

科技部專題研究計畫成果報告

計畫編號：MOST 104-2313-B-157-001-MY3

執行期限：104年08月01日至107年07月31日

主持人：鍾竺均 中華科技大學 生物科技系

計畫參與人員：謝敏琪、鄭秋玉、林思婷、何憫瑛

一、中文摘要

鉻是常見的工業物質，常廣泛應用於電鍍(如鍍鉻)、耐合金(如鋼製品)、皮革制革與染料生產。鉻之形式從Cr(IV)到Cr(VI)，其中在自然界以Cr(VI)和Cr(III)的形式存在，其中六價鉻具有毒性與致突變性，其亦具有高度的可溶性。利用專一性微生物對於特定污染物之耐性或活性，在代謝污染物同時進行產電，而釋出之「訊號」與污染物「濃度」之關聯性，變成商業化可用之微機電裝置。本實驗室獲得一株厭氧*Exiguobacterium* sp. YC152，其對低、中濃度Cr⁶⁺具有高度還原力，以微生物燃料電池之角度，陽極環境一般都需在厭氧條件，因此，此菌若能在厭氧條件下還原Cr⁶⁺，並對環境及毒性具有高耐性，便顯現出其極大之「應用」價值。研究結果顯示，*Exiguobacterium* sp. YC152在厭氧下生長、去除鉻及產電效果較好氧佳，最適生長溫度為中溫條件，最適pH範圍為微鹼性。最適導線與電極材料為鉑塗覆石墨氈電極與白金導線組合，敏感度最佳。最佳陰極與陽極配方分別為50 mM PB + 100 mM NaCl與未稀釋之LB。本系統可於1小時內穩定偵測六價鉻，並可利用濃度0~4 mg/L與4~20 mg/L之兩條回歸方程式精確測得檢體中六價鉻之濃度。

ABSTRACT

Chromium is extensively used in electroplating (as chromeplating), resistant

alloys (e.g., stainless steel), leather tanneries and dye productions. Hexavalent chromium (Cr⁶⁺) is a priority toxic, mutagenic and carcinogenic chemical. Therefore, Cr (VI) concentration existed in the effluent was stipulated by the law/regulation. Microbial fuel cell (MFC) can purify wastewater, produce electricity, and be as a biosensor. An anaerobic *Exiguobacterium* sp. YC152 isolated from Cr (VI) containing wastewater can effectively reduce Cr⁶⁺. According to the literature, *Exiguobacterium* sp. grew in a wide range of temperature and pH, and highly endured to the salt, UV irradiation, and heavy metals. Hence, *Exiguobacterium* sp. YC152 has a high potential as biological components of MFC-type biosensor based on its physiological properties. Results indicated the growth rate, Cr⁶⁺ removal and electricity generation of *Exiguobacterium* sp. YC152 were excellent under the anaerobic condition. The optimal temperature and pH for *Exiguobacterium* sp. YC152 were mesophilic temperature and slightly alkaline. The optimal ingredients of anolyte and catholyte were the mixture containing 50 mM PB and 100 mM NaCl, and LB broth, respectively. The Cr⁶⁺ concentration in water samples could be fast measured in 1 h by two regression equations between Cr⁶⁺ concentration and voltage output. Thus, the MFC-type biosensor might become a good instrument for measuring Cr⁶⁺

concentration in water.

二、緣由與目的

鉻在環境中常以 Cr^{3+} [Cr(III)] 與 Cr^{6+} [Cr(VI)] 之形式存在， Cr^{3+} 常是生物重要之營養物， Cr^{6+} 則相反常對生物具有毒性，其在生物體所產生之毒性主要是因為其容易通過細胞膜。經由動物實驗證實，六價鉻具有致癌性及致突變性，可能導致癌症發生(例如：肝癌、胃癌)，美國環保署(USEPA) 甚至將其認定為最危害人類17種物質之一。

含鉻廢水之來源包括：金屬精鍊廢水、化學製程廢水、採礦廢水、陶瓷製程廢水及皮革製程廢水，許多國家在追求工業發展之際，常常輕忽環保問題，常直接或間接排放含鉻之廢水至水體，或未謹慎有效處理此類廢污水，導致水體殘留一定濃度之 Cr^{6+} 化合物，因此，水體或放流水中 Cr^{6+} 濃度之檢測/監測有其必要性。目前對於鉻金屬離子之分析方法或技術，包括：原子吸收光譜法(AA)、感應耦合電漿法(ICP)、離子層析法(IC)、比色法或其他複合技術。這些化學技術具有高靈敏度、高選擇性與高準確度之優點，其缺點是無法在現場(野外)使用、需熟練的操作人員、較複雜的預處理、較長之測量時間與相對昂貴之價格。因此，發展一套可在現場使用、操作簡單、測量時間短與相對便宜之系統有其必要性。

生物感應器(biosensor)具有操作簡單、價格低廉、反應速度快與攜帶方便之特性，同時具有即時、線上與連續監測之潛力，因此成為傳統化學法之替代選項。其中以「微生物」為元件之生物感應器，最具應用潛力，並已被廣泛應用於環境監測、食品及發酵工業與臨床診斷。目前生物感應器，已應用於偵測 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、

Fe^{3+} 、 As^{3+} 、 Sb^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^+ 與 Au^{3+} 等金屬離子之偵測，唯獨對於檢測水體 Cr^{6+} 濃度之研究非常有限，即便作了一些嘗試也遇到應用上的瓶頸。

本實驗室經過3個月之馴養與篩選，獲得一株「厭氧」鉻酸鹽還原菌，經DNA定序後暫時命名為 *Exiguobacterium* sp. YC152，其對低、中濃度 Cr^{6+} 具有高度還原力(本研究未來應用對象主要在放流水監測並非處理，因此，無須篩選對高濃度 Cr^{6+} 具耐受性之菌株)。根據文獻，*Exiguobacterium* sp. 可生長於相當廣泛之溫(-12°C-55°C)，對於鹽分、UV照射及重金屬有高耐性，並且可生存於廣泛的pH(4-11)。以微生物燃料電池之角度，陽極環境一般都需在厭氧條件下操作，因此，這株能在厭氧條件下還 Cr^{6+} ，並對環境及毒性具有高耐性之微生物，便顯現出其極大之「應用」價值，因為其可以直接植種於厭氧之陽極槽(做為微生物感應器之元件)，並且在某 Cr^{6+} 濃度範圍，顯示濃度與電流(電壓)正比關連性，另外 *Exiguobacterium* sp. 之特性，正好適用於多變水體/水質之監測應用，具有發展為監測 Cr^{6+} 之微生物燃料電池生物感應器(MFC-type biosensor)之潛力。本年度計畫具體目標包括：完成菌株基本特性之分析、 Cr^{6+} MFC-type biosensor系統之組裝(批次)、MFC最佳操作條件之建立與MFC系統各種檢測特性之評估。

三、研究方法

3.1 植種菌株來源

以桃園某電鍍廠污泥、廢水與附近土壤作為六價鉻還原菌之篩選對象。原始菌株經過分離、馴養(以化學恆定器chemostat進行菌株篩選，以低濃度至高濃度逐次通入 K_2CrO_4 ，定時塗盤，直到優勢菌落出現)與

基本功能測試(Cr^{6+} 之還原能力、是否導電與需氧狀況)後，獲得一株厭氧之六價鉻還原菌，此菌可作為本研究微生物燃料電池生物感應器之植種菌種(文獻記載選擇親電性菌株可降低電子梭費用與避免毒性問題)。將此菌純培養後以甘油小管保存，提供將來研究使用。

3.2 植種菌株鑑定

3.2.1 總DNA萃取

將導電菌株加入25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH=8.0)和0.05 M Glucose 混合均勻後，再各別加入Lysozyme (1 mg/L), Proteinase K (0.2 mg/L), 1% SDS, 1% CTAB, 0.75 M NaCl 於適當溫度下反應，藉以破壞與分解其細胞壁、蛋白質及多醣；隨後再加入同體積25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamyl 於7,000 rpm離心，除蛋白質及多醣，再加入同體積之24:1 Chloroform/Isoamyl於7,000 rpm離心，去除phenol，隨後加入0.6 體積之Isopropanol 於 -20°C 下反應以沈澱DNA。再以酒精去除鹽類後乾燥，最後將DNA 樣本重新溶於水中即可得到微生物的總DNA。

3.2.2 聚合酵素鏈反應(PCR)與產物的純化

取適量的PCR Master Mix 及適量稀釋的genomic DNA，混合後置於DNA Thermal Cycler (Stratagene RoboCycler Gradient 96)進行反應。溫度週期包括： $95^{\circ}\text{C}/10\text{ min}/1\text{ cycle}$ ，接著 $95^{\circ}\text{C}/30\text{ sec}$ 、 $58^{\circ}\text{C}/50\text{ sec}$ 、 $72^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$ ，及 $72^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ 。而聚合酶鏈反應(PCR)產物純化乃是利用QIAGEN的QIAquick PCR Purification Kit進行之。

3.2.3 16S rDNA 之選殖與定序

將已經膠體純化後的16S rDNA PCR產物加入Ligase buffer、T4 Ligase與去離子水，置於 16°C ，過夜後加入200 μL *E. coli*菌液，培養約30分鐘，其後將此菌液加入37

$^{\circ}\text{C}$ 下預熱之SOC培養基，培養約一小時，其後取適量菌液塗於充滿IPTG及X-gal各20 μL 之LB/AP培養基，培養過夜後取白色菌落於新之LB培養基，利用M13 PCR將標的序列大量複製。DNA定序乃是委託廠商進行分析。取得序列分析結果再自行與NCBI 網站之基因資料庫中加以比對，分析其序列與其他菌種間的相關性、相似度，便可清楚得知所定序微生物之學名及其在分類學上的相關位置。在預備實驗中，經過3 個月後篩選到一株厭氧之鉻酸鹽還原菌，經DNA 定序後暫時命名為 *Exiguobacterium* sp. YC152。

3.3 菌株生長特性分析

(1)利用鉻酸鹽培養基(LB外加1 mM K_2CrO_4 as Cr^{6+} 52 mg/L)於pH 7.0、 30°C 與厭氧狀況，以光密度(OD)及塗盤方式，測定 *Exiguobacterium* sp. YC152菌株之生長曲線及計算比生長速率(μ)，所得之對數生長期(log phase)時間，可作為未來接種時間。

(2)取對數生長期後期之 *Exiguobacterium* sp. YC152 菌株，接種於pH 最後調整為6~11之鉻酸鹽培養基中，進行厭氧培養，測定接種2天後之微生物數目，求其最佳生長pH。

(3)取對數生長期後期之 *Exiguobacterium* sp. YC152菌株，接種於鉻酸鹽培養基(pH暫設定為10)中，進行厭氧培養，溫度條件設定為 $20\sim 45^{\circ}\text{C}$ 之環境條件，測定接種2天後之微生物數目，求其最佳生長溫度。

3.4 微生物燃料電池型 Cr(VI) 生物感應器/ 組裝構型(Cr^{6+} MFC-type biosensor)

壓克力材質，外觀 $8\times 8\times 8\text{ cm}^3$ 正方形結構，中間以Nafion 117離子交換膜(Dupont Co., USA)分為陰陽極兩槽，每槽體積約為256 mL，陰陽極皆以碳布(carbon cloth) (Pham et al., 2004)作為電極($6\times 6\text{ cm}^2$)，以白

金作為導線(ID=0.5 mm)，可變電阻作為外電阻，陰陽極側邊與上方皆預留孔洞。陽極孔洞作為進流、植菌、出流與測定水質使用(ORP、pH、BOD、DO、Cr⁶⁺、菌數、Cr³⁺)，陰極孔洞作為添加無機溶液、曝氣與出氣使用。進流水先通氮除氧後以蠕動幫浦定流速導入陽極，空氣則以幫浦經流量計定量後通入陰極(暫訂20 mL/min)。各種電流特性以多功數位電錶接電腦連續監測。每次實驗同時操作至少3組，以獲得平均實驗值。

3.4.1 陰陽極槽填充溶液

陰極槽以添加無菌之50 mM 鈉鹽磷酸buffer (pH 7)與100 mM NaCl為主。陽極槽則添加鉻酸鹽培養基(LBCr)。

3.4.2 植種與啟動

將增殖培養至對數生長期後期之 *Exiguobacterium* sp. YC152 植入厭氧的燃料電池陽極(外電阻設定為5000Ω)。以緩慢速度(停留時間2天)進行陽極槽液循環，使微生物附著陽極碳布，藉由偵測電壓/電流穩定度，研判微生物之附著完成情形。移去原溶液(broth)導入新鮮之陽極液，以較快流速(停留時間12小時)進行陽極液導入(不循環)，直至電流穩定，此時可視為陽極菌株固定化完成。

3.5 建立Cr⁶⁺ MFC-type biosensor 最佳化操作條件

3.5.1 最佳電阻/導電條件

採「批次」方式，固定鉻酸鹽培養基Cr⁶⁺濃度為52 mg/L (1 mM K₂CrO₄)，pH 5，陰陽極皆以碳布作為電極(6×6 cm²)，導線則以白金、鈦或銅線作為導線，電阻由10Ω逐漸升高至10,000Ω，每個電阻條件操作至電流輸出穩定。測量電流密度(I)、功率密度(P)、電流密度及電壓(V)之關係，所獲得之極化曲線，以了解此Cr⁶⁺ MFC-type biosensor之特

性與最佳外電阻。

由於本研究希望偵測到0.01 mg-Cr⁶⁺/L之濃度，因此，考慮電子電路上之問題，在最佳電阻條件下，改通入0.01 mg-Cr⁶⁺/L 測試不同電極(碳布或鉑塗覆石墨氈)與導線(白金、鈦或銅線)組合，希望能獲得何種組合對低濃度Cr⁶⁺有最佳電流偵測效果之資訊。未來實驗之條件亦會採用此最佳之電極與導線組合。

3.5.2 最佳陰極電解液配方

在其他固定條件下，分別評估去離子水、100 mM NaCl、50 mM PB、50 mM PB + 100 mM NaCl、25 mM PB + 50 mM NaCl 與 10 mM HCl等組合，獲得最佳陰極電解液配方。

3.5.3 最佳陽極電解液配方

在其他固定條件下，分別評估1/10,000 LB + 1 mM K₂CrO₄、1/1,000 LB + 1 mM K₂CrO₄、1/100 LB + 1 mM K₂CrO₄、1/10 LB + 1 mM K₂CrO₄與LB + 1 mM K₂CrO₄ 等條件下，對於偵測Cr⁶⁺濃度之影響。

3.6 建立系統濃度與反應時間之關連性

在最佳操作條件下，以批次之方式改變待測Cr⁶⁺濃度0.5, 5, 25 mg/L，測試濃度對Cr⁶⁺ MFC-type biosensor之反應性，例如高低濃度電流由波谷至波峰之反應程度與重複導入相同濃度時之穩定性。以獲得不同濃度測定條件下所需之平衡(偵測)時間。

3.7 Cr⁶⁺ MFC-type biosensor 系統之檢測特性

3.7.1 建立Cr⁶⁺濃度與電流之標準曲線

目前大部分國家在工業廢水與污水排放對六價鉻所訂定的標準為0.5 mg/L。而對於飲用水、地面水及漁業用水之標準為0.05 mg/L。因此，本研究在最佳操作條件下，以

批次方式導入待測Cr⁶⁺濃度0.01~20 mg/L，建立兩者關連性，可能因濃度範圍會出現好幾組標準曲線(檢量線)，並進一步求取偵測極限。

3.7.2 評估Cr⁶⁺ MFC-type biosensor 之再現性與穩定性

在最佳操作條件下，以批次之方式獲得每個濃度三重複之標準差，以瞭解系統之再現性。另添加固定Cr⁶⁺濃度(例如：10 mg/L)進行測試，連續測試14 天，以瞭解系統之操作穩定性(Stability)。

3.8 鉻濃度測定

六價鉻濃度之測定是利用比色法。取10 ml含鉻樣品，利用6 M H₂SO₄ 調整pH 值等於2，最後加入200 μl的DPC，穩定5-10 分鐘以OD 540 nm 之分光光度計測定(NIEAW320.52A)。其中六價鉻比色劑 S-diphenyl carbazide(DPC)製作方法如下：0.25%(w/v) 六價鉻比色劑 S-diphenyl carbazide (DPC)製備於丙酮內。總鉻濃度之測定是利用以AA 來進行分析。三價鉻濃度之測定則是將總鉻濃度扣除六價鉻之濃度來估算。

四、結果與討論

4.1 YC152 菌株

利用桃園某電鍍廠污泥與附近土壤作為六價鉻還原菌之篩選對象，經由適當的培養條件處理，由革蘭氏染色發現，此編號 YC152 之菌株為革蘭氏陰性及桿狀(圖一)，而根據培養特性可知為厭氧之六價鉻還原菌，另依據定序結果，可知其屬於 *Exiguobacterium* sp. 菌。

4.2 YC152 菌株之基本特性分析

由圖二與圖三的結果顯示，厭氧情況下的 YC152 菌株生長情況較佳，反之好氧情況下生長情況略差但仍可生長。後續比較兩者皆添加 52 mg/L Cr⁶⁺對其菌株生長之影響，由圖三所示，在添加 Cr⁶⁺暨厭氧情況下的 YC152 菌株生長情況較佳，反之添加 Cr⁶⁺暨好氧情況下之菌株生長情況略差，但仍可生長。

由於 YC152 菌株之培養基成份較為特殊，為評估好氧及厭氧情況下，培養基之濃度對於此菌株生長情形之差異是否影響，以做為未來實廠操作成本之考量。實驗結果如圖四，除了未稀釋培養基不影響 YC152 菌株的生長，厭氧狀態下，OD₆₀₀ 達 1.5 左右，好氧狀態下，也有接近 1 的數值，其他稀釋後的培養基皆明顯影響菌株的生長，OD₆₀₀ 低於 0.4，YC152 菌株生長受限。

4.3 YC152 菌株之生長特性分析

圖五為 YC152 菌株之生長曲線，根據厭氧下之生長曲線，可知前 2 小時為 YC152 菌株生長之適應期(lag phase)，2~11 小時為其對數生長期(log phase)，11 小時後進入穩定期(stationary phase)，根據這個結果，未來菌株接種時機設定為培養後 6 小時。其中厭氧與好氧狀態下，YC152 菌株之比生長速率分別為 0.62 h⁻¹ 及 0.36 h⁻¹。

4.4 不同 pH 值或溫度對於 YC152 菌株之生長影響

圖六顯示不同 pH 值條件下，添加六價鉻對於 YC152 菌株之影響，發現 pH 10 的去除效果達 80%，優於其他條件，顯示 YC152 菌株在鹼性下發揮的效果較為明顯。溫度方面，低溫或高溫的條件下對六價鉻的去除率效果也不佳，根據圖七結果顯示，最佳溫度為 35°C，去除率達 77%。

4.5 六價鉻濃度標準曲線之建立

建立六價鉻濃度之標準曲線，經由回歸分析可得 y (OD_{540}) = $0.2309 x$ (ppm) - 0.1196 之關聯性($R^2=0.997$)，我們可藉由此關係快速推算六價鉻之濃度(圖八)。

4.6 燃料電池組裝

YC152 菌株的最佳培養條件確認後，即組裝燃料電池(圖九)。將 YC152 菌株以培養基增殖培養，並厭氧注入燃料電池陽極槽，固定電阻為 1200Ω ，陰極則為磷酸緩衝溶液，為使微生物附著於碳布，陽極槽須緩慢重複循環，直到電量穩定。

4.7 導線與電極材料之影響

使用不同導線(白金、鈦或銅線)評估電池電流與功率密度之關係。結果如圖十，根據圖形轉折可獲得使用白金、鈦或銅線為導線時，最佳電阻分別為 1200 、 5000 與 7500Ω 。使用不同導線(白金、鈦或銅線)與電極材料評估對 0.01 mg/L 六價鉻對電池電壓之影響，結果如圖十一。原始電壓為 405 mV ，其中以鈦塗覆石墨電極與白金導線之組合最佳，敏感度最佳，可達 11% ，適合作為低濃度六價鉻檢測之用。

4.8 陰極與陽極電解液之影響

圖十二為陰極與陽極電解液對微生物燃料電池之影響。研究結果顯示，最佳陰極配方為 $50 \text{ mM PB} + 100 \text{ mM NaCl}$ ，最佳陽極配方為 $\text{LB} + 1 \text{ mM K}_2\text{CrO}_4$ ，未稀釋之 LB 培養基對微生物生長(圖四)及電量產生皆有助益。

4.9 濃度與反應時間及電池電壓之關連性

圖十三為濃度與反應時間之關連性。結果顯示隨著濃度之增加，電壓穩定時間將越久，大約在 60 分鐘內，小於 25 mg/L 之六價

鉻可被測得。圖十四為六價鉻濃度與電池電壓之關連性。結果可知不同濃度範圍呈現兩條線性關係，在濃度 $0\sim 4 \text{ mg/L}$ 條件下， $y = -19.6x + 397.2$ ，在濃度 $4\sim 20 \text{ mg/L}$ 條件下， $y = -10.7x + 155.5$ 。根據這兩條方程式，只要知道添加六價鉻穩定後 1 小時之電壓值，便可推估出檢體中六價鉻之濃度。

4.10 Cr^{6+} MFC-type biosensor 之再現性與穩定性

圖十五為連續操作 14 天， Cr^{6+} MFC-type biosensor 檢測 20 mg/L 六價鉻之再現性與穩定性。由圖中可知在連續監測 14 天六價鉻時，其電壓變化約在 $284\sim 291 \text{ mV}$ 變化，操作相當穩定。而根據每日 5 次之重複測定，所得之平均標準差(SD)為 2.25 ，顯示其再現性亦佳。

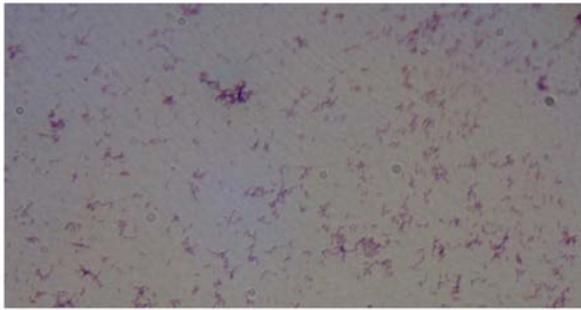
五、計畫成果自評

目前本研究之成果已依進度完成 90% (至 5 月底)，將依計畫期程完成本計畫。目前已將部分成果發表於 Australian Society for Microbiology Annual Scientific Meeting 2016 (ASM-2016)。

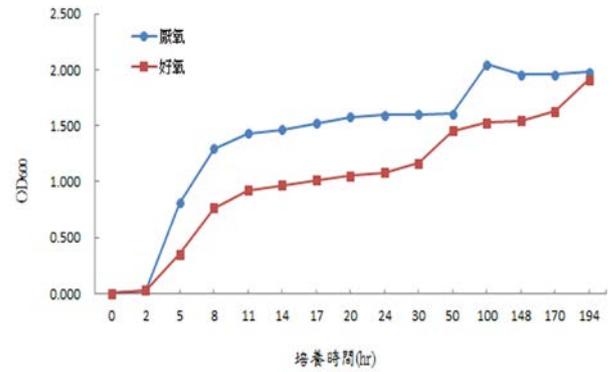
六、參考文獻

- Bagchi, D., Stohs, S.J., Bernard, W.O., Bagchi, M. & Preus, H.G. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanism of different forms of chromium. *Toxicology* 180, 5-22.
- Bohm, U., Mucha, A., Stütz, E., Schienle, M. & Fleischer, M. 2012. Detection of toxic chromium species in water using cell-based sensor systems. 14th International Meeting on Chemical Sensors - IMCS 1364-1367.
- Chang, I.S., Moon, H., K. & Kim, B.H. 2005. Improvement of a microbial fuel cell

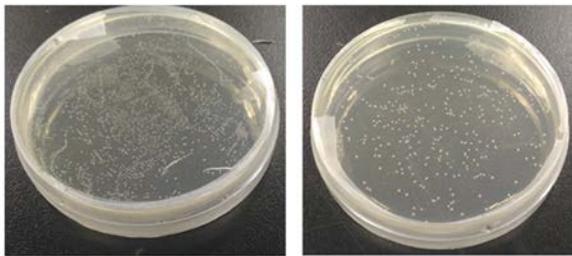
- performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1856-1859.
- Dey, S. & Paul, A.K. 2013. Hexavalent chromium reduction by aerobic heterotrophic bacteria indigenous to chromite mine overburden Braz. *J. Microbiol.* 44, 307-315.
- Du, Z. W., Li, H. R. & Gu, T. Y. 2007. A State of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25, 464-482.
- Gurung, A., Oh, S., Kim, K. D. & Shin, B. 2012. Semi-continuous detection of toxic hexavalent chromium using a sulfur-oxidizing bacteria biosensor. *J. Environ. Manage.* 106,110-112.
- Karube, I., Matsunga, T., Mitsuda, S. & Suzuki, S. 1977. Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol Bioeng.* 19, 1535-1547.
- Han, S., Zhu, M., Yuan, Z. & Li, X. 2001. A methylene blue-mediated enzyme electrode for the determination of trace mercury (II), mercury (I), methylmercury, and mercury-glutathione complex. *Biosens. Bioelectron.* 16, 9-16.
- Lei, Y., Chen, W. & Mulchandani, A. 2006. Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* 568, 200-210.
- Marques, M.J., Salvador, A., Morales Rubio, A. & De La Guardia, M. 2000. Chromium speciation in liquid matrices: a survey of the literature, *J. Anal. Chem.* 367, 601-613.
- Mulchandani, A. & Rogers, K.R. 1998. *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols.* Humana Press, Totowa, 225.
- Philp, J.C., Balmand, S., Hajto, E., Bailey, M.J., Wiles, S., Whitely, A.S., Lilley, A.K., Hajto, J. & Dunbar, S.A. 2003. Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. *Anal. Chim. Acta* 487, 61-74.
- Tag, K., Kwong, A.W.K., Lehmann, M., Chan, C.Y. Riedel, K. & Kunze, G. 2000. Fast detection of high molecular weight substances in wastewater based on an enzymatic hydrolysis combined with the *Arxula* BOD sensor system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75, 1080-1082.
- Vaiopoulou, E. 2005. On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor. *Biosens. Bioelectron.* 21, 365-371.
- Vyrides, I. & Stuckey, D. C. 2011. Chromium removal mechanisms and bacterial community in an integrated membrane bioreactor system. *Environ. Engine. Science* 28, 661-670.



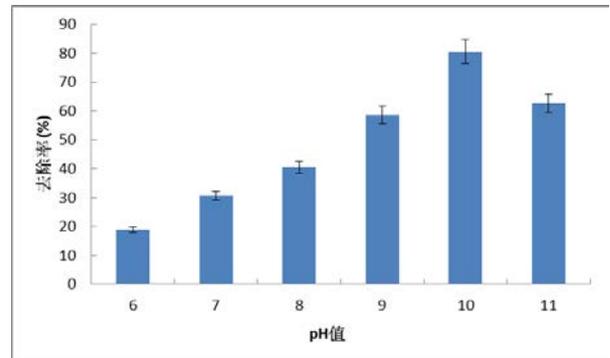
圖一、YC152菌株之革蘭氏染色



圖五、YC152菌株於厭氧/好氧之生長曲線



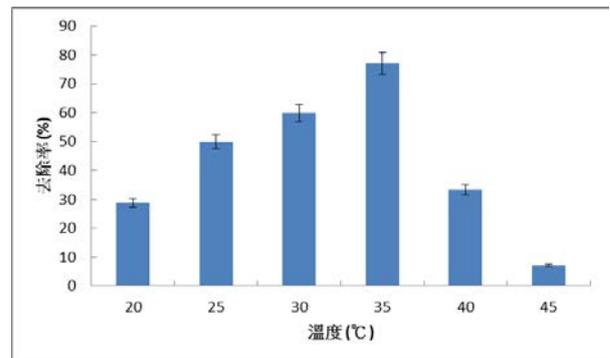
圖二、YC152菌株之生長狀態(左為厭氧，右為好氧)



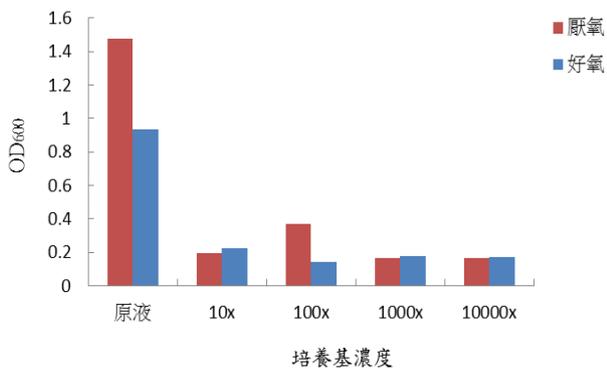
圖六、pH值對於六價鉻去除率之影響



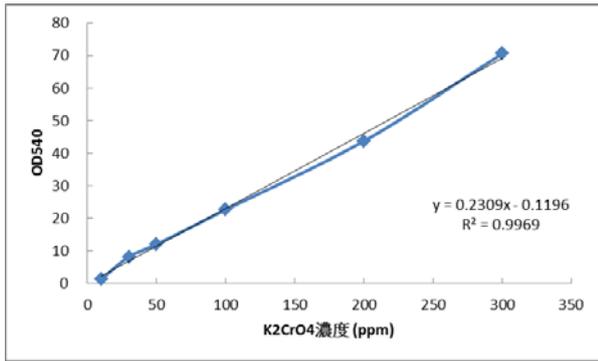
圖三、YC152菌株添加1 mM K₂CrO₄之生長狀態(左為厭氧，右為好氧)



圖七、溫度對於六價鉻去除率之影響



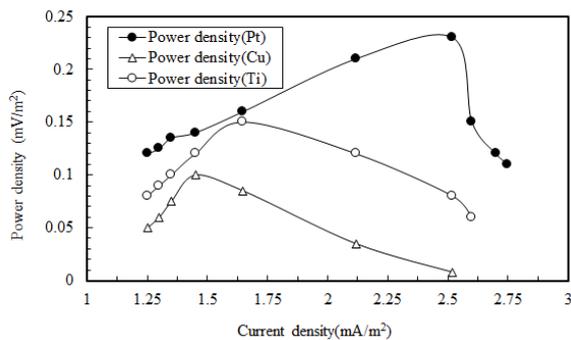
圖四、LB濃度對於YC152菌株生長之影響



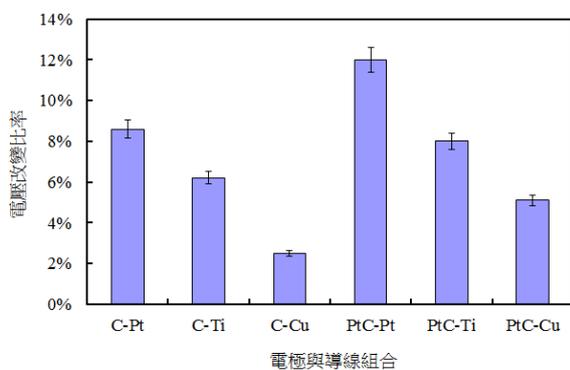
圖八、六價鉻濃度之標準曲線



圖九、燃料電池系統組裝圖

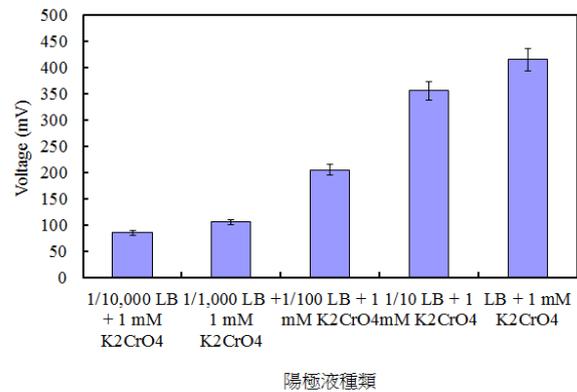
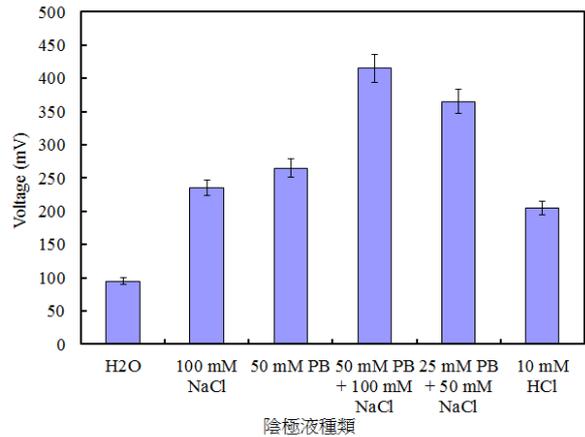


圖十、導線材料對微生物燃料電池操作影響

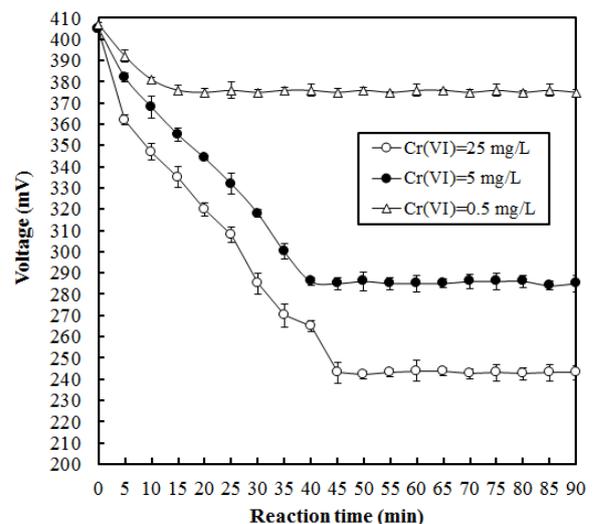


圖十一、導線與電極材料對微生物燃料電池

偵測六價鉻敏感度之影響

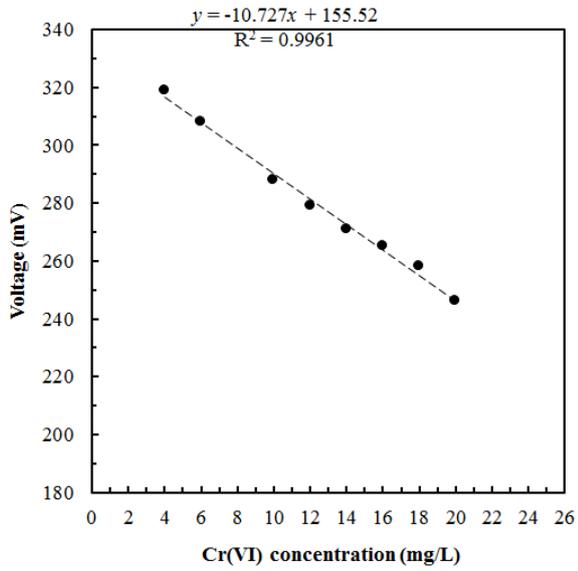
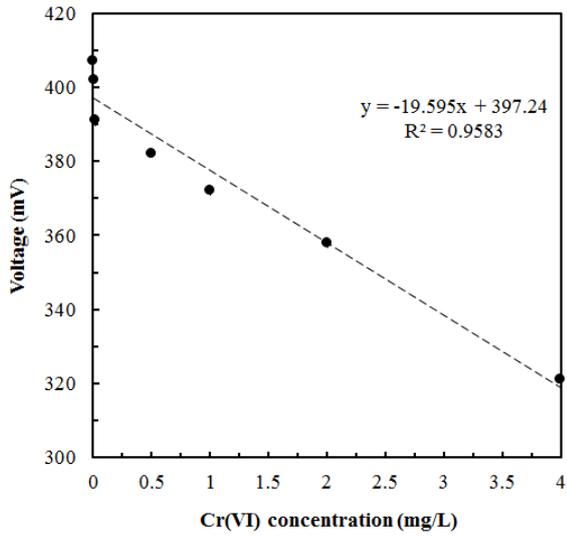


圖十二、陰極與陽極電解液對微生物燃料電池產電之影響

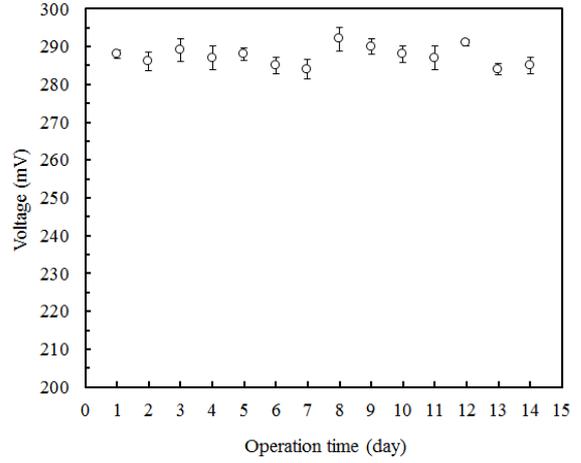


圖十三、微生物燃料電池偵測六價鉻濃度與

反應時間之關連性



圖十四、六價鉻濃度與電池電壓之關連性 (0~4 mg/L 與 4~20 mg/L)



圖十五、Cr⁶⁺ MFC-type biosensor 之再現性與穩定性