

私立東海大學化學工程暨材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

利用 *Chlorella vulgaris* 降低廢水化學需氧量(COD)及移除重金屬

Cr(VI)與固碳之研究

The study of chromium and chemical oxygen demand (COD) reduction
and carbon fixation by using *Chlorella vulgaris*

研究生：許志淵 撰

Graduate student : Chih-Yuan Hsu

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

中文摘要

隨著人類生活品質的提升，大家也開始注重與大自然的相處，除了溫室氣體排放外，由於工業區廢水排放常見重金屬含量偏高，尤其六價鉻水體污染為當今嚴重的環境問題，而含有鉻的產品若沒經過妥善回收處理，鉻汙染將遍及土壤及水中，對臺灣的環境造成嚴重傷害，其中 Cr(III) 是人體必需營養素，可幫助人體使用糖分、蛋白質及脂肪的必須營養素，且三價鉻造成的毒性影響也較六價鉻低許多，而高濃度的六價鉻會傷害鼻子及造成癌症，食入後也會造成貧血或腸胃的損傷。因此，利用 *Chlorella* 具有吸附廢水中重金屬的能力，探討微藻吸附 Cr(VI) 的效果。綜合實驗結果，已知微藻移除重金屬速率約在 2.50 ~ 3.33 mg /L · day，進而延伸探討微藻如何移除 Cr(VI)，發現綠藻內含有具抗氧化功能的谷胱甘肽 (GSH)，在微藻進行重金屬移除的過程中，谷胱甘肽 (GSH) 也可能少部分的使 Cr(VI) 轉變為 Cr(III)，且當微藻中谷胱甘肽 (GSH) 濃度越大，將可以還原越多的 Cr(VI)，但反應順序為微藻還原酵素皆反應完後，才會由抗氧化劑谷胱甘肽 (GSH) 反應，證實了微藻在移除 Cr(VI) 的過程中，不只是將 Cr(VI) 吸附還有少部分的 Cr(VI) 被綠藻還原酵素與抗氧化劑 GSH 還原成 Cr(III)。

此外，在臺灣，許多生活廢水和生產污水時常在未經過處理就直接排入河川中，使得含有高營養物質、磷、有機物等廢水直接汙染了河川，導致河川生態受到影響和破壞，負荷不了這麼多汙染的河川，也逐漸的變得混濁和惡臭及蚊蟲孳生。因此，利用 *Chlorella* 具有代謝有機物等高營養物質的能力與培養週期短且穩定等特性，探討利用批次 (Batch) 及連續式 (Continuous) 反應培養 *C. vulgaris* 並同時去除廢水中化學需氧量 (COD)。綜合實驗結果，在批次培養方面，以稀釋 50 % 的葡萄糖碳源發酵紅酵母後之廢水材料最適合作為微藻的生長環境，培養

10 天約可以降低廢水中 7000 mg/L 的化學需氧量，在連續式培養上，以水力停留時間 5 天最適合微藻生長以及菌體累積，培養 10 天後，一天約可以降低廢水中 10000 mg/L 的化學需氧量，找出最佳的培養條件後，進而探討放大反應體積與改變反應形式對於降低廢水中化學需氧量之效果，得到在批次培養下，放大為 5L 反應器與改變反應形式，淨化效果提升至 10 天降低廢水中化學需氧量 10000 mg/L，而連續式培養下，放大為 5L 反應器與改變反應形式，設定 HRT 5 天，淨化效果提升至 10 天後，每天降低廢水中化學需氧量 14000 mg/L，發現改變反應體積與反應形式可以提升降低廢水中化學需氧量的效果，也得到對於微藻降低水中化學需氧量以連續式反應為最佳的反應設置條件，整體系統可以維持微藻藻種濃度約 2.0 g/L，且具有更好的化學需氧量移除效果與廢水使用量。

探討完重金屬的移除與降低廢水化學需氧量之外，最後討論利用串聯培養並進行固碳實驗，本次研究將黏紅酵母菌 *Rhodotorula glutinis* 及小球藻 *Chlorella vulgaris* 之生物反應器相互串聯，利用 *R. glutinis* 在發酵過程中代謝碳源並釋出 CO₂，再將 CO₂ 供給 *C. vulgaris* 做為碳源使用。由此系統供給 CO₂ 濃度培養 *C. vulgaris* 得到藻體平均濃度為 1.51 g /L，故證實 *R. glutinis* 所釋出之 CO₂ 可用來培養 *C. vulgaris*。此外，*R. glutinis* 釋出之氣體，CO₂ 含量大約為 2.0 %，每一克的紅酵母菌體，每天可產出 0.142 kg CO₂；而經由微藻固碳反應後，*C. vulgaris* 釋出之 CO₂ 含量大約為 0.2 %，每一克的微藻藻體，每天可固定 1.08 kg CO₂ 生成綠藻細胞，故此串聯系統之微藻 *C. vulgaris* 可有效固定 *R. glutinis* 所釋出之 CO₂ 達 35.6 %，結果顯示此一串聯系統可有效利用好氧系統排放之二氧化碳，達到系統淨排放及循環共生之目的。

關鍵字：*Chlorella vulgaris*、生物吸附、重金屬六價鉻還原、GSH、廢水處理、化學需氧量、串聯培養系統

Abstract

With the improvement of human quality of life, environmental problems at the same time become the focus of global attention. Green house gas emission and heavy metals pollution has become a global issue of concern due to their higher toxicities. Especially, Cr(VI) is introduced in the environment mainly as a consequence of its industrial use and it has been causing serious environmental pollution due to its carcinogenicity.

In this study, the possible use of *Chlorella vulgaris* biomass as an alternative biosorbent for Cr (VI) removal was investigated. Therefore, the use of *C. vulgaris* has the ability to adsorb heavy metals in wastewater, and to explore the effect of microalgae adsorbing heavy metal Cr(VI). The results showed that microalgae can removal of Cr (VI). And then extend the discussion of microalgae how to remove heavy metals Cr (VI). It was found that glutathione (GSH) in *C. vulgaris* could decrease the heavy metal Cr(VI) into Cr(III) in the process of heavy metal removal in microalgae, and the greater the concentration of glutathione (GSH), the greater the reduction of heavy metals Cr (VI). But the reaction sequence is microalgae reduction enzyme exhausted, the antioxidant glutathione will be the reaction. It is confirmed that Cr (VI) is not only adsorbed by algae, but also a small part of Cr (VI) is reduced to Cr(III) by reduction enzyme and antioxidant during the removal of heavy metal Cr (VI) by microalgae.

Additionally In Taiwan, many domestic sewage and production wastewater are often discharged into rivers, untreated, high levels of nutrition, phosphorus, organic

matter and other waste water directly pollute the river, causing the river ecology to be affected and damaged, The river suffered from severe pollutions has gradually become muddy and foul, and then lots of mosquitos and insects have bred in it. Therefore, use of *Chlorella* has the ability to metabolize organic matter and other high nutrient capacity and it's culture cycle is short and stable, to explore the use of batch and continuous reaction to culture *C.vulgaris* and remove chemical wastewater (COD). According to the comprehensive experimental results, 50% of glucose carbon source's *R. glutinis* fermentation wastewater is the most suitable microalgae growth environment. The chemical oxygen demand can be reduced about 10000 mg/L day by batch. In the continuous culture study, the 5-days hydraulic retention time is most suitable for microalgae growth and cell accumulation, culture for 10 days can reduce wastewater chemical oxygen demand 7000 mg/L in 10 days .The next discussion is best condition of scale up 5 times of culture's reaction volume and changes the reaction form. In the batch culture, the chemical oxygen demand in the 50% wastewater can be reduced to 10000 mg /L of COD in 10 days, and the chemical oxygen demand in the wastewater can be reduced by about 14000 mg/L in the HRT 5 days. It is found that the scale up reaction volume and change the reaction form can increase the degree of removing chemical oxygen demand in the wastewater, and the best reaction conditions for the reduction of chemical oxygen demand in the continuous reaction were obtained. The whole system can maintain algal concentration of about 2.0 g/L, with good chemical oxygen demand removal effect.

Furthermore, in this sustainable cultivation system of aerobic yeast *-Rhodotorula glutinis* and photosynthetic microalgae *-Chlorella vulgaris*, a yeast and a microalgae were grown in two separate reactors connected by their gas transportation. The

aerobic yeast provides CO₂ for the growth of microalgae via photosynthesis process as both carrying out the production of lipids, and efficient CO₂ fixation by *Chlorella vulgaris*. Moreover the aerobic yeast *R. glutinis* provides 0.142 kg CO₂ / Day · g Biomass and *C. vulgaris* can utilize 1.08 kg CO₂/ Day · g Biomass. Microalgae can utilize CO₂ of emission gas from the yeast fermenter efficiently up to 35.6 %. It was demonstrated that this sustainable cultivation system of the yeast *Rhodotorula glutinis* and the autotrophic growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* was successful in the reduction of CO₂ emission.

Keywords : *Chlorella vulgaris* 、 biosorption 、 chromium (VI) 、 GSH 、 waste water treatment 、 chemical oxygen demand 、 sustainable cultivation system 、 carbon fixation

誌謝

誠摯的感謝指導教授 顏宏偉老師，自從我進入實驗室開始就對我細心教導與用心培養我的專業能力和邏輯思考，在我思考得過程中，總是透過引導來啟發以及訓練我獨立思考解決問題的能力，使我在東海大學求學的過程中收穫頗豐，在此謹致上由衷的謝意。同時感謝感謝 成大化工所 張嘉修教授、元智生技所 魏毓宏教授、元智化材所 藍祺偉教授，於口試期間給予寶貴的建議及指導，使得本論文更臻充實，在此獻上最誠摯的謝意。

研究所求學生涯中，感謝學姐小孟、于婷、品妘；學長國智、老翰、子翔、裕仁、綸綸在實驗上的指導與照顧，感謝惟翔、晉安、猩猩、威仁、適任的相互扶持與勉勵，以及學弟妹大熊、悠軫在實驗上的幫忙與協助，感謝有你們使我的求學生涯更加精采。

當然不能忘記我的家人，父母親、阿公、老妹以及淨雯和阿豆，感謝在我求學的過程中給我的鼓勵和依靠，是我最重要的精神糧食，讓我在可以在求學階段無後顧之憂的進行研究，因為有你們的默默付出我才能順利完成學業，謝謝你們！

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 微藻.....	2
2.1.1 微藻簡介.....	2
2.1.2 小球藻簡介.....	3
2.1.3 微藻培養環境因子.....	4
2.1.4 微藻培養方式.....	8
2.2 環境中六價鉻之特性及汙染.....	9
2.2.1 鉻物化特性.....	9
2.2.2 環境中六價鉻汙染來源.....	9
2.2.3 六價鉻之危害.....	10
2.2.4 法令規定.....	10
2.3 利用微藻移除重金屬.....	11
2.3.1 微藻移除重金屬簡介.....	11
2.3.2 微藻移除重金屬機制.....	13

2.4 利用微藻移除廢水有機物.....	16
2.4.1 汙水處理概論.....	16
2.4.2 微藻移除廢水簡介.....	18
2.4.3 微藻淨化廢水機制與優點.....	19
2.5 生物反應器串聯培養系統.....	21
2.5.1 生物反應器串聯培養系統簡介.....	21
2.5.2 綠藻固碳應用簡介.....	22
第三實 驗材料與方法.....	23
3.1 實驗材料.....	23
3.1.1 實驗藻種及廢水樣品.....	23
3.2 實驗儀器.....	27
3.3 分析方法.....	29
3.3.1 光照強度測定方法.....	29
3.3.2 藻體濃度測量方法（吸光值測量藻體濃度）.....	29
3.3.3 葡萄糖濃度分析方法.....	29
3.3.4 六價鉻濃度分析方法.....	30
3.3.5 鉻價數轉換分析方法（XANES）.....	30
3.3.6 化學需氧量(COD)測量方式.....	31

3.3.7 谷胱甘肽(GSH)測量方式.....	31
3.3.8 綠藻酵素測量方式.....	32
3.3.9 二氧化碳測量方式.....	32
3.4 實驗方法.....	33
3.4.1 藻種保存及活化.....	33
3.4.2 菌種保存.....	33
3.4.3 接菌.....	33
3.4.4 培養基組成.....	34
3.4.4.1 藻種培養基組成.....	34
3.5 實驗架構.....	35
3.6 實驗培養條件.....	36
3.6.1 批次系統與連續式系統之利用紅酵母上清液對小球藻培養.....	36
3.6.1.1 500 ml <i>C. vulgaris</i> 光合反應器批次發酵程序.....	36
3.6.1.3 5 LC. <i>vulgaris</i> 批次系統與連續式系統光合反應器程序.....	37
3.6.2 微藻 <i>C. vulgaris</i> 移除 Cr(VI).....	38
3.6.2.1 微藻 <i>C. vulgaris</i> 還原酵素移除 Cr(VI)培養程序.....	38
3.6.2.2 微藻 <i>C. vulgaris</i> 谷胱甘肽(GSH)移除 Cr(VI)培養程序(時間)	39
3.6.2.3 微藻 <i>C. vulgaris</i> 谷胱甘肽(GSH)移除 Cr(VI)培養程序(濃度)	39

3.6.3 循環共生系統黏紅酵母菌與小球藻之串聯培養.....	40
3.6.3.1 串聯 50 L <i>R. glutinis</i> 發酵槽及 20 L <i>C. vulgaris</i> 光合反應器重複饋料批次 (Repeated Fed-batch) 發酵程序.....	40
3.7 實驗裝置圖.....	42
3.7.1 微藻 <i>C. vulgaris</i> 移除 Cr(VI).....	42
3.7.2 微藻批次反應培養.....	43
3.7.3 微藻連續式反應培養.....	44
3.7.4 連續式及批次 5 L 放大反應與改變反應形式培養.....	45
3.7.5 20.0 氣升式反應器與 50 L 黏紅酵母發酵槽反應器之串聯設備 ...	46
第四章 結果與討論.....	48
4.1 小球藻移除 Cr(VI)探討.....	48
4.1.1 探討小球藻 <i>C. vulgaris</i> 在利用綠藻酵素下進行生物機制移除 Cr(VI)。	49
4.1.2 探討小球藻 <i>C. vulgaris</i> 在利用綠藻藻體內谷胱甘肽(GSH)下進行非生物機制移除 Cr(VI)。	51
4.2 微藻 <i>C. vulgaris</i> 降低廢水中化學需氧量(COD).....	57
4.2.1 測試將綠藻培養於含有粗乾油廢水之實驗效果.....	58
4.2.2 測試將綠藻培養於不含粗乾油廢水之實驗效果.....	60
4.2.3 利用批式反應培養綠藻並去除廢水中化學需氧量探討.....	62

4.2.4 利用連續式反應培養綠藻並去除廢水中化學需氧量探討.....	65
4.3 串聯培養實驗.....	70
4.3.1 循環共生系統黏紅酵母菌與小球藻之串聯培養.....	70
4.3.2 串聯 50 L <i>R. glutinis</i> 發酵槽及 20 L <i>C. vulgaris</i> 光合反應器重複饋料 批次 (Repeated Fed-batch) 發酵程序.....	70
第五章 結論與未來展望.....	73
5.1 結論.....	73
5.2 未來展望.....	75
參考文獻.....	76
附錄.....	81
作者簡歷.....	85

圖目錄

圖 2-1 小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)	3
圖 2-2 光合作用效率與光照強度關係圖	5
圖 2-3 溶解無機碳比例與酸鹼值關係圖	7
圖 2-4 微藻吸附重金屬機制	15
圖 2-5 微藻和細菌利用工業廢水機制	19
圖 3-1 小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 及紅酵母上清液	23
圖 3-2 小球藻藻種培養及移除 Cr(VI)實驗之設備簡圖	42
圖 3-3 小球藻藻種培養及移除 Cr(VI)實驗裝置圖	42
圖 3-4 小球藻 500 ml 批次反應器	43
圖 3-5 小球藻 1L 連續式反應器	44
圖 3-6 小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 5L 連續式及批次反應器	45
圖 3-7 20.0 氣升式反應器	46
圖 3-8 串聯培養設備圖	47
圖 4-1 小球藻還原酵素進行生物機制移除 Cr(VI)	50
圖 4-2 探討藻液中會影響 Cr(VI)之元素	52
圖 4-3 利用谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)莫耳數 1:1 反應變化.....	53
圖 4-4 不同谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)濃度比反應變化.....	55

圖 4-5 不同谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)濃度比 pH 變化.....	55
圖 4-6 綠藻酵素和谷胱甘肽(GSH)反應 Cr(VI).....	56
圖 4-7 探討 <i>C. vulgaris</i> 利用含粗乾油廢液作為培養基之藻體濃度變化	59
圖 4-8 探討 <i>C. vulgaris</i> 利用含粗乾油廢液作為培養基之 pH 值變化.....	59
圖 4-9 探討 <i>C. vulgaris</i> 利用葡萄糖碳源之紅酵母廢液之藻體濃度變化	61
圖 4-10 探討 <i>C. vulgaris</i> 利用葡萄糖碳源之紅酵母廢液作為培養基之 pH 變化..	61
圖 4-11 500 ml 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度	63
圖 4-12 5 L 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度	63
圖 4-13 1L 光合反應器以不同水力停留時間 (HRT 10、8、5 及 3 天) 連續式培養 <i>C. vulgaris</i> 之藻體濃度與 pH 影響	66
圖 4-14 1L 光合反應器以水力停留時間 HRT 5 天連續式培養 <i>C. vulgaris</i> 之藻體濃度與化學需氧量(COD)實驗	67
圖 4-15 5L 光合反應器以水力停留時間 HRT 5 天連續式培養 <i>C. vulgaris</i> 之藻體濃度與化學需氧量(COD)實驗	68
圖 4-16 串聯培養實驗中，20L 綠藻光合反應器培養情形實驗.....	71
圖 4-17 串聯培養實驗中，微藻與紅酵母之生長情形與二氧化碳濃度趨勢.....	72

表目錄

表 2-1 使用不同微藻移除 Cr(VI)	12
表 2-2 常見的污水處理法	17
表 2.3 使用微藻移除不同廢水 COD 之去除率	20
表 2.4 不同藻類之固碳效果比較.....	22
表 3-1 微藻所使用之藥品清單	24
表 3-2 黏紅酵母菌所使用之藥品清單	26
表 3-3 實驗使用之儀器設備清單	27
表 3-4 Basal 培養基	34
表 4-1 探討谷胱甘肽(GSH)移除 Cr(VI)濃度與速率比.....	54
表 4-2 5L 光合反應器以連續式、批式、放大反應培養 <i>C. vulgaris</i> 之實驗數據 .	69
表 4-3 串聯 50 L <i>R. glutinis</i> 發酵槽及 20 L <i>C. vulgaris</i> 光合反應器整理	72

第一章 緒論

(一)

台灣工業區為數眾多的中小企業中，電鍍技術與半導體業一直是台灣傳統產業與科技業的重要製程，隨著人類生活水平提高及工業發達，對於鉻金屬的使用需求日益增加，相對鉻帶給環境之汙染也隨其用途增加而加劇。其中含有鉻的產品在被生產、加工、使用甚至拋棄後，其所釋放的鉻可在空氣、土壤及水中發現，而鉻經由人體吸收後，三價的鉻是人體必需的微量元素，但六價鉻化合物對人體有害，更易為人體吸收而且在體內累積而構成致癌物質，進而引起細胞的突變和癌變。目前應用微藻去除重金屬已被廣泛報導，因此本實驗將利用微藻，針對去除重金屬六價鉻進行研究，然而，微藻將水體中之重金屬還原，在文獻上研究論證案例並不多，故利用微藻 *Chlorella vulgaris* 進行重金屬還原之可能性探討。

(二)

近年來環保意識提高，政府對於工廠廢水的排放也逐漸重視，不僅會不定期的對於河川進行採樣，如果查到汙染源也會對該工廠進行開罰，也使得每一間工廠都會有廢水處理的動作，工廠的廢棄物處理裡有很多，其中綠藻也是最近用於廢水處理討論的重點之一，有鑑於此，除了在進行微藻去除重金屬，也可以利用綠藻降低水中汙染物的特性來進行探討，因為綠藻擁有很強的吸收能力，步驟為將附有經濟價值的紅酵母利用完後，在收集其廢液做為綠藻降低汙染物的水源並加入綠藻中，目的為探討水中化學需氧量（COD）的下降，並探討紅酵母廢液剩餘的營養源對綠藻生長(Biomass)的影響。

第二章 文獻回顧

2.1 微藻

2.1.1 微藻簡介

藻類屬於真核微生物的一種，藉由光、水和二氧化碳轉化成藻類生物質量且釋放出氧氣。根據化石遺跡的推斷，微藻的出現已經在地球超過三十五億年的時間，是存活在地球上最為古老的生命形式的一體，不論是湖泊、海洋、冰河、河流或是高達 55 °C 的溫泉均可以發現它們的蹤跡。微藻是一種原始且簡單的植物，大多屬於真核微生物，它們缺乏根、莖、葉，但卻擁有細胞壁與葉綠素，而葉綠素則是作為最主要的光合色素，它的細胞大小介於數微米到數百微米之間，一般要在光學顯微鏡下才能被觀察。

目前現今已知的藻類約為兩萬三千萬多種，而其中微小種類族群約占 70%，表示微藻包括的種類相當廣泛。依照其形態、色素、生長方式等分類，可以分為藍綠藻門、金藻門、綠藻門、紅藻門、褐藻門、甲藻門、輪藻門、裸藻門、隱藻門等植物門。近幾年來，藻類因其固碳作用及生質能源的生產大受矚目，在未來極具發展潛力。

18 世紀開始，藻類的應用逐漸多元廣泛，包括食品、飼料、添加劑、化妝品與色素等。以藻類生技為主的產業，每年約產出千萬噸的藻類作為各種商業化應用，依藻類生技的應用除了上述的幾點還增加了污染防治的部分，可用於廢水處理，降低污水中的氮、磷及有機物含量，並可移出工業廢水中的有毒重金屬。

2.1.2 小球藻簡介

Chlorella 為綠球藻或稱為小球藻是一種單細胞微藻其細胞大小約為 2~8 μm ，並以單生或聚集方式生長。小球藻被歸類於植物界中之綠藻門，綠藻門具有植物的葉綠體和細胞壁兩大特徵。

由於小球藻具有生長快速、高濃度 CO_2 容忍度、低營養源需求和高產率等優勢。*Chlorella vulgaris* EXP-06 具有生長快速之特性。海水中 *Chlorella* 亦具有高效率的固碳能力，在通氣濃度為 15 % CO_2 之條件下，最佳之固碳能力為 $17.2 \text{ g L}^{-1}\text{day}^{-1}$ (Chiu et al., 2008)。綜合以上敘述，小球藻不僅可生產油脂且具有高油脂含量還可固定 CO_2 降低溫室氣體，因此小球藻適合作為實驗研究之藻種。

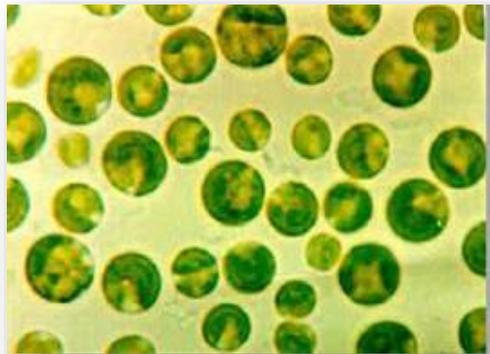


圖 2-1 小球藻 (*Chlorella vulgaris*)

2.1.3 微藻培養環境因子

微藻培養過程中，外在的環境因子或多或少會影響微藻的生長速率、脂肪酸組成、油脂累積與含量、菌體生長等，環境因子的過量或缺乏都會限制藻類生長，而藻類對這些因子的最高和最低之間可容忍範圍就是“忍受極限”（Tolerance limit）。其中最為主要影響的因子包括有光、二氧化碳、溫度、鹽度、pH 值。

(1) 光

由於絕大部份的藻類都具有光合自營的特性，但其藻體含有的色素差異與含量的不同，所以可行光合作用的光波長也不相同。藻類無法完全吸收全波長（380-750 nm）的光來進行光合作用，只能吸收相當於可見光的波長（400-750 nm）的光進行光合作用，此波長範圍的光就稱為光合作用有效輻射（photosynthetically active radiation, PAR）。所以光照為其生長的重要限制因子，因此了解光的基本性質在培養藻類上是有其必要性的（Masojidek et al., 2004）。

i. 光強度

微藻細胞內含有許多輔助色素，所以能夠有效地吸收光能去進行光合作用，但其光強度對光合作用的效率也會有一定的影響，而微藻的光合作用速率與光強度變化的關係，可藉由光反應曲線圖（Photosynthesis-Light response curve）得知。如圖2-2所示，光強度對微藻生長速率的研究中指出，若光強度範圍在30-80 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時，光作用效率隨著光強度的增加呈現線性增加（Sandnes, 2005），此為光限制區（Light limitation）。當光強度持續增加至某一程度，其光合作用效率會由線性增加變為平緩狀態，此為光飽和區（Light saturation）。若達光飽和區後還持續增加光強度，則過強的光能會破壞光反應中的PS II (Photosystem II)，光合作用效率便會開始有下降的現象，此為光抑制區（Light inhibition）。

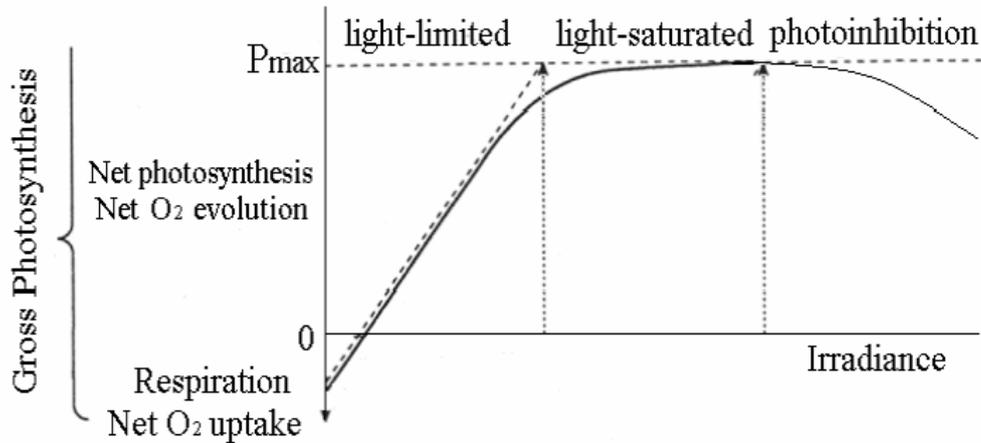


圖 2-2 光合作用效率與光照強度關係圖 (Masojidek et al., 2004)

ii. 光遮蔽

在微藻培養系統中，光線所通過的路徑稱為光徑 (Light-path)。據文獻指出，光照強度會隨藻類濃度和光徑長度增加而以指數關係逐漸衰減 (Suh et al., 2001)。當培養系統的光徑過長時，會使得光線無法完全穿透藻液，造成部分區域完全沒有光線照射，或是隨著藻液濃度的提升，藻類彼此間會相互遮蔽光線 (Mutual shading)，使光線較難穿透藻液，只有部分區域光線照射的到，因此藻類培養系統可分為兩個區域，一個是光線可達到的區域，稱之為光區，另一個是光線無法達到的區域，稱之為暗區，在此區域的藻液幾乎無法照射到光，故沒有光合作用的發生 (Amos Richmond, 2004)。

因此在反應器設計當中，如何有效的利用光徑長度與體積大小就變得十分重要；在適當的光徑長度有最高的產量，代表在此光徑長度下，藻類具有最佳的光使用效率，而此光徑長度就成為最適光徑 (optimallight-path) (Goksan, 2003)。

(2) 碳源

藻類對於碳源供給方式可分為自營性、異營性、混營性；所謂自營性是利用光能以無機碳行光合作用而生長，而大氣中的二氧化碳為最重要的基本碳源；異營性則是利用有機碳做為碳源生長，如：葡萄糖、甘油等有機碳；混營性則是白天行光合作用，晚上利用有機碳做為碳源培養。微藻體內的碳含量約為 40~50%，所以生成 1 公斤的微藻細胞，需要 1.5~2.0 公斤的二氧化碳，因此碳元素的有無對於微藻生長有很大的影響。

微藻本身能利用溶於水中的無機碳源，如 CO_3^- 、 HCO_3^- 、 H_2CO_3 、 CO_2 等進行生長，普遍最常利用的型態為 CO_2 ，在自然環境裡，微藻攝取的碳源是相當足夠的，但在人工培養條件下，往往因為微藻細胞濃度過高，光照強度大，導致光合作用旺盛，造成 CO_2 不足，因此在培養系統中，通常會通入 CO_2 和空氣的混合氣體以提供藻類足夠的碳源。

(3) 溫度

每種藻類都有適合其生長的溫度，一般來說大約在 15~30 °C。依造適合溫度的不同可分為，低溫種、中溫種、高溫種，在不同溫度培養條件下，其粗脂肪含量和生長速率都有所不同。

(4) pH 值

在培養微藻過程中，二氧化碳的消耗是造成培養液酸鹼值改變的主要因素。溶解於水中之二氧化碳會與碳酸鹽以及重碳酸鹽達成平衡，平衡式如下：



當水中 pH 值越低時，會往 CO_2 的方向進行，pH 值越高時，往 CO_3^{2-} 方向進行，如圖 2-3 所示，而酸根 (CO_3^{2-}) 是藻類無法利用的 (Philips, 1997)。

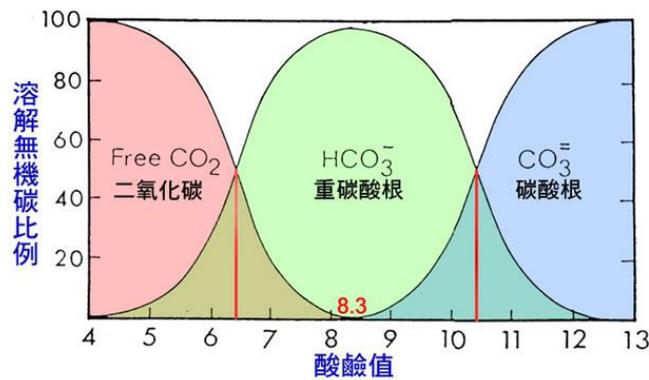


圖 2-3 溶解無機碳比例與酸鹼值關係圖

從上述的結論得知，二氧化碳的形態不同，會有藻類能否吸收利用的問題產生，進而影響藻類生長。隨著藻類吸收培養液中的二氧化碳，並同時代謝出氫氧根離子，使得培養系統內的酸鹼質逐漸變鹼，故在培養時須留意二氧化碳與酸鹼值的變化。

(5) 鹽度

培養環境的鹽度高低會改變滲透壓，也會影響藻類生長及粗脂肪含量。文獻指出，當鹽度增加時，*Isochrysis sp.*和 *N. oculata* 的油脂含量上升，但 *Nitzschia* 則相反，而且 *Nitzschia* 中 EPA 的含量也隨鹽度上升而下降 (Ben-amotz, 1985)。亦有研究報告指出，探討鹽度對 *Chlorella minutissima* 影響，在鹽度範圍 15~35 % 下結果顯示，當鹽度 35% 時，其 PUFA 含量及 EPA 產量最高。

2.1.4 微藻培養方式

藻類的生長方式依光源有無與不同碳源可分為三種方式：光自營培養、異營培養、混營培養。

(1) 光自營培養 (Photoautotrophy)

光自營培養是利用無機碳（二氧化碳為主）做為唯一碳源，並在光照環境中行光合作用；由於陽光與二氧化碳皆可從大自然環境中取得，故成本較低，幾乎所有藻類皆可行光自營生長，且光為提供能量的來源，因此光合反應器需要較大的光照面積 (Terry and Raymond, 1985)，目前大規模培養方式主要以光自營培養為主。

(2) 異營培養 (Heterotrophy)

異營培養是可以在不照光的環境下，利用有機碳(葡萄糖、甘油)作為建構細胞的主要碳源，提供生長所需的能量。異營培養較容易受到汙染，所以皆培養於密閉式反應器中，大多為發酵槽較為常見。且由於異營培養因添加有機碳作為碳源，造成成本上升，故通常只用於生產高單位價值產品，如 EPA 或 DHA 等多元不飽和脂肪酸 (Chen, 1996)。

(3) 混營培養 (Mixotrophy)

混營培養方式為光自營與異營培養方式的結合。即微藻可利用有機碳源並同時行光合作用，此時碳源與光照皆為影響微藻生長之限制因子。有研究結果顯示 (Laliberte and Delanoue, 1993)，不論是生長速率、油脂含量、葉綠素、碳水化合物及蛋白質，混營生長源皆比異營生長佳，而異營生長又比自營生長佳。

2.2 環境中六價鉻之特性及汙染

2.2.1 鉻物化特性

在 1790 年由 Vauquelin 學者發現，鉻元素 (Chromium, Cr)，屬於 VIB 族的過度元素，分子量 51.996，熔點 1930°C，沸點 2642°C。鉻或鉻化物都具高溶點、高硬度、高耐磨及耐腐蝕等特性，鉻具有廣泛的氧化型態，一般以三價鉻與六價鉻為主要穩定型態存在於自然界中 (McGrath et al., 1990; Shewry and Peterson, 1976)。

2.2.2 環境中六價鉻汙染來源

近年來，台灣工業區廢水排放常見重金屬含量偏高，在為數眾多的中小企業中，電鍍業一直是中小企業重要的一部份。在電鍍的過程中，六價鉻是相當常見的電鍍原料之一。六價鉻酸溶於水、水溶液可導電、可將六價鉻電鍍至物體表面以產生銀白光亮之金屬光澤、或增加表面硬度等的特質，使得六價鉻的使用量相當高。然而其高強度的腐蝕性，使許多工廠對於環境汙染的防範疲於奔命。六價鉻具有毒性，存在於土壤與地下水環境中將對生物體與人體健康產生危害 (TASGEP Newsletter, 2007)。

在國際上，六價鉻也被廣泛運用在製備合金，鍍鉻，皮革鞣制，生產耐火材料，染料工業，工業用水冷卻，紙漿生產，石油煉製，木材防腐和核動力等工業中 (McGrath et al., 1990; Stern, 1982)。

2.2.3 六價鉻之危害

在環境中，三價鉻是人和動物所必需的一種微量元素，而且對植物生長有刺激作用（Codd et al., 2001；Francisco et al., 2010）。鉻可經空氣、水和食物進入人體，人體胃腸道對三價鉻的吸收率(約 0.5 %)較六價鉻低。一般六價鉻的毒性比三價鉻約高 100 倍，並且六價鉻較具生物活性，容易被人體吸收。

因此常有許多研究有關六價鉻對人體急慢毒性效應，急毒性效應方面，會造成心血管休克、腎、肝、神經系統以及造血器官等毒性；慢毒性效應方面，將導致氣管、支氣管炎的症狀。在胃內酸性條件下，六價鉻易還原為三價鉻，長期經消化道攝入大量的鉻，可累積在體內。若以六價鉻的形式滲入細胞，然後在細胞內還原為三價鉻而構成致癌物質，進而引起細胞的突變和癌變。鉻在生產環境中會引起癌症已被證實，因此於美國環保署 USEPA 將六價鉻歸為 Group A 代表有充足證據對人類具致癌性（He and Chen, 2014）。

2.2.4 法令規定

美國職業安全及健康管理局（Occupational Safety and Health Administration, OSHA）規定於在一天八小時，一週四十小時的工作環境中，平均暴露不可超過的濃度，六價鉻 0.005 mg/m^3 ，三價鉻 0.5 mg/m^3 及鉻 1 mg/m^3 。台灣勞工作業環境空氣中有害物容許濃度標準規定，在工作場所中八小時，鉻的日時量平均容許濃度(PEL-TWA)為 1 mg/m^3 ，六價鉻 0.05 mg/m^3 ，三價鉻 0.5 mg/m^3 （ATSDR, 2008）。此外，台灣事業、污水下水道系統及建築物污水處理設施之放流水標準，六價鉻為 0.5 mg/L （行政院環保衛生署-放流水標準, 2014）。

2.3 利用微藻移除重金屬

2.3.1 微藻移除重金屬簡介

微生物吸附重金屬的現象，在二十世紀七零年代，核電廠排放含放射性元素（為重金屬之一）的廢水當中，意外發現有幾種微藻在其中，故微藻在含有重金屬且高毒性的環境中亦能生長，在這之後也有許多研究證明，如表 2-1。利用微藻去除水體中重金屬之技術，具有可行性且符合成本效益。傳統吸附重金屬方法有化學還原法、離子交換、沉澱、膜分離等吸附技術相比，利用微藻吸附去除重金屬，運作成本低，可高效率的吸附低濃度的有害重金屬污染，生物法利用藻類處理廢水具有效果好、投資少及運作費用低、易於管理和操作、不產生二次污染等優點，既能保護環境，又能節約能源、資源，具有良好的生態效益和社會經濟效益（Sheng et al., 2007）。吸附用的藻類種類豐富，不論是大型海藻，還是淡水微藻，都可為吸附研究和應用提供充足原材料，應用處理經濟、方便，尤其適合處理較低濃度(100 mg/L 以下) 的重金屬廢水。

表 2-1 使用不同微藻移除重金屬 Cr(VI)

Metal	Organism	pH	Metal uptake(mg/g)	Reference
Cr(VI)	<i>Spirulina sp.</i>		306	Doshi et al., 2008
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	18.2	Arıç et al., 2005
	<i>Chlorella vulgaris</i>	4	23.6	Aksu and Kutsal, 1990
	<i>Dunaliella sp.</i>	2	58.3	Dönmez and Aksu, 2002
	<i>Oscillatoria tenuis</i>	8.2	7.35	Dwivedi et al., 2010
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	2	15.6	Dönmez et al., 1999
	<i>Synechocystis spp.</i>	2	19.2	Dönmez et al., 1999
	<i>Nostoc muscorum</i>	3	22.92	Gupta and Rastogi, 2008

2.3.2 微藻移除重金屬機制

藻類很強的重金屬吸附能力和藻類細胞壁的結構、生理特點有關。藻類細胞壁的存在及其結構組成對重金屬離子吸附有著重要影響。常見的用於重金屬離子吸附的藻類有綠藻門，褐藻門和紅藻門；這些藻的細胞壁結構均以纖維素微纖維為骨架，外面包圍無定形的基質（Davis et al., 2003）。藻類細胞壁分層，外層主要由纖維素、果膠質、藻酸鈉岩藻多糖和聚半乳糖硫酸酯等多層微纖維組成的多孔結構，內層主要成分是纖維素，且表面附多皺摺，使吸附表面積更大（Davis et al., 2003）。

此外，細胞外壁還富含藻細胞釋放的以多肽、多糖（藻酸鹽、鹽藻衣聚糖等）為主的胞外產物。這些多聚複合體給藻類提供了大量可以與金屬離子結合的官能團如羧基、氨基、醛基、羥基、巰基、磷酰基及羰基等（Gupta and Rastogi, 2008；Sheng et al., 2004），如圖 2-4 這些官能基可以與金屬離子進行離子交換、螯合、靜電吸附作用，進而將重金屬離子去除。

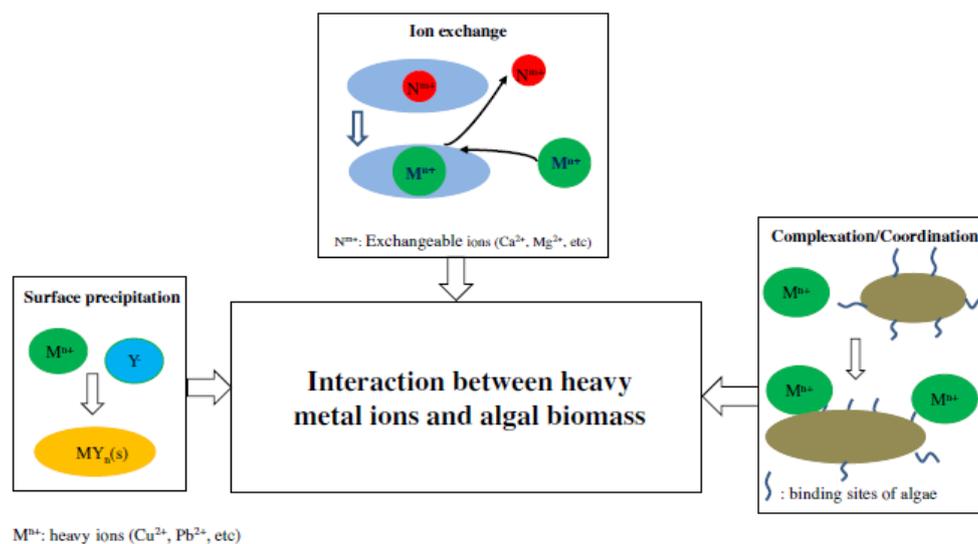


圖 2-4 微藻吸附重金屬機制（Sud et al., 2008）

在這些官能基中，羥基、磷酸根、氨基、羧基、巰基由於可以提供電子而使細胞壁表面呈電負性，進而吸附金屬陽離子。然而，官能基的種類雖多，卻並不是所有的官能基都會參與重金屬離子的吸附，在所有吸附重金屬離子的官能基中，羧基具有最關鍵的地位，其次是硫酸根與氨基，褐藻之所以具有比其他藻類更高的重金屬離子吸附性能，就是基於其羧基和硫酸根的含量非常高所致，除此之外，細胞壁中的多糖與蛋白質能提供的吸附點最多。至於影響藻類吸附重金屬離子的因素則包含金屬離子的種類、藻類組成以及環境條件（pH 值、離子強度、競爭離子）等。

除了細胞壁的特殊結構外，藻類通常還會向周圍水體中排泄或分泌大量由醣類及果膠質等大分子物質所組成的胞外產物，而這些胞外產物與細胞壁內的有機物一樣，也能螯合重金屬離子。各種官能團吸附重金屬的過程，及螯合過程去除重金屬程序，可由光譜技術研究，如 FT-IR、XPS 和 XANES (Chen and Yang, 2005；Yang et al., 2011)。

其中生物吸附法是利用微生物將水中重金屬六價鉻吸附至微生物，來降低水中的含量，但此方法需進一步以化學方法將六價鉻還原成三價鉻 (Bai et al., 2003；Lee et al., 2000；Loukidou et al., 2004；Srinath et al., 2004)，而生物還原法是利用微生物的還原酵素作用，可直接將水中六價鉻含量降低，且也具有較高的經濟效益，文獻指出，微生物具備去除重金屬的能力，包括細菌，微藻 (Park et al., 2004；Gupta and Rastogi, 2009) 和真菌 (Bai and Abraham, 2001；Shugaba et al., 2012)。微生物利用各種作用使六價鉻還原三價鉻進行生物轉換 (biotransformation) (Shugaba et al., 2012；Fukuda et al., 2008；Cárdenas-González and Acosta Rodríguez, 2010)，如酵素催化作用，功能蛋白的電子傳遞等；而生物轉化的途徑也分為直接還原 (Lee et al., 2000；Valls et al., 2000)、間接還原及還原過程中電子及碳源

(Acevedo-Aguilar et al., 2006 ; Morales-Barrera and Cristiani-Urbina, 2008)。

此外，微藻具還原六價鉻的能力已在文獻中被證實，微藻還原六價鉻機制，首先行生物吸附至藻體隨後進行生物還原反應。其六價鉻還原機制順序為：(1) 微藻在酸性環境下生物吸附六價鉻：質子(protons)被微藻藻體上的氨基所吸附，隨後六價鉻離子吸附至質子化點 (protonated sites) 上；(2)六價鉻生物還原為三價鉻：吸附至微藻表面的六價鉻被藻體上的還原酵素（例如：多醣類或其他還原有機物）還原；(3)釋放出三價鉻：從微藻藻體釋放出部份還原之三價鉻 (Han et al., 2007)。因此，若將微藻應用於還原毒性高之重金屬，既能保護環境又能節約能源、資源，同時具有良好的生態效益和社會經濟效益。

2.4 利用微藻移除廢水有機物

2.4.1 污水處理概論

污水處理是處理水污染的重要過程。含有各種污染物的水可區分成廢水和污水兩種，凡是工廠在製造、操作、資源開發過程或作業環境所產生含有污染物的水，便是工廠的「廢水」。所謂「污水」乃是指工廠外所產生的，包含污染物的水(民生、都市、家庭污水)。常見的污水處理為採用物理、化學及生物的方法，主要對生活污水以及工業廢水進行處理以分離水中的固體污染物並降低水中的有機污染物和富營養物（主要為氮、磷化合物），使之達到政府訂頒放流水標準始於排放或回收利用，以減輕水域的污染，並達成水資源的永續利用。

污水處理通常包括三個階段，稱為一級，二級和三級處理。以下為處理級別。

- 一級處理：將污水中的固體垃圾、油、沙、硬粒以及其他可沉澱的物質清除。整個過程純粹為機械運作。
 - 過濾→沉降→羽化
- 二級處理：將污水中的有機化合物分解為無機物。
 - 滴濾池：水經過生物薄膜，分解水中的有機物
 - 曝氣：水會加入大量氧氣，幫助水中的細菌和真菌進行有氧分解。
 - 消毒：加入氯氣或臭氧，或經紫外光照射。
- 三級處理
 - 沙濾
 - 經過活性碳，化解毒素。
 - 利用微藻生物清除重金屬。

	應用	BOD 去除率(%)	懸浮物 去除率(%)	優點	缺點
物理法	攔汙柵 沉澱池 汙除池 過濾池	0~30%	20~70%	簡單 方便 安全	專一性差
化學法	消毒 化學沉降 氧化還原 離子交換	30~75%	70~80%	快速 專一性佳 效果好	昂貴
生物法	懸浮生長 接觸生長 厭氧系統	70~95%	80~90%	專一性佳 效果好 零汙染	緩慢

表 2-2 常見的污水處理法

常見水汙染防治相關法規如下：

- 水汙染防治法
- 放流水標準
- 土壤處理法
- 下水道法
- 海洋汙染防治法

2.4.2 微藻移除廢水簡介

微藻特殊的多孔性潛力引起了越來越多的關注，將微藻培養在廢水或污水內已被視為是利用微藻的理想環境。利用各種廢水來生產藻類生物量和拆除無機營養物質及重金屬去除之廢水處理也已深入研究 (Aravantinou 等 2013)。工業上的污水已經廣泛用於微藻培養，不論是含有豐富氮營養素之養豬廢水(Yue Wang 等 2015)以及含有豐富重金屬色素之紡織業廢水(Hala Yassin El-Kassas 等 2014)等含有高營養源之廢水皆適用於微藻的培養使用。如果沒有適當的處理排出的高濃度營養鹽和廢水會嚴重污染到環境。

在生態系統中釋放廢水是一個非常大的污染，富營養源和重金屬的來源，都會改變整個生態環境的平衡，包括在水生物中改變光合活性、降低溶解氧(DO)以及 pH 值、增加生化需氧量(BOD)和化學需氧量(COD)(Amin 等人, 2008)。因此，在不可逆之前，必須對這些廢水進行處理後，才能排放到環境中，否則當含重金屬進到水循環內將可能透過生物鏈造成生態浩劫，而如果是含有豐富的有機物廢水，水中的氧氣可能無法將其分解，如果變成無氧分解的話將造成河川惡臭，造成蚊蟲等傳染病滋生。其中 COD 以 mg/L 表示，通過水質監測儀器檢測出的 COD 數值，水質可分為五大類，其中一類和二類 $COD \leq 15$ mg/L，基本上能達到飲用水標準，數值大於二類的水不能作為飲用水的，其中三類 $COD \leq 20$ mg/L、四類 $COD \leq 30$ mg/L、五類 $COD \leq 40$ mg/L 屬於污染水質，COD 數值越高，污染就越嚴重。而微藻扮演的角色則為清除污水內的重金屬、COD 及 BOD 的水中益藻，如果可以廣泛應用在廢水處理上一定是人類的一大邁進。

2.4.3 微藻淨化廢水機制與優點

如上述 2.3.2 所說，藻類很強的吸收能力和藻類細胞壁的結構、生理特點有關。藻類細胞壁分層，外層主要由纖維素、果膠質、藻酸鈣岩藻多糖和聚半乳糖硫酸酯等多層微纖維絲組成的多孔結構，內層主要成分是纖維素。所以也能用來做廢水去除的角色，其中利用藻類吸附回收污水中貴重金屬的技術與其它處理方法相比較，具有以下優點：(1) 材料廉價易得；(2) 不產生二次污染；(3) 吸附容量大，去除效率高，適用範圍廣；(4) 對金屬離子具有良好的吸附選擇性；(5) 吸附的重金屬離子容易洗脫，利於吸附材料的重複利用和金屬離子的回收；(6) 對低濃度重金屬污水依然具有較好的處理效果等。即使死亡藻體也具有吸附的能力 (Mohamed Zakaria A. 2001)。

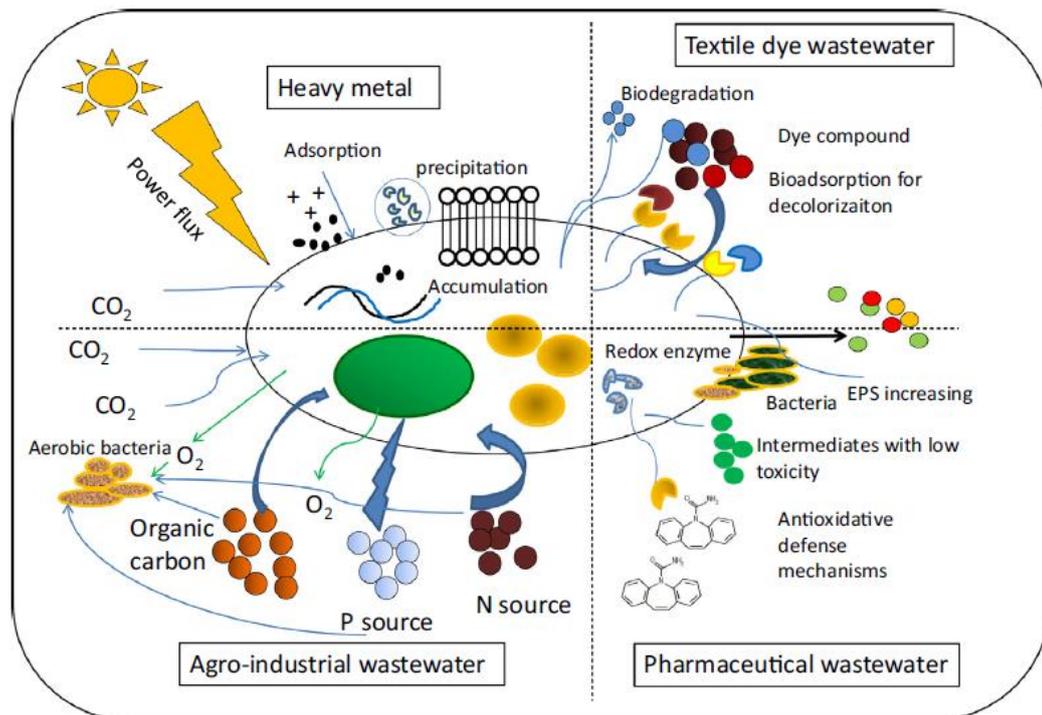


圖 2-5 微藻和細菌利用工業廢水機制 (Y. Wang et al., 2016)

表 2-3 使用微藻移除不同廢水 COD 之去除率

Organism	Wastewater sources	pH	Initial COD (g/L)	COD removal(%)	Reference
<i>Chlorella sp</i>	Textile wastewater		5	60%	Jane-Yii Wu (2016)
	Textile wastewater	8	0.5	17.5%	Hala Yassin El-Kassas(2014)
	Ottawa (Canada). wastewater	8	0.6	30%	Fares A. AlMomani(2016)
	Glycerol wastewater	9	25	94%	Xiaochen Ma(2016)
	Swine wastewater	8.95	1	60%	Yue Wang(2015)
	Domestic wastewater	7	0.02	98.89%	Ming-sheng Miao(2016)

2.5 生物反應器串聯培養系統

2.5.1 生物反應器串聯培養系統簡介

發酵過程中，耗氧菌因為呼吸作用的關係，呈現極度好氧狀態，產生二氧化碳進而累積菌體，如酵母。而微藻的自營培養，則是由無機碳（二氧化碳）做為碳源，並在光照環境中行光合作用（Wang et al., 2008）。其中微藻及酵母菌都具有生長周期短、生物油脂含量豐富適合作為生質柴油之微生物油脂（Miao and Wu, 2006；Andrade et al., 2012）。為了提高微生物生產效率，因此提出兩個生物反應器相互串聯培養，將兩系統通過氣體相連接，使它們之間的氧氣和二氧化碳的氣體交換，產生共生效應，能夠不斷增加微藻細胞濃度。兩系統串聯培養方法已成功的被證明（Santos et al., 2011）。

利用串聯培養系統中好氧菌所釋出之氣體，與工業廢氣做為無基碳源培養微藻，串聯系統所釋出之二氧化碳具有：(1)成本低廉 (2)串聯系統可自行供給 (3)且無毒性，對於利用工業廢氣培養微藻製成的產品，如葉黃素、類胡蘿蔔素的飼料、食品和醫藥製品，普遍社會及大眾市場對於工業廢氣所產生之產品可能會存有食品安全之疑慮（Santos et al., 2013）。

2.5.2 綠藻固碳應用簡介

人類歷史上，由於人為的石油燃料使用，空氣中的二氧化碳濃度顯著增加，但是二氧化碳濃度不如排放量那麼高。因為地球上同時進行著許多活躍的碳循環反應，把生物圈和海洋中可回收的二氧化碳反應掉（Smith 和 Smith，2009）。

微藻小球藻，它是一種球形單細胞真核綠藻，以它的細胞壁厚（100-200nm）作為其主要特徵。這種細胞壁提供機械和化學保護，並透過文獻報告得知，小球藻與重金屬抵抗和移除具有很好的優勢，不僅是廢棄物處理，綠藻更是良好的生物固碳材料，通過碳酸酐酶進行碳酸鈣的攝取，可以催化 CO₂ 以形成 HCO⁻ 和質子，提共綠藻生長反應。Hirata (1996). 小球藻的碳固定量是可變的，除了其他因素外，還取決於氣態源中的二氧化碳濃度。其中 Yun 等人（1997）在研究中得知，在 15% 的二氧化碳中培養了 *C.vulgaris*，並獲得了 624 mg/L · day 的二氧化碳固定。

表 2-4 不同藻類之固碳效果比較

Microalgae Strain	Biomass (mg /L)	CO ₂ Fixation Rate (mg/ L · day)	Reference
<i>Spirulina platensis</i>	145	318	Sydney et al., 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	129	151	Sydney et al., 2011
<i>Anabena sp.</i>	310	1450	Lo´pez et al., 2009
<i>Botryococcus braunii</i>	207	500	Sydney et al., 2011
<i>Dunaliella</i>	143	272	Sydney et al., 2011

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗藻種及廢水樣品

本實驗所使用的藻種 *Chlorella vulgaris* EXP-06，取自成功大學化工系張嘉修老師實驗室。小球藻是一種球形或略成橢圓形之單細胞藻其細胞壁是由纖維素所組成，質體 (Plastids) 內部因含葉綠素 α 、葉綠素 β 而成亮綠色，分類上屬綠藻門，綠藻綱，小球藻目，卵孢藻科，單細胞綠藻屬。直徑約 3~10 微米，如圖 3-1 所示。

本實驗所採用的廢水樣品為利用菌株 *Rhodotorula glutinis* 在經過發酵培養後去除其具經濟價值之菌體後，所剩餘的上清液作為此次廢水處理探討之樣品，經測量廢水 COD 含量約為 30 g/L，包含了碳源 8 g/L、氮源 18 g/L 以及剩餘的鹽類和微量元素，如圖 3-1 所示。



圖 3-1 小球藻 *Chlorella vulgaris* EXP-06 及經離心處理之紅酵母上清液，作為廢水養品。

3.1.2 實驗藥品

表 3-1 微藻所使用之藥品清單

中文名	英文名	廠牌
硝酸鉀	Potassium nitrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogenphosphate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
乙二胺四乙酸二鈉	Disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate dehydrate	SHOWA
硼酸	Boric acid	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	SHOWA
硫酸鐵	Ferrous sulfate	聯工化學試藥
硫酸鋅	Zinc sulfate heptahydrate	SHOWA
氯化錳	Manganese chloride tetrahydrate	Alfa
三氧化鉬	Molybdenum(VI) oxide	SHOWA
硫酸銅	Copper sulfate pentahydrate	SHOWA
硝酸鈷	Cobalt(II) nitrate	SHOWA
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA

鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
重鉻酸鉀	Potassium dichromate	ACROS
硫酸鉻	Sulfate hydrate	Alfa Aesar
硫酸	Sulfuric acid	Scharlau
磷酸	Phosphoric Acid	Scharlau
二苯基二胺脲	Diphenylcarbazine	ACROS
二氧化碳	Carbon dioxide	炳輝氣體公司

表 3-2 黏紅酵母菌廢水所使用之藥品清單

中文名	英文名	廠牌
YM BROTH	Yeast Malt Broth	ST BIO
工業級粗甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCO BD
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogen phosphate	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	聯工化學試藥
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	AENCORE
硫酸	Sulfuric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA

3.2 實驗儀器

表 3-3 為本研究所使用之儀器設備清單

儀器設備	廠牌	型號
電子天平	<i>Precisa</i>	BJ 100M
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
pH 計	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
恆溫震盪培養箱	DENG YNG	E600L
超純水系統	RODA	D11031218.1
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
6 公升光合反應器	得勝股份有限公司	—
5 公升攪拌式發酵槽	Biotop	BTF-A 5L
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
高效液相層析儀 Pump	Hitachi	L-2130/ 5110
高效液相層析儀 Auto Sampler	Hitachi	L-2200/ 5210
氣相層析儀 Gas Chromatography	SHIMADZU	GC-14B

超音波震盪器	DECTA	DC300H
紅外線水分蒸發儀	IR 35	DENVER INSTRUMENT
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
數位型離心機	HSIANTAI	CN-650
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
LED 燈	MR16-7W	DENVER
光度計	LI-COR	LI-250A
超音波震盪破碎儀	MISONIX	S-3000
烘箱	LIAN SHEN	LO-150

3.3 分析方法

3.3.1 光照強度測定方法

使用光度計測量 (LI-COR LI-250A) 光合反應器受光左右表面，此兩點所測得的光照強度取平均值，即為光反應器所受之光照強度，單位為 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

3.3.2 藻體濃度測量方法 (吸光值測量藻體濃度)

1. 在本實驗中，以分光光度計找出 *C. vulgaris* 的特徵波長，其波長位於 650 nm，再利用此波長去測量樣品吸光值 (optical density, O.D)。
2. 將濾紙秤重並烘乾 24 小時，然後取 50 ml 藻液，將其藻液抽氣過濾，同時用去離子水沖洗數次，並將殘留在濾紙上的藻體放入 70 °C 烘箱烘乾 24 小時，得到藻體乾重 (Dry Cell Weight, DCW)。
3. 取不同濃度之藻液，利用分光光度計在波長 650 nm 下測量光學密度 (Optical density, O.D)。依不同濃度所測得的 DCW 和 O.D 值作圖，獲得檢量線： $\text{DCW}(\text{g/l})=0.6803 \times \text{O.D}_{650}$
- 4.

3.3.3 葡萄糖濃度分析方法

將發酵液置入離心管中，以離心機轉速 7000 rpm 離心 10 min，分離菌體與上清液，取上清液並稀釋 10 倍，以 0.45 μm 針筒過濾器過濾。

利用高效液相層析儀 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析甘油濃度。分析條件：管柱 C18 (Vercopak N50DS, 250 mm \times 4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H_2SO_4 ，流速 0.8 ml/min，注射量 50 μL 。

3.3.4 六價鉻濃度分析方法

1. 取 1 ml 樣品經適當稀釋至 25 ml 置於適當容器中，加入約 0.06 ml 的濃磷酸，再以 0.5 M 硫酸溶液及 pH 計，調整待測樣品之 pH 至 2.0 ± 0.5 。
2. 加入 0.5 ml 二苯基二氨脲溶液，混合均勻，倒入具刻度之試管中，以 RO 水稀釋至 25 ml。靜置 5 分鐘後，以分光光度計於波長 540 nm 處讀取吸光度，以試劑水為對照樣品，吸光度讀數應扣除製備空白吸光值，並由檢量線求得六價鉻濃度 (mg/L)。

檢量線於附錄 B。

3.3.5 鉻價數轉換分析方法 (XANES)

C. vulgaris 內鉻元素的化學狀態，是由國家同步輻射研究中心 (NSRRC)，台灣光束線 BL16A1 進行 X 光吸收近邊緣結構 (XANES) 分析，此鉻價數轉換分析實驗由李寧博士協助進行。

鉻金屬箔與 K 邊緣吸收端在 5989.0 eV 作為校正標準，以確定每個樣品的正確邊緣的能量，此外，六價鉻化學品重鉻酸鉀 ($K_2Cr_2O_7$) 及三價鉻 (III) 氧化物 (Cr_2O_3) 粉末作為 XANES 光譜的測定作為標準參考，而吸收邊緣能量為第一個反曲點作為光子能量。

將待測樣品粉末均勻分散在卡普頓膠帶上，使用偵測器 (Lytle detector)，在室溫下以螢光模式進行，測量期間光譜的掃描能量範圍在 5970 ~ 6055 eV，並以 0.25 eV 每 3 秒一次進行實驗分析，使用雅典娜 0.8.056 軟體程式 (Athena 0.8.056) 進行數據整理。

3.3.6 化學需氧量(COD)測量方式

1. 取 20 mL 混合均勻之水樣 (若水樣之 COD 值大於 400 mg/L 時，應予適當稀釋)於 250 mL 錐形瓶(或具相同功能之容器)內，加入數粒沸石及 10.0 mL 0.02083 M 重鉻酸鉀溶液 (迴流用) 混勻後，連接冷凝管，並通入冷卻水。
2. 由冷凝管頂端加入 30 mL 硫酸-硫酸銀試劑，搖晃混合均勻後方可加熱，以免酸液濺出，沸騰後迴流 2 小時，迴流時以小燒杯蓋在冷凝管頂端以防污染物掉入。
3. 冷卻後，以 30 mL 試劑水由冷凝管頂端沖洗冷凝管內壁，取出錐形瓶 (或具相同功能之容器)，加入 30 mL 試劑水，冷卻至室溫。加入 2 至 3 滴菲羅林指示劑，以 0.125 M 硫酸亞鐵銨溶液滴定至當量點，此時溶液由藍綠色轉為紅棕色。所有的樣品應使用等量指示劑。
4. 依不同濃度並代入公式

$$\text{化學需氧量 (mg/L)} = \frac{(A - B) \times C \times 8,000}{V}$$

A：空白消耗之硫酸亞鐵銨滴定液體積 (mL)

B：水樣消耗之硫酸亞鐵銨滴定液體積 (mL)

C：硫酸亞鐵銨滴定液之莫耳濃度 (M)

V：水樣體積 (mL)

3.3.7 谷胱甘肽(GSH)測量方式

將綠藻代測樣品置入離心管中，以離心機轉速 7000 rpm 離心 10 min，分離藻體與上清液，以 0.45 μ m 針筒過濾器過濾。

利用高效液相層析儀 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析谷胱

甘肽濃度。分析條件：管柱 C18 (Vercopak N5ODS, 250 mm ×4.6 mm, Taiwan)，移動相為 64% 磷酸、36% 乙腈，流速 0.8 ml/min，注射量 20 μL；UV 偵測器 214 nm。

谷胱甘肽濃度對波峰面積作圖，獲得檢量線於附錄 D。

3.3.8 綠藻酵素測量方式

1. 取 250 mL 混合均勻之水樣，離心去除上清液，利用 Tris-HCl 洗菌一次，再離心去除上清液，此時試管內為乾淨的待測酵素之綠藻。
2. 加入適量 Tris-HCl 並進行細胞破碎 2 次，破碎完離心 10 分鐘並取上清液，此時上清液為不含任何綠藻藻體，只含有綠藻酵素之樣品。
3. 取上清液 0.3 ml，加入 0.5 ml (包含 K_2CrO_4 0.05 mM、NADH 0.1 mM、Tris-HCl 50 mM)，並計時於 0 分與 10 分鐘時，測試 Cr^{+6} 含量， Cr^{+6} 測量方法如 3.3.4。
4. 計算 10 分鐘所下降之 $Cr(VI)$ 含量，再推出 1 分鐘下降量，除以分子量以及單位換算，可得出 n-mol/毫升-分鐘的單位，並定義 n-mol/毫升-分鐘為一個酵素活性單位。

3.3.9 二氧化碳測量方式

利用氣體採樣管採集 *R. glutinis* 發酵槽及 *C. vulgaris* 光合反應器出氣口之氣體，利用氣相層析儀 Gas Chromatography (GC-14B) 進行分析。

分析條件：管柱 Packed Column J (GC-14B SUS I.D.3ψ×3 m Porapak T 80 / 100)，氣相層析儀烘箱 (oven) 溫度設定為 50°C；注射孔 (injector) 溫度為 120°C；熱導偵測器 (Thermal conductivity detector, TCD) 溫度為 140°C；運送氣體 (carrier gas) 為氦氣 (Helium)，樣品注射量為 0.4 ml。獲得檢量線於附錄 C。

3.4 實驗方法

3.4.1 藻種保存及活化

本實驗中，藻種保存採繼代培養的方式。取 50 ml 小球藻接至於 500 ml 之培養基，於血清瓶中進行培養，每週重新接種一次（約為停滯期初期）。而藻種活化，取藻種於 500 ml 培養基進行藻種活化培養，藻種起始濃度控制 O.D=0.100(約 0.05 g 藻細胞)，當微藻生長進入對數生長期時（5~6 天），取出藻液作為實驗上主培養之藻種使用。

培養條件：通氣量為 1 vvm (2 % CO₂)，光照強度 340 μmole m⁻² s⁻¹，24 小時連續照光，溫度約 24~26 °C。

3.4.2 菌種保存

將購自菌種中心的 *Rhodotorula glutinis* 之冷凍乾燥管，接至 YM BROTH (Yeast Malt Broth) 液態培養基活化，並放入恆溫培養箱中以 24 °C 培養 72 小時，取 0.8 ml 菌液和 0.2 ml 無菌甘油於微量離心管中均勻混合後，放入 4 °C 冰箱保存。

3.4.3 接菌

本研究實驗均將 *C. vulgaris* 起始藻種濃度控制在 O.D=0.100 (約 0.05 g 藻細胞)。而 *R. glutinis* 則將培養 24 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，5 公升攪拌式發酵槽中，接菌量為 Fermentation medium 10%之體積。

3.4.4 培養基組成

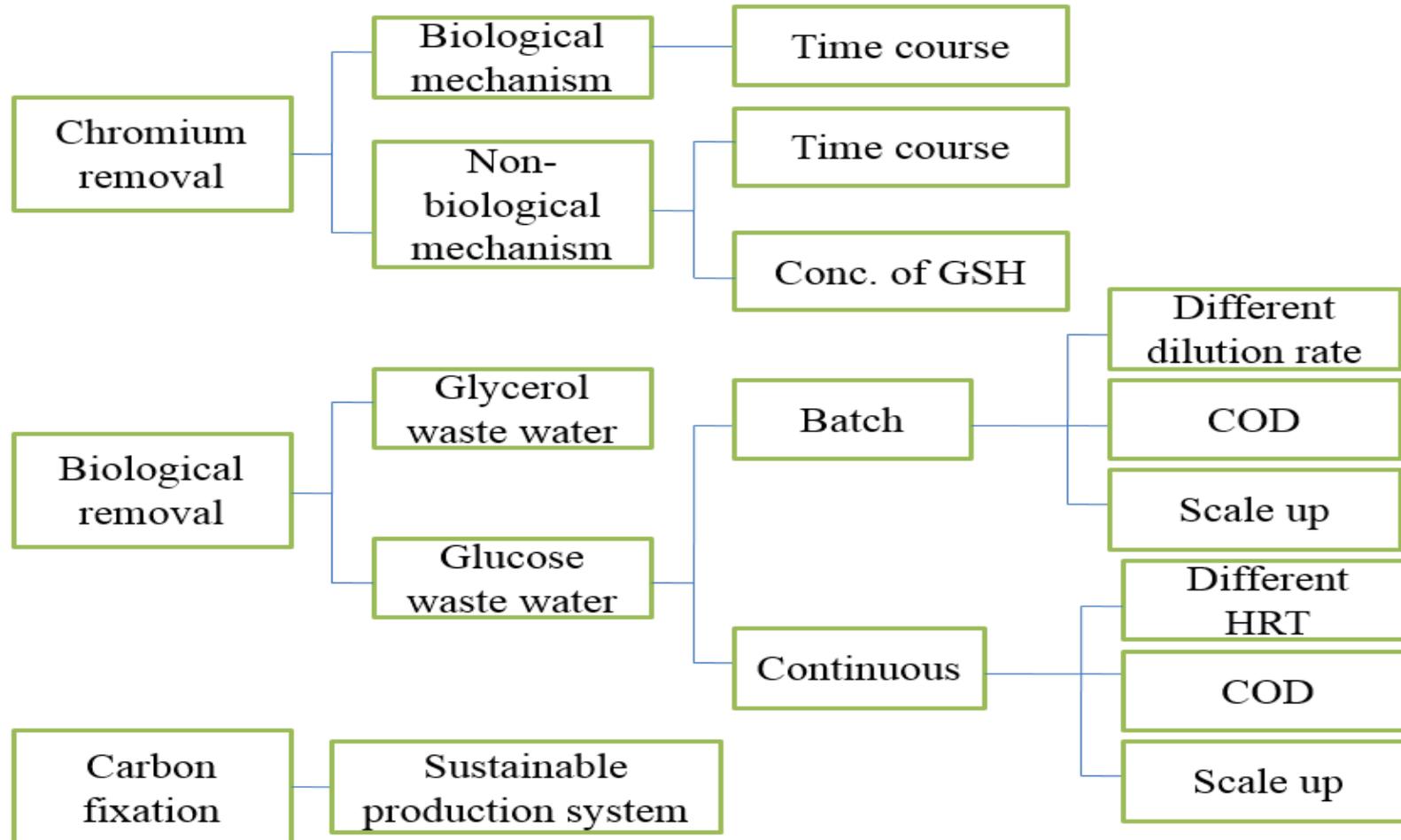
3.4.4.1 藻種培養基組成

Chlorella vulgaris 以 Basal 培養基為藻種保存與活化之培養，培養基組成如表 3-4。

表 3-4 Basal 培養基

Components	Concentration (g /L)
KNO ₃	1.2500
KH ₂ PO ₄	1.2500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0000
EDTA	0.5000
H ₃ BO ₃	0.1142
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1110
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0498
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0882
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0142
MoO ₃	0.0071
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0157
Co(NO ₃) · 6H ₂ O	0.0049

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件

3.6.1 批次系統與連續式系統之利用紅酵母上清液對小球藻培養

3.6.1.1 500 ml *C. vulgaris* 光合反應器批次發酵程序

目的：探討利用批次反應將 *R. glutinis* 在取出其具有經濟價之菌體後，將剩餘的上清液作為培養 *C. vulgaris* 之可行性探討，及測試出最佳的稀釋倍率。

1. 利用 *R. glutinis* 上清液配製不同稀釋比例(100%、50%、30%、10%)作為接種 *C. vulgaris* 之培養基。
2. 將培養基接至 500 ml 光合反應器進行培養，藻細胞起始接菌量為 1%，濃度控制約在 O.D=0.100，培養十天，觀察並每天取一次樣，測試其藻體濃度變化。

培養條件：微藻 *C. vulgaris* 實驗溫度為 24~26 °C，利用一盞白光 LED 照射，光強度平均為 340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光距離為 5 cm，每 24 小時取樣一次，起始 pH 6.0，持續培養十天。

3.6.1.2 1 L *C. vulgaris* 光合反應器連續式發酵程序

目的：探討利用連續式反應將 *R. glutinis* 在取出其具有經濟價之菌體後，將剩餘的上清液作為培養 *C. vulgaris* 之可行性探討，及測試出最佳的水力停留時間 (HRT)，找出可以達成綠藻生長的最佳條件。

1. 利用 *R. glutinis* 再經由過濾後，取其上清液作為連續式饋入綠藻反應器之廢水樣品，控制廢水起始 pH 為 6.0 以利綠藻生長。
2. 將培養七天之綠藻接至 1 L 光合反應器進行培養，並依照不同的水力反應時間(HRT)分別為 10、8、5、3 天連續饋入上清液於綠藻光合反應器內，培養十天，觀察並每天取一次樣，測試其藻體濃度變化。

培養條件：微藻 *C. vulgaris* 實驗溫度為 24~26 °C，利用一盞白光 LED 照射，光強度平均為 340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光距離為 5 cm，每 24 小時取樣一次，持續培養十天。

3.6.1.3 5 L *C. vulgaris* 批次系統與連續式系統光合反應器程序

目的：探討利用最佳的批次及連續式培養 *C. vulgaris* 的條件來作為放大體積 5 L 光合反應器的條件進行培養，測試出放大反應體積對於 *C. vulgaris* 降低廢水的化學需氧量之影響。

1. 利用 *R. glutinis* 再經由過濾後，取其上清液作為連續式、批次饋入綠藻反應器之廢水樣品，控制廢水起始 pH 為 6.0 以利綠藻生長。
2. 批次培養條件為 50% 稀釋倍率；連續式培養條件為 HRT 5 day，分別進行 5L 放大培養反應，並於每天取一次樣，測試其藻體濃度與 COD 變化。

培養條件：微藻 *C. vulgaris* 實驗溫度為 24~26 °C，利用五盞白光 LED 照射，光強度平均為 340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光距離為 5 cm，每 24 小時取樣一次，持續培養十天。

3.6.2 微藻 *C. vulgaris* 移除重金屬六價鉻

3.6.2.1 微藻 *C. vulgaris* 還原酵素移除重金屬六價鉻培養程序

目的：探討 *C. vulgaris* 酶酵素對於移除重金屬六價鉻之所需時間及效果。

1. 將 *C. vulgaris* 於 500 ml 血清瓶進行培養，藻細胞起始接菌量 1%，濃度控制約 O.D=0.100，持續培養至藻體濃度達約 2 g /L。。
2. 取出 *C. vulgaris* 藻液 250 ml 並進行綠藻酶之測試，測量出 10 分鐘綠藻酶降低重金屬六價鉻的速率。

培養條件：通氣量 1 vvm(2 % CO₂)，光照強度 340 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，光距離為 3 cm ，
24 小時連續照光、溫度約 24~26 °C，培養 7 天。

3.6.2.2 微藻 *C. vulgaris* 谷胱甘肽(GSH)移除重金屬六價鉻培養程序(時間)

目的：利用微藻藻體內含有豐富谷胱甘肽(GSH)之特性，測試綠藻是否透過非生物機制將谷胱甘肽(GSH)作為移除重金屬六價鉻之探討，並測試谷胱甘肽(GSH)如果用來移除重金屬六價鉻所需的反應時間。

1. 將 *C. vulgaris* 於 500 ml 血清瓶進行培養，藻細胞起始接菌量 1%，濃度控制約 O.D=0.100，持續培養至藻體濃度達約 2 g/L。
2. 將培養完整的綠藻進行細胞破碎，以利於谷胱甘肽(GSH)從藻細胞內釋出，再離心去除破碎後的藻體，只留下含有谷胱甘肽(GSH)的上清液來作為移除重金屬六價鉻的實驗。
3. 觀察谷胱甘肽(GSH)移除六價鉻的效果與反應時間。

培養條件：通氣量 1 vvm(2 % CO₂)，光照強度 340 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，光距離為 3 cm，連續照光、溫度約 24~26 °C，每 1 小時取樣一次，培養 10 小時。

3.6.2.3 微藻 *C. vulgaris* 谷胱甘肽(GSH)移除重金屬六價鉻培養程序(濃度)

目的：利用微藻藻體內含有豐富谷胱甘肽(GSH)之特性，測試綠藻內谷胱甘肽(GSH)，如果濃度不同是否會影響藻體移除重金屬六價鉻之效果。

1. 分別配製不同莫耳數比（谷胱甘肽:六價鉻）1:1、2:1、3:1 之濃度來進行培養。
2. 觀察不同比例之谷胱甘肽(GSH)對於移除六價鉻之影響。

培養條件：通氣量 1 vvm (2 % CO₂)，光照強度 340 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，光距離為 3 cm 連續照光、溫度約 24~26 °C，每 1 小時取樣一次，培養 10 小時。

3.6.3 循環共生系統黏紅酵母菌與小球藻之串聯培養

3.6.3.1 串聯 50 L *R. glutinis* 發酵槽及 20 L *C. vulgaris* 光合反應器重複饋料批次 (Repeated Fed-batch) 發酵程序

目的：探討 *R. glutinis* 釋出之氣體培養 *C. vulgaris* 之可行性，及兩發酵槽相互串聯培養是否可達平衡且持續生長。

1. *C. vulgaris* 於 500 ml 血清瓶進行前培養，培養六天；*R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基培養 24 小時。
2. 將前培養藻種接至 20 L 光合反應器進行培養，藻細胞起始濃度控制在 O.D=0.400；*R. glutinis* 接菌量為 Fermentation medium 10%之體積。
3. 利用棉花阻絕 *R. glutinis* 發酵槽釋出之少量菌體與 *C. vulgaris* 共培養 (Co-culture)。

培養條件：微藻 *C. vulgaris* 實驗溫度為 24~26 °C，利用三支 Shian Yih 白光 LED 固定再一起，由內層管上方置入光合反應器中照射，*R. glutinis* 發酵槽釋出之氣體由氣膜從光合反應器底部打入，每 12 小時取樣一次；酵母菌 *R. glutinis* 以 5 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養，每 12 小時取樣一次，此系統持續培養 25 天。

3.6.3.2 微藻 *C. vulgaris* 固定串聯系統中之二氧化碳

目的：探討 *C. vulgaris* 固定串聯系統 *R. glutinis* 釋出氣體中之二氧化碳，生成綠藻細胞。

1. 在酵母菌 *R. glutinis* 快速累積菌體濃度，約培養時間前 12 小時，利用氣體採樣管採集 *R. glutinis* 發酵槽及 *C. vulgaris* 光合反應器出氣口之氣體，利用氣相層析儀 Gas Chromatography 進行分析。
2. 在培養時間 12 小時後，每天兩次，採集氣體進行二氧化碳分析，至下一次重複饋料批次 (Repeated Fed-batch)。

3.7 實驗裝置圖

3.7.1 微藻 *C. vulgaris* 移除重金屬六價鉻

本裝置為微藻 *C. vulgaris* 之藻種繼代、活化、及六價鉻去除之 500ml 血清瓶反應系統以圖 3-2、3-3 進行反應研究。

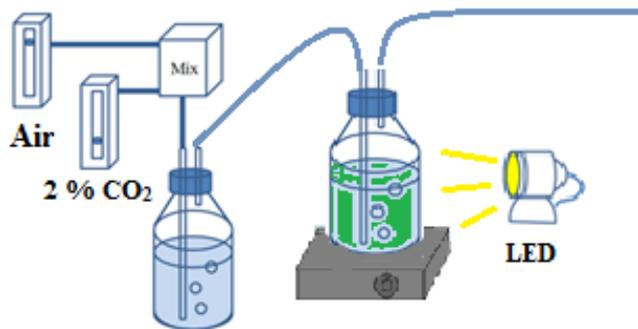


圖 3-2 小球藻藻種培養及移除重金屬六價鉻實驗之設備簡圖。



圖 3-3 小球藻藻種培養及移除重金屬六價鉻實驗裝置圖。

3.7.2 微藻批次反應培養

本裝置為測試利用紅酵母上清液作為微藻 *C. vulgaris* 之培養利用以圖 3-4 實驗設備進行批次反應討論；其中包括探討不同稀釋倍率如：稀釋 100 %、50 %、30 %、10 % 來進行實驗，找出最佳稀釋倍率後則進行化學需氧量 COD 之去除實驗。

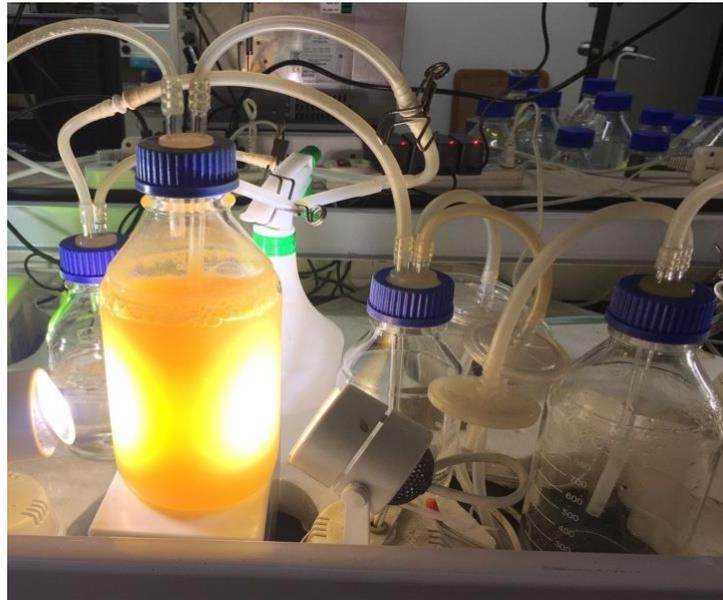


圖 3-4 小球藻 500 ml 批次反應器。

3.7.3 微藻連續式反應培養

本裝置為測試利用紅酵母上清液作為微藻 *C. vulgaris* 之培養利用以圖 3-5 實驗設備進行連續式反應討論；包括測試水力反應時間(HRT)如:HRT 10 day、8 day、5 day、3 day 來進行實驗，設定固定流速後，利用蠕動幫浦將紅酵母上清液連續饋入綠色光合反應器內進行實驗，找到最佳水力反應時間後則進行化學需氧量 COD 之去除實驗。



圖 3-5 小球藻 1L 連續式反應器。

3.7.4 連續式及批次 5 L 放大反應培養

再找出最佳連續式及批次反應條件後，利用放大反應器的方法來觀測如果增加反應體積是否會影響其最佳條件的效果，以利於未來用於更大反應體積的根據，以圖 3-6 實驗設備進行連續式與批次反應討論。

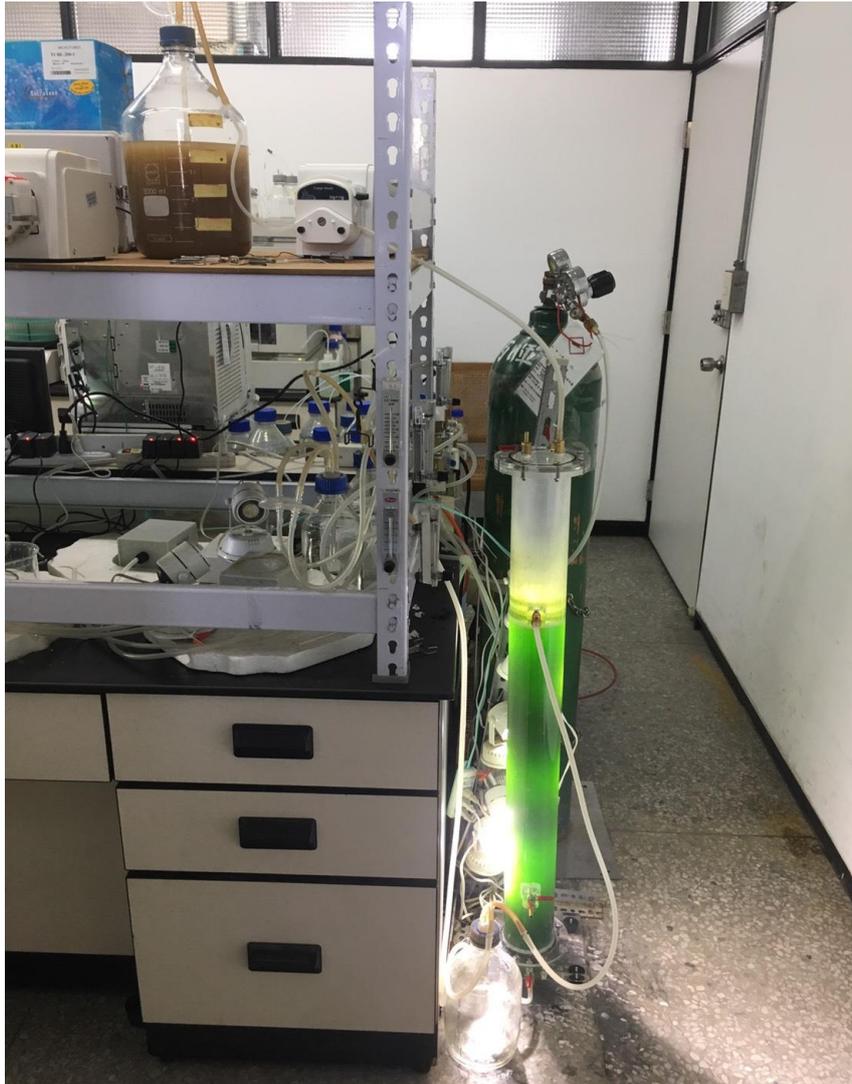


圖 3-6 小球藻 5L 連續式及批次反應器。

3.7.5 20.0 氣升式反應器與 50 L 黏紅酵母發酵槽反應器之串聯設備圖

(一) 20.0 氣升式反應器

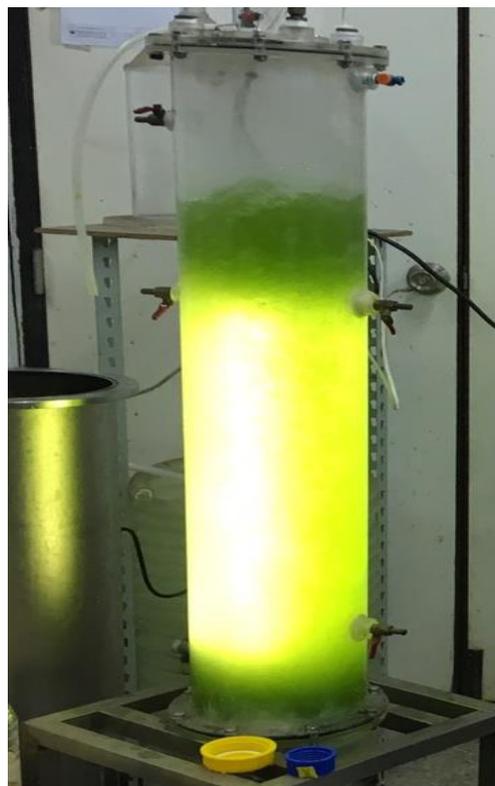
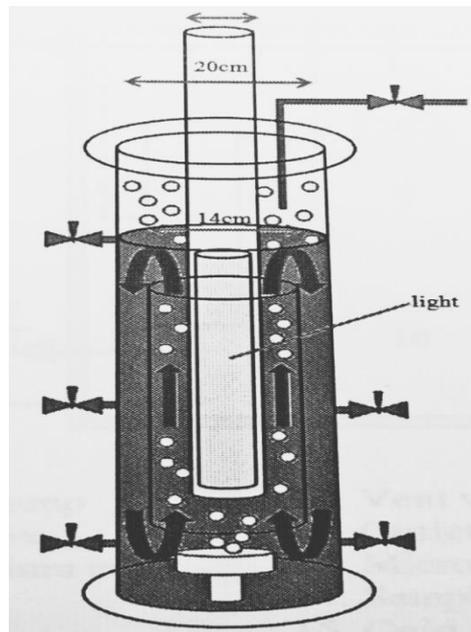


圖 3-7 20.0 氣升式反應器

(二) 串聯培養設備圖

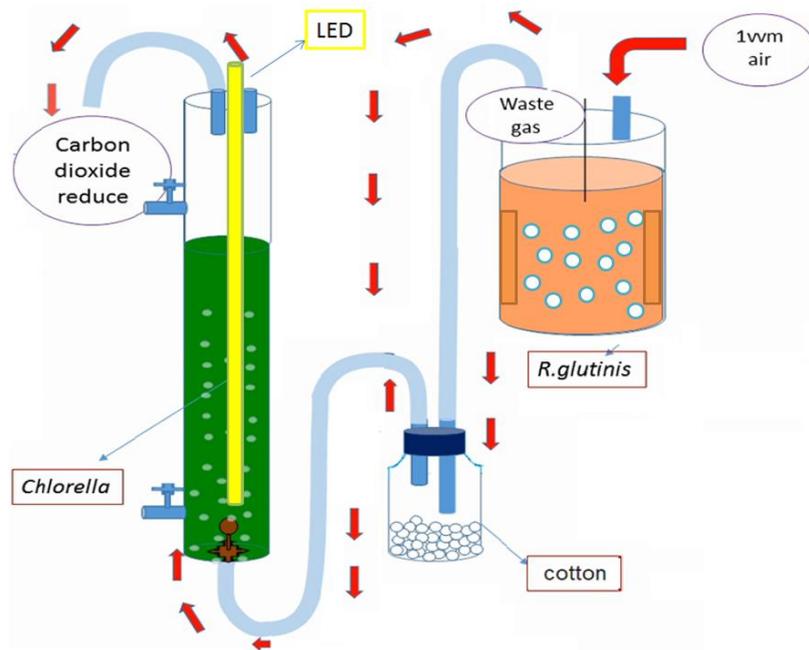


圖 3-8 串聯培養設備圖

第四章 結果與討論

4.1 小球藻移除重金屬六價鉻探討

產業的發展與進步為人類帶來便捷且高品質的物質生活，工業相對如此高度發展，所帶來的即是含有農藥、重金屬等有毒有害物質，不但破壞自然環境，導致衍生需多環境問題，影響人類健康和水生生態系統 (Noue and Paw, 1988)。

目前工業利用吸附，反滲透，電解回收技術和離子交換等技術去除六價鉻 (Shewry et al., 1976; Vajpayee et al., 1999)。然而，這些方法對於低濃度六價鉻 (1~100 mg /L) 往往是昂貴且不符合經濟成本 (Debski et al., 2004)，近年來，利用生物吸附廢水中的中金屬已成為一個具有經濟效益和高效率的方法，包括細菌，真菌及藻類都已有去除六價鉻之研究 (Zayed et al., 2003; Poopal et al., 2009; Gibb et al., 2000; Gibb et al., 2000)，此外，綠藻具有適應廣泛環境，不論鹹水或淡水中都能生長之特性，不僅在吸附過程中能使除去重金屬之成本降低，在吸附去除重金屬上，*Chlorella sp.* (Debski et al., 2004; Saxena et al., 1990)、*Ceramium virgatum* (Zhou et al., 2002)、*Sargassum muticum* (Shi et al., 2002) 及 *Oedogonium hatei* (Codd et al., 2001) 都具有較高去除六價鉻之能力。

本次實驗將介紹小球藻 *Chlorella vulgaris* 在進行移除 Cr(VI) 過程中除了利用藻體吸附之外還包含了生物機制反應與非生物機制反應，使得微量的 Cr(VI) 被還原成 Cr(III)。本實驗的起源為探討 *C. vulgaris* 移除 Cr(VI)，但將反應後的綠藻溶液利用 XANES 儀器測量後，發現液體中不只含有剩餘的 Cr(VI) 的特徵峰，還發現有 Cr(III) 的特徵峰，故推測藻液內有可以還原 Cr(VI) 的元素，再經過文獻比對下，推測造成 Cr(VI) 改變狀態的元素可能有兩種，分別為綠藻內的還原酵素，另一個為綠藻內具有抗氧化功能的谷胱甘肽(GSH)，它在綠藻藻體內扮演著抗氧化物的角色，當 Cr(VI) 進入到綠藻藻體內，綠藻酵素開始代謝 Cr(VI)，等到酵素使用完，或者是細胞死亡，就是谷胱甘肽(GSH)發揮功能的時機。

4.1.1 探討小球藻 *C. vulgaris* 在利用綠藻酵素下進行生物機制移除重金屬六價鉻。

在探討此項目之前，我們已經了解 *C. vulgaris* 在移除 Cr(VI) 之最高毒性耐受度、最佳的水力反應時間、最佳化的反應設定等(2015 Pin Wen Chen)，我們還不明白的是小球藻在進行移除 Cr(VI) 的過程中，除了生物吸附外是如何將 Cr(VI) 移除的？又是如何在反應後出現 Cr(III) 的原因？所以在結果與討論 4.1 中我們將探討小球藻 *C. vulgaris* 利用綠藻酵素進行生物機制反應與綠藻藻體內的抗氧化劑所進行的非生物機制反應之差別與反應順序。在這個章節中，之所以稱呼藻體內的抗氧化劑之影響為非生物機制，是因為谷胱甘肽(GSH)是透過化學反應將 Cr(VI) 轉變成 Cr(III) 而不是利用生物活性反應所致，故以非生物機制稱之。由於一開始並不知道小球藻的綠藻酵素在進行移除 Cr(VI) 時所需要的反應時間，故此實驗設計為利用小球藻細胞破碎後之細胞碎片與小球藻經過細胞破碎處理且含有綠藻酵素之上清液，分別分開兩者樣品進行移除 Cr(VI) 實驗，前者細胞破碎後之細胞碎片，其培養目的在於探討小球藻之細胞在死亡的細胞下，是否還會吸附 Cr(VI)，導致 Cr(VI) 濃度的下降，而另一個小球藻上清液的培養目的在於了解綠藻酵素在進行生物機制反應時，移除 Cr(VI) 之反應所需時間和反應趨勢。(本實驗所採用之綠藻樣品為綠藻在接種藻種後，培養至穩定 Biomass 1.8 g/L 後取出使用，取出的綠藻藻種樣品為 250 ml。)

實驗結果如圖 4-1，將 3.5 mg/L Cr(VI) 投入兩個 500 ml 的樣品中作為起始 Cr(VI) 之濃度，並進行 30 分鐘的反應，每十分鐘取一次樣，並測量 Cr(VI) 濃度，因為酵素的反應非常快，所以在每次取完樣品後，必須馬上將樣品的環境調整為 4°C 低溫與 pH 2.0 的環境下，以免酵素持續進行移除 Cr(VI) 的反應。由圖 4-1 可以看出，所測出的初始 Cr(VI) 濃度約為 3.4 mg/L，在測量 0 min 之初始濃度時，因為測量所需時間約為一分鐘，故以 1 分鐘作為第一個反應點，再來，當十分鐘後進行第二次測量後發現，綠藻的還原酵素約反應掉 0.7 mg/L 的 Cr(VI)，而死亡細胞碎片利用吸附移除 Cr(VI) 趨近於 0.05 mg/L，最後當實驗進行達 30 分鐘後，可以發現死亡的細胞碎片在移除 Cr(VI) 上的效果不明顯，也相對緩慢，再透

過觀察綠藻酵素移除 Cr(VI)的數據中，可以發現 30 分鐘的反應時間約可以移除 0.8 mg/L 的 Cr(VI)，但是其中的 0.7 mg/L 約在前 10 分鐘就已經移除掉了。故此實驗推得知綠藻之還原酵素在進行 Cr(VI)移除時，反應非常的快速，且每次的酵素反應效果約在 10 分鐘內完成，故之後的酵素測量實驗，酵素的反應測量皆以 10 分鐘下降的 Cr(VI) 濃度為單位作計算。

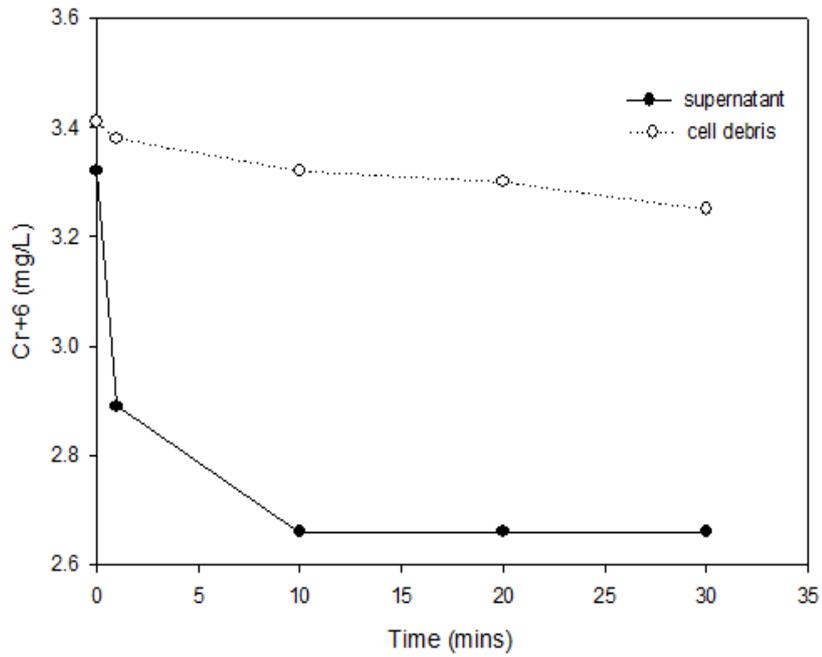


圖 4-1 小球藻酵素進行生物機制移除 Cr(VI)。

4.1.2 探討小球藻 *C. vulgaris* 在利用綠藻藻體內谷胱甘肽(GSH)下進行非生物機制移除重金屬六價鉻。

在水性環境中，鉻有兩種穩定氧化態，三價鉻（III）及六價鉻（VI）。而六價鉻因水溶性極佳利於生物運用(Buttner and Beyersmann, 1985; Bauthio, 1992)，且在各工業上廣泛被應用，反之，三價鉻的化合物難溶於水相，在動力學上也相對惰性(Bartlett and James, 1988)，故生物在運用上也相當有限(Kortenkamp et al., 1987)。因此，如何將高毒性且移動性佳的六價鉻還原為移動性差、可以沉澱去除的三價鉻，變成為處理廢水中六價鉻或環境中鉻污染的重要考量因素。

然而，微藻進行六價鉻還原在文獻上雖無明確的論證但已有初步推測其可能性，因此，本實驗利用微藻 *C. vulgaris* 吸附重金屬之特性，進而延伸探討微藻生物轉換（Bioconversion）重金屬價數之可能性。

本實驗探討 *C. vulgaris* 吸附六價鉻經由生物還原為三價鉻的可能性，故利用細胞破碎法及 XANES 兩種分析方法推測其可能性。首先由委託國家同步輻射研究中心李寧老師，利用 XANES 測試在綠藻移除過量 Cr(VI)後，剩餘綠藻液中所含有何種鉻金屬的離子，原先是認為綠藻將所有能負荷的 Cr(VI)利用微藻藻體來作吸收，所以綠藻液內應該剩下的金屬離子皆是 Cr(VI)，但經過 XANES 測量後，發現液體樣品中不只出現 Cr(VI)的波峰，還出現 Cr(III)的波峰，所以懷疑綠藻內還有可以將六價鉻還原成三價鉻之元素，透過文獻了解綠藻藻體中含有還原酵素與豐富的谷胱甘肽(GSH)，其中谷胱甘肽(GSH)的目的是作為綠藻細胞的抗氧化劑，此元素通常用來作為綠藻營養食品的材料做為抗氧化劑目的，所以推測，綠藻除了利用綠藻酵素來進行生物機制來移除 Cr(VI)並生成 Cr(III)外，還利用了綠藻藻體內的谷胱甘肽(GSH)進行非生物機制，使得少部分的 Cr(VI)被還原成 Cr(III)。在探討谷胱甘肽(GSH)影響之前，先測試了活藻、綠藻培養基、細胞破碎後的死亡藻細胞、以及高濃度 10 mg/L 谷胱甘肽(GSH)對六價鉻降低之影響，以確保培養基和死亡後的藻細胞並不會影響六價鉻的濃度，實驗結果如圖 4-2，首先四瓶樣品分別是(1)Biomass 2.0 g/L 之活藻細胞，(2)不含藻種的綠藻培養基，(3)經過細胞破碎後的上清液(含微量酵素)，(4)添加 10 mg/L 谷胱甘肽(GSH)溶液，

將以上四個樣品皆加入 10 mg Cr(VI)，並培養 4 天，每天取樣觀察其 Cr(VI) 濃度，實驗結果發現，樣品(2) 不含藻種的綠藻培養基並不會影響 Cr(VI) 濃度，而含有些微綠藻還原酵素酶的樣品(3)如同 4.1.1 結果，些微影響了 Cr(VI) 的濃度，而樣品(1) Biomass 2.0 g/L 之活藻細胞與(4) 添加 10 mg/L 谷胱甘肽(GSH)溶液皆可以把 10 mg Cr(VI) 移除完全，故確定谷胱甘肽(GSH)確實會影響重 Cr(VI) 的濃度。

在確定谷胱甘肽(GSH)對於 Cr(VI) 濃度之影響後，進而探討(一)谷胱甘肽(GSH)使 Cr(VI) 還原成 Cr(III) 的反應時間為何，(二) 探討谷胱甘肽(GSH)濃度，對於還原 Cr(VI) 之效果，(三)綠藻酵素和谷胱甘肽(GSH)同時存在於含有 Cr(VI) 的環境內之兩者反應情形。

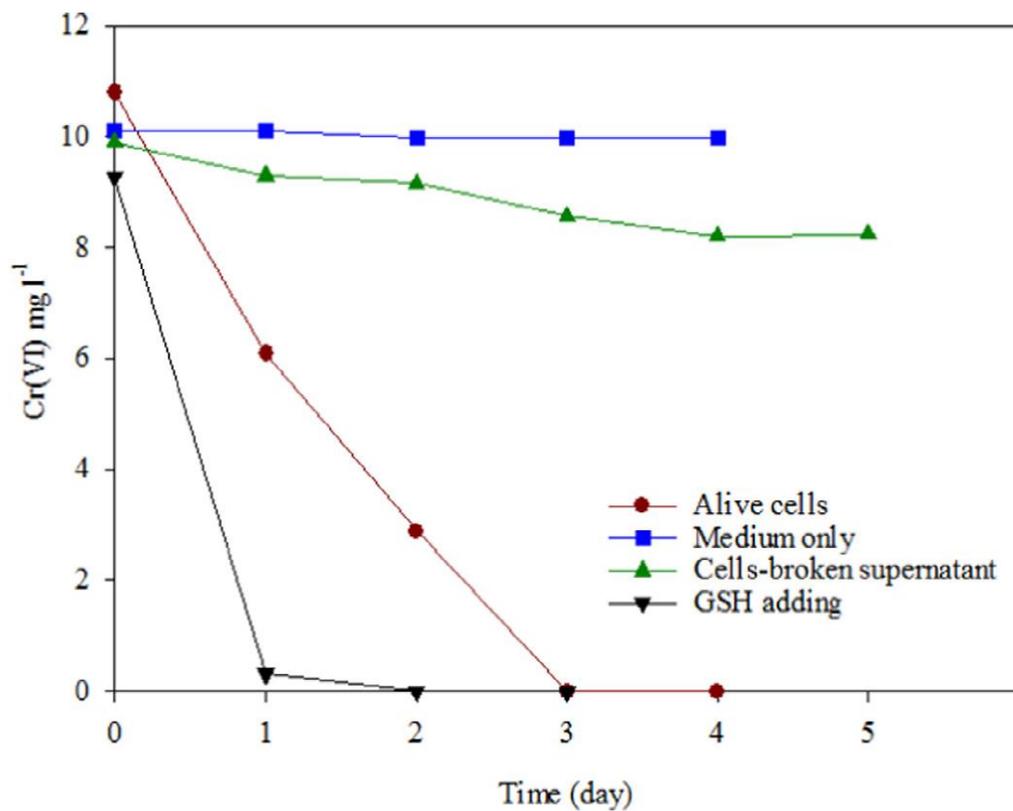


圖 4-2 探討藻液中會影響重金屬六價鉻之元素。

(一) 谷胱甘肽(GSH)使 Cr(VI)還原成 Cr(III)的反應時間為何

實驗如圖 4-3，利用谷胱甘肽(GSH) 與 Cr(VI)之莫耳數比 1:1 相溶培養，分別在 0、5、17 小時取一次樣，並觀察 Cr(VI)的下降情形，可以發現兩者起始濃度分別約為谷胱甘肽(GSH) 9.4 g/L; 重金屬六價鉻 9.8 mg/L，當時間經過 5 小時，可以發現谷胱甘肽(GSH)和 Cr(VI)皆下降，其中 Cr(VI)約下降 2 mg/L，再反應來到時間 17 小時，Cr(VI)與谷胱甘肽(GSH)已達成平衡，兩者的濃度皆不在下降，由此實驗得到谷胱甘肽(GSH)確實將會影響 Cr(VI)之濃度，反應時間約為 5 小時。

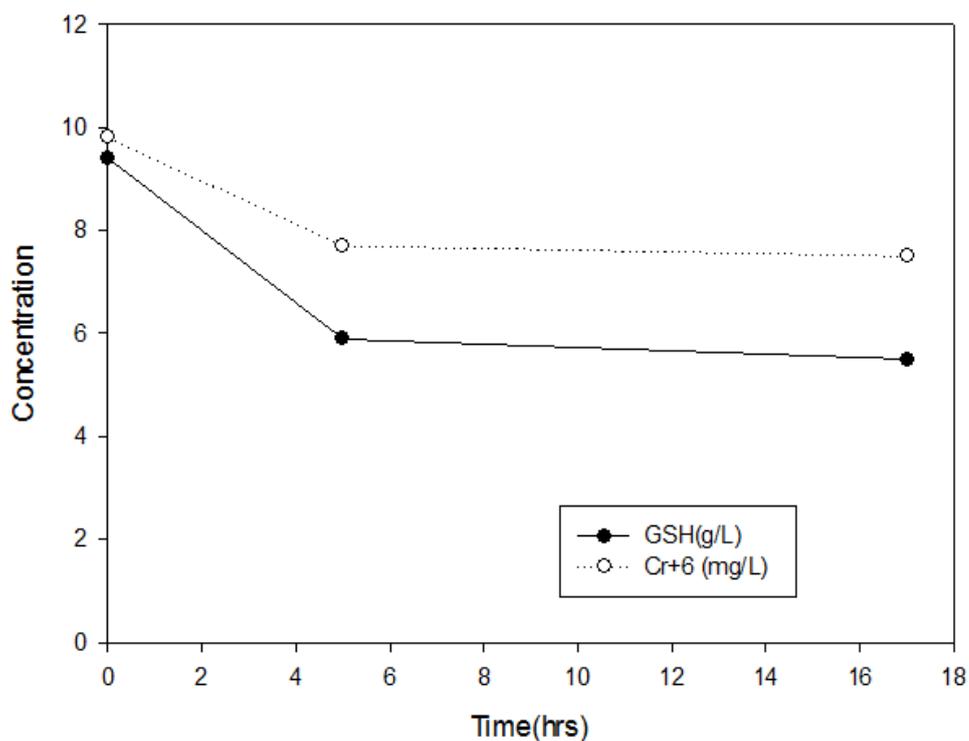


圖 4-3 利用谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)莫耳數 1:1 反應變化。

(二) 探討谷胱甘肽(GSH)濃度，對於還原 Cr(VI)之效果

從討論(一)中的結論已經得到谷胱甘肽(GSH)確實會造成 Cr(VI)的濃度降低後，且反應會在 10 小時內完成，下一步為探討如果增加谷胱甘肽(GSH)的濃度量，是否會使谷胱甘肽(GSH)在反應過程中，更快速且數量更多地降低 Cr(VI)，故此實驗利用 Cr(VI):GSH 莫耳數比 1:1、1:2、1:3 相溶進行培養，每小時取一次樣，並測量重金屬 Cr(VI)與 GSH 的下降情形。實驗如圖 4-4、4-5，可以發現在實驗開始進行後，三個不同濃度的 GSH 樣品皆開始消耗 Cr(VI)，其中 1:1 條件中，其反應效果約為 10 個小時降低 Cr(VI) 6 mg/L，而 1:2 條件在 8 小時內將 Cr(VI) 12 mg/L 移除完畢，最後 1:3 條件在 4 小時內就已經將 Cr(VI) 12 mg/L 移除完畢，故將數據整理於表 4-1 中，可以發現隨著谷胱甘肽(GSH)濃度增加，可以移除的 Cr(VI)的數量也越多，且反應時間越短，也再一步的證明，綠藻藻體內的谷胱甘肽(GSH)會進行非生物機制來影響 Cr(VI)的濃度得以解釋。

表 4-1 探討谷胱甘肽(GSH)移除 Cr(VI)濃度與速率比

	Initial Cr(VI) (mg/L)	pH	R- Cr(VI) (mg /L)	Cr(VI) Reduction rate (mg /L · 4h)
1 moles GSH	12	6.2 ~ 6.4	6	5
2 moles GSH			12	9
3 moles GSH			12	12

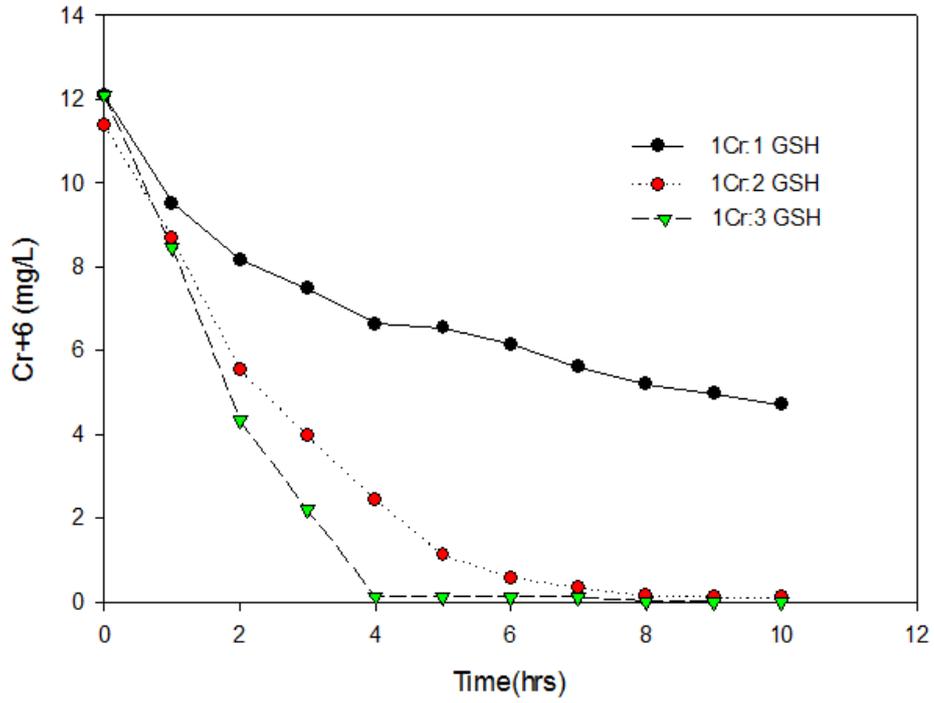


圖 4-4 不同谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)濃度比反應變化。

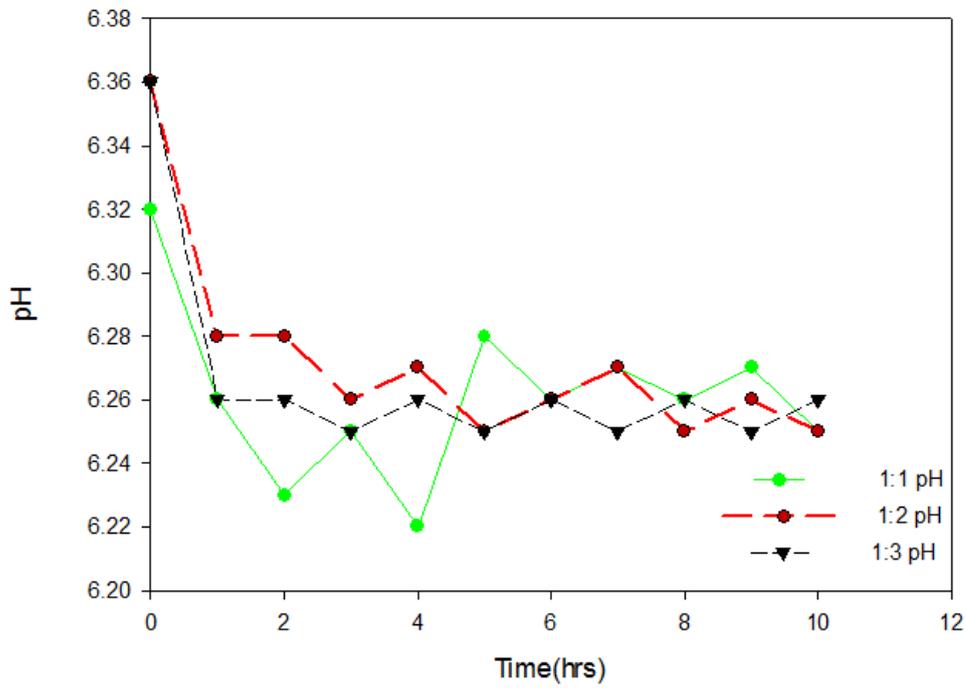


圖 4-5 不同谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI)濃度比 pH 變化。

(三) 綠藻還原酵素和谷胱甘肽(GSH)同時存在於含有重金屬六價鉻的環境內之兩者反應情形

由上述(一)(二)主題的結論，已經初步了解綠藻內 GSH 的確會影響 Cr(VI) 的濃度，以及當 GSH 的濃度越高，移除 Cr(VI) 的效果就越好，移除速率也越快，那現在要了解的是若兩者皆同時存在含有 Cr(VI) 的溶液中的反應情形。方法為：利用培養一批新鮮的綠藻開始，設定起始綠藻藻體接菌量為 1%，密度約為 0.1 g/L，並進行 13 天的培養，每天取一次樣，並於藻體密度達穩定 2.0 g/L 時投入 Cr(VI) 12 mg/L，觀察 GSH 與綠藻酵素對 Cr(VI) 濃度的反應變化。

實驗結果如圖 4-6，在投入 Cr(VI) 之前，GSH 隨著藻體密度稍微的增加，當綠藻生長至 2.0 g/L 後，將 Cr(VI) 12 mg/L 投入後，可以發現綠藻酵素活性快速的下降，並逐漸移除了 Cr(VI)，而谷胱甘肽(GSH)卻沒有與 Cr(VI) 的反應，故推測當 Cr(VI) 進到綠藻細胞內，綠藻酵素會優先與外來的毒性反應，直到酵素完全消耗完後或者是微藻細胞死亡後才有可能使谷胱甘肽(GSH)與 Cr(VI) 反應。

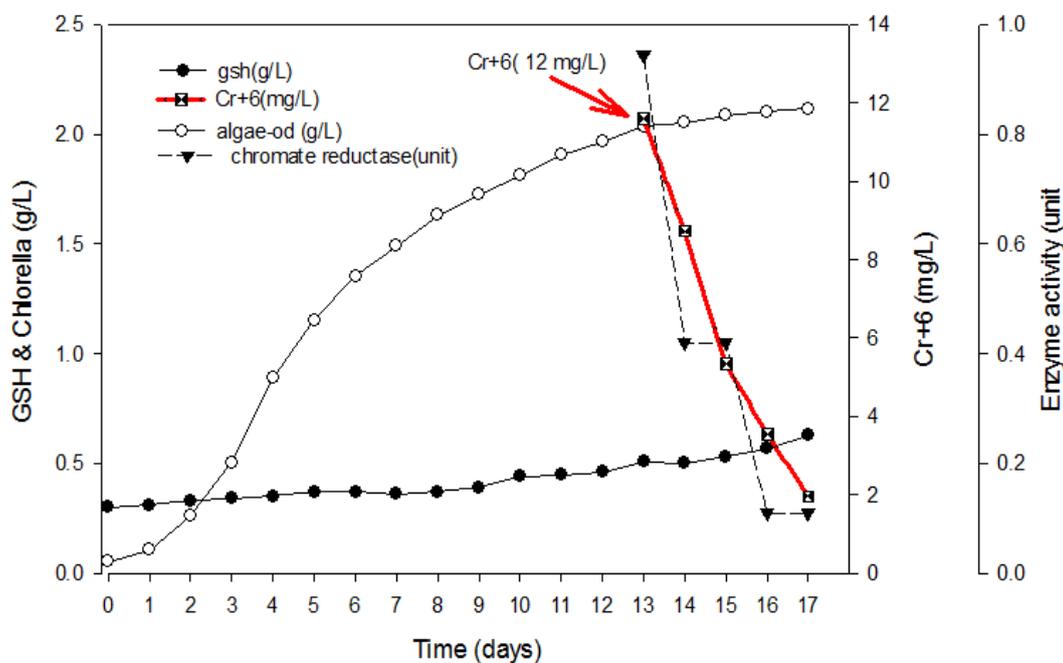


圖 4-6 綠藻酵素和谷胱甘肽(GSH)反應 Cr(VI)。

4.2 微藻 *C. vulgaris* 降低廢水中化學需氧量(COD)

台灣工業區為數眾多，許多不肖廠商常常將工業廢水再未經處理下直接排入河川，為了節省工廠水污染的處理成本，污染整個水生態。目前臺灣河川所面臨的危機，主要歸因於人類在集水區內的活動，其中在上游以農業礦業不當的開發為主，在中下游則與工商業和家庭活動關係密切，其中以工業污染造成的危害最為急遽。目前應用微藻淨化廢水也是研究的熱門主題，因此本實驗將利用微藻，針對降低廢水中化學需氧量(COD)進行研究，然而，本實驗將使用紅酵母發酵後的廢水，以這些廢水作為微藻 *Chlorella vulgaris* 進行水質改善之降低廢水中化學需氧量之可能性探討。目的為：在進行微藻去除重金屬之外，利用綠藻降低水中污染物的特性來進行延伸探討，步驟為將附有經濟價值的紅酵母利用完後，收集其上清液廢液做為綠藻降低污染物的水樣品並將綠藻培養於廢水樣品中，利用綠藻代謝廢水有機物的能力來降低水中化學需氧量(COD)，並探討紅酵母廢液剩餘的營養鹽對綠藻生長的影響。

一般以水污染指標來判斷廢水等級，指標可以分為物理性、化學性、生物性三類。化學性指標中的化學需氧量(chemical oxygen demand, COD)係指在一定的條件下，採用一定的強氧化劑處理水樣品時，所消耗的氧化劑量。它反映了水中受物質污染的程度，化學需氧量越大，說明水中受有機物的污染越嚴重(環檢所)。在測定 COD 的過程中，水中之有機物不論其是否屬微生物可氧化者，均會氧化成 CO_2 與 H_2O 。例如葡萄糖屬微生物易氧化之有機化合物，而木質素就相當不易被微生物氧化，但兩者在 COD 的測定過程，均會被完全氧化，可以大抵看出水質的污染程度，在 COD 的測量上也非常的快速與方便。COD 以 mg/L 表示， $\text{COD} \leq 15\text{mg/L}$ ，基本上能達到飲用水標準。

希望能利用綠藻培養快速和耐受度高的優點，將廢水中的 COD 含量在符合經濟效益的情況下大量的降低 COD 含量，並找出最佳化條件與效果，進能達成利用無二次污染的生物法來淨化廢水之目的

4.2.1 測試將綠藻培養於含有粗乾油廢水之實驗效果

首先，在廢水樣品的選擇上，本實驗室有兩個廢水樣品，皆為紅酵母發酵培養後的廢液，不同的是，其中一個是利用粗乾油作為紅酵母培養之碳源的廢液，另一個為利用葡萄糖作為紅酵母培養之碳源的廢液，其中含粗乾油的廢液看起來顏色較深且透光性不佳，也包含許多粗乾油未知的元素，故此實驗的目的為：在微藻進行廢水淨化之前，先挑選出適合讓綠藻作為廢水處理的廢水樣品，如果微藻能在此廢水進行生長，才進行下一步的廢水淨化探討。首先利用粗乾油碳源之廢液作為綠藻的培養基作培養來進行測試，方法為利用批次反應並稀釋不同比例(100%、50%、30%、10%)後，將綠藻藻種接種 1%於 500 ml 血清瓶中，並同時饋入與控制組相同的含有 2%的 CO₂ 碳源，每天取一次樣，並觀察綠藻藻體密度與 pH 值變化。

實驗結果如 4-7、4-8，觀察綠藻藻體濃度與控制組來做比較，可以看出各別稀釋濃度的綠藻生長曲線，發現利用含有粗乾油的廢水樣品並不適合作為綠藻的培養基來使用，因為綠藻在此環境中，無法有效的在 12 天內穩定增加其藻體密度，初步懷疑是因為剩餘 0~3 g/L 的粗甘油廢水內含有某些未知物質，抑制了綠藻藻體在培養基內的生長，或是造成了綠藻細胞的堵塞，而且這個物質只要些微濃度就會影響綠藻生長，也就是為什麼連只含有 10 %的粗甘油碳源廢液也無法使綠藻穩定生長，而 pH 值方面到不是影響綠藻生長的因素，除了 100 % 以外，pH 皆借於 6.0~7.0 之間，是適合綠藻生長的環境。由上述實驗結果，決定不使用含有粗甘油碳源的發酵廢液作為此次廢水處理的樣品，而改為測試不含粗甘油的葡萄糖碳源紅酵母廢液作為廢水處理的樣品。

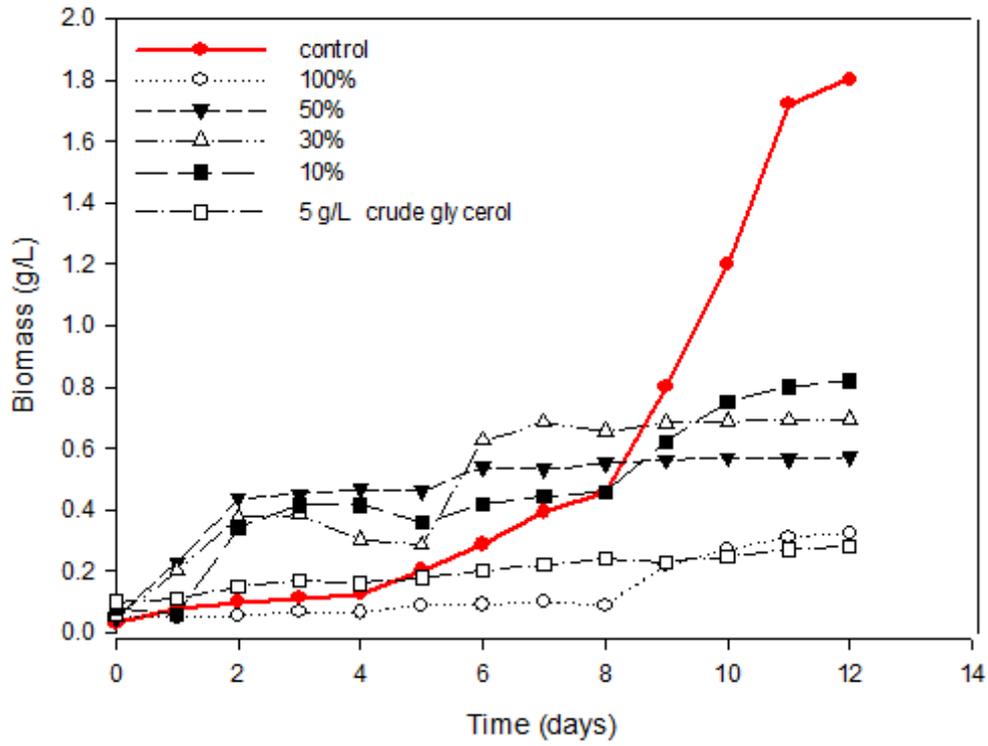


圖 4-7 探討 *C. vulgaris* 利用含粗乾油廢液作為培養基之藻體濃度變化。

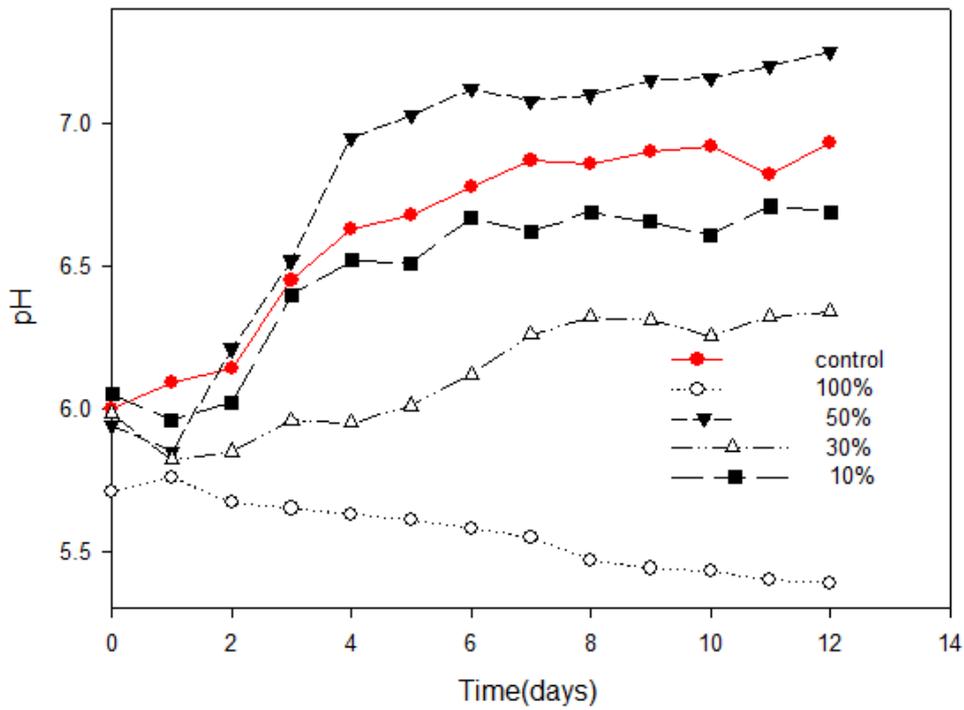


圖 4-8 探討 *C. vulgaris* 利用含粗乾油廢液作為培養基之 pH 值變化。

4.2.2 測試將綠藻培養於不含粗乾油廢水之實驗效果

由於在結果與討論 4.2.1 中，微藻利用含粗甘油廢水作為培養基並不適合做為此次實驗的廢水材料，故將廢水材料的選擇更改為利用葡萄糖碳源培養紅酵母發酵後之廢液，此廢水同樣是在紅酵母進行發酵培養後，取出其具有經濟價值的酵母菌後，剩餘的上清液則做為此次實驗的廢水樣品，首先還是需要先測試此廢水溶液是否能作為綠藻的培養環境，透過觀察藻體濃度和 pH 值變化，探討此廢水溶液適不適合使綠藻在廢水中穩定的生長，如果不會抑制綠藻生長，則在進一步探討綠藻降低水中化學需氧量之最佳化實驗。

實驗結果如圖 4-9、4-10，本實驗同樣設定在批次反應下，利用不同稀釋倍率(100%、50%、30%、10%)作為綠藻培養之培養基，接種 1%綠藻藻種，並同時饋入與控制組相同的含有 2%的 CO₂ 碳源，於每天取一次樣，測量綠藻藻體濃度及 pH 值變化。透過圖表可以發現不含粗甘油的廢水溶液就不會抑制綠藻生長，每一個稀釋倍率實驗在培養 12 天後皆有達到控制組 1.8 g/L 以上的綠藻藻體濃度，再由各稀釋倍率來看，50%之稀釋倍率可以在最短的時間 4 天就達到最高的藻體濃度，且持續維持藻體濃度大於 1.8 g/L，由 pH 值來看，每一個稀釋倍率皆生長於 6.0~7.0 之間，是適合綠藻藻體生長的環境，由上述結果推論，利用葡萄糖碳源培養紅酵母之廢水溶液來做為此次廢水處理之樣品是可行的，且在批次實驗條件設定上，以稀釋倍率 50 %為最佳的培養條件，雖然 30%、10%的稀釋倍率也可以達成不錯的藻體密度，但因為所使用到的廢水比例太少，不符合經濟效益，而 100%的稀釋倍率雖然藻體密度和控制組數據相仿，但是 100%稀釋倍率環境中在培養後期的 pH 有上升的情形，故之後的批次實驗皆以 50%稀釋倍率為批次設定條件來進行測試。

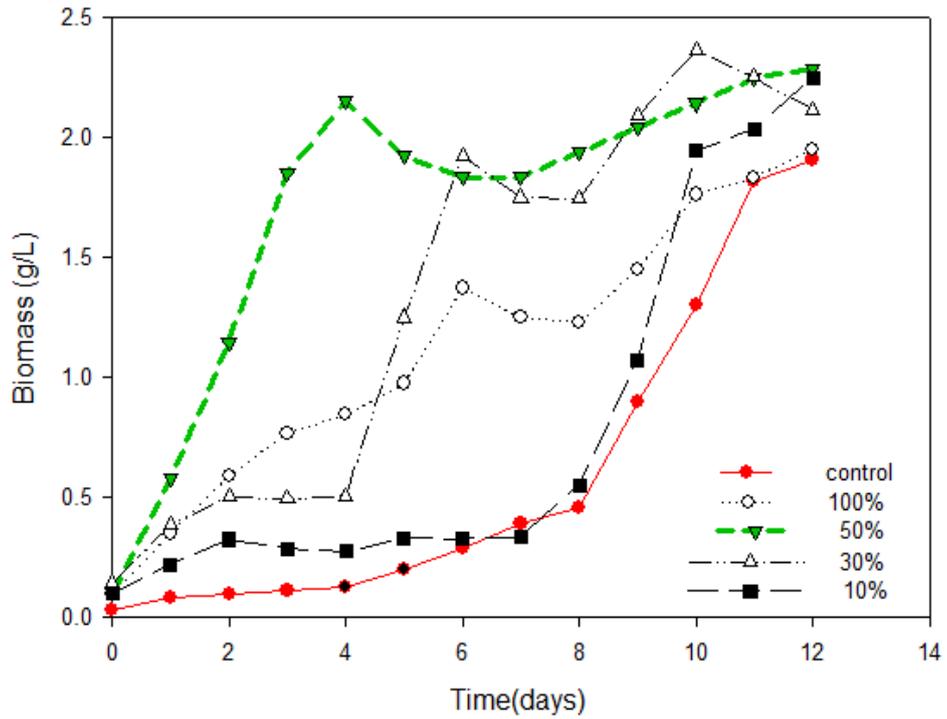


圖 4-9 探討 *C. vulgaris* 利用葡萄糖碳源之紅酵母廢液作為培養基之藻體濃度變化。

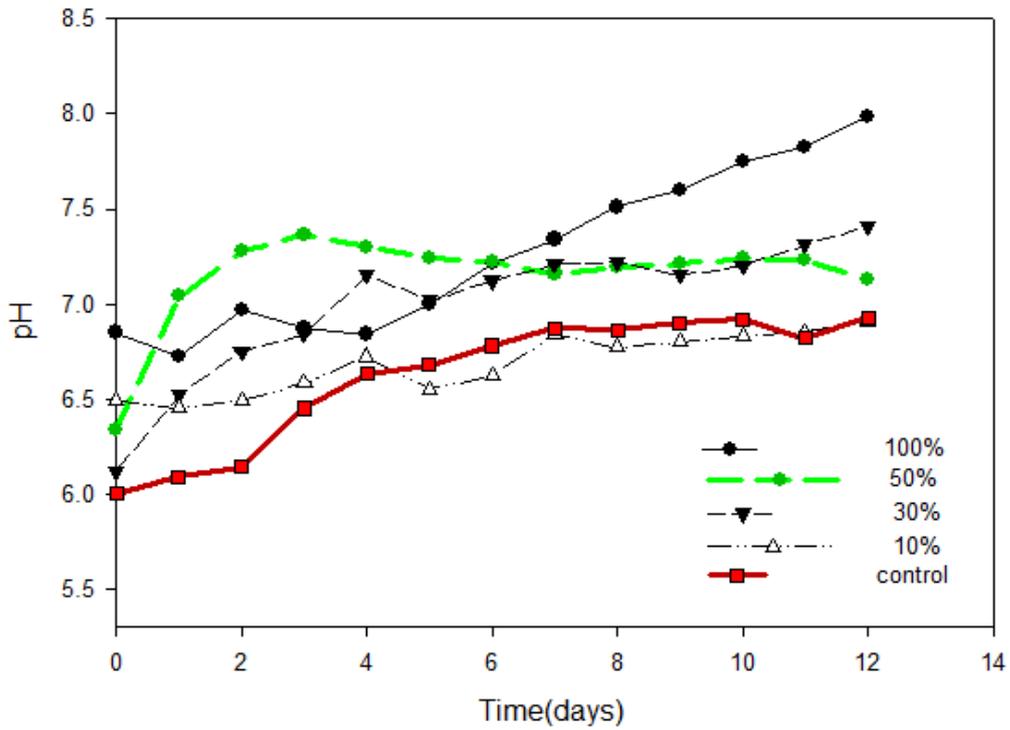


圖 4-10 探討 *C. vulgaris* 利用葡萄糖碳源之紅酵母廢液作為培養基之 pH 變化。

4.2.3 利用批式反應培養綠藻並去除廢水中化學需氧量探討

微生物的培養需要有機碳源及許多微量元素，而微藻可以轉換陽光，二氧化碳，碳酸鹽，無機物氮，等營養成分，使得藻類生成生質油，碳水化合物和蛋白質，若使用的原料為廢棄物或廢水，則可以達成污染減少且生成有用的經濟價值 (Beuckels 等人，2015; Mata 等人，2010)。

透過在結果與討論 4.2.2 中，已經了解微藻可以利用葡萄糖碳源所培養紅酵母之廢水上清液作為微藻的培養環境，下一步實驗將探討微藻淨化此廢水樣品的方法與成效，首先，經過環檢署提供的 COD 測量方法測得此發酵廢水溶液的化學需氧量(COD)約為 30 g/L，裡面含有培養紅酵母後所剩餘的碳源 8 g/L、氮源 18 g/L 以及 4 g/L 的其他元素，在廢水等級裡面算是有機物含量相當高的廢水，所以本實驗的目標為利用綠藻吸附與代謝有機物的特性來降低此廢水中的化學需氧量(COD)並同時維持綠藻藻體密度，使綠藻可以生生不息的生長，甚至進行其他重金屬去除等多方面的利用。

在實驗設計上，主要分為批次反應和連續式反應，首先討論利用批次反應降低廢水中化學需氧量(COD)之探討，由於在 4.2.2 討論中，已經找出最適合綠藻生長之批次條件為利用廢水稀釋倍率 50 % 的環境，此環境可以在最短的反應時間使綠藻密度生長到 2.0 g/L，且穩定維持綠藻藻體密度的，以利於達成短時間淨化廢水之經濟效益條件，所以在批次反應的探討上，皆以 50 % 廢水稀釋倍率作為培養條件，下一步為探討批次反應下淨化廢水之程度與效果，內容分別有 (一)500 ml 光合反應器中配製 50 % 廢水稀釋倍率並探討培養十日之化學需氧量 (COD) 移除程度、(二)將體積放大為 5L 光合反應器與改變反應形式培養對於化學需氧量(COD)移除效果。結果於圖 4-11、4-12 所示並個別討論。

(一) 500 ml 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度

實驗結果如圖 4-11，首先配製 50 % 廢水稀釋倍率作為綠藻培養基並進行培養，設定起始 pH 值為 6.0、綠藻接菌量為 1%，通入含有 2% 二氧化碳之空氣，培養 10 天並觀察綠藻藻體濃度及化學需氧量(COD)變化。可以發現化學需氧量隨著藻體濃度增加而逐漸下降，其中藻體濃度在第 4 天達到最高點並開始下降並維持在 1.8 g/L 左右，推測是因為起出在利用分光光度計測量 Biomass 時，有測到廢水所以影響了背景值，因為 50% 稀釋倍率的廢水還是有些微的混濁度，而在反應中後段，微藻將廢水淨化後，廢水所影響的背景值消失，數值則回到真實的微藻藻體濃度，實驗在進行十天的反應後，綠藻將總體 COD 約下降了 7000 mg/L，pH 維持在 7.0。

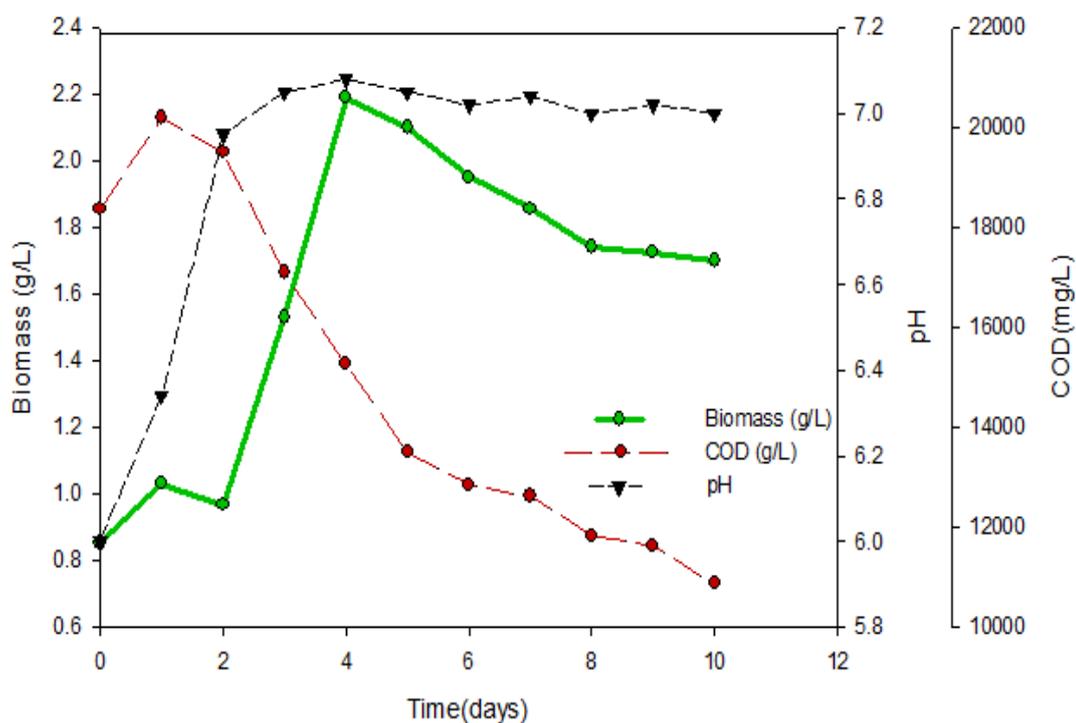


圖 4-11 500 ml 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度。

(二) 5 L 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度

本實驗目的為將反應體積放大十倍，利用 5 L 光合反應器放大培養，並觀察放大培養之淨化廢水效果。實驗結果如圖 4-12，在初始環境設定上同樣利用批次反應，反應條件為 50% 廢水稀釋倍率作為綠藻培養基進行培養，設定起始 pH 值為 6.0、綠藻接菌量為 1%，通入含有 2% 二氧化碳之空氣，培養 10 天並觀察藻體濃度及化學需氧量(COD)變化。可以發現化學需氧量同樣隨著藻體濃度增加而逐漸下降，其中藻體濃度在第 5 天達到最高點並開始下降並維持在 2.0 g/L 左右，pH 在反應後期維持在 7.4，稍微超出綠藻生長的理想值，10 天的反應下，綠藻將總體 COD 約下降了 10000 mg/L，與 500 ml 反應器相比，不但提高了綠藻藻體密度，還增加了化學需氧量的去除量，在總體表現上優於小體積的培養，也得到了放大反應體積可以增加化學需養量去除量的結果。

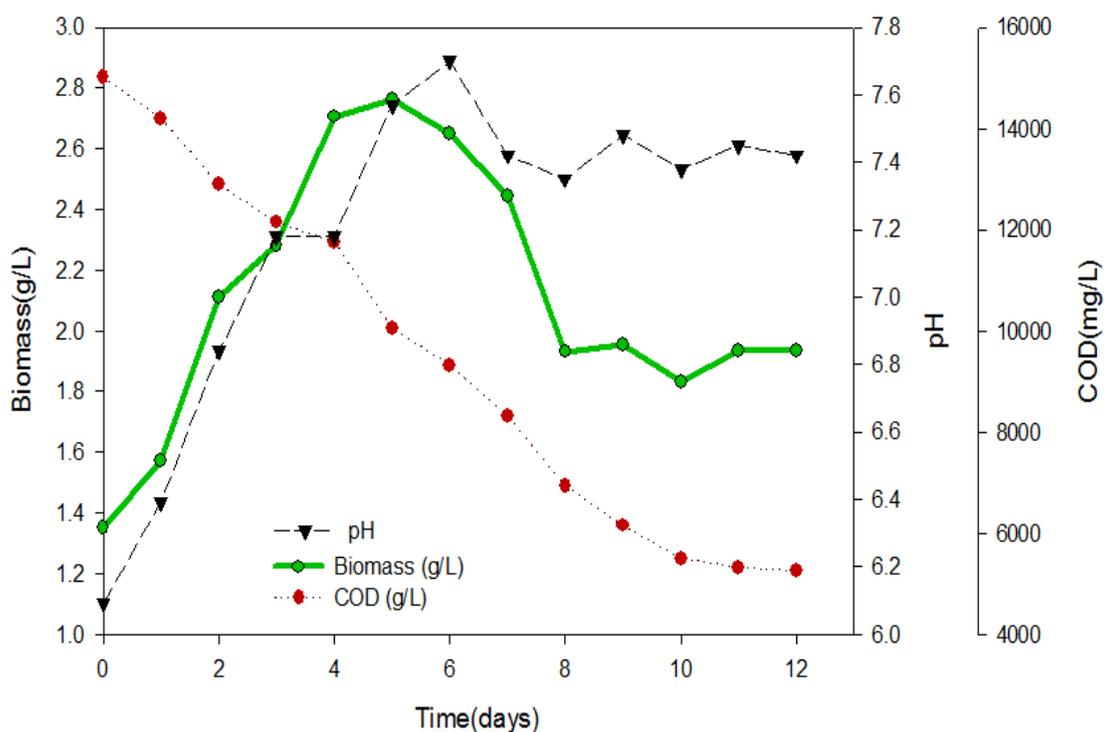


圖 4-12 5 L 中 50 % 廢水稀釋倍率之化學需氧量(COD)移除程度。

4.2.4 利用連續式反應培養綠藻並去除廢水中化學需氧量探討

水力停留時間 (Hydraulic retention time, HRT)，是實現在自然處理廢水系統中生物降解有機污染物重要的設計參數 (Luo et al., 2014)，因此本實驗設計以不同水力停留時間，進行探討連續式去除廢水中化學需氧量(COD)測試，探討化學需氧量(COD)之消耗速率 (Reduction rate) 與藻體濃度平衡之水力停留時間影響，以達連續式培養目的。

本實驗由前述批次反應實驗延伸並做比較，利用不同水力停留時間進行連續式 (Continuous) 培養，首先找出最適當之水力停留時間，測試時間分別為 HRT 10、8、5、3 天，並探討最適合綠藻生長的水力停留時間，再找出最佳的水力停留時間後，在進行降低廢水中化學需氧量(COD)之實驗，分別為(一)探討體積 1L 光合反應器中，最佳水力停留時間對於廢水中化學需氧量(COD)之降低效果，(二)將體積增加為 5L 光合反應器之放大連續式培養與改變反應形式對於廢水中化學需氧量(COD)之降低效果，作為未來產業化與經濟化培養基礎。

首先測量的是利用不同水力停留時間進行連續式培養，實驗結果如圖 4-13 顯示，已知當 *C. vulgaris* 停止對數生長期時，綠藻藻體濃度約為 1.8 g/L，以此作為藻體濃度之初始值，並開始連續餵入廢水樣品，在 HRT 10 及 8 天，綠藻的藻體濃度皆穩定的成長至 2.2 g/L，且可以持續維持綠藻濃度及維持 pH 值的穩定，但由於反應時間過長並不符合經濟效益，故不考慮 10 天與 8 天的水力停留時間，當 HRT 降為 5 天時，綠藻藻體密度在三天內生長至 2.4 g/L，雖然前期藻體濃度較不穩定，但後期還是維持在最高的藻種密度，且反應時間及 pH 值尚能接受，最重要的是此反應時間符合經濟效益，不至於太過於耗時，再來是將 HRT 降為 3 天，發現藻體濃度的累積效果上相當的不理想，推測可能原因為 HRT 3 天對於 *C. vulgaris* 而言，連續饋入廢水的速率過快，導致置換綠藻藻液速度太快而無法累積綠藻的藻體濃度，且 HRT 3 之 pH 值也相當的不穩定。透過以上實驗結果，在連續式淨化廢水的光合反應實驗上，之後進行連續式實驗探討皆以水力停留時間 5 天作為連續式反應設定之基準。

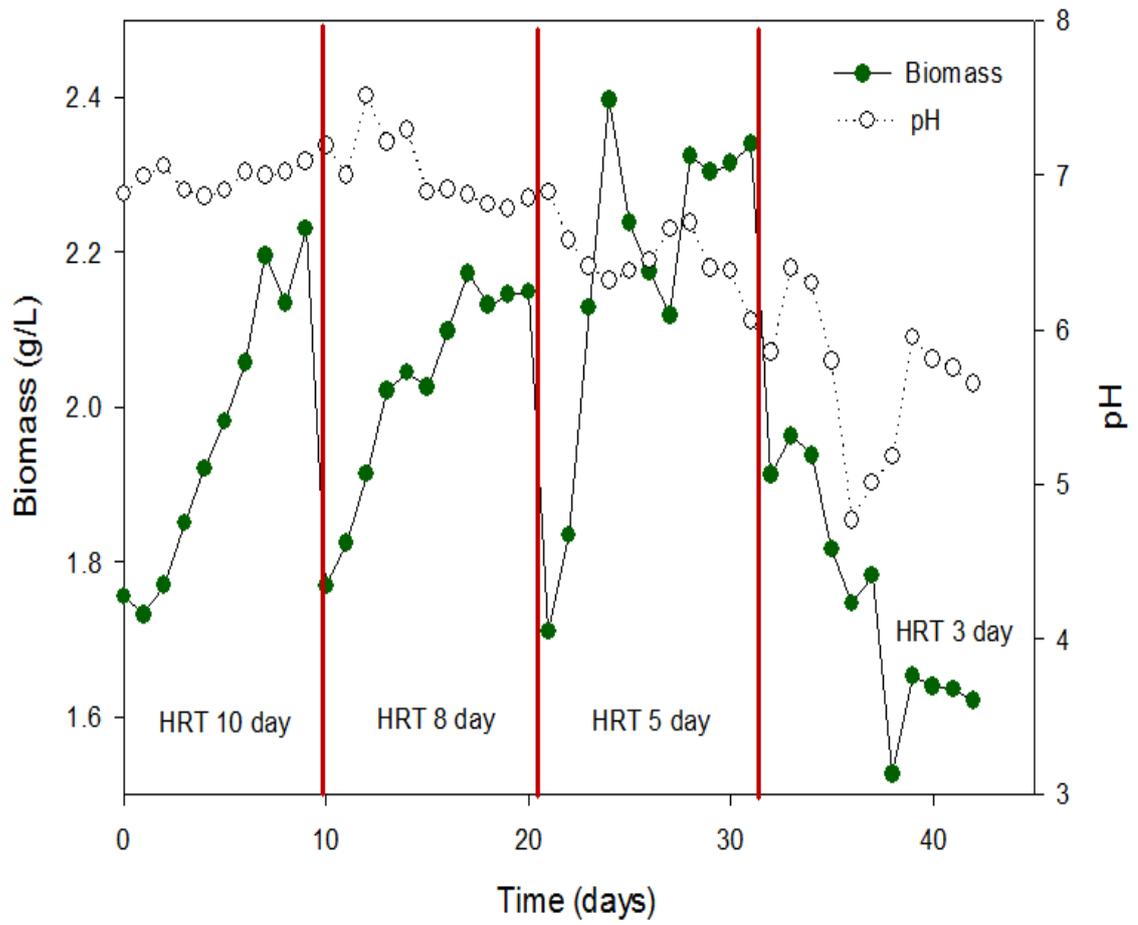


圖 4-13 1L 光合反應器以不同水力停留時間(HRT 10、8、5 及 3 天)連續式培養 *C. vulgaris* 之藻體濃度與 pH 影響。

(一) 1L 中 HRT 5 days 之化學需氧量(COD)移除程度

在測得最佳的水力停留時間後，開始探討利用連續式反應淨化廢水之效果。實驗結果如圖 4-14，首先將綠藻培養至穩定濃度 1.8 g/L，起始 pH 值為 6.0、綠藻接菌量為 1%，通入含有 2% 二氧化碳之空氣，設定 HRT 5 days 並連續饋入廢水，經由測量得知起始廢水化學需氧量(COD)約為 29000 mg/L(以粗紅線表示)，培養 10 天並觀察綠藻藻體濃度及化學需氧量(COD)變化。實驗發現化學需氧量隨著連續饋入廢液而逐漸的上升，最後約上升至化學需氧量(COD) 22000 mg/L 才穩定，其中藻體濃度約保持在起始濃度 1.8 g/L 左右，所以推測利用連續式培養 1L 反應體積十天後，一天能降低廢水中化學需氧量(COD)約為 10000 mg/L。在實驗規劃方面，並不在考慮使用更高的 HRT 設定，原因為就算廢水化學需氧量移除效果可能更好，但相對花費的反應時間也更長，此外，有鑒於 4.2.3 之結論，發現增加反應體積可以增加化學需氧量(COD)的去除量，故進而探討 5L 連續式光合反應器之降低化學需氧量(COD)效果。

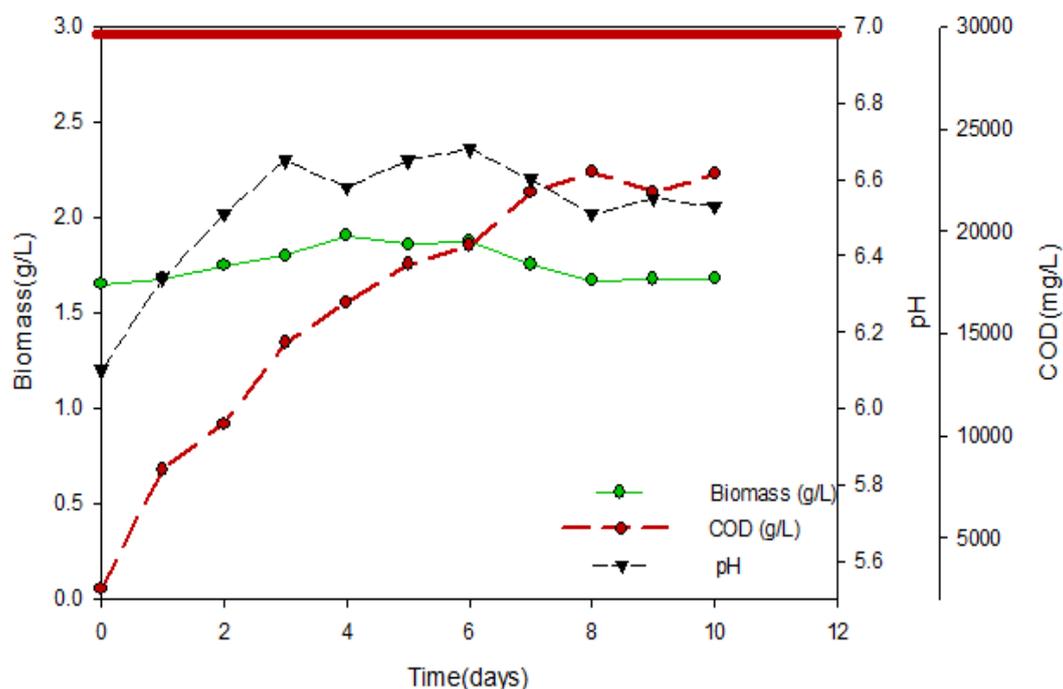


圖 4-14 1L 光合反應器以水力停留時間 HRT 5 天連續式培養 *C. vulgaris* 之藻體濃度與化學需氧量(COD)實驗。

(二) 5 L 中 HRT 5 days 之化學需氧量(COD)移除程度

實驗結果如圖 4-15，同樣先將綠藻培養至穩定濃度 1.8 g/L、起始 pH 值為 6.0、綠藻接菌量為 1%，通入含有 2% 二氧化碳之空氣，設定 HRT 5 days 並連續饋入廢水，起始廢水化學需氧量(COD)約為 29000 mg/L(以粗紅線表示)，培養 10 天並觀察藻體濃度及化學需氧量(COD)變化。此次放大體積與改變反應形式培養發現化學需氧量同樣隨著連續餵入廢水而逐漸的上升，最後約穩定於化學需氧量(COD) 15000 mg/L，藻體密度在 10 天的反應皆保持在 1.8 g/L，所以利用 5L 反應體積培養十天後，一天能降低的化學需氧量(COD)約為 14000 mg/L，故得到增加反應體積確實可以增加化學需氧量(COD)消耗量效果。並將所有的去除化學需氧量整理於表格 4-2，由實驗數據得到在利用綠藻淨化廢水這個章節，以 HRT 5 days 的連續式反應去除速率最佳。

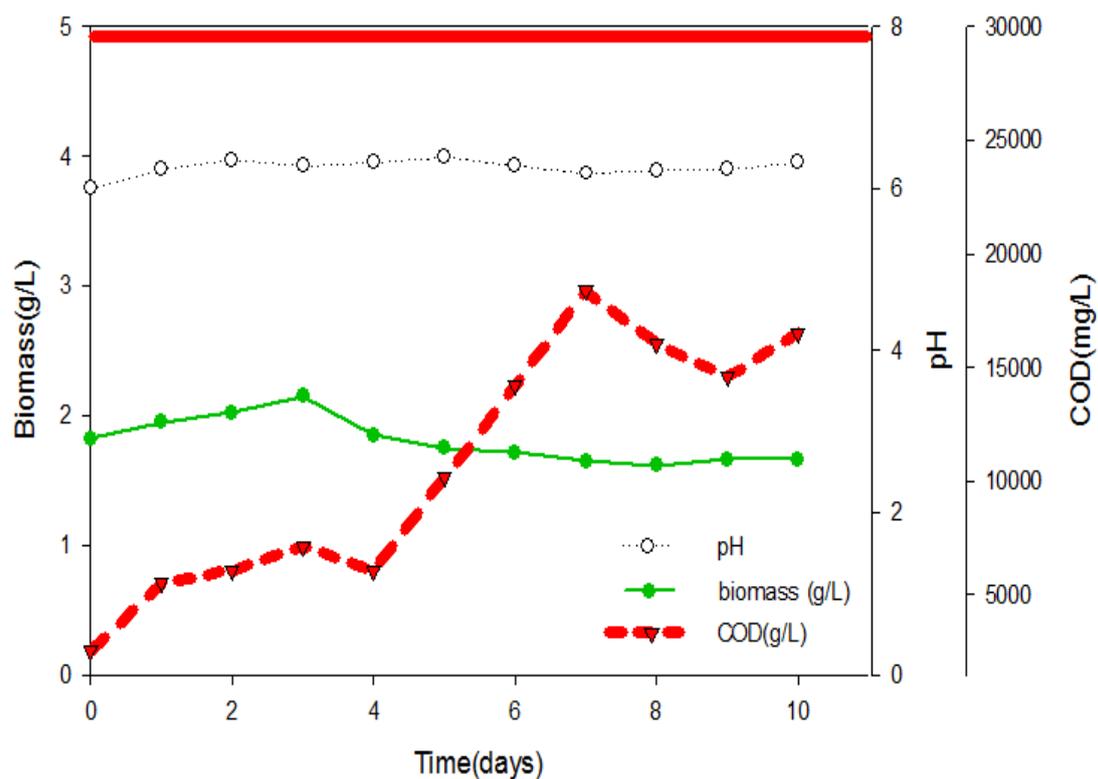


圖 4-15 5L 光合反應器以水力停留時間 HRT 5 天連續式培養 *C. vulgaris* 之藻體濃度與化學需氧量(COD)實驗。

表 4-2 5L 光合反應器以連續式、批式、放大反應培養 *C. vulgaris* 之實驗數據

	Reaction volume	Avg Biomass (g/L)	pH	COD Reduction Rate (mg/L · day)	Reduction Percentage (%)
Batch 50%	500 ml	1.7	7.0	700	47
	5 L	2.0	7.4	1000	67
Continuous HRT 5 days	1 L	1.7	6.6	10000	34
	5 L	1.9	6.4	14000	50

4.3 串聯培養實驗

4.3.1 循環共生系統黏紅酵母菌與小球藻之串聯培養

本次實驗將黏紅酵母菌 *R. glutinis* 及小球藻 *C. vulgaris* 之生物反應器相互串聯培養，回收並利用 *R. glutinis* 在發酵過程中，代謝碳源所釋出之氣體二氧化碳供給 *C. vulgaris* 作為自營培養的碳源，進而探討串聯兩生物反應器是否可達穩定且連續培養之可行性。

4.3.2 串聯 50 L *R. glutinis* 發酵槽及 20 L *C. vulgaris* 光合反應器重複饋料批次 (Repeated Fed-batch) 發酵程序

在綠色能源意識高漲下，若利用海水作為 *R. glutinis* 之培養基，可有效利用環境並產生出具有經濟價值的作物。由於 *R. glutinis* 屬好氧性菌體，在培養過程中，成極度好氧狀態代謝培養基中的碳源，累積菌體並釋出含有二氧化碳之氣體，供給 *C. vulgaris* 做為碳源。而 *R. glutinis* 所釋出之氣體中含有少量菌體及水氣，培養過程中會伴隨系統管線與 *C. vulgaris* 進行共培養 (Co-culture)，故利用棉花盡可能的阻絕菌體與 *C. vulgaris* 共同培養，因為棉花具有很強的吸水性，進而產生吸附力去除水氣或是紅酵母菌液，使兩生物反應器可經由串聯互通氣體，且各系統可獨立持續培養。兩系統串聯實驗中，綠藻的生長情形如圖 4-16，可以看出綠藻利用紅酵母所釋出的二氧化碳作為碳源並生長，顏色由原本的淺綠色，經過十天培養成深綠色，實驗數據如圖 4-17，十天的串聯培養實驗，除了探討生長情形，還要探討綠藻固碳之效果，所以當紅酵母菌體濃度維持穩定且培養基中粗甘油碳源耗盡時，洩出工作體積一半的培養基，並饋入工作體積一半含有粗甘油碳源的培養基至發酵槽中持續培養，透過重複性的饋料批次，持續使紅酵母穩定生長，並生成二氧化碳，目的為維持 *R. glutinis* 不間斷供給含有二氧化碳之氣體，其釋出之氣體曝氣至光合反應器中使 *C. vulgaris* 穩定生長，此外，串聯系統所培養之微藻 *C. vulgaris* 所生長的平均藻體濃度為 1.5 g/L；*R. glutinis* 平均生物質量為 25.3 g/L，而 *R. glutinis* 最適重複饋料時間分別為 4 天及 7 天。對綠藻而言，碳源（二氧化碳）的濃度有絕對的影響性，曝入之空氣中含有 15% CO₂ (v/v)，

將會抑制綠藻生長，而曝入之空氣中含有 5 % CO₂ (v/v)，綠藻則能累積較高濃度 (Yun et al., 1997)，而 *C. vulgaris* 經由前人實驗曝入之空氣中含有約 2 % CO₂ (v/v)，為適合生長的碳源濃度。為了分析綠藻固碳之效果，利用氣相層析儀分析 *R. glutinis* 及 *C. vulgaris* 釋出之氣體，由圖 4-17 數據顯示，*R. glutinis* 釋出之氣體，在豐富的碳源提供下，CO₂ 含量大約為 1.9%，每天可產出 4.27 kg CO₂；而經由微藻固碳後，*C. vulgaris* 釋出之 CO₂ 含量大約為 0.3 %，每天可固定 1.52 kg CO₂ 並生成綠藻細胞，故此系統綠藻 *C. vulgaris* 可有效固定 *R. glutinis* 所釋出之 CO₂ 達 35.6 %，但是實驗後期發現綠藻藻細胞測不出藻體密度的增加，但還是持續代謝 CO₂，認為是因為許多藻體生長在管壁以及內層檔板上，使得所測出的藻體密度無法上升。最後將結果整理於表 4-3 中，結果顯示，每一克的紅酵母每天約產生 0.142 kg CO₂，而每一克綠藻每一天約可以消耗掉 1.08 kg CO₂，因此本次串聯培養系統可有效利用好氧系統排放之二氧化碳達到系統幾近淨排放及循環共生之目的。

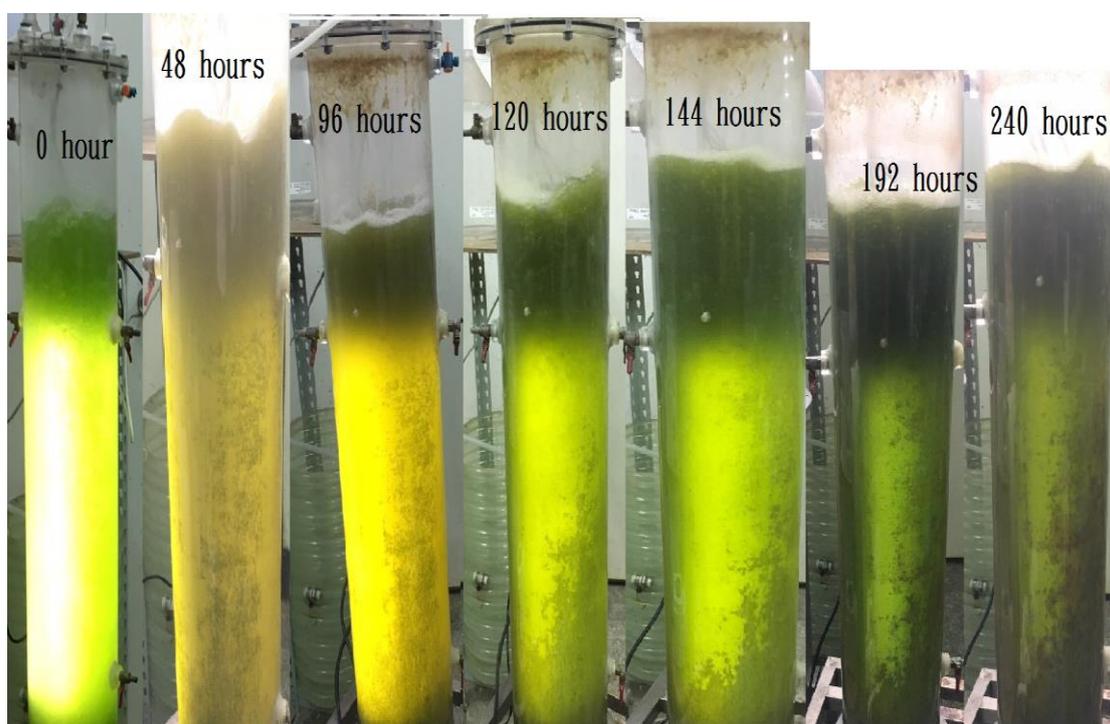


圖 4-16 串聯培養實驗中，20L 綠藻光合反應器培養情形實驗。

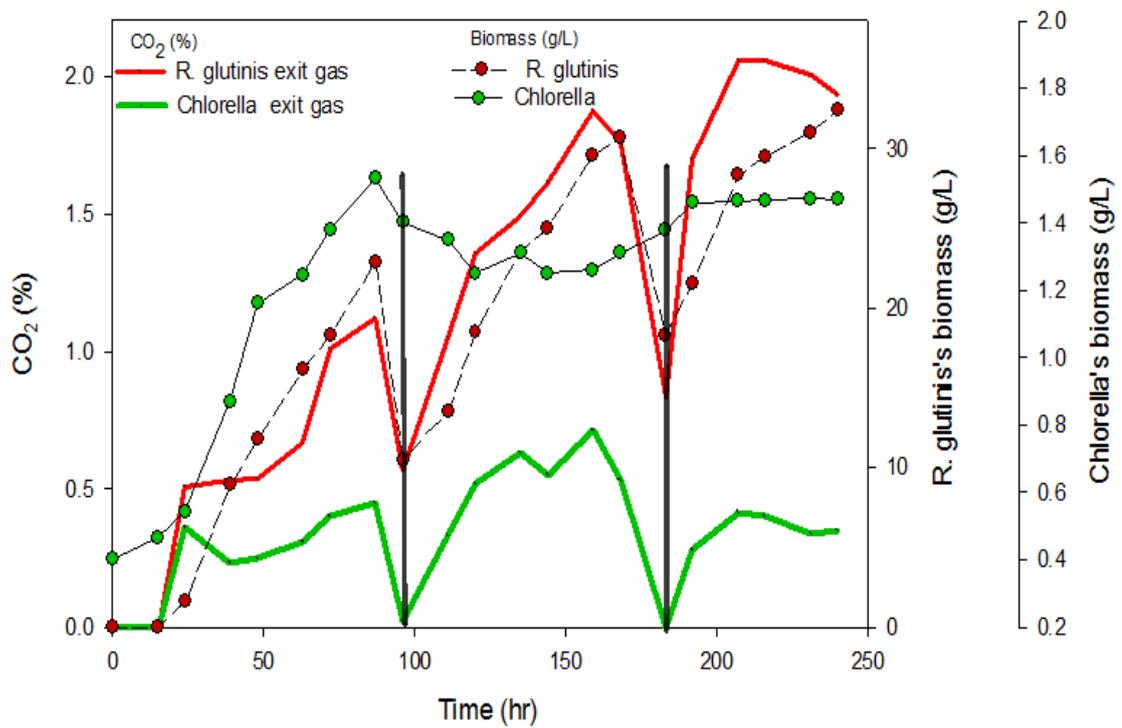


圖 4-17 串聯培養實驗中，微藻與紅酵母之生長情形與二氧化碳濃度趨勢。

表 4-3 串聯 50 L *R. glutinis* 發酵槽及 20 L *C. vulgaris* 光合反應器整理。

	<i>R. glutinis</i>	<i>C. vulgaris</i>
菌體 / 微藻 密度 (g/L)	25.3	1.5
CO ₂ (%)	2.0	0.3
kg CO ₂ · Day ⁻¹	4.27	1.52
kg CO ₂ · Day ⁻¹ / g Biomass	0.142	1.08

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本次實驗分為三大部分進行結論探討：(I) 探討 *C. vulgaris* 細胞內之還原酵素與抗氧化物谷胱甘肽(GSH)之移除 Cr(VI)關係；(II) *C. vulgaris* 降低廢水中化學需氧量之探討；(III) 黏紅酵母菌 *R. glutinis* 與小球藻 *C. vulgaris* 之串聯培養探討。綜合上述實驗結果，整理出以下幾點結論：

(I) 探討 *C. vulgaris* 細胞內之還原酵素與抗氧化物谷胱甘肽(GSH)之移除 Cr(VI) 關係

首先由 *C. vulgaris* 去除 Cr(VI)的實驗中，發現溶液內出現微量的三價鉻，固探討還原酵素與抗氧化物谷胱甘肽(GSH)在綠藻中影響重金屬還原的效果，以及在反應中扮演的角色，發現谷胱甘肽會影響六價鉻的濃度，以及谷胱甘肽濃度越高，會還原越多的 Cr(VI)，且還原速率越快，但若是在 *C. vulgaris* 還原酵素與谷胱甘肽同時去除 Cr(VI)反應中，得到反應以酵素為優先，直到酵素完全用完或是綠藻藻體細胞死掉後才可能會和釋放出來的谷胱甘肽反應，也說明了三價鉻生成的原因。

(II) *C. vulgaris* 降低廢水中化學需氧量之探討

1. 在選擇廢水的樣品中，探討利用粗甘油碳源培養紅酵母與葡萄糖碳源培養紅酵母兩者的上清液來培養 *C. vulgaris* 之可行性探討，實驗結果顯示，含有粗甘油的廢液並不適合做為 *C. vulgaris* 的培養環境，推測此廢水樣品中含有某些粗乾油內未知的元素，抑制了 *C. vulgaris* 的藻體生長，而葡萄糖碳源培養紅酵母上清液並不會影響 *C. vulgaris* 藻種生長，且是適合微藻生長的環境，故選擇葡萄糖碳源培養紅酵母上清液為廢水樣品，且測出此廢水樣品含有非常多的化學需氧量(COD)，大約是 30000 mg/L。

2. 探討批次 (Batch) 反應及稀釋倍率培養 *C. vulgaris* 並降低廢水中化學需氧量實驗，實驗結果顯示，利用批次培養 *C. vulgaris* 過程中，綠藻濃度會先上升至 2.0 g/L 以上再降低至 1.8 g/L，推測藻體濃度 2.0 g/L 非為穩定值，而是因為批次反應前期就投入大量的廢水，導至藻體生長快速，或是廢水背景值影響使得反應初始測出濃度過高，在反應中後段，也就是在廢水化學需氧量降低後，藻體濃度才下降並穩定於 1.8g/L，反應十天約下降化學需氧量 7000 mg/L；在稀釋倍率實驗中，以 50 % 廢水稀釋倍率為批次反應的條件，能達成快速使綠藻濃度上升至穩定值，且在廢水的使用量也符合經濟效益。
3. 探討連續式 (Continuous) 反應及水力停留時間(HRT)培養 *C. vulgaris* 降低廢水中化學需氧量探討，實驗結果顯示，利用連續式培養 *C. vulgaris* 過程中，因為連續饋入廢水樣品，使得水中化學需氧量隨著時間而增加，直到與綠藻濃度消耗平衡才穩定，反應十天後，一天約下降化學需氧量 14000 mg/L，在水力停留時間(HRT)實驗中，以 HRT 5 天為最佳的綠藻藻體累積時間，雖然 HRT 越長綠藻藻種可以生長得越穩定，但反應時間過長並不符合經濟效益，故選擇 HRT 5 天為連續饋入廢水反應的最佳設定條件。
4. 批次 (Batch)、連續式 (Continuous) 改變反應體積與反應形式探討，實驗結果顯示，以反應時間為十天作為基準，發現連續式放大培養體積與改變培養形式能降低更多的廢水中化學需氧量，目前測得最佳的連續式反應去除速率為 14000 mg/L · day，約為去除 50 % 化學需氧量。

(III) 黏紅酵母菌 *R. glutinis* 與小球藻 *C. vulgaris* 之串聯培養探討

此串聯系統可利用棉花有效阻隔 *R. glutinis* 經由管線與 *C. vulgaris* 進行共培養，使兩系統可相互串聯獨自培養，而連續串聯實驗中，*R. glutinis* 的最佳重複饋料時間分別為 4 天及 7 天，且 *C. vulgaris* 可有效固定此串聯系統中 *R. glutinis* 所釋出氣體中之二氧化碳達 35.6 %，實驗結果顯示，每一克的紅酵母每天約產生 0.142 kg CO₂，而每一克綠藻每一天約可以消耗掉 1.08 kg CO₂，此一串聯培養系統可有效利用好氧系統排放之二氧化碳達到系統幾淨排放及循環共生之目的。

5.2 未來展望

對於實驗後續研究，分別以放大系統串聯培養同時進行微藻去除重金屬及微藻降低廢水中化學需氧量(COD)結合延伸探討：

首先，可以探討利用系統串聯培養實驗，透過放大反應體積培養去了解對於Cr(VI)之去除的最佳化條件；之後進而探討利用微藻同時降低廢水化學需氧量(COD)的部份，亦可找尋更適合降低廢水化學需氧量之微藻以及探討不同初始接菌量對廢水淨化之影響，或是利用改變培養環境的方法，因為有文獻指出在特定酸鹼環境下可以提升綠藻對降低廢水化學需氧量的程度，但是此環境可能會抑制了藻種的生長，所以可以找尋最佳的實驗條件；最後，若能將串聯培養系統放大培養與微藻去除重金屬並同時降低水中需氧量，此實驗合併不僅具有循環串聯培養系統之好處及優點，且利用微藻達成工業廢水處理之目標，並滿足系統循環共生減碳及去除汙染之目的。

參考文獻

- 吳培堯、劉沛宏、許益源、陳怡君、楊致行。台灣土壤及地下水環境保護協會 T ASGEP Newsletter 第二十二期 第 4 頁-第 8 頁, 2007。
- 陳品妘(2015)。黏紅酵母菌與小球藻之串聯培養與小球藻對於重金屬鉻去除之可行性探討。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 施金杉(2013)。探討蛇管光合反應器自營培養小球藻與超臨界流體技術轉酯生成生質柴油之研究。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 陳儷娟(2013)。探討共培養黏紅酵母菌與柵藻對藻體生長與油脂累積之影響。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 翁煥廷(2014)。廢水處理系統操作問題排除，經濟部工業局環境保護中心質量平衡圖計算分析與操作問題排除講習班講義，共 106 頁。
- 陳聖文(2013)。污水處理廠水再生利用應用於基隆地區之可行性研究，經濟部水利署水利規劃試驗所專題報導，共 3 頁。
- 張家源(2003)。污水工程—中洲污水處理廠，嘉南藥理科技大學環境工程與科學系上課講義，共 43 頁。
- 張怡塘(2009)。環境微生物實驗第五版。高立圖書有限公司。
- 謝誌鴻、吳文騰(2009)。綠色生質能源。科學發展，433 期，36-41。
- 鄭俊明(2007)。微藻產業。科學發展，415 期，34-40。
- 劉翠玲、許嘉伊(2011)。藻類應用，商機無限；全球水產藻類發展現況與趨勢。全球綠色商機與農業發展趨勢。系列 5-9
- 李光中、劉新校、侯佳慧(2012)。淺談利用微藻固定 CO₂ 實現碳減排。桃園縣大學校院產業環保技術服務團，環保簡訊，第 16 期。
- 鄒樹平(2007)。微藻的綜合開發利用。水產科學，第 26 卷，第三期，179-181。
- 侯嘉龍(2010)。綠色寶藏-綠藻的開發與應用。化工，第 57 卷，第 2 期，53-64。
- Ai W., Guo S., Qin L., Tang Y.(2008). Development of a ground-based space micro-algae photo-bioreactor. *Advances in Space Research* Vol.41, 742-747.
- Abdullahi Balarabe Sallau, Hauwa Mairo Inuwa, Sani Ibrahim and Andrew Jonathan Nok.(2014) Isolation and Properties of Chromate Reductase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Modern Cellular and Molecular Biology*, 3(1): 10-21

- Bhagwat Prasad Rath, Sasmita Das, Pradeep Kumar Das Mohapatra, Hrudayanath Thatoi. (2014) Optimization of extracellular chromate reductase production by *Bacillus amyloliquefaciens* (CSB9) isolated from chromite mine environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 335–41.
- Changling Li, Hailin Yang, Xiaole Xia, Yuji Li, Luping Chen, Meng Zhang, Ling Zhang, Wu Wang, (2013). High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. *Bioresource Technology* 127 248–255.
- Chirayu Desai, Kunal Jain, Datta Madamwar (2008). Hexavalent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr(VI) contaminated industrial landfill. *Process Biochemistry* 713–721.
- C.H. Park, M. Keyhan, Wielinga, S. Fendorg, Martin. (2000). Purification to Homogeneity and Characterization of a Novel *Pseudomonas putida* Chromate Reductase. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1788–1795
- Daniela Giustarini, Dimitrios Tsikas, Graziano Colombo, Aldo Milzani, Isabella Dalle-Donne, Paolo Fanti, Ranieri Rossi. (2016). Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of Chromatography B* Volume 1019, Pages 21–28
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage*, Elsevier, 49:2106–2116.
- David Dah-Wei Tsai, Paris Honglay Chen, Rameshprabu Ramaraj. (2017). The potential of carbon dioxide capture and sequestration with algae. *Ecological Engineering* 98-17–23.
- Eduardo Bittencourt Sydney, Alessandra Cristine Novak, Julio Cesar de Carvalho, Carlos Ricardo Soccol (2014). *Respirometric Balance and Carbon Fixation of Industrially Important (Algae)*. Biotechnology Division, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil. CHAPTER 4.
- Francisco, R., Moreno, A., Vasconcelos Morais, P. (2010). Different physiological responses to chromate and dichromate in the chromium resistant and reducing strain *Ochrobactrum tritici* 5bv11. *BioMetals*, 23, 713-725.
- Fares A. AlMomania, Banu Örmecib. (2016) Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering* 95 - 280–289.
- Ghulam Mujtaba, Muhammad Rizwan, Kisay Lee (2016). Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. JIEC 3265 No. of Pages 7
- Hala Yassin El-Kassas, Laila Abdelfattah Mohamed. (2014). Bioremediation of the

- textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. *Egyptian Journal of Aquatic Research* , 40, 301–308.
- He, Jinsong, Chen, J. Paul. (2014). A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*, 160, 67-78.
- Ibrahim, W.M. (2011). Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. *J. Hazard. Mater*, 192 (3), 1827–1835.
- John Geraldine Sandana Mala1, Dhanasingh Sujatha, Chellan Rose.(2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research* 170, 235–241.
- Kleinubing, S.J., Silva, E.A., Silva, M.G.C., Guibal, E. (2011). Equilibrium of Cu(II) and Ni(II) biosorption by marine alga *Sargassum filipendula* in a dynamic system: competitiveness and selectivity. *Bioresour. Technol*, 102 (7), 4610–4617.
- K.SureshKumar,Hans-UweDahms,Eun-JiWon,Jae-SeongLee,Kyung-HoonShin.(2015)Microalgae –A promising tool for heavy metal remediation. *EcotoxicologyandEnvironmentalSafety*113, 329–352.
- Luo Y, Guo W, Ngo H.H, Nghiem L.D, Hai F.I, Zhang J, Liang S, Wang X.C. (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 473–474.
- Morales-Barrera, L. and Cristiani-Urbina, E. (2008). Hexavalent chromium removal by a *Trichoderma inhamatum* fungal strain isolated from tannery effluent. *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 187, no. 1–4, 327–336.
- Ming-sheng Miao , Xu-dong Yao , Li Shu , Yu-jie Yan , Zhen Wang , Na Li ,Xiao-tong Cui , Ya-min Lin , Qiang Kong.(2016). Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 113 , 120-125
- M. A. Raggi* / R. Mandrioli / E Bugamelli / C. Sabbioni.(1997) Comparison of Analytical Methods for Quality Control of Pharmaceutical Formulations Containing Glutathione. *Chromatographia* Vol. 46, No. 1/2.
- Patterson, J.W., Shugaba, A., Stoneham, MA., Buba, F., Kolo, B.G., Nok, A. J., Ameh, A.D. and Lori, J.A. (2012). Uptake and reduction of hexavalent chromium by *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, vol. 3, no. 3, 1–8.
- Plaza Cazon, J., Bernardelli, C., Viera, M., Donati, E., Guibal, E. (2012). Zinc and cadmium biosorption by untreated and calcium-treated *Macrocystis pyrifera* in a batch system. *Bioresour. Technol*, 116, 195–203.
- Qingjie Hou , Haiyan Pei, Wenrong Hua, Liqun Jiang , Ze Yua(2016). Mutual facilitations of food waste treatment, microbial fuel cell bioelectricity generation

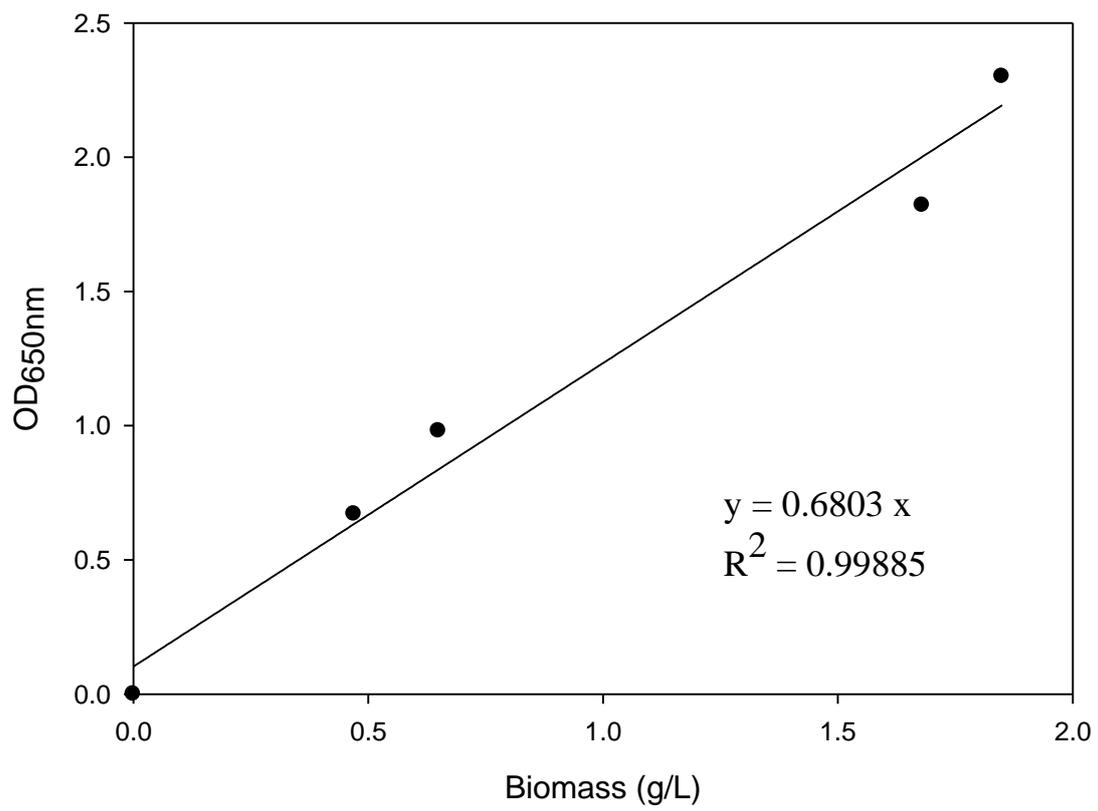
- and *Chlorella vulgaris* lipid production. *Bioresource Technology* 203 , 50–55
- Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L., Munoz, J.A. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresour. Technol*, 98 (17), 3344–3353.
- Rai L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. *Biol Rev*, 56, 99-151.
- Santos, C.A., Ferreira, M.E., Lopes da Silva, T., Gouveia, L., Novais, J.M., Reis, A. (2011). A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 38, 909–917.
- Santos, C.A., Caldeira, M.L., Lopes, T., Novais, J.M., Reis, A. (2013). Enhanced lipidic algae biomass production using gas transfer from a fermentative *Rhodospiridium toruloides* culture to an autotrophic *Chlorella protothecoides* culture. *Bioresource Technology*, 138, 48–54.
- Saidur,R.(2010).Energy, economics and environmental analysis for chillers in office buildings. *Energy Educ Sci Technol Part A*. 25:1-16
- Shugaba, A., Buba, F., Kolo, B. G., Nok, A. J., Ameh, D. A. and Lori, J. A. (2012). Uptake and reduction of hexavalent chromium by *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, vol. 3, no. 3, pp. 1–8.
- Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, RF., Konopka, AE. (2002). Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3859–3866.
- Vajpayee, P., Sharma, SC., Tripathi, RD., Rai, UN., Yunus, M. (1999). Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere*, 39, 2159–2169.
- Valls, M., Atrian, S., Lorenzo, V. and Fern´andez, L.A. (2000). Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 6, 661–665.
- Xiaochen Ma, Hongli Zheng, Min Addy, Erik Anderson, Yuhuan Liu, Paul Chen, Roger Ruan.(2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in wastewater with waste glycerol:Strategies for improving nutrients removal and enhancing lipidproduction. *Bioresource Technology* 207, 252–261.
- Xu L, Luo M, Li W, Wei X, Xie K, Liu L, Jiang C, Liu H. (2011). Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 1169-1176.

- Yue Wang , Shih-Hsin Ho.(2016). Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology* 222, 485–497
- Yue Wang , Wanqian Guo, Hong-Wei Yen, Shih-Hsin Ho, Yung-Chung Lo, Chieh-Lun Cheng ,Nanqi Ren, Jo-Shu Chang(2015). Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology* 198, 619–625.
- Zheng, Y.M., Liu, T., Jiang, J.W., Yang, L., Fan, Y.P., Wee, A.T.S., Chen, J.P. (2011). Characterization of hexavalent chromium interaction with *Sargassum* by X-ray absorption fine structure spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and quantum chemistry calculation. *J. Colloid Interface Sci*, 356 (2), 741–748.

附錄

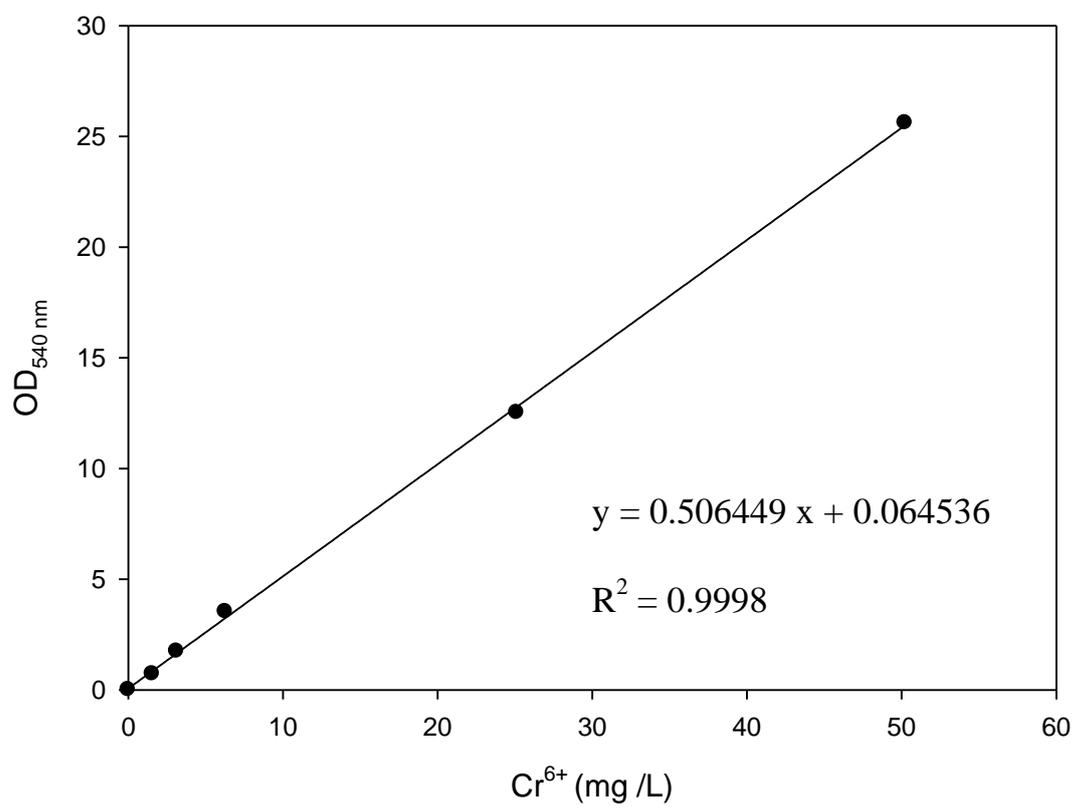
附錄 A

藻體乾重 (biomass) 檢量線



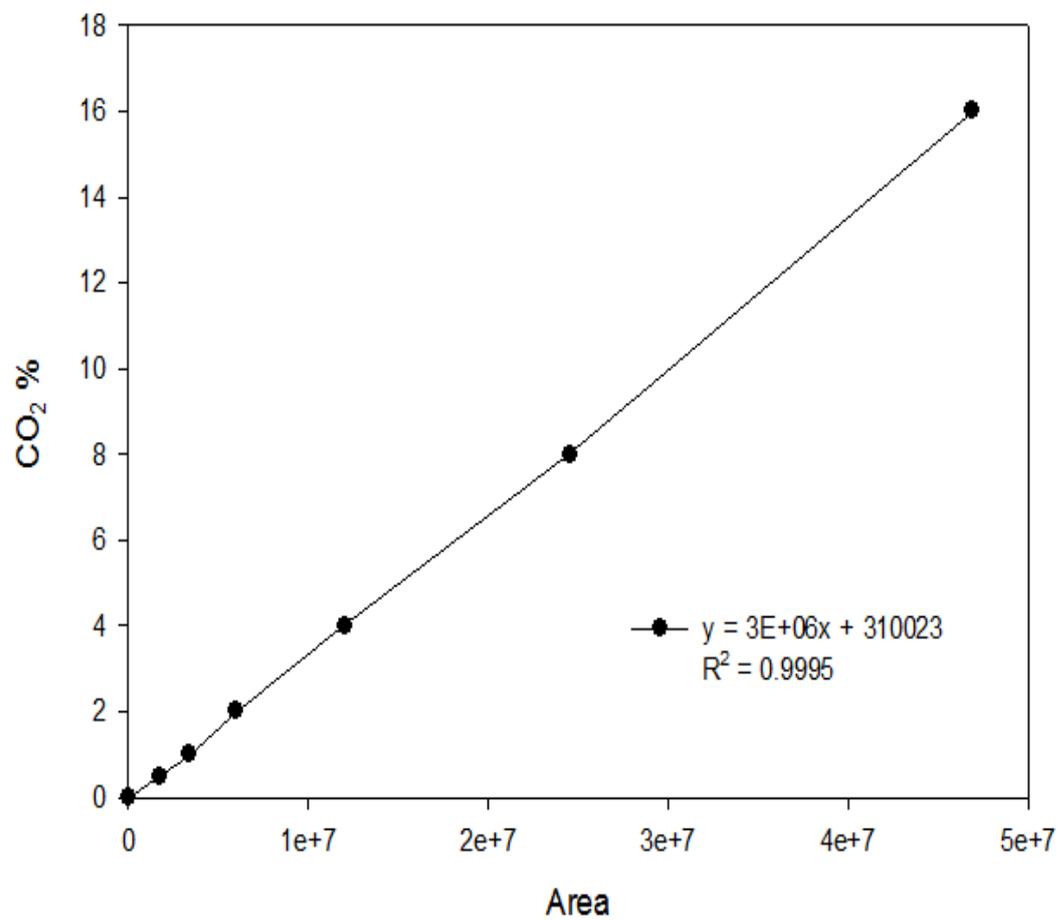
附錄 B

六價鉻檢量線



附錄 C

二氧化碳檢量線



附錄 D

谷胱甘肽(GSH)檢量線

