 菌株 Freundlich equation 之各項參數

根據表 5.8 之 Freundlich equation 參數 n 值，可知 $n > 1$ 為有利性吸附，表示該菌株對重金屬的吸附能力最佳，相比於其他菌株，這些菌株合成胞內 NPs 產量較佳，有利取得胞內 NPs。本研究所篩選分離出耐受重金屬鋅菌株中，選擇 n 值最大之前三者作為後續生產 NPs 對象，分別為編號 Zn1、Zn3B 以及 Zn6，其 n 值依序為 1.1242、1.0447 以及 1.0378。

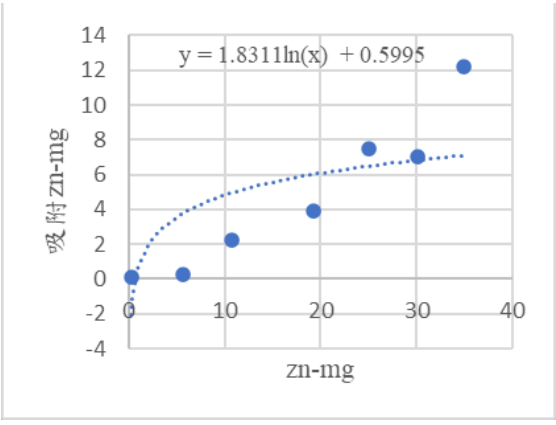


應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

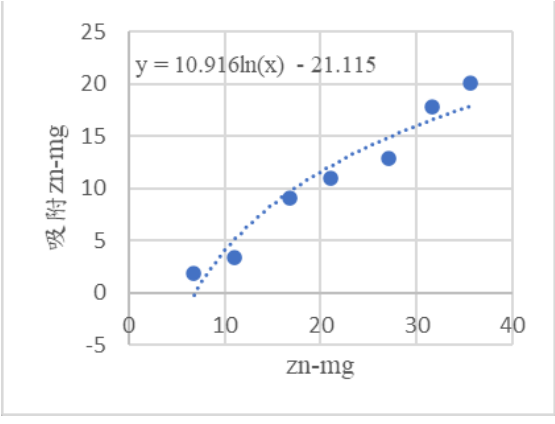
(a) Zn1



(b) Zn2



(c) Zn3A



(d) Zn3B

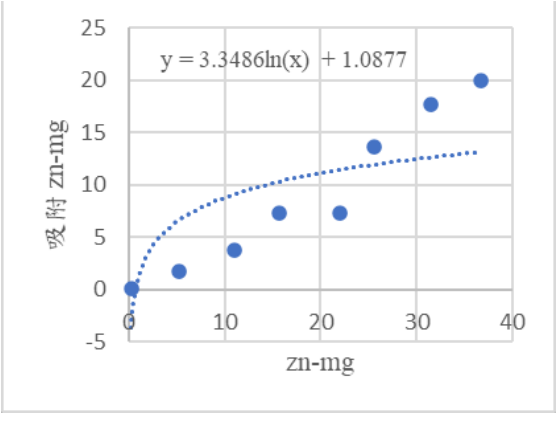
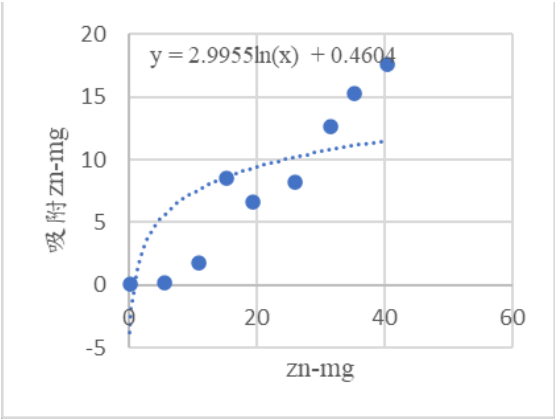


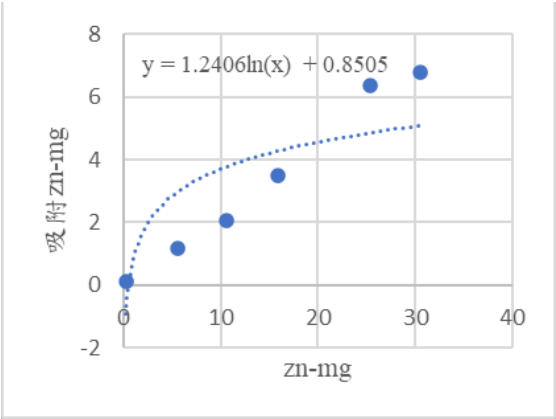
圖5.7、不同菌株Zn1~Zn9之吸附曲線



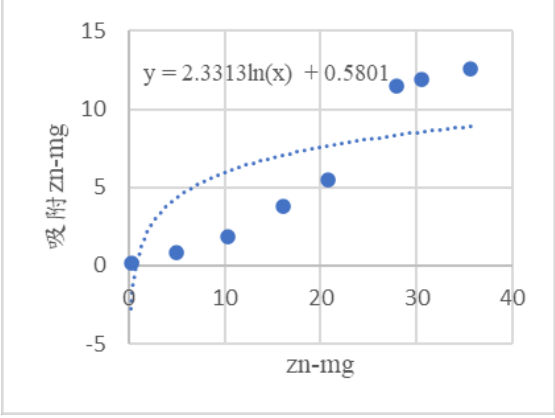
(e) Zn4



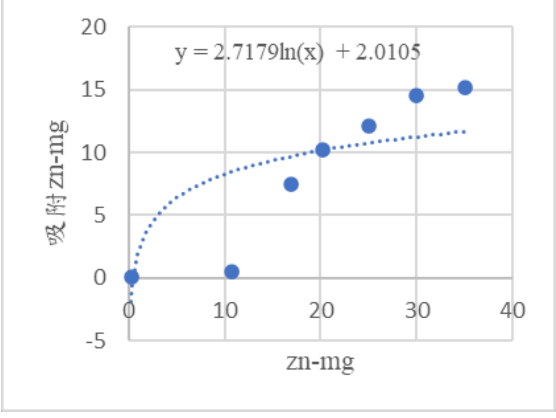
(f) Zn5



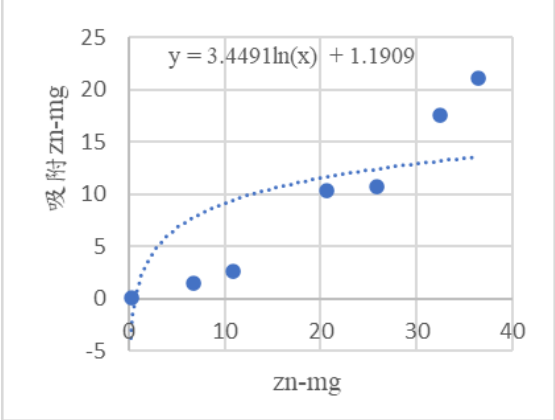
(g) Zn6



(h) Zn7



(i) Zn8



(j) Zn9

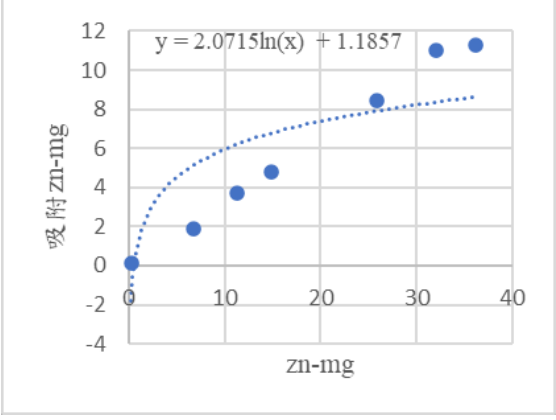
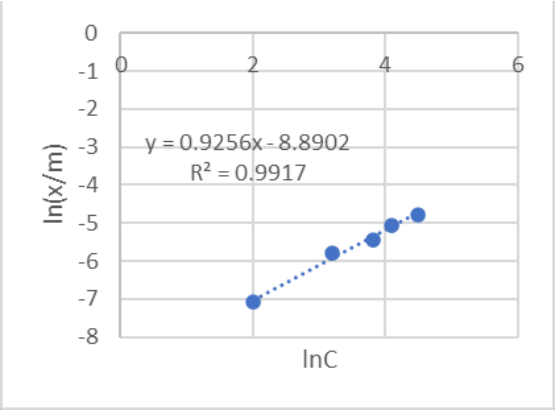


圖5.7、不同菌株Zn1~Zn9之吸附曲線(續)

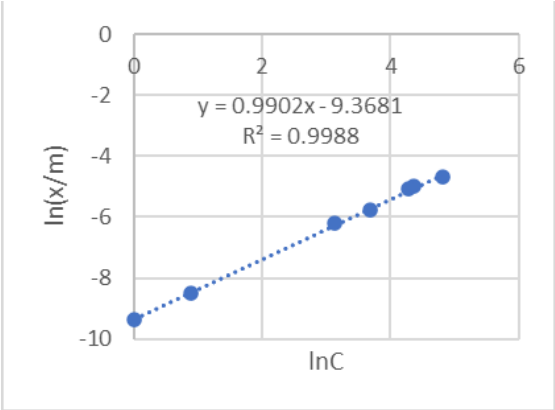


應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

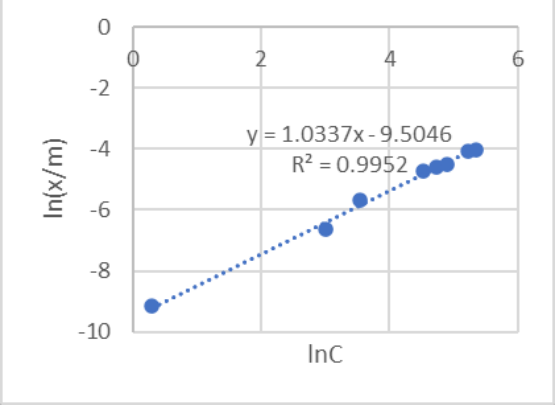
(a) Zn1



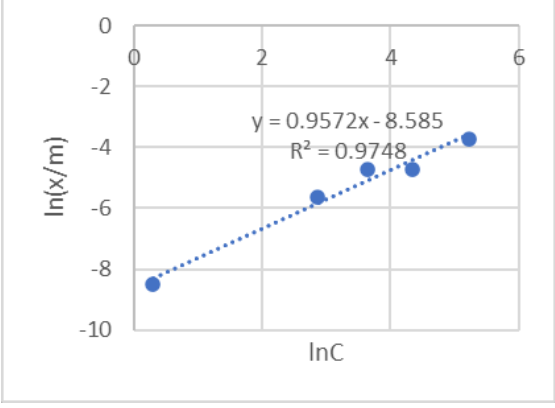
(b) Zn2



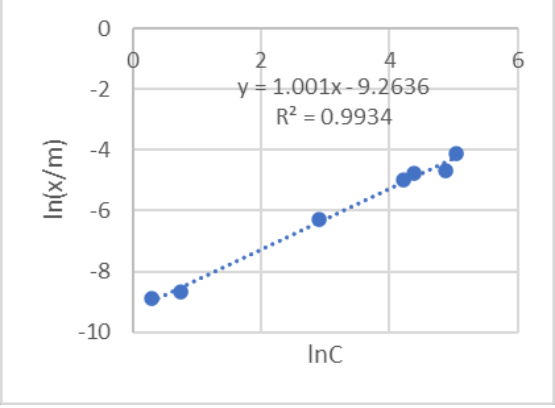
(c) Zn3A



(d) Zn3B



(e) Zn4



(f) Zn5

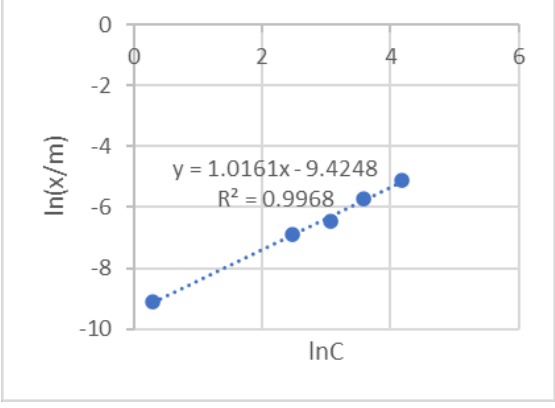
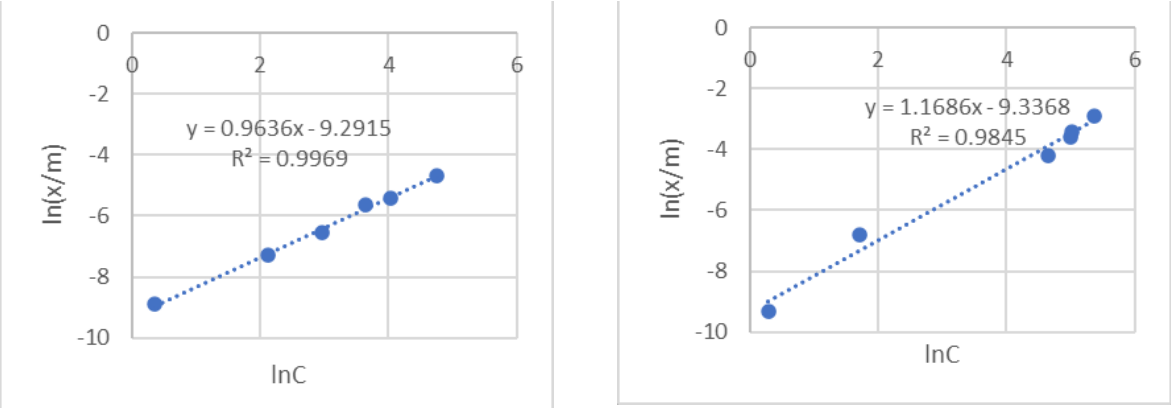


圖5.8、不同菌株Zn1~Zn9之Freundlich Equation吸附模式

(g) Zn6

(h) Zn7



(i) Zn8

(j) Zn9

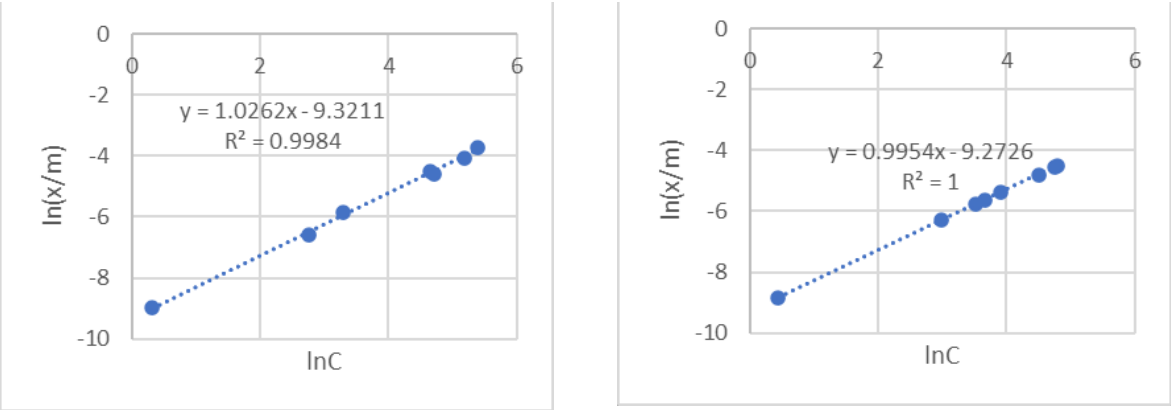


圖5.8、不同菌株Zn1~Zn9之Freundlich Equation吸附模式（續）

表 5.8、菌株編號 Zn1~Zn9 之 Freundlich Equation 及其參數

菌株編號	Freundlich Equation $\ln(x/m)=(1/n)\ln C + \ln K$	R^2	K	n
Zn1	$y = 0.9256x - 8.8902$	0.9917	1.5231×10^{-4}	1.1242
Zn2	$y = 0.9902x - 9.3681$	0.9988	8.5406×10^{-5}	1.0099
Zn3A	$y = 1.0337x - 9.5046$	0.9952	7.4508×10^{-5}	0.9674
Zn3B	$y = 0.9572x - 8.585$	0.9748	1.8689×10^{-4}	1.0447
Zn4	$y = 1.001x - 9.2636$	0.9934	9.4813×10^{-5}	0.9990
Zn5	$y = 1.0161x - 9.4248$	0.9968	8.0698×10^{-5}	0.9425
Zn6	$y = 0.9636x - 9.2915$	0.9969	9.2205×10^{-5}	1.0378
Zn7	$y = 1.1686x - 9.3368$	0.9845	8.8121×10^{-5}	0.8557
Zn8	$y = 1.0262x - 9.3211$	0.9984	8.9515×10^{-5}	1.0262
Zn9	$y = 0.9954x - 9.2726$	1	9.3964×10^{-5}	1.0046



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

5.4 耐受重金屬菌株對含重金屬(銅、鋅)廢水之處理效率評估

5.4.1 耐受銅重金屬菌株對含銅廢水之處理效率

耐受銅菌株分別在含 200 ppm Cu²⁺之 TSB (模擬含銅廢水)下，在最適吸附量培養期間對銅之去除率介於 76.4%-80.8% (圖 5.9，表 5.9)。

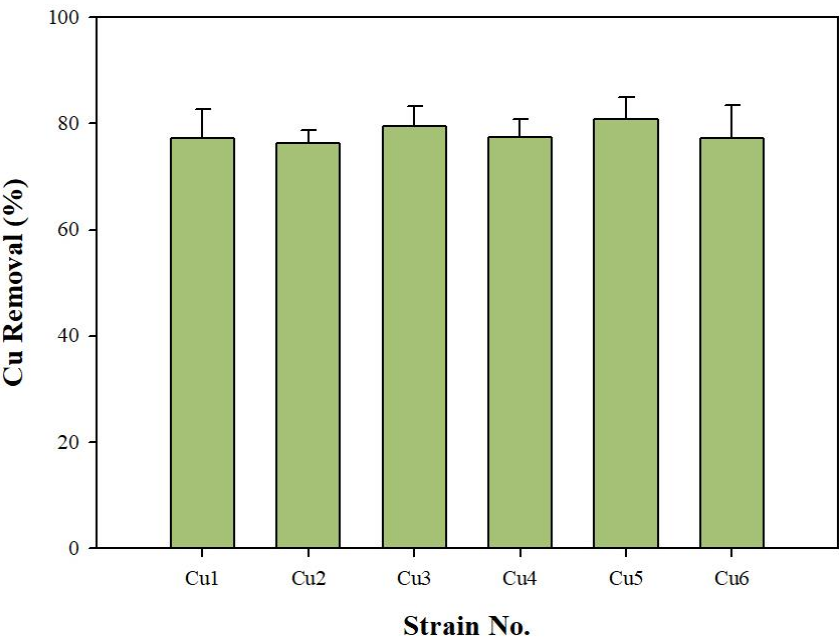


圖 5.9、耐受銅菌株在含 200ppm Cu²⁺ TSB 對銅之去除率

表 5.9、耐受銅菌株在含 200ppm Cu²⁺ TSB 對銅之去除率

菌株編號	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Cu5	Cu6
銅去除率(%)	77.2	76.4	79.5	77.4	80.8	77.2



5.4.2 耐受鋅重金屬菌株對含鋅廢水之處理效率

耐受鋅菌株分別在含 200 ppm Zn²⁺之 TSB (模擬含鋅廢水)下，在最適吸附量培養期間對鋅之處理除率介於 25.2%-56.3%，其中以菌株編號 Zn3A、Zn7、Zn8 對鋅的去除率較佳，處理效率大於 50% (圖 5.10，表 5.10)。

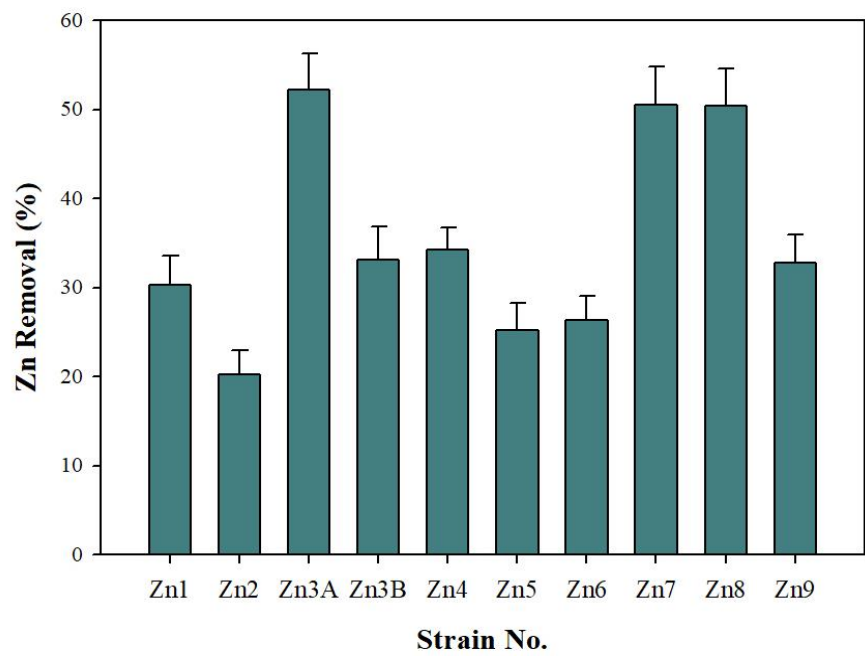


圖 5.10、耐受鋅菌株在含 200ppm Zn²⁺ TSB 對鋅之去除率

表 5.10、耐受鋅菌株在含 200ppm Zn²⁺ TSB 對鋅之去除率

菌株編號	Zn1	Zn2	Zn3A	Zn3B	Zn4	Zn5	Zn6
鋅去除率(%)	30.3	20.2	56.3	33.2	34.3	25.2	26.4

菌株編號	Zn7	Zn8	Zn9
鋅去除率(%)	50.5	50.4	32.8

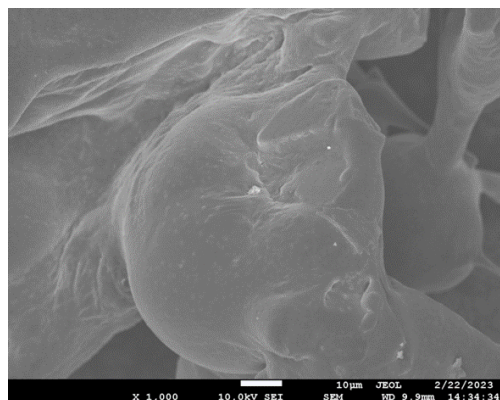


5.5 胞內奈米金屬顆粒特性分析

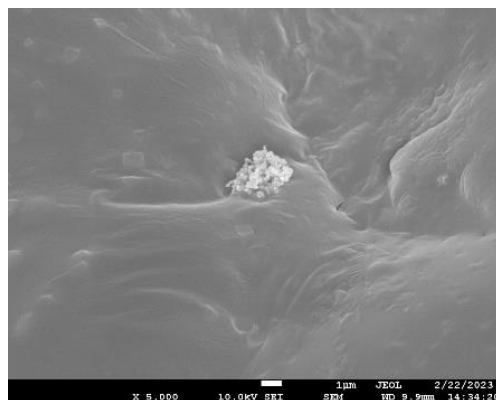
5.5.1 掃描電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, FE-SEM) 分析

將菌株編號 Cu2、Cu3、Cu4 生產之 CuO-NPs 及菌株編號 Zn1、Zn3B、Zn6 生產之 ZnO-NPs 經萃取、濃縮、淨化至 500 ppm 後，將其冷凍乾燥成粉末，送至中原大學泰昌貴重儀器中心，以超高解析場發掃描式電子顯微鏡 (JEOL, JSM-7600F) 進行觀測。圖 5.11、圖 5.12、圖 5.13 為不同比例尺下之菌株編號 Cu2、Cu3、Cu4 生產之 CuO-NPs 型態；圖 5.14、圖 5.15、圖 5.16 為不同比例尺下之菌株編號 Zn1、Zn3B、Zn6 生產之 ZnO-NPs 型態。其可清楚看出 CuO-NPs 及 ZnO-NPs 主要為球型奈米金屬顆粒，證明本研發專案成功利用微生物為工廠，成功製作出胞內 NPs。

(a)



(b)



(c)

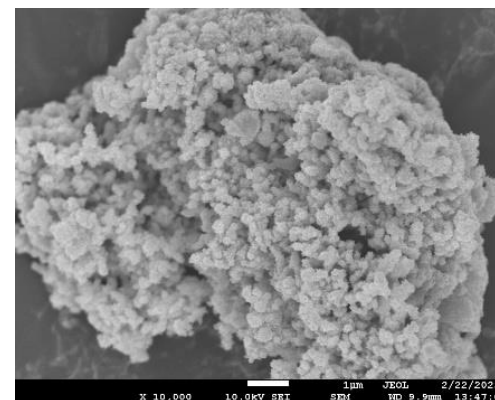
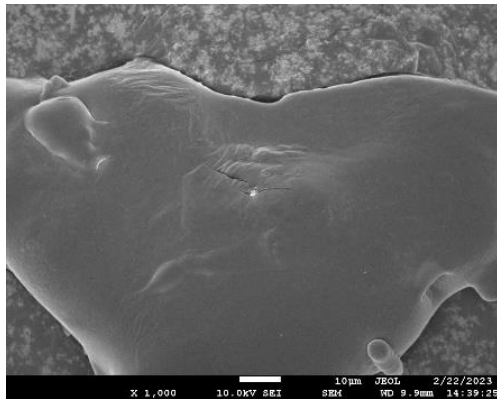


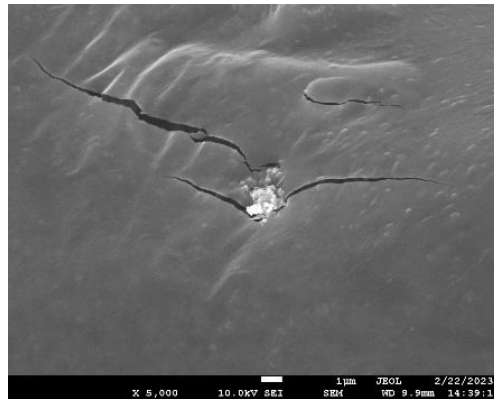
圖 5.11、菌株編號 Cu2 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態：(a) 1,000 X；(b) 5,000 X；(c) 10,000 X

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a)



(b)



(c)

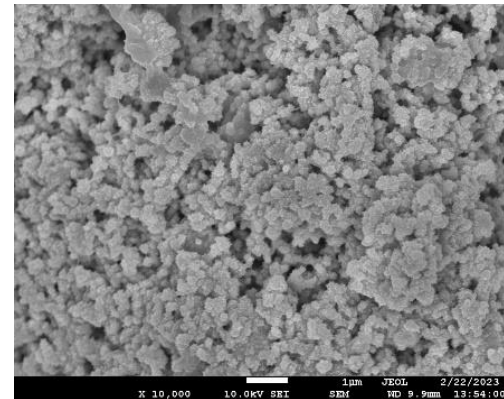
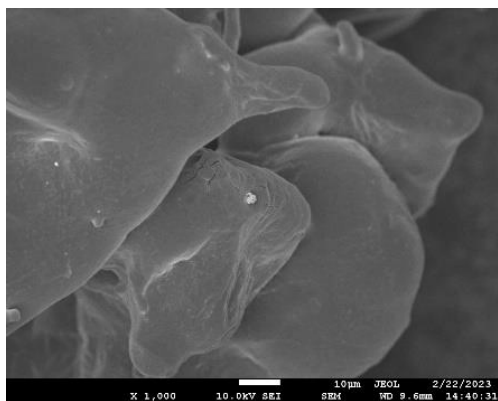
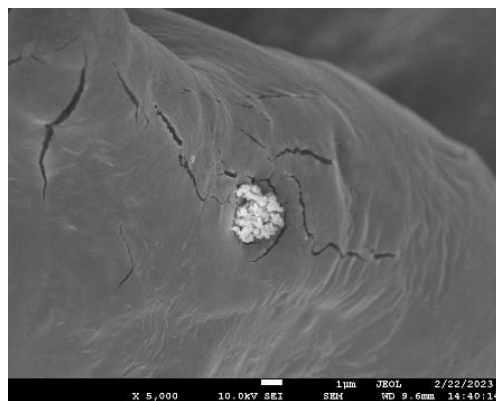


圖 5.12、菌株編號 Cu3 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態: (a) 1,000 X ; (b) 5,000 X ; (c) 10,000 X

(a)



(b)



(c)

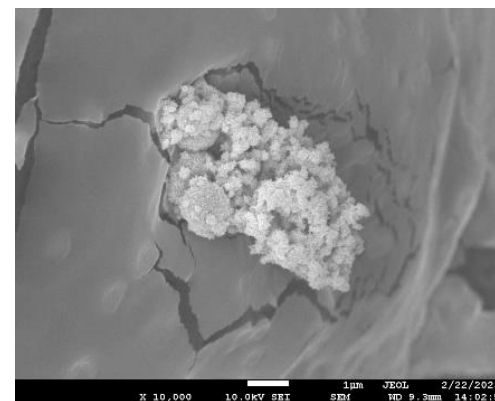
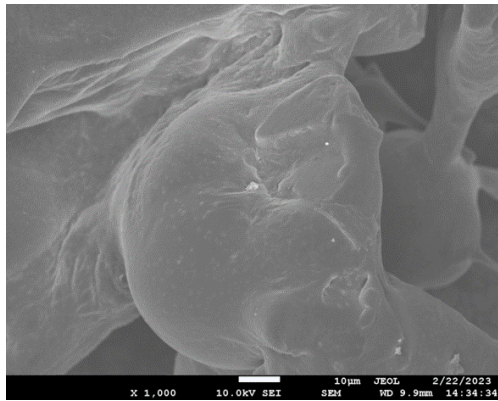


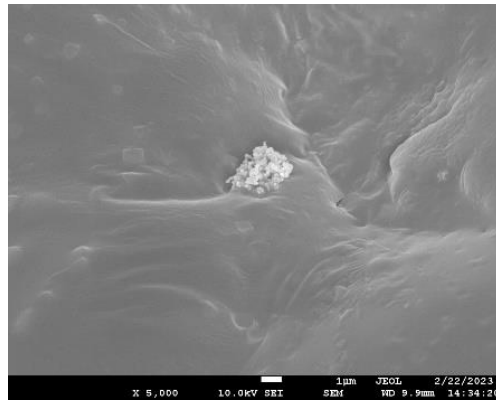
圖 5.13、菌株編號 Cu4 生產之 CuO-NPs 於 SEM 下之型態: (a) 1,000 X ; (b) 5,000 X ; (c) 10,000 X

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a)



(b)



(c)

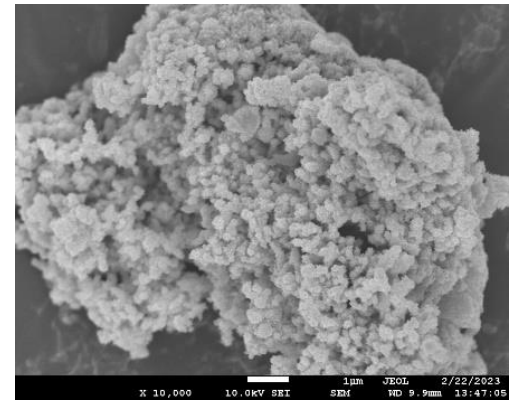
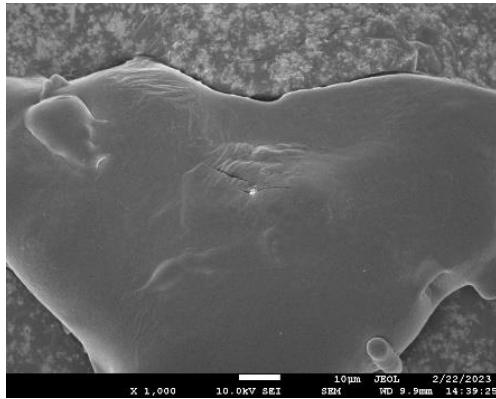
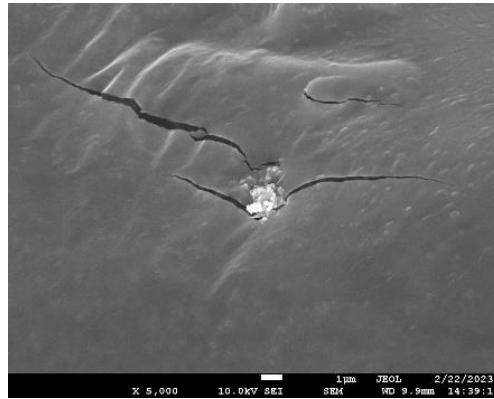


圖 5.14、菌株編號 Zn1 生產之 ZnO-NPs 於 SEM 下之型態: (a) 1,000 X ; (b) 5,000 X ; (c) 10,000 X

(a)



(b)



(c)

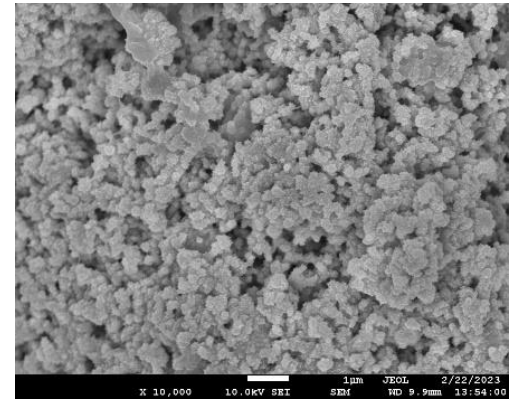
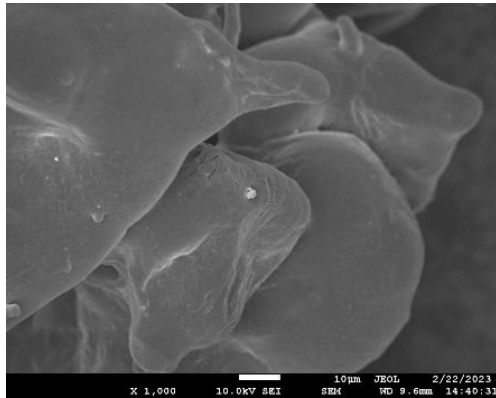


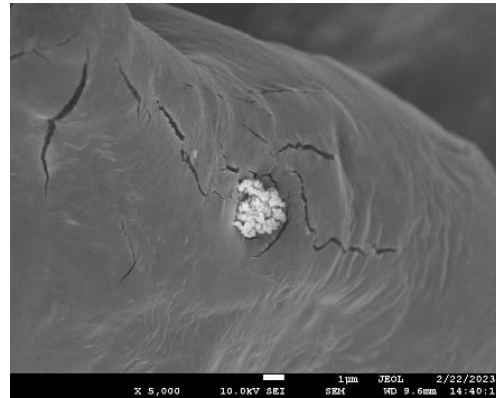
圖 5.15、菌株編號 Zn3B 生產之 ZnO-NPs 於 SEM 下之型態: (a) 1,000 X ; (b) 5,000 X ; (c) 10,000 X

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a)



(b)



(c)

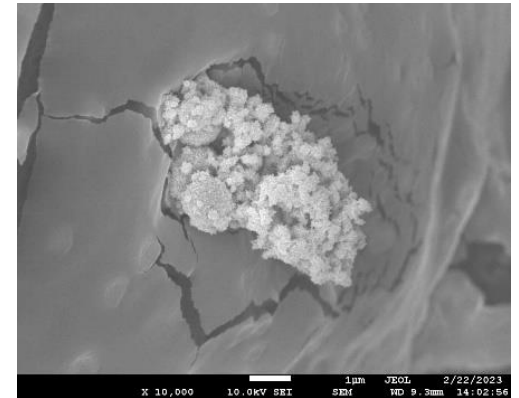


圖 5.16、菌株編號 Zn6 生產之 ZnO-NPs 顆粒於 SEM 下之型態: (a) 1,000 X ; (b) 5,000 X ; (c) 10,000 X



5.5.2 X 光能量散佈光譜 (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) 分析

將菌株編號 Cu2、Cu3、Cu4 生產之 CuO-NPs 及菌株編號 Zn1、Zn3B、Zn6 生產之 ZnO-NPs 經萃取、濃縮、淨化至 500 ppm 後，將其溶液冷凍乾燥成粉末，送至中原大學泰昌貴重儀器中心，以 X 光能量散佈分析儀 (EDS, Oxford Xmax80) 進行元素分析。

本研發專案成功製作胞內金屬 NPs。圖 5.17 中可看到菌株編號 Cu2、Cu3 及 Cu4 所產生的 CuO-NPs 皆有元素銅之強烈訊號 (0.9~1.1 keV)，另經計算可知銅元素於樣品中所佔重量百分比(%)，菌株編號 Cu2、Cu3 及 Cu4 產生的 NPs 中，銅占比分別為 49.58 %、28.58 % 及 52.51 % (表 5.11)。圖 5.18 可看到菌株編號 Zn1、Zn3B 及 Zn6 所產生的 ZnO-NPs 皆有元素鋅之明顯訊號 (1.0~1.2 keV)，另經計算可知鋅元素於樣品中所佔重量百分比(%)，菌株編號 Zn1、Zn3B 及 Zn6 產生的 NPs 中，鋅占比分別為 14.71 %、43.81 % 及 47.68% (表 5.12)。

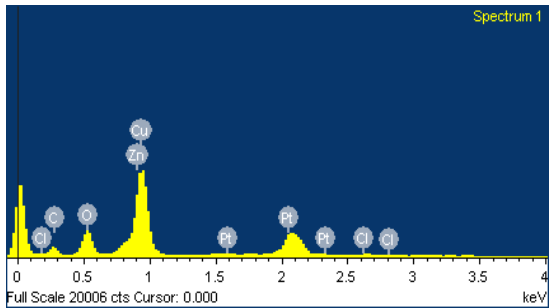
5.5.3 奈米金屬顆粒粒徑分析

為證明本研究專案產生的金屬 NP s 符合奈米尺度標準，本專案藉由 SEM 之尺規並搭配軟體 ImageJ 進行尺規作圖及計算。證明本專案所產生的奈米氧化銅顆粒粒徑範圍落在 65-90 nm 間，Cu2 產生的 CuO-NPs 為 65.4 nm，Cu3 產生的 CuO-NPs 以及 Cu4 產生的 CuO-NPs 為 65.4 nm。

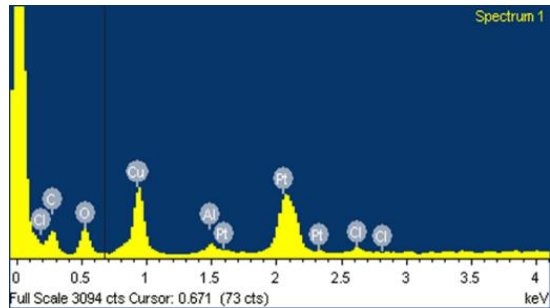
另外微生物生產的 ZnO-NPs 之粒徑範圍則落在 80-100 nm 間，Zn1 產生的 ZnO-NPs 為 85.7 nm，Zn3B 產生的 ZnO-NPs 為 79.6 nm 以及 Zn6 產生的 ZnO-NPs 為 97.3 nm。以上皆符合奈米顆粒之尺度規範。圖 5.19、圖 5.20 為菌株產生之奈米金屬銅/鋅顆粒之尺規作圖。

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a) Cu2-NPs



(b) Cu3-NPs



(c) Cu4-NPs

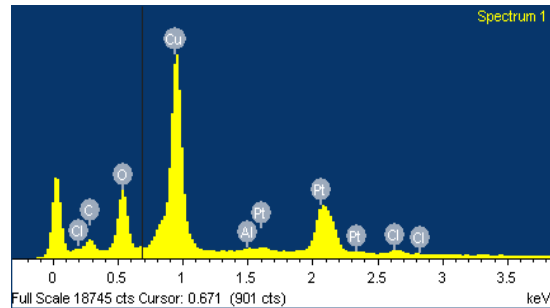
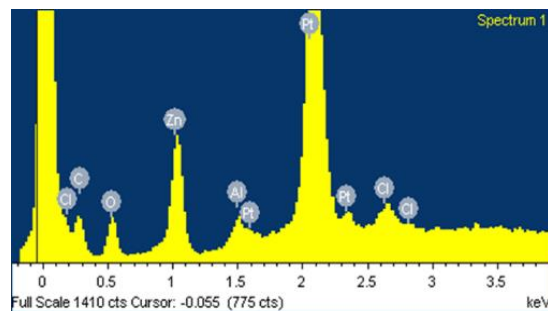


圖 5.17、胞外 CuO-NPs 之 EDS 訊號圖

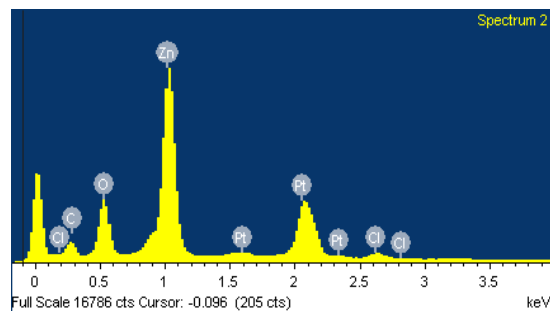
表 5.11、胞外 CuO-NPs 之 EDS 訊號

Strain No.	銅元素在 CuO-NPs 所佔百分比 (%)
Cu2	49.58 %
Cu3	28.58 %
Cu4	52.51 %

(a) Zn1-NPs EDS



(b) Zn3B-NPs EDS



(c) Zn6-NPs EDS

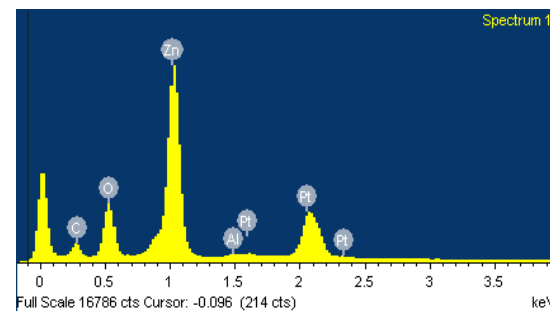


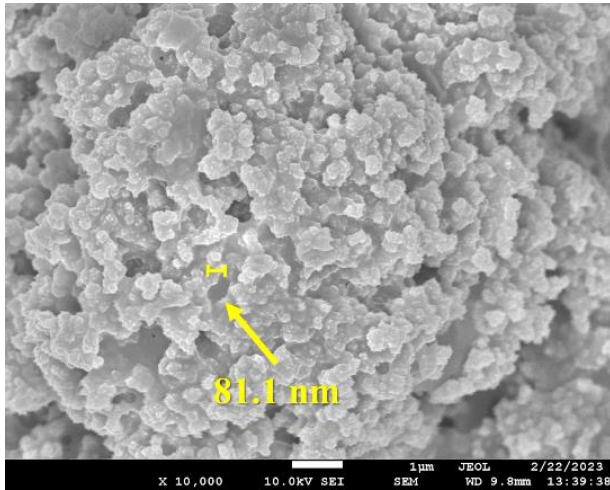
圖 5.18、胞外 ZnO-NPs 之 EDS 訊號圖

表 5.12、胞外 ZnO-NPs 之 EDS 訊號

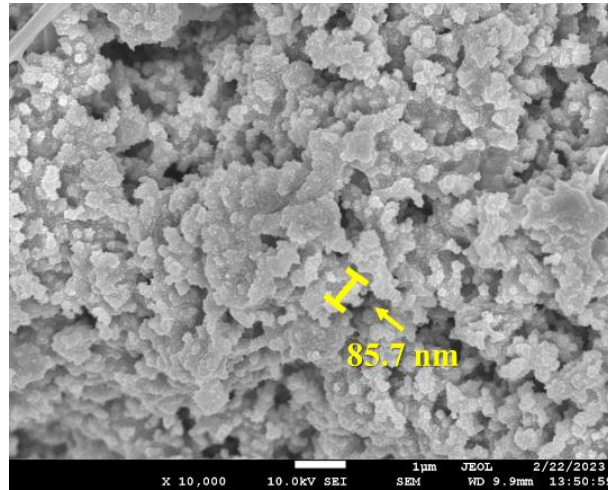
Strain No.	鋅元素在 ZnO-NPs 所佔百分比(%)
Zn1	14.71 %
Zn3B	43.81 %
Zn6	47.68 %

應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

(a) Cu2-NPs



(b) Cu3-NPs



(c) Cu4-NPs

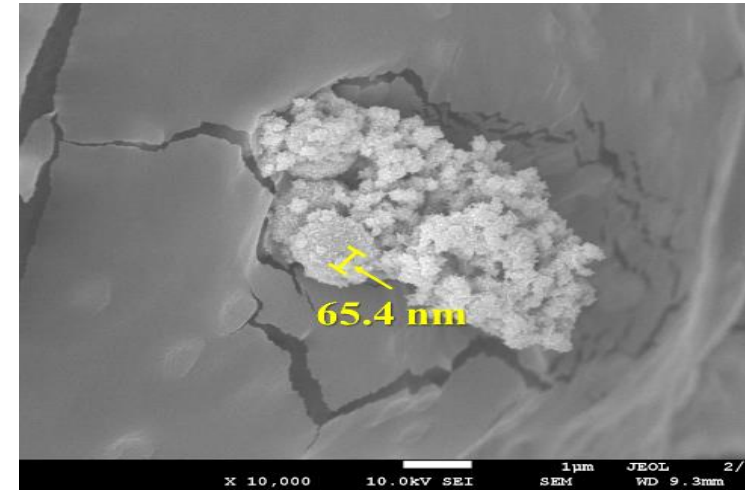
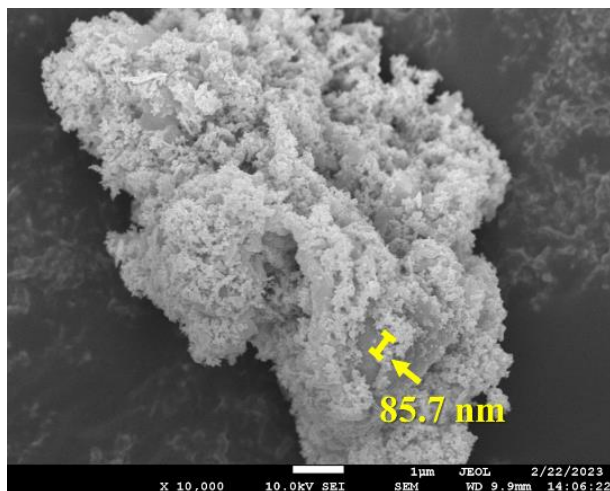
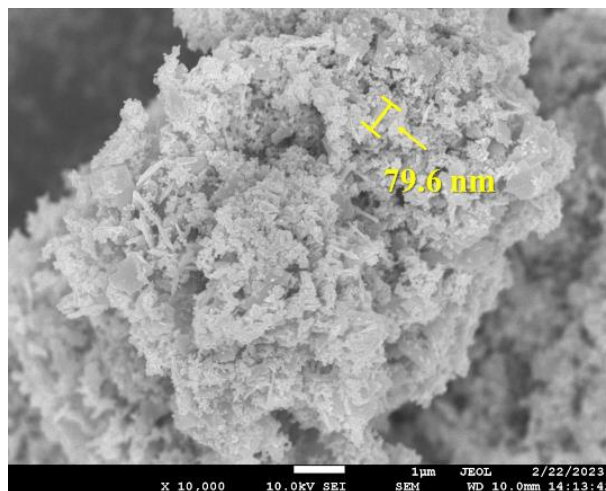


圖 5.19、胞外 CuO-NPs 粒徑分析: (a)編號 Cu2；(b)編號 Cu3；(c)編號 Cu4

(a) Zn1-NPs



(b) Zn3B-NPs



(c) Zn6-NPs

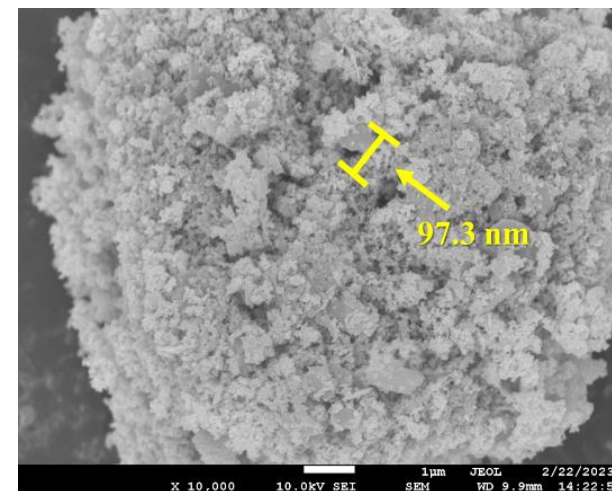


圖 5.20、胞外 ZnO-NPs 粒徑分析: (a)編號 Zn1；(b)編號 Zn3B；(c)編號 Zn6



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

5.6 胞內奈米金屬顆粒催化能力分析

5.6.1 胞內奈米氧化銅之催化能力

NPs 之催化能力是比較催化反應之反應速率，亦即比較擬一階常數中 k 值（反應速率常數）之大小。當 k 值越大，表示其催化能力越好。實驗結果可得知，市售奈米銅催化效果較生物製備胞內 CuO-NPs 效果為佳。圖 5.21 為市售奈米銅顆粒與生物生產之胞內 CuO-NPs (10 mg/L) 催化能力之實驗結果。表 5.13 為市售奈米銅顆粒及生物製備胞內 CuO-NPs 催化反應之擬一階反應參數。市售奈米銅與菌株編號 Cu2、Cu3 及 Cu4 所製備 CuO-NPs 之催化能力 k 值 (min^{-1}) 計算後分別為 0.253、0.068、0.106 及 0.063。生物合成之胞內 CuO-NPs 催化能力均較市售奈米銅顆粒為差，推測可能原因包括：(1)元素銅之催化能力均較氧化態銅強；(2)與本專案產生之奈米氧化銅相較，市售奈米銅顆粒較小，且對微生物之殺菌機制效率較佳；(3)胞內 CuO-NPs 外層蛋白質去除不完全。比較三種生物製備之胞內 CuO-NP，菌株編號 Cu3 製備之 CuO-NP 催化效果 ($k=0.106 \text{ min}^{-1}$) 較菌株編號 Cu2 ($k=0.068 \text{ min}^{-1}$) 及菌株編號 Cu4 ($k=0.063 \text{ min}^{-1}$) 製備之 CuO-NPs 催化效果佳。

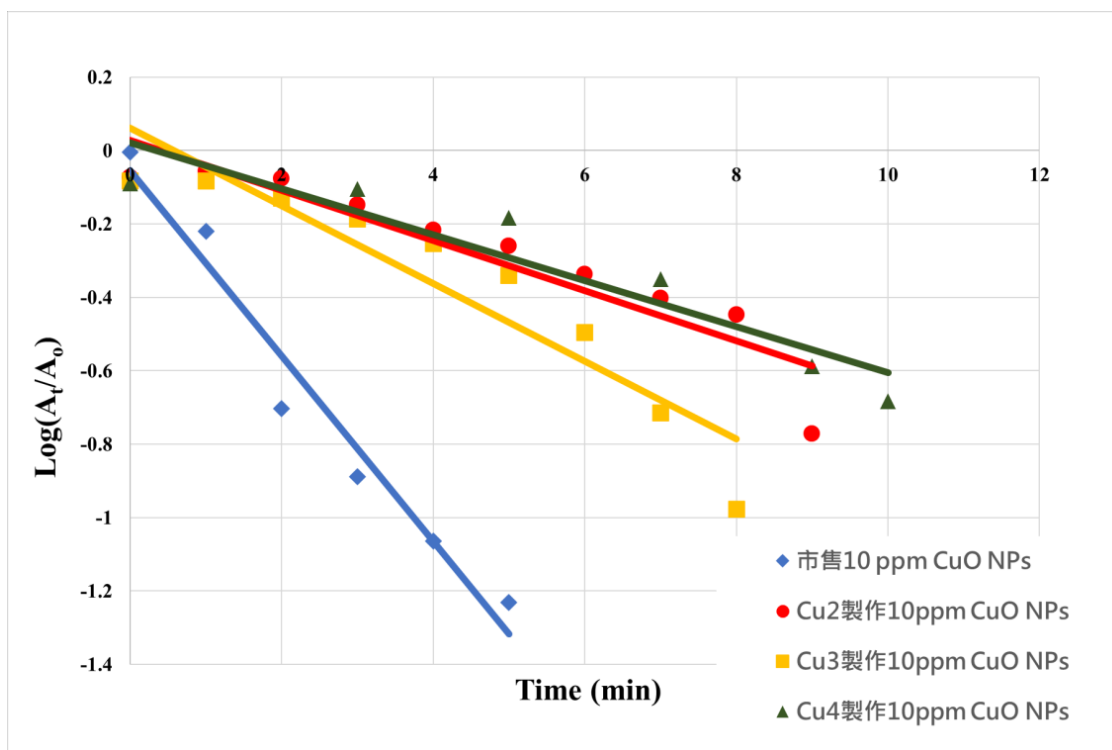


圖 5.21、胞內 CuO-NPs 之催化能力



表 5.13、胞內 CuO-NPs (10 mg/L)催化反應擬一階反應參數(k)

菌株編號	Control ¹ : Cu-NPs	Cu2 CuO-NPs	Cu3 CuO-NPs	Cu4 CuO-NPs
k (min ⁻¹)	0.253	0.068	0.106	0.063
R^2	0.963	0.866	0.871	0.874

¹:市售奈米銅顆粒 (Cu-NPs)

5.6.2 胞內奈米氧化鋅之催化能力

本研發專案同樣針對奈米氧化鋅進行相同之催化反應實驗。圖 5.22 為市售奈米鋅顆粒與生物生產之胞內 ZnO-NP 顆粒催化能力 (10 mg/L)。表 5.14 為市售奈米鋅及生物製備 ZnO-NPs 催化反應擬一階反應參數，可得知市售奈米鋅顆粒之催化效果較胞內 ZnO-NPs 效果為佳。市售奈米鋅顆粒與菌株編號 Zn1、Zn3B 及 Zn6 製備 ZnO-NPs 之 k 值 (min⁻¹)，計算後分別為 0.206、0.083、0.108 及 0.101。生物合成之胞內 ZnO-NPs 催化能力均較市售奈米鋅顆粒差，推測原因為：(1)元素鋅之催化能力均較氧化態鋅強；(2) 市售奈米鋅顆粒較小，且對微生物之殺菌機制效率較佳；(3) 微生物合成之胞內 ZnO-NPs 純度較低、外層蛋白質去除不完全，導致催化能力之差異。比較三種生物製備之 ZnO-NPs，菌株編號 Zn3B 製備之 ZnO-NPs 催化效果，相較菌株編號 Zn6 及編號 Zn1 製備之 ZnO-NPs 催化效果較佳。生物合成之菌株 Zn3B ZnO-NPs ($k=0.108$ min⁻¹) 與菌株 Cu3 CuO-NPs ($k=0.106$ min⁻¹) 之擬一階反應速率，其催化能力較佳。

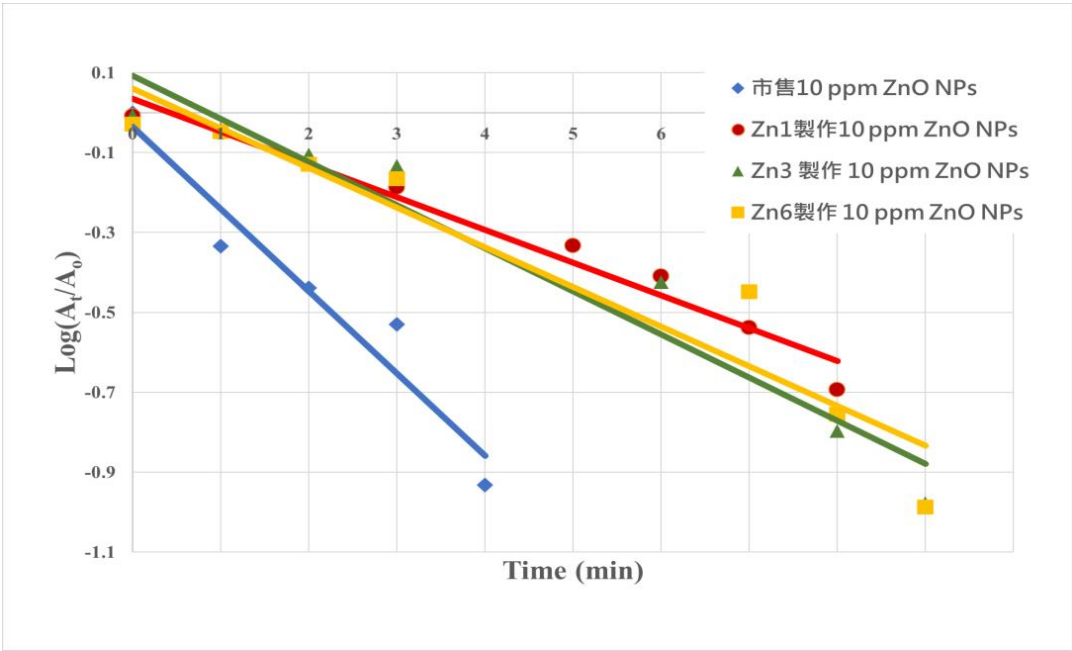


圖 5.22、胞內 ZnO-NPs 之催化能力



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

表 5.14、胞內 ZnO-NPs(10 mg/L)催化反應擬一階反應參數(*k*)

菌株編號	Control ¹ Zn-NPs	Zn1 ZnO-NPs	Zn3B ZnO-NPs	Zn6 ZnO-NPs
<i>k</i> (min ⁻¹)	0.206	0.083	0.108	0.101
R ²	0.933	0.964	0.950	0.923

¹: 市售奈米鋅 (Zn-NPs)

5.7 胞內奈米金屬抗菌能力分析

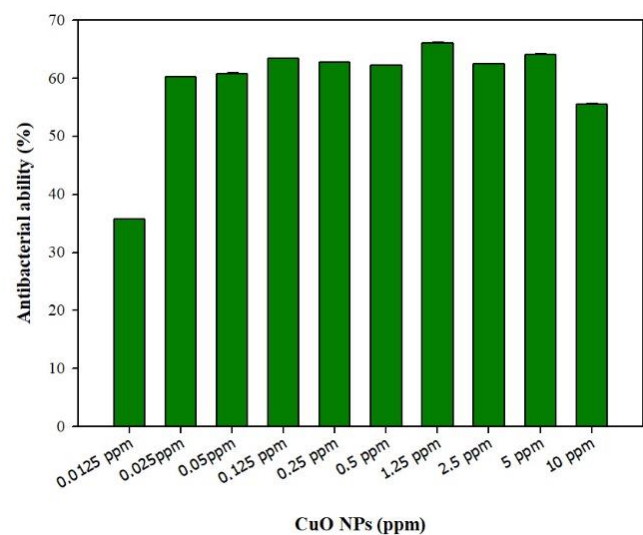
5.7.1 奈米氧化銅抗菌能力分析

本研發專案分析微生物合成之 CuO-NPs 之 XTT 抗菌能力分析，選用大腸桿菌為模式菌株。在相同濃度梯度下，比較市售 Cu-NPs 與微生物合成 CuO-NPs 之抗菌能力。實驗共測試 10 個濃度，由小到大分別為 0.0125、0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1.25、2.5、5 以及 10 µg/mL，圖 5.23 為本研發專案針對微生物製備 CuO-NPs 大腸桿菌抗菌能力實驗結果。表 5.15 為市售 Cu-NPs 與微生物製備之 CuO-NPs 在各濃度梯度之抗菌能力結果。市售 Cu-NPs 抗菌能力較微生物生產之 CuO-NPs 為佳，在濃度 0.025 ~ 10 µg/mL 下，抗菌能力達 60 %~65 %，但是當濃度降低至 0.0125 µg/mL 時，抗菌能力明顯下降為 35.7 %。推測可能原因是市售 Cu-NPs 低濃度時其抗菌能力佳；但市售 Cu-NPs 在高濃度下(>1.25 µg/mL)可能形成團聚顆粒(aggregates)，其抗菌能力也因此降低。

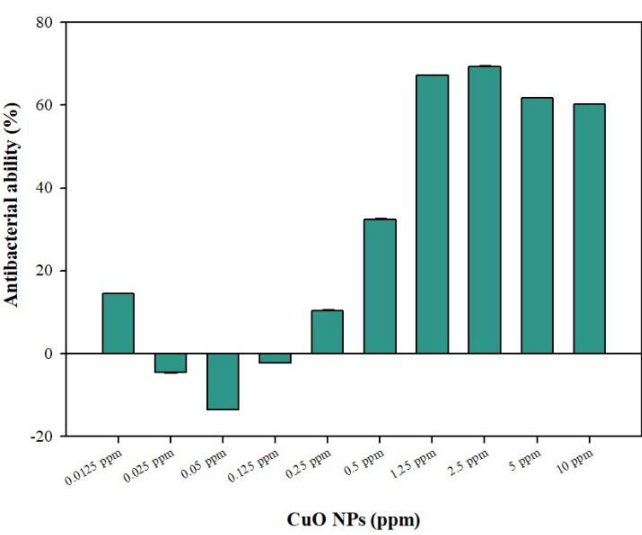
比較微生物合成之 CuO-NPs 抗菌能力，當濃度降低至 0.5 µg/mL 後，無論是菌株編號 Cu2、Cu3，還是菌株編號 Cu4 產生之胞內 CuO-NPs，抗菌能力在 36% 以下；當 CuO-NPs 濃度增加至 0.5 µg/mL 以上，其抗菌能力較明顯。菌株編號 Cu3 生產之 CuO-NPs，2.5 µg/mL 及 5 µg/mL 其抗菌能力可分別達到最高:76.82% 及 77.08%；菌株編號 Cu2 生產之 CuO-NPs，在相同濃度下，其抗菌能力可分別達到 69.33%及 61.75%；菌株編號 Cu4 生產之 CuO-NPs，在相同濃度下，其抗菌能力只可分別達到 64.82%及 54.21%。



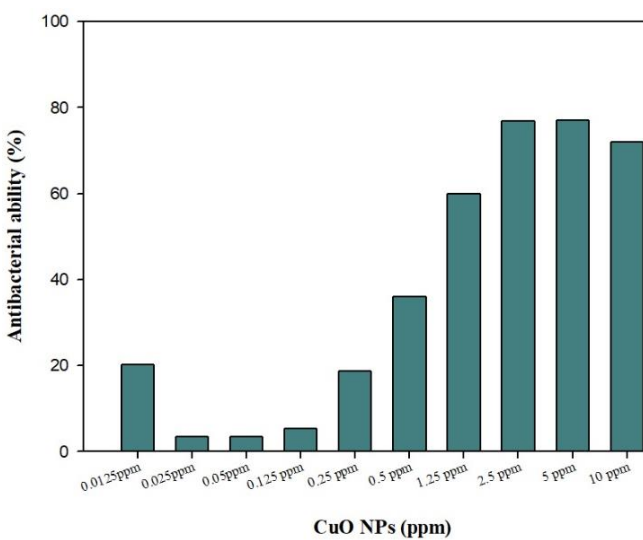
(a) 市售奈米銅 (Cu-NPs)



(b) Cu2



(c) Cu3



(d) Cu4

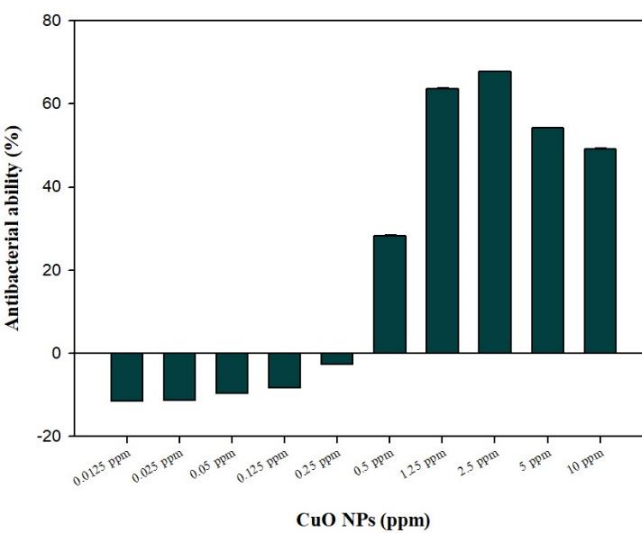


圖 5.23、胞內 CuO-NPs 抗菌能力分析: (a)市售奈米銅；(b)菌株編號 Cu2；(c)菌株編號 Cu3；(d)菌株編號 Cu4。



表 5.15、胞內 CuO-NPs 在不同濃度之抗菌能力

種類 濃度(μg/mL)	市售 Cu-NPs 抗菌能力(%) (control)	Cu2 生產之 CuO-NPs 抗菌能力(%)	Cu3 生產之 CuO-NPs 抗菌能力(%)	Cu4 生產之 CuO-NPs 抗菌能力(%)
0.0125	35.75	14.50	20.11	-11.48
0.025	60.26	-4.57	3.38	-11.30
0.05	60.82	-13.52	3.46	-9.52
0.125	63.40	-2.22	5.33	-8.18
0.25	62.71	10.42	18.68	-2.55
0.5	62.21	32.42	35.98	28.26
1.25	66.09	67.14	59.82	63.70
2.5	62.44	69.33	76.82	67.82
5.0	64.08	61.75	77.08	54.21
10.0	55.48	60.17	71.87	49.21

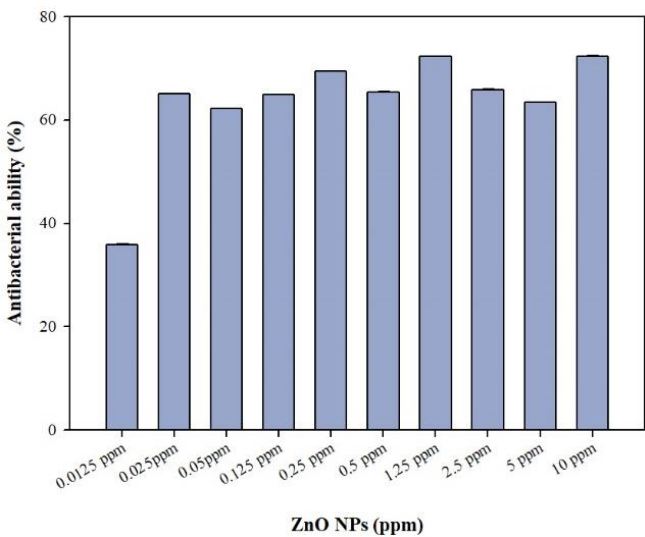
5.7.2 奈米氧化鋅抗菌能力分析

本研發專案亦分析微生物合成之 ZnO-NPs 之 XTT 抗菌能力分析，選用大腸桿菌為模式菌株。相同濃度梯度下，比較市售 Zn-NPs 與微生物合成 ZnO-NPs 之抗菌能力。實驗共測試 10 個濃度，由小到大分別為 0.0125、0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1.25、2.5、5 以及 10 μg/mL，圖 5.24 為本研發專案針對微生物製備 ZnO-NPs 對大腸桿菌抗菌能力實驗結果。表 5.16 為市售 Zn-NPs 與微生物製備之 ZnO-NPs 之抗菌能力。市售 Zn-NPs 之抗菌能力較微生物生產之 ZnO-NPs 為佳，當濃度為 0.025 ~10 μg/mL 下，抗菌能力達 62%~72%，較市售 Cu-NPs 為佳，當濃度降低至 0.0125 μg/mL 時，其抗菌能力則明顯下降 (35.9 %)。

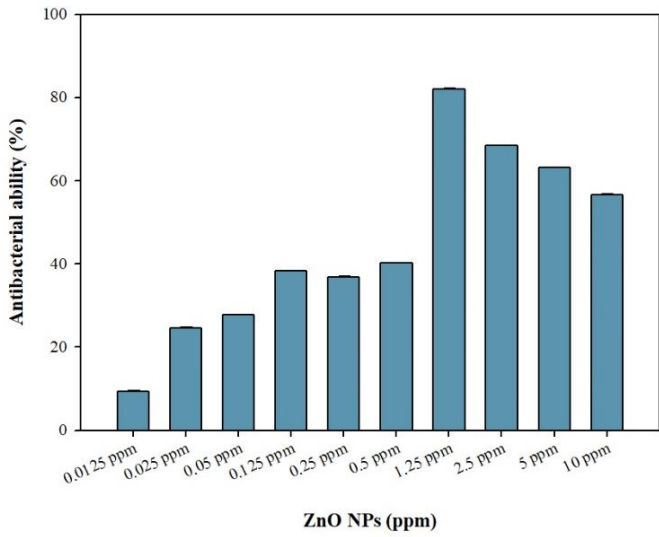
進一步討論微生物合成 ZnO-NPs 之抗菌能力，當其濃度降至 0.5 μg/mL 下，無論是菌株編號 Zn1、Zn3B 還是 Zn6 產生的 ZnO-NPs，對大腸桿菌之抗菌能力明顯下降，可知胞內 ZnO-NPs 有效抗菌濃度在濃度 0.5 μg/mL 以上。菌株編號 Zn3B、Zn6 產生 ZnO-NPs 濃度下降 0.125 μg/mL 時，則無抗菌能力，推測此濃度下 Zn 為微生物可接受之微量元素，因此可被微生物利用。菌株編號 Zn1 生產之 ZnO-NPs，1.25 μg/mL 及 2.5 μg/mL 其抗菌能力可分別達最高: 82.01%及 68.50%；菌株編號 Zn3B 生產之 ZnO-NP，在相同濃度下，其抗菌能力可分別達到 61.75%及 71.65%；菌株編號 Zn6 生產之 ZnO-NP，在相同濃度下，其抗菌能力分別只達到 63.85%及 69.44%。



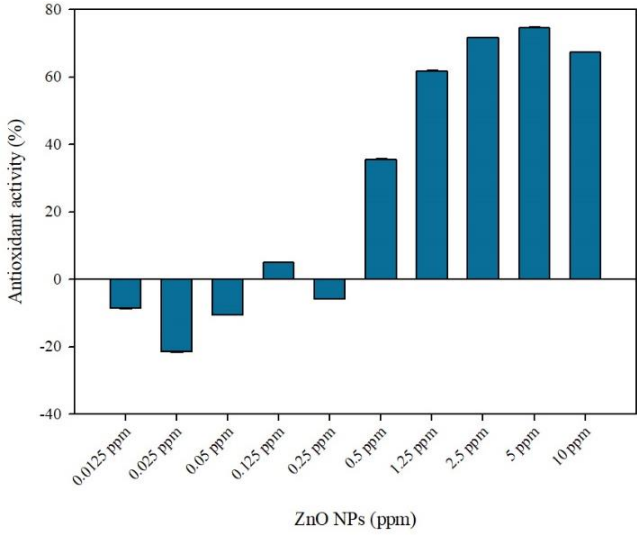
(a) 市售奈米鋅 (Zn-NPs)



(b) Zn1



(c) Zn3B



(d) Zn6

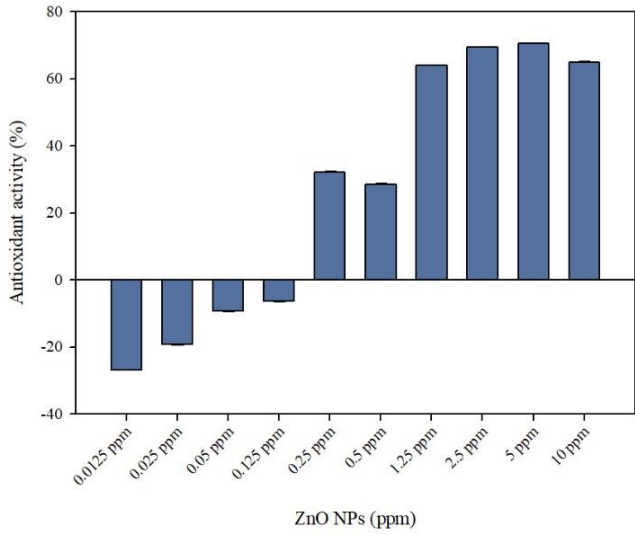


圖 5.24、胞內 ZnO-NPs 抗菌能力分析: (a)市售奈米鋅; (b)菌株編號 Zn1; (c)菌株編號 Zn3B; (d)菌株編號 Zn6



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

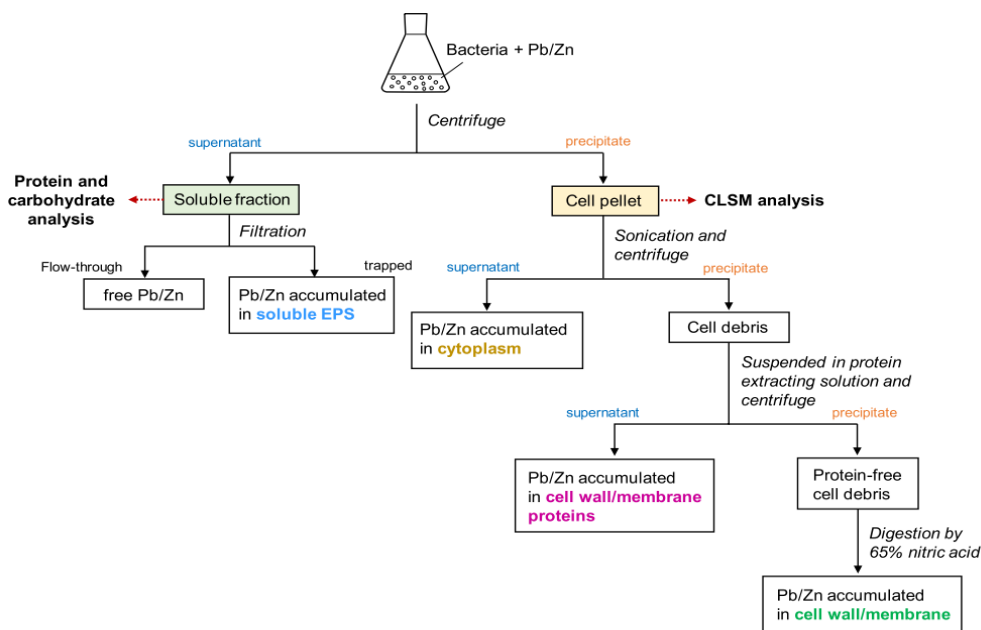
表 5.16、胞內 ZnO-NPs 在不同濃度之抗菌能力

種類 濃度(μg/mL)	市售 Zn-NPs 抗菌能力(%) (Control)	Zn1 生產之 ZnO-NPs 抗菌能力(%)	Zn3B 生產之 ZuO-NPs 抗菌能力(%)	Zn6 生產之 ZnO-NPs 抗菌能力(%)
0.0125	35.93	9.44	-8.53	-26.74
0.025	65.07	24.62	-21.33	-19.27
0.05	62.20	27.79	-10.50	-9.21
0.125	64.94	38.28	4.91	-6.18
0.25	69.43	36.91	-5.78	32.16
0.5	65.43	40.26	35.57	28.51
1.25	72.30	82.01	61.75	63.85
2.5	65.87	68.50	71.65	69.44
5.0	63.38	63.17	74.71	70.45
10.0	72.30	56.69	67.36	64.95

5.8 技術應用之可行性及發展性

環境工程領域上，生物吸附法去除重金屬廢水相關理論與技術都已成熟，如強調以生物處理系統之活性污泥作為生物絮凝劑，用於去除(吸附)工業廢水中之重金屬(Puay et al., 2013)。但若要進一步生產奈米金屬顆粒，尚需釐清金屬顆粒是否為奈米尺度(<100nm)，以及是否具有催化及抑菌之特性。本專案產生之金屬顆粒經萃取、濃縮後，另以胰蛋白酶 (Trypsin) 去除蛋白質後(淨化)，並採用 PVA 進行封端(caping)以避免顆粒團聚。實驗結果顯示，菌株所產生之金屬顆粒的確為奈米等級，另由其特性分析得知，這些顆粒均具有催化反應及抑菌能力。可說明本技術已成功開發生物生產之胞內 CuO-NPs，ZnO-NPs。

微生物生長需要許多重金屬，但所需多是微量等級濃度。高濃度重金屬廢水對活性污泥系統或生態系統中之細菌、原生動物均為毒性物質。本專案關鍵技術為自受污染環境中能成功篩選出可耐受重金屬微生物(細菌)，其能吸附廢水中之特定重金屬並能生產奈米尺度之重金屬顆粒(圖5.25) (Mwandira et al., 2020)。此外，這些細菌吸附重金屬在胞外 (如細胞壁/細胞膜之 EPS)，或是累積在細胞質之比例並不相同。相關文獻顯示，細菌吸附重金屬過程，其分佈在細菌胞內或胞外之量並不相同，在多數情況下，重金屬 Pb, Zn 之細菌胞外吸附量(87%)遠高於胞內吸附量(1%Pb 或 6%Zn) (Mwandira et al., 2020) (圖5.26)。



Scheme 1. Flowchart for the analytical procedure for the determination of the distribution of heavy metal in different cellular parts.

圖5.25、細菌合成奈米金屬顆粒之可能方式 (Mwandira et al., 2020)

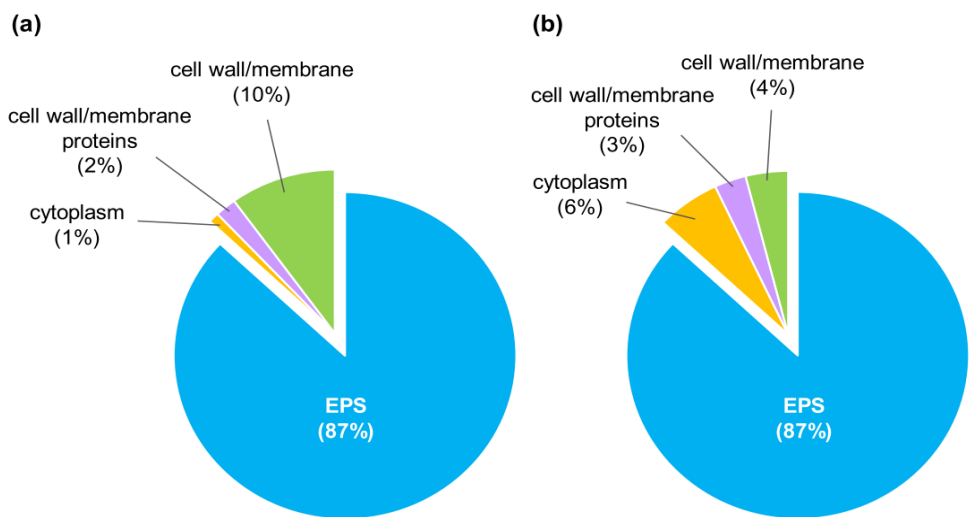


Figure 3. Distribution of (a) Pb(II) and (b) Zn(II) in different cellular parts of *O. profundus* KBZ 3-2.

圖5.26、金屬離子(Pb, Zn)在細菌結構上之分佈情形 (Mwandira et al., 2020)

5.8.1 胞內 CuO-NPs 與 ZnO-NPs 之產量計算

由 SEM 實驗結果顯示，CuO-NPs、ZnO-NPs 顆粒表面仍有雜質，推測可能仍存在 EPS (如蛋白質、肽聚糖 polysaccharide 或其他成分)(圖5.27)。本研發專案所篩選之耐受重金屬菌株，生產胞內 CuO-NPs 及 ZnO-NPs 速率經計算如表5.1及表5.2。比較胞內 CuO-NP 之產率 (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg)為編號 Cu4 (0.755) > 編號 Cu3 (0.229) > 編號 Cu2 (0.111)；胞內 ZnO-NP 產率 (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg) 比較為編號 Zn3B (0.271) > 編號 Zn6 (0.074) > 編號 Zn1 (0.013)。



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

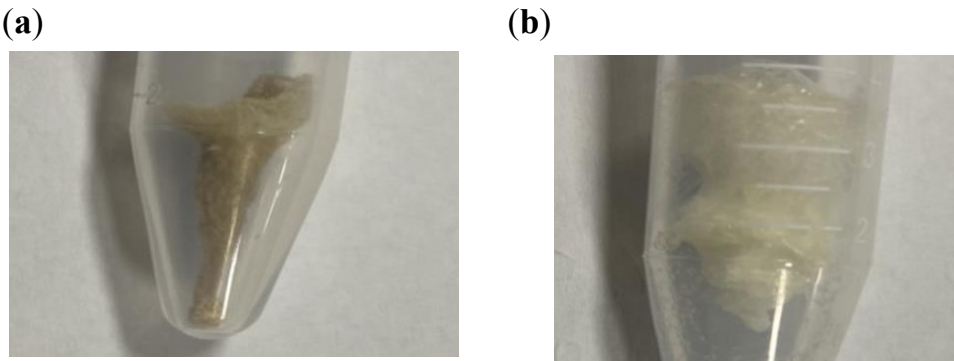


圖5.27、本研發專案製作之胞內奈米金屬成品照片：
(a) CuO-NPs (菌株編號 Cu2)；(b) ZnO-NPs (菌株編號 Zn1)

表5.17、菌株製造 CuO-NPs 之產率

菌株編號	Cu2	Cu3	Cu4
CuO-NPs 產率 (NPs mg/bacterial cell dry weight, mg)	0.229	0.111	0.755

表 5.18、菌株製造 ZnO-NPs 之產率

菌株編號	Zn1	Zn3B	Zn6
ZnO-NPs 產率 (NPs mg/bacterial cell dry weight, mg)	0.013	0.271	0.074

5.8.2 製作 NPs 模廠試驗之初步規劃

本研發專案後續規劃模廠規模(pilot scale)生產胞內 NPs，其處理標的為國內常見印刷電路板製作及電鍍過程產生之高濃度重金屬(Cu)廢水，使用大型發酵槽體進行試驗，添加本專案成功篩選之耐受銅菌株 (如編號 Cu2, Cu3 and Cu4)。操作時依槽體體積，添加適量耐受銅菌株生長所需 TSB 培養基、適量重金屬廢水(需調整 pH< 8.5-9.5 使其 Cu 保持離子態，避免發生沉澱反應)。接著需進行模廠規模實驗，調整培養條件，如攪拌速率、培養溫度、培養時間等，使其操作條件可同時表現最佳重金屬去除率及生產最多胞內 CuO-NPs。當微生物菌體吸附含銅廢水後，再依本專案所開發之方法將其吸附後之菌體進行萃取、濃縮、淨化、封端等步驟，取得胞內 CuO-NPs。

傳統化學沉澱法由於需額外添加化學混凝劑去除廢水中之銅金屬，另外還需處理含銅化學污泥 (有害事業廢棄物)。本方法之優點是去除廢水中高濃度重金屬銅並使用吸附重金屬廢水後之菌體製作 CuO-NPs，培養耐受重金屬微生物，節省化學混凝劑及處理含銅化學污泥之費用。然而此構想還需進行詳細 實驗設計及



規劃，其可能限制條件：(1) 發酵槽體中微生物吸附廢水重金屬過程可能受到其他微生物所污染；(2) 當含銅廢水存在其他重金屬時，雖耐受重金屬微生物產生之 EPS 可同時去除廢水中重金屬，但所製作之胞內 NPs 可能即含多種重金屬，其純度因此下降；(3) CuO-NPs 需以界面活性劑微胞溶液方式進行保存，以確保其顆粒之分散及穩定性。

5.9 結論

1. 本專案成功篩選出可耐受重金屬銅並產生胞內 CuO-NPs 之微生物，其耐受濃度達 200 mg/L，最佳耐受銅之菌株為編號 Cu2、Cu3 及 Cu4，其對重金屬銅 (200mg/L) 之去除率分別為 76.36 % 79.49 % 及 77.35 %，其胞內 CuO-NP 之產率 (NPs-mg/ bacterial cell dry weight-mg) 分別為 0.111、0.229、0.755。
2. 本專案成功篩選出可耐受重金屬鋅並產生胞內 ZnO-NPs 之微生物，其耐受濃度達 350 mg/L，最佳耐受鋅之菌株為編號 Zn1、Zn3B 及 Zn6，其對重金屬鋅 (200mg/L) 之去除率分別為 30.34 %、33.16 % 及 26.35 %，其胞內 ZnO-NPs 之產率 (NPs-mg/bacterial cell dry weight-mg) 分別為 0.013、0.271、0.074。
3. 可耐受重金屬銅、鋅之菌株分別吸附重金屬銅、鋅溶液，均符合等溫吸附模式 Freundlich Equation，其中菌株編號 Cu2、Cu3 及 Cu4 之 n 值分別為 1.1719、1.9778 及 0.9994；菌株編號 Zn1、Zn3B 及 Zn6 之 n 值分別為 1.1242、1.0477 及 1.0378。這些菌株具有可生產較多胞內 CuO-NPs、ZnO-NPs 之能力。
4. 本專案選取菌株編號 Cu2、Cu3、Cu4、Zn1、Zn3B 以及 Zn6 六株菌之 V1~V9 region 16S rRNA 進行菌種鑑定。編號 Cu2 鑑定為 *Acinetobacter* sp. (NCBI per identify, 99.42 %)；編號 Cu3 為 *Acinetobacter* sp. (NCBI per identify, 98.69 %)；編號 Cu4 為 *Klebsiella pneumoniae* (NCBI per identify, 100 %)。編號 Zn1 鑑定為 *Bacillus albus* (NCBI per identify, 100 %)；編號 Zn3B 為 *Bacillus thuringiensis* (NCBI per identify, 100 %)；編號 Zn6 為 *Bacillus cereus* (NCBI per identify, 99.64 %)。
5. SEM 照片結果可知，胞內 CuO-NPs/ZnO-NPs 已對蛋白質進行去除，但仍看見 NPs 上仍包覆類似 EPS 成分。此外，NPs 經 PVA 封端後，其尺度屬於奈米尺度，CuO-NPs 直徑約為 65 nm-90 nm，ZnO-NPs 直徑約為 80-100 nm。
6. 本專案成功研發出胞內 CuO-NPs 及 ZnO-NPs，菌株編號 Cu2、Cu3、Cu4 及 Zn1、Zn3B、Zn6 分別合成 CuO-NPs 及 ZnO-NPs，利用 SEM/EDS 分析這些 NPs 均出現銅、鋅元素之訊號。編號 Cu2、Cu3、Cu4 生產之 NPs 中，銅元素 (At%) 占比分別為 49.58 %、28.58 % 及 52.51 %；編號 Zn1、Zn3B、Zn6 合成之 NPs 中，鋅元素 (At%) 占比分別為 14.71 %、43.81 % 及 47.68 %。
7. NPs 催化反應分析，菌株生產 NPs 均具備奈米金屬之氧化還原能力。CuO 催



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

化能力效果經計算依序為 CuO-NPs (菌株編號 3) > CuO-NPs (菌株編號 2) > CuO-NPs (菌株編號 4)，其型態為 CuO-NPs，因此催化能力不及市售 Cu-NPs；ZnO 催化能力效果依序為 ZnO-NPs (菌株編號 Zn3B) > ZnO-NPs (菌株編號 Zn6) > ZnO-NPs (菌株編號 Zn1)，其形態為 ZnO-NPs，因此催化能力不及市售 Zn-NPs。

8. 抗菌能力試驗結果可知，微生物生成之胞內 NPs 對大腸桿菌 (*E. coli*) 抗菌作用濃度高於 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。相較於市售 Cu-NPs/Zn-NPs 在 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ 濃度對大腸桿菌有抗菌作用，推測其原因為 CuO-NPs/ZnO-NPs 胞內顆粒較大，且顆粒表面仍殘留 EPS (蛋白質)，進而降低與受測菌株之接觸面積所致。
9. 本研發專案導入循環經濟概念，篩選與分離能耐受重金屬銅或鋅污染之河川底泥之細菌菌株，利用人工模擬之重金屬廢水為原料，將細菌視為生物合成胞內 NPs 之工廠，成功將攝入細菌胞內之銅離子或鋅離子，合成奈米金屬顆粒 (CuO-NPs, ZnO-NPs) 建立生物合成胞內奈米重金屬之方法。此外，菌株可利用胞外 EPS 吸附廢水中重金屬銅或鋅，達到處理重金屬廢水之目的。本專案並針對生物合成之胞內奈米金屬顆粒進行特性分析，包括表面成分、粒徑大小、催化能力、抑菌能力等，以確保顆粒為奈米尺度並具備其相關性質。

5.10 建議

1. 本專案屬於先導型研發計畫，執行過程著重於方法開發，先由受重金屬底泥中篩選可耐受重金屬之微生物，並於實驗室規模 (lab-scale) 嘗試是否生產胞內奈米重金屬顆粒。針對本技術應用之可行性及發展性已於期末報告 5.8 節中說明之。建議後續研究針對去除真實廢水中之重金屬去除及實務量產胞內奈米顆粒為主要目標。
2. 本專案重點主要探討胞外 EPS 去除廢水中之重金屬。由相關文獻顯示，微生物產生胞外 EPS 具吸附重金屬之能力。若依其物理型態分類，EPS 分為 total EPS, bound EPS, soluble EPS 等產物，各有其分析方法。EPS 成分亦十分複雜，包括醣類、蛋白質、脂肪、腐殖酸、eDNA 等。建議後續可分析 EPS 之含量及其成分，討論 EPS 對重金屬之吸附能力與其關聯性。
3. 胞內奈米金屬顆粒雖用 PVA 進行封端 (capping) 以維持 (增加) NPs 顆粒之分散性。但由 SEM 顯示，金屬粉體仍有團聚現象，影響其催化反應、抗菌能力。為避免發生團聚現象，建議將 NPs 粉體改溶於非離子界面活性劑微胞 (micelle) 之中。
4. 本實驗製成之胞內 NPs 為氧化態: CuO-NPs 或 ZnO-NPs。由 SEM 結果皆觀察



出 NPs 上仍有擬似 EPS (蛋白質)物質存在，由 EDS 元素分析也偵測出 C、N 等元素，說明本專案產生之 NPs 仍無法完全去除 EPS (蛋白質)，建議後續持續改善 NPs 純化方法，如使用更有效方法去除 EPS 蛋白質、醣類。此外，因評估 NPs 特性較少使用氧化態，因此若需與市售產品相互比較，還需將 CuO-NPs、ZnO-NPs 分別還原成 Cu-NPs、Zn-NPs，方可分析其特性。



(六)、參考文獻

1. 行政院環保署，土壤及地下水整治網，2012，何謂底泥。
2. 行政院環保署，土壤及地下水整治網，2012，底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法。
3. 行政院環保署，土壤及地下水整治網，2022，地下水污染物監測、管制標準。
4. 卓裕盛，2008，PVA 固定化硫酸還原菌體顆粒處理含銅廢水之研究，國立交通大學，碩士論文。
5. 林冠嘉，2004，國內重金屬污泥資源回收再利用現況。
6. 金益鼎集團，2012，循環經濟-貴金屬回收再利用案例。
7. 許正一，2011，土壤重金屬知多少，科技大觀園。
8. 程淑芬，2019，製備多硫化鈣及應用於地下水重金屬污染整治技術，政府研究資訊系統。
9. 羅筱玫，2015，甲殼素混摻奈米碳管及膨脹石墨應用於重金屬離子檢測之研究，國防大學理工學院，碩士論文。
10. **Abu-El-Halawa, R., and Zabin, S.A. (2017).** Removal efficiency of Pb, Cd, Cu and Zn from polluted water using dithiocarbamate ligands. *Journal of Taibah University for Science* 11, 57-65.
11. **Agnew UM, Slesinger TL.** Zinc Toxicity. 2022 Dec 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32119435.
12. **Ahmad, A., Wei, Y., Syed, F., Imran, M., Khan, Z.U.H., Tahir, K., Khan, A.U., Raza, M., Khan, Q., and Yuan, Q. (2015).** Size dependent catalytic activities of green synthesized gold nanoparticles and electro-catalytic oxidation of catechol on gold nanoparticles modified electrode. *RSC advances* 5, 99364-99377.
13. **Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., Tarrahimofrad, H., Mirbagheri, V.S., Easton, A.J., and Ahmadian, G. (2021).** Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *Journal of Nanobiotechnology* 19, 86.
14. **Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Rajendran, R.B., and Velmurugan, D. (2011).** Biosynthesis of gold nanoparticles by actinomycete *Streptomyces viridogens* strain HM10. *Indian J Biochem Biophys.* 48, 331-335.



15. **Beveridge, T.J., and Murray, R.G. (1980).** Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 141, 876-887.
16. **Boriová, K., Čerňanský, S., Matúš, P., Bujdoš, M., Šimonovičová, A., and Urík, M. (2019).** Removal of aluminium from aqueous solution by four wild-type strains of *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering* 42, 291-296.
17. **Comte, S., Guibaud, G., and Baudu, M. (2007).** Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *J Hazard Mater* 140, 129-137.
18. **Das, K.K., Reddy, R.C., Bagoji, I.B., Das, S., Bagali, S., Mullur, L., Khodnapur, J.P., and Biradar, M.S. (2019).** Primary concept of nickel toxicity – an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 30, 141-152.
19. **DeMessie, J.A., Sorial, G.A., and Sahle-Demessie, E. (2022).** Chapter 9 - Removing chromium (VI) from contaminated water using a nano-chitosan-coated diatomaceous earth. In *Separation Science and Technology*, S. Ahuja, ed. (Academic Press), pp. 163-176.
20. **Dhand, C., Dwivedi, N., Loh, X.J., Jie Ying, A.N., Verma, N.K., Beuerman, R.W., Lakshminarayanan, R., and Ramakrishna, S. (2015).** Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *RSC Advances* 5, 105003-105037.
21. **Diep, P., Mahadevan, R., and Yakunin, A.F. (2018).** Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 157.
22. **Elgarahy, A.M., Elwakeel, K.Z., Mohammad, S.H., and Elshoubaky, G.A. (2021).** A critical review of biosorption of dyes, heavy metals and metalloids from wastewater as an efficient and green process. *Cleaner Engineering and Technology* 4, 100209.
23. **Ghosh, S., Ahmad, R., Banerjee, K., AlAjmi, M.F., and Rahman, S. (2021).** Mechanistic aspects of microbe-mediated nanoparticle synthesis. *Frontiers in Microbiology* 12.
24. **Gupta, P., and Diwan, B. (2017).** Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 13, 58-71.
25. **Haq, A.N.U., Nadhman, A., Ullah, I., Mustafa, G.M., Yasinzai, M., and Khan, I. (2017).** Synthesis approaches of zinc oxide nanoparticles: The dilemma of



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

- ecotoxicity. *Journal of Nanomaterials* 2017, 1-14.
26. **Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., and Hao, B. (2008).** Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 24, 4140-4144.
 27. **Hulkoti, N.I., and Taranath, T. (2014).** Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 121, 474-483.
 28. **Jacob, J.M., Lens, P.N., and Balakrishnan, R.M. (2016).** Microbial synthesis of chalcogenide semiconductor nanoparticles: a review. *Microb Biotechnol* 9, 11-21.
 29. **Jamkhande, P.G., Ghule, N.W., Bamer, A.H., and Kalaskar, M.G. (2019).** Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of drug delivery science and technology* 53, 101174.
 30. **Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Kirthi, A.V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A., Gaurav, K., Karthik, L., and Rao, K.V. (2012).** Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 90, 78-84.
 31. **Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., and Granqvist, C. (2001).** Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol* 19, 15-20.
 32. **Kuroda, K., and Ueda, M. (2014).** Generation of arming yeasts with active proteins and peptides via cell surface display system: cell surface engineering, bio-arming technology. *Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols*, 137-155.
 33. **Lakherwal, D. (2014).** Adsorption of heavy metals: a review. *International Journal of Environmental Research and Development* 4, 41-48.
 34. **Li, X., Xu, H., Chen, Z.-S., and Chen, G. (2011).** Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials* 2011, 270974.
 35. **Li, X.Y., and Yang, S.F. (2007).** Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research* 41, 1022-1030.
 36. **McShan, D., Zhang, Y., Deng, H., Ray, P.C., and Yu, H. (2015).** Synergistic antibacterial effect of silver nanoparticles combined with ineffective antibiotics on



- drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104. Journal of Environmental Science and Health, Part C 33, 369-384.
37. **Mikutta, R., Baumgärtner, A., Schippers, A., Haumaier, L., and Guggenberger, G. (2012).** Extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis* associated with minerals modify the extent and rate of heavy metal sorption. Environmental Science & Technology 46, 3866-3873.
 38. **Nasreen, S., and Anwar, S. (2014).** Causal relationship between trade openness, economic growth and energy consumption: A panel data analysis of Asian countries. Energy Policy 69, 82-91.
 39. **Osman, G.E., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Shaaban, M.R., and Ahmad, I. (2019).** Recent Progress in Metal-Microbe Interactions: Prospects in Bioremediation. Journal of Pure & Applied Microbiology 13.
 40. **Oves, M., Khan, M.S., and Zaidi, A. (2013).** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. Saudi J Biol Sci 20, 121-129.
 41. **Paquin, P.R., Santore, R.C., Wu, K.B., Kavvas, C.D., and Di Toro, D.M. (2000).** The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. Environmental Science & Policy 3, 175-182.
 42. **Paul, D. (2017).** Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. Annals of Agrarian Science 15, 278-286.
 43. **Priyadarshini, S., Gopinath, V., Meera Priyadharsshini, N., MubarakAli, D., and Velusamy, P. (2013).** Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. Colloids Surf B Biointerfaces 102, 232-237.
 44. **Raghupathi, K.R., Koodali, R.T., and Manna, A.C. (2011).** Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir 27, 4020-4028.
 45. **Rai, A., Prabhune, A., and Perry, C.C. (2010).** Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. Journal of Materials Chemistry 20, 6789-6798.
 46. **Rai, G.K., Bhat, B.A., Mushtaq, M., Tariq, L., Rai, P.K., Basu, U., Dar, A.A., Islam, S.T., Dar, T.U., and Bhat, J.A. (2021).** Insights into decontamination of soils by phytoremediation: A detailed account on heavy metal toxicity and mitigation strategies. *Physiologia Plantarum* 173, 287-304.



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

47. **Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., and Annadurai, G. (2013).** Intracellular and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by using marine bacteria *Vibrio alginolyticus*. *Nanosci Nanotechnol* 3, 21-25.
48. **Rezvani Amin, Z., Khashyarmanesh, Z., and Fazly Bazzaz, B.S. (2016).** Different behavior of *Staphylococcus epidermidis* in intracellular biosynthesis of silver and cadmium sulfide nanoparticles: more stability and lower toxicity of extracted nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, 1-11.
49. **Royer A, Sharman T.** Copper Toxicity. 2023 Mar 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32491388.
50. **Shaikh, S., Nazam, N., Rizvi, S.M.D., Ahmad, K., Baig, M.H., Lee, E.J., and Choi, I. (2019).** Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. *Int J Mol Sci* 20.
51. **Shanmugam, R., Chelladurai, M., K, P., Vanaja, M., G, G., and Gurusamy, A. (2013).** Intracellular and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by using marine bacteria *Vibrio alginolyticus*. *Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal* 3.
52. **Sheikhloo, Z., and Salouti, M. (2011).** Intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium chrysogenum*. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 102-105.
53. **Sheikhloo, Z., Salouti, M., and Katiraei, F. (2011).** Biological synthesis of gold nanoparticles by fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Cluster Science* 22, 661-665.
54. **Shi, T., Wang, Z., Liu, Y., Jia, S., and Changming, D. (2009).** Removal of hexavalent chromium from aqueous solutions by D301, D314 and D354 anion-exchange resins. *J Hazard Mater* 161, 900-906.
55. **Shrestha, R., Ban, S., Devkota, S., Sharma, S., Joshi, R., Tiwari, A.P., Kim, H.Y., and Joshi, M.K. (2021).** Technological trends in heavy metals removal from industrial wastewater: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105688.
56. **Siddiqi, K.S., Husen, A., and Rao, R.A.K. (2018).** A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* 16, 14.
57. **Sreedevi, P., Suresh, K., and Jiang, G. (2022).** Bacterial bioremediation of



- heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. *Journal of Water Process Engineering* 48, 102884.
58. **Srivastava, S.K., and Constanti, M. (2012).** Room temperature biogenic synthesis of multiple nanoparticles (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, and Li) by *Pseudomonas aeruginosa* SM1. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 831.
59. **Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., and Sutton, D.J. (2012).** Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Suppl* 101, 133-164.
60. **Tripathi, S., Arora, N., Gupta, P., Pruthi, P.A., Poluri, K.M., and Pruthi, V. (2019).** Chapter 4 - Microalgae: An emerging source for mitigation of heavy metals and their potential implications for biodiesel production. In *Advanced Biofuels*, A.K. Azad, and M. Rasul, eds. (Woodhead Publishing), pp. 97-128.
61. **Varshney, R., Seema, B., Gaur, M., and Pasricha, R. (2011).** Copper Nanoparticles Synthesis from Electroplating Industry Effluent. *Nano Biomedicine and Engineering* 3.
62. **Wang, L.K., Hung, Y.-T., and Shammash, N.K. (2005).** Physicochemical treatment processes (Springer).
63. **Wu, D.q., Ding, X.S., Zhao, B., An, Q., and Guo, J.S. (2022).** The essential role of hydrophobic interaction within extracellular polymeric substances in auto-aggregation of *P. stutzeri* strain XL-2. *International Biodeterioration & Biodegradation* 171, 105404.
64. **Zhang, Z., Xia, S., Wang, X., Yang, A., Xu, B., Chen, L., Zhu, Z., Zhao, J., Jaffrezic-Renault, N., and Leonard, D. (2009).** A novel biosorbent for dye removal: Extracellular polymeric substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ-1. *J Hazard Mater* 163, 279-284.



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

附錄

附錄一、本研發專案使用之儀器設備

1. 火焰式原子光譜儀 (Flame Atomic Absorption Spectrometry, AA, GBC XplorAA)
2. 超高解析場發掃描式電子顯微鏡 (Field-emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM): JEOL JSM-7600F, 中原大學, 泰昌貴重儀器中心。
3. 能量散布分析儀 (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDS): Oxford Xmax80, 中原大學, 泰昌貴重儀器中心。
4. 高溫高壓滅菌釜 (Tomin Speedy autoclave TM-325, Taiwan)
5. 電子天平 (Precisa XS 225A, Switzerland)
6. 恆溫培養箱 (DENG YNG Incubator E600L)
7. 消化加熱裝置。
8. -20°C 臥室冷凍櫃 (HCF-202): Haier®, Taiwan
9. 高轉速冷凍離心機 (MPW Med. instruments, Centrifuge MPW-351R)
10. 迷你水平電泳槽 (Major Science, ZGMJ-105SR)
11. 聚合酶連鎖反應儀 (PC-816): ASTEC®, Japan
12. 複式顯微鏡 (MICROTECH, MX600-CT-C)
13. 酵素分析免疫儀 (EPOCH 2 Microplate Reader): BioTek®, U.S.A
14. 桌上型迷你微量離心機 (Mini-Micro Centrifuge PC-100): Bersing®, Taiwan
15. 桌上型照膠系統 (SmartView Pro 2000): Major Science®, Taiwan
16. 膠體電泳電源供應器 (MP 250V Power Supply): Major Science®, Taiwan
17. 酸鹼度計 (Portable pH meter): Up-aqua, Taiwan
18. 無菌操作臺 (BM-4000): Genewave Scientific®, Taiwan
19. 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Nicolet iS5 FTIR Spectrometer): Thermo Fisher



附錄二、本研發專案使用之培養基、藥品等實驗材料

一、實驗用水

1. 去離子水(RiOs 水): Water Purification System, Millipore® , U.S.A
2. 超純水(Mili-Q 水, 阻抗值 $\leq 18.2\Omega$): Water Purification System, Millipore® , U.S.A

二、藥品

1. 七水合硫酸鋅 (Zinc sulfate heptahydrate): Sigma-Aldrich, 99%, CAS No.7446200
2. 五水合硫酸銅 (Copper(II) sulfate pentahydrate): J.T.Baker®, $\geq 99\%$, CAS No. 7758-99-8
3. 鋅(Zn)標準品: High Purity Standards, Zinc at 1,000 $\mu\text{g/mL}$ in 2% HNO_3
4. 銅(Cu)標準品: High Purity Standards, Copper at 1,000 $\mu\text{g/mL}$ in 2% HNO_3
5. 硼氫化鈉(Sodium tetrahydridoborate, NaBH_4): Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$, CAS No.16940-66-2
6. 對硝基苯酚(4-Nonylphenol, 4-NP): Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, CAS No.100-02-7
7. 市售奈米銅 (nano-Cu): Sigma-Aldrich, nanopowder, 25 nm particle size (TEM), CAS No.7440-50-8
8. 市售奈米鋅 (nano-Zinc): Sigma-Aldrich, nanopowder, 40-60 nm avg. part. size, $\geq 99\%$ trace metals basis, CAS No. 7440-66-6

三、溶劑

1. 丙酮(Acetone): Macron Fine Chemicals™, U.S.A, $\geq 97\%$, HPLC 級
2. 乙醇(Ethanol): Honey Well, $\geq 99.8\%$, CAS No. 64-17-5
3. 丙三醇(Glycerol): J. T. Baker, 99%, CAS No.56815
4. 硫酸(Sulfuric acid): Honey Well, 95-97%, CAS No. 7732-18-5
5. 硝酸(Nitrate acid): Honey Well, 67-69%, CAS No. 7697-37-2

四、培養基

1. 洋菜(agar powder): Amresco®, 分生級
2. Tryptic Soy Broth (TSB): Becton, Dickinson and Company
Pancreatic Digest of Casein..... 17.0g



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

- Papa Digest of Soybean..... 3.0g
- Dextrose..... 2.5g
- Sodium chloride..... 5.0g
- Dipotassium Phosphate..... 2.5g

五、 套組

- 1. 消化試劑套組 (Crack Set 10) 1000 times，Merck 3.2.2.2，CAS No.114687
- 2. 革蘭氏染色套組:東耀生物科技有限公司
- 3. 細胞活力檢測試劑組 (XTT Cell Viability Assay Kit): Biotium

六、 其他用品

- 1. 0.22μm Nylon 濾頭: Vastech®，Taiwan
- 2. Primer 27F: Genomics，10mM
- 3. Primer 1492R: Genomics，10mM
- 4. MasterMix (5X): GenMark
- 5. HealthView Nucleic Acid Stain: Genomics，Cat.GN-NAS-100
- 6. 6× Loading dye: Bioman，Cat No. DD01
- 7. 100bp DNA Ladder (Provided 6x loading dye): Bioman，Cat No.DM100
- 8. 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) (Shi et al., 2023)

藥品	g/L
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
K ₂ HPO ₄	0.245
● 800 ml 試劑水溶解上述藥品	
● 以 HCl 及 NaOH 調整 pH 值至7.40	
● 補水至1000 ml	



附錄三、耐受重金屬菌株定序結果

Cu2_27F:

GGCCAAAGGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACCGGACCTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGA
AAGGGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCG
GACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
AGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAAGGATGATCCGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTCTAGTTAATA
CCTAGGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGC
GTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTA
ACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTA
GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGG
GAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACT
AGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGA
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCTGGCCTTGACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC
GGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTGGGTAAAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTTTCCTACTGCCAGCATTTCGAT
GGCACTTTAGATACTGCAGTGACAACTGAGAGGCGGGACGACGTCAGTCAT
CATGTCCTTACGGCAGGCTACACACGTGCCTACATG

Cu2_1492R:

GACAAACTCTTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATG
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC
AATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCA
ACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCA
TGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCC
TTAAAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

CACCTGTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTTCTAG
TATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGC
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGAC
CGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGCCTCA
AAGGCCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAG
ATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAGCTCACCAGTATCGAATGC
AATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTCACATCCGACTTAATAAGCCGCCTAC
GCACGCTTTACGCCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCA
CTATCCCTAGGTATTAATACTAGAGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTTACA
ACCATAAGGCTCTCCACACGCGGCATGCTGGATCAGGTTCCCATGTCAAT
ATTCCCAGTCTGCTCCGTAGGAGTCTGGGCGGGTCTCAGTCCAGTGGTGG
GCGGAT

Cu3_27F:

TACAGTCGAGCGGGGGAAGGAAGCTTGCTACCGGACCTAGCGGCGGACAG
GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
GGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGAC
CTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG
CCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG
CCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTCTAGTTAATAC
CTAGGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCG
TAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAA
CTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAG
AATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTA
GCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGAC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGAACCT
TACCTGGCCTTGACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGTGCCTTCGGG



AATCTAGGATACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTG
GTAAAGTCCCGCACGAGCGCAACCCTTTCCTTACTGCCAGCATTTCGATGGG
AACTTTAAGGATACTGCAGTGACAACTGAGAGCGGGACGACGTCAAGTCAT
CATGGCTACGTCAGGCTACACTGCTAATGGTCGTACAGTGCTACCAGCGATG
GTGATGCTAATCTCAAAAGCCGATT

Cu3_1492R:

TGATCTATAAATCTAACGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTG
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGA
TCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAAT
CCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACC
CTTTGTACCGACCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGA
TGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTA
AAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC
CTGTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTTCTAGTAT
GTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGT
ACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGCCTCAAA
GGCCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATG
GCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACAC
CTGGAATTCTACCATCCTCTCCCATACTCTAGCTCACCAGTATCGAATGCAAT
TCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACATCCGACTTAATAAGCCGCCTACGCA
CGCTTTACGCCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATC
CCTAGTATTACTAGAGTAGCCTCTCCTCGCTTAAGTGCTTACACATAGCTTCT
CACACACGCGCATGCTGGATCAGGTCCCCAATTGTCCATATTCCCCTGCTG
CTTCCGGTAGAGTCTGGCGGCTCTCAGTCCCAGTGTGGCGATTATCCTCTC
GGACGCTACGATCGTGCCTTGGTAGCTTAACCCACATCT

Cu4_27F:

GGGCTTAGCAGCAATCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTG
CTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCT
GATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGC
AAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAG
CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTC
AAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTG
GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGG
CGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCA
CAGAACTTGACAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGTGCTG
CATGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAGTCCGCACGAGCGC
ACCCTATCTTTGTGCAGCGATCGCGGACTCAGGAACTGCAGTGATACTGAG
AGGTGGGATGACGTCAGTCATCATGCCCTACGACAGGCTACCACACGTGCT
ACA

Cu4_1492R:

GCCACAGGATCAAGTGAGTAGCGCCCTCCCGAAGGTAAAGCTACCTACTTC
TTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA
ACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATG
GAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGC
TTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAG
CCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGT
TTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAG
GATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAG
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAAAG
CATCTCTGCTAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAAGTTCTTCGCGTTG
CATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAT
TTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTAAACGCGTTA
GCTCCGGAACCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGA
GCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATC



TCTACGCATTTACACGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCT
AGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACAT
CCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAC
GCTTGACACCTCCGTATTACGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTT
CTTCTGCGGGTAACGTCAATCGACAAGGTATTAACCTTATCGCCTTCCTCCC
GCTGAAAGTACTTTACACCCGAGCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATC
AGCTGCGCCATGTGCATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGAGTCTGGACGGT
GTCCTCAGTTCCAGTGGTGGCTGGTCATCCCTCCTCAGAACCAGCTAG

Zn1 27F:

CATATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAA
CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCG
AAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC
TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGA
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGT
GCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
GAAACTCAAAGGATTTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TAAATCGAGCACGCCGAGAACCTTACCAGTCCTGACATCTCTGACAACCTA
GAGATAGGCTCTTCTTCGGGAGCAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCATC
CTCTGTCTGGAACCT

Zn1 1492R:

ACGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTC
GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCA
TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC
TACAATCCGAACCTGAAAACGGTTTTATGAAATTAGCTCCACCTCGCGGTCTT



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

GCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTC
ACCTTAAAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCGCTC
GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACAACAACCATGC
ACCACCTGTCACCTCTGCTCCCCGAAGGAAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCA
AAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTG
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAG
GGCGGAAACCCTCTAACACTTACCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTAC
AGACCAAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACATGAAATTCCACTTTCCTCTTCCTGCACTCAAGTCTCCCA
GTTTCAAATGACCCTCCACGGTTGAGCAGTGGGCTTTCACATCAAACCTTAA
GAAACCACTGCGCGCGCTTAACGCCCATATTCCGGAAAACGCTTGCAACCA
CGTAATACGCAGTCTGCTAGCAGTAGTAAGCCGTGCTTCTGGTAGTACGGAC
AGTGCCAGCTATTCAC

Zn3B 27F:

TGCCACAAGCCCAAGCGCGTGCAGGTTTAGCTCTATTTGTATCTAAGAAGG
AGTCAGTAGTGGCGGCGTGGTGAAGGAATGAGTATTGTTATCCTTGTCAGA
AATGTGAAGTTTCTCCAGCACTTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTTATTTGAAC
CGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACC
CGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCT
GGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGT
TTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGG



TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAC
AGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCACCCCTTGATCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGG
TGACTGCGTGACAACGAGAGGTGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTATGA
CTGGCTACCACGTGCTACATGCACGGTACAGACTGCAGACCGAGGTGACCT
ATCTCATAAACGTTCCCTCAGTTCGGATGTGGTAAGGCGTGTGCA

Zn3B 1492R:

ACTACCTCTTTATAGTTAATGGATGCAAACCTATAACCCTACGACTTCGGGTGG
TACAACTCTAGTGGTGTGACGGGGGGGGGGTACAAAGGTAGGGAACGTATT
CCCCGCGGCATGGTGATCCCCGATTACCAACCAATCCCGCTTCCTGGAAGG
GAATTGGAACCTAAAATCCGAACCTGAAAACGGGTTTATGAAAATAACTCCC
CCTCCCGGTCCTGGCACTTTTTGTACCGTCCATTGGAACACGTGTGTAACCC
AAGGCATAAGGGGCATGAAGAATTGACCTCCTCCCCCCTTCCTCCGGGT
GGCCCCGGGAGTCCCCTTAGAATGGCCAACTGAATGAAGGGAACATAAAAA
CAAGGGTTGGGCTCCTTGCGGGAATTAACCAACATCTCCCGAACCAACT
GAACAACACCATGGACCACCTGGCACTCTGGTCCCGAAAGAAAAGCCCTAT
CTCTAAGGTTGGCCGAAGAAGGCAAGAACTGGTAAGGGTCTTCCGGTTGCT
TCGGATTAAACCACATTGTCCAACGCTTGGGCGGGCCCCCGTCAAATTCTTT
GAGTTTCAGCCTTGCCGCCGTACTCCCCAAGGGGAGTGGTTAATGCGGTTA
CTTCAGGACTAAAAGGGGGAAACCCCCTAAACCTAAGACTCATCCGTTACC
GGGGGACTACCAAGGGTATCTATCCTGGTTGCTTCCCCAAGCTTTCCCGCCT
CGTGGTCAGTTACAGAACAGAAAGTCGCCTCGCCACTGGTGGTCCTCCATA
TCTCTACGCATTTACCGCTACCCATGGAAATCCACTTTCCTCCTTCTGCACT
TCAGTCTTCCAGTTTCCATGACCCTTCACCGTGAGCCGTGGGGCTTTCACCA
TCAGACTTAAGAAACCACTGCGCGCCGCTTTACGCCCATATCAGATACGCTG
CACTACGTATACGCGCTGCTGCACGTAGTAGCGTGCTTCTGTAGTACGTCAG
TGCAGCTATCACTAGCACTGTTCTCTACACGAGTTACGACGAGCCTCATCAT
CAGCGCATGCTCGTCGACTCGTCATTGCGAGATCCTACTGCTGCTCGTAGAT
CTGCCGTTTCAATCATGGCGATCCTTCAGTCGTACGATCGTGCTGGAGCGATA
TCCAAATGCTATGCACGGTCTCTAGCGTACCGACGCCATGA

Zn6 27F:

GGAAAAACCTCTTAGGGTTCAACTCATATACATGCAAGTCGAGCGAATGGAT
TAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCCATAGAACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG



應用底泥微生物同時去除地下水重金屬並生產奈米金屬

ATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCAC
TTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GATACACGGCCCAGACTCCTACGGAAGGGATACTATGGAATCTTCCGCTATG
GACGATAATCTGATGGATCGGGCCGCGTTGCTGACA

Zn6 1492R:

GGGGGAGGAGGGTTACGTTTCTTTTCGAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACC
CCAACGACTTCCGGTGTTACAAACTTCCCTGGGGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGGCCGGGAACCTTTTCCCCGCGGCATGGTGATCCGCGATTACTAACGA
ATCCCGCTTCCTGGACGGCAATTGCAGCCCCAAAATCCGGAATGAAAAAGGT
TTTTTTAAAATTGACTCCGCTCCCGGGCCTTGTCTGCCTTGTGCGAGCCAAT
GTTACATGGTGCGATTTCGAAGGCAATACACGGGTTGAGCACTGGGCTTCCA
CAACAACCTTTATCTGATTACCACTCCCCCTCCAATCCCCTAATTCCAATTTT
AGGTGAAGGCCTCTGATATATTGCGAAAGCTGGGAACTTTCTGGACCGGC
TTACCTGGAAATTACATCAAAACAATAAAGAATTAAACGCTGCCCTTCCTCC
CATGTAAAAATGCTGTCCCACCTCAGACCAGCCTATAAACCTCCACAACCTGG
AAATGCGATTTCCAATGACCATAATCACGGTGATACTACCTTATGAACTGGA
ACTTGGGCTGGAAAGAATGAATGACTTTCTTCTTAATTTCTTCGGAACGACT
CCCTATCAACCGTACCCTCCGACTAGCTAACTGTGTTGGGCTCATATGAAAC
GGTCGCCGAACGTCACGTGATTTCAACTGTCACGTTGCTATATCGTAATCATT
AAAAAATTAAAACCTACTCACCGTATAATCCAAATCATAGTCTTA