

## 土壤污染整治

# 半連續培養泥漿法甲苯共代謝三氯乙 烯生物降解之研究

吳博章\*、李春樹\*\*、高銘木\*\*\*

## 摘要

本研究乃以半連續泥漿法模擬遭三氯乙烯(Trichlorethylene, TCE)污染之土壤，在不同操作條件下，利用甲苯為生長基質共代謝 TCE。藉以探討甲苯分解菌 T1 與現地原生菌對 TCE 共代謝能力差異。

在甲苯及三氯乙烯進流濃度分別為 10 mg/l 及 0.5 mg/l 操作下，若未考慮吸附及洩漏等非生物性降解因素，T1 菌及原生菌的三氯乙烯降解率在第四個培養期即分別高達 93.2% 及 85.2%，甲苯則完全降解無殘留情形。根據穩定期單一期程試驗結果，T1 菌及原生菌皆能在半天內使菌數及生物活性達最大。甲苯僅需約 12 小時即可降解 90% 左右；TCE 由於競爭酵素之能力較差，故降解時間發生於甲苯之後。若將吸附及洩漏(23.5%)因素列入考慮，T1 菌及原生菌在穩態下的三氯乙烯降解率分別為 71.3%~74.7% 及 63.3%~68%。

【關鍵字】1.半連續泥漿法 2.三氯乙烯 3.甲苯 4.共代謝

\*國立成功大學環境工程學系碩士

\*\*國立成功大學環境工程學系博士候選人

\*\*\*國立成功大學環境工程學系教授

## 一、前　　言

由於三氯乙烯屬於重質非水相液體(dense non-aqueous phase liquids, DNAPLs)而增加土壤污染之深度及範圍，且因為多氯數的特殊穩定化學結構而不易為自然界微生物所分解，容易造成土壤及地下水的持久性污染。再者，三氯乙烯具潛在致基因突變性、致癌性等毒性特徵<sup>(1)</sup>，若不儘速整治處理，會危害人體健康及破壞人們賴以生存的土壤環境，甚至危害整個生態系統的運作平衡。

美國超級基金(supfund)所列管場址中，遭三氯乙烯污染者佔大多數，使用的整治技術種類繁多，包括物理、化學和生物方法，其中生物復育技術具有將污染物減毒或去毒、整治後能維持土壤原有用途、經濟效益較佳等優點，在應用上最具潛力。以厭氧生物代謝方式分解三氯乙烯時，常伴隨分解速率緩慢及生成更具毒性的中間產物(如氯乙烯)之累積問題；在好氧狀況下，微生物則無法直接以三氯乙烯為生長基質，只能藉由具共代謝三氯乙烯能力之微生物(如苯環類分解菌、甲烷分解菌、硝化菌等)將其完全分解為無害的二氧化碳及水，故目前大多採用好氧共代謝(cometabolic)三氯乙烯的方式處理。半連續泥漿法(semi-continuous slurry)為一介於批次與連續流間之操作方式，其操作簡便且系統中微生物之生長與基質降解模式較接近連續流之穩定狀態。使用半連續培養方式進行生物處理將可簡便且具代表性的預測生物降解能力及微生物之生長動力參數。

## 二、研究材料與方法

### 2.1 供試土壤

本研究使用由臺南區農業改良場所提供之梅山土壤。土壤樣品採集後，經過破碎、風乾以及 2 mm 篩網過篩後，保存於塑膠桶中備用。

### 2.2 菌種來源

本研究中用以植種之甲苯分解菌(T1 菌)係由 BTEX 生物濾床之濾材篩選而得<sup>(2)</sup>。T1 菌為苯環類分解菌，適合於好氧環境下共代謝三氯乙烯，於共代謝三氯乙烯之批次試驗中<sup>(3)</sup>，經由植入 T1 菌後，發現 T1 菌在甲苯濃度為  $700 \mu\text{g/g-soil}$  及

三氯乙烯濃度為  $25 \mu\text{g/g-soil}$  時尚可將三氯乙烯完全礦化。經由鏡檢結果顯示，T1 菌屬革蘭氏陰性(G<sup>-</sup>)之短桿菌，大小為  $0.5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ 。

### 2.3 菌株液體培養

於實驗前，菌株需以液體培養方式進行預培養。其步驟為先取出純菌株 T1 (甲苯分解菌)，劃於平板培養基上進行增殖，再以無菌水沖洗收集平板培養基上之菌株，將所得菌液以冷凍離心機在  $4^\circ\text{C}$ 、12,000 rpm 下離心 10 分鐘，去除上澄液，接著以無機營養鹽清洗菌株，相同條件下進行離心，移除上澄液以去除殘留之碳源。最後將得到的濃縮菌體以無機營養鹽稀釋後，注入適量甲苯，震盪培養即可。

### 2.4 半連續泥漿法共代謝三氯乙烯試驗流程

本試驗探討在泥漿環境中，以半連續培養方式定期重新添加甲苯與三氯乙烯對甲苯分解菌(T1 菌)及現地原生混合菌的影響，以及甲苯與三氯乙烯之降解情形。本試驗分為植種組、未植種組及滅菌吸附組，三者分別於 313 ml 血清瓶中進行三氯乙烯生物共代謝降解實驗。植種組添加 O.D<sub>560</sub> 值為 0.2 之甲苯分解菌菌液 1 ml(菌數約  $2.4 \times 10^7$ )，藉此探討植種對降解甲苯及三氯乙烯之影響；未植種組則以未滅菌及不額外添加外來菌種之方式，以瞭解現地原生混合菌降解甲苯及三氯乙烯之情形；滅菌吸附組以滅菌釜進行滅菌，目的為瞭解非生物性之影響。實驗中所使用之土壤為梅山土壤，實驗前供試土壤先以碳酸鈣調整其 pH 成中性，以適合微生物生長。在半連續流試驗中，以定期重複添加方式持續添加總體積為 40 ml 之甲苯、三氯乙烯及無機營養鹽混合液，同時移出等體積之澄清代謝廢液，此步驟於無菌環境下操作以避免其它微生物污染。圖 1 所示為植種組半連續泥漿法共代謝三氯乙烯試驗操作流程。

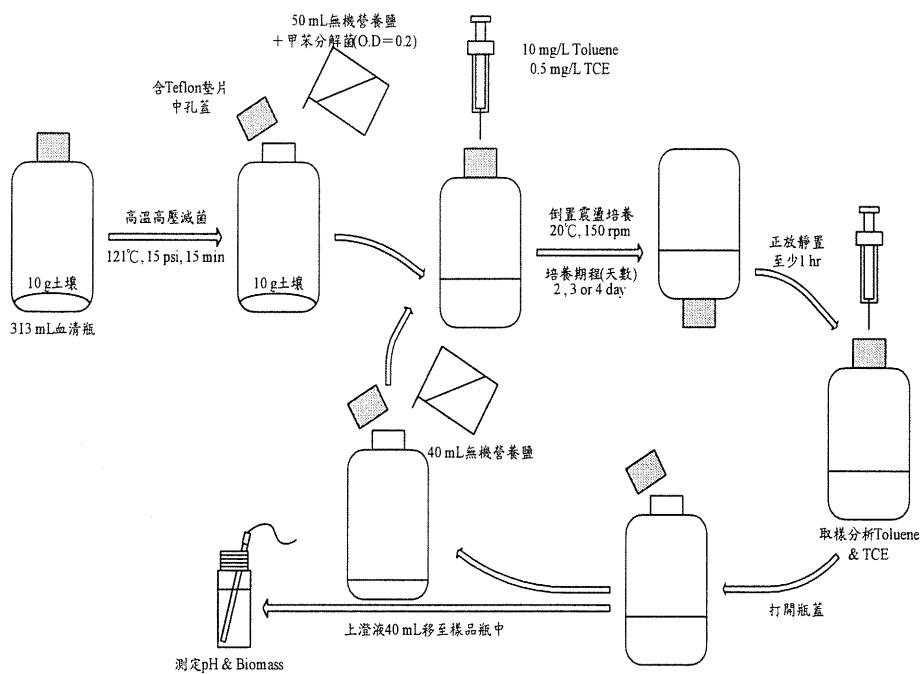


圖 1 半連續泥漿法（植種組）操作流程

## 2.5 半連續泥漿法共代謝三氯乙烯試驗操作條件

在半連續培養泥漿法實驗中，每兩次重新添加甲苯及三氯乙烯之間隔為微生物分解甲苯及三氯乙烯之時間，稱之為培養期程(incubation)，各組之培養期程皆為 3 天及 4 天，依序互換。表 1 所示為各組實驗之操作條件。

表 1 實驗組別操作條件

組別	編號	微生物種類	甲苯濃度 (ppm)	三氯乙烯 濃度(ppm)	培養期程 (incubation, day)
植種組	S1	甲苯分解菌, T1	10	0.5	3、4 天
	S2	甲苯分解菌, T1	20	0.5	3、4 天
未植種組	U1	原生混合菌	10	0.5	3、4 天
	U2	原生混合菌	20	0.5	3、4 天
吸附組	A1	無	10	0.5	3、4 天
	A2	無	20	0.5	3、4 天
測漏組	L1	無	10	0.5	3、4 天
	L2	無	20	0.5	3、4 天

註：上表中之 S 代表植種(seed)、U 代表未植種(unseed)、A 代表吸附(adsorption)、L 代表洩漏(leakage)。

## 2.6 分析方法

實驗中甲苯及三氯乙烯濃度之量測採頂部空間法(Head Space)，以氣密針(Hamilton, 100  $\mu$ L)抽取血清瓶頂部空間之氣體注入氣相層析儀中分析。甲苯及三氯乙烯分別採用 SHIMADZU GC-14B 型火焰離子偵測器(FID)及 Varian 3400 型電子捕捉偵測器(ECD)進行分析。

## 三、結果與討論

### 3.1 非生物降解

非生物降解係指洩漏、吸附及光解等反應。由於本試驗所使用之血清瓶先以鋁箔紙包覆再放置於陰暗之恆溫振盪器中培養，應可排除甲苯及三氯乙烯發生光解之可能。本試驗洩漏控制組之洩漏誤差及滅菌吸附組之梅山土吸附率等非生物降解率總和，三氯乙烯之平均值為 21.9%，甲苯則為 25.9%。非生物性降解在三氯乙烯共代謝生物降解效率計算上應列入，但為求計算方便，本研究僅於穩態下扣除三氯乙烯非生物降解損失量，進行三氯乙烯實際生物共代謝降解效率計算。

### 3.2 不同濃度甲苯對三氯乙烯共代謝之影響

在本階段試驗中，每次添加的三氯乙烯濃度固定為 0.5 ppm，甲苯濃度則分別為 10 ppm 及 20 ppm。圖 2 為甲苯濃度 10 ppm、三氯乙烯濃度 0.5 ppm 之植種組(S1 組)與未植種(U1 組)降解曲線圖。如圖所示，S1 組之三氯乙烯降解在第四培養期程達到穩定狀態，平均降解率約為 93.2%。甲苯降解曲線則於第二培養期程趨於平緩，平均降解率約為 99.7%。U1 組之三氯乙烯及甲苯則於第四及第三培養期程達穩定狀態，平均降解率分別為 85.2% 及 99.8%。

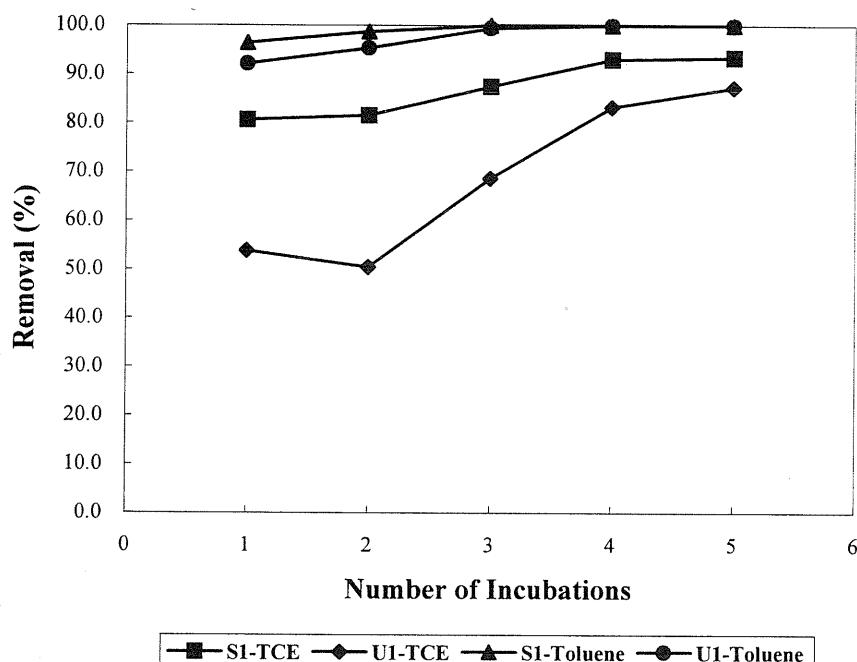


圖 2 植種組(S1 組)與未植種(U1 組)之甲苯(10 ppm)及三氯乙烯濃度(0.5 ppm)降解率變化

圖 3 為甲苯濃度 20 ppm、三氯乙烯濃度 0.5 ppm 之植種組(S2 組)與未植種(U2 組)降解曲線圖。S1 組之三氯乙烯及甲苯之降解現象在第四及第二培養期程達到穩定，三氯乙烯平均降解率約為 96.6%，甲苯則為 99.8%。U2 組之三氯乙烯於第四培養期程達穩定，平均降解率為 89.9%；甲苯則於第三培養期程達穩定，平均降解率為 99.2%。

由圖 2 及圖 3 可發現無論高低甲苯濃度，植種組對於甲苯及三氯乙烯的降解率皆高於未植種組。此外，植種組比未植種組提早達到降解平衡，此乃因為現地混合菌中可分解甲苯之微生物量較植種組為低，且經甲苯馴化後之混合菌未必皆能產生作用於苯環上可共代謝三氯乙烯的甲苯氧化酵素。在周孟琦<sup>(3)</sup>之研究中亦可發現類似結果。另一方面，當甲苯濃度提高，三氯乙烯之降解率亦隨之提高，推測是由於氧化酵素隨甲苯提高而增加所致。

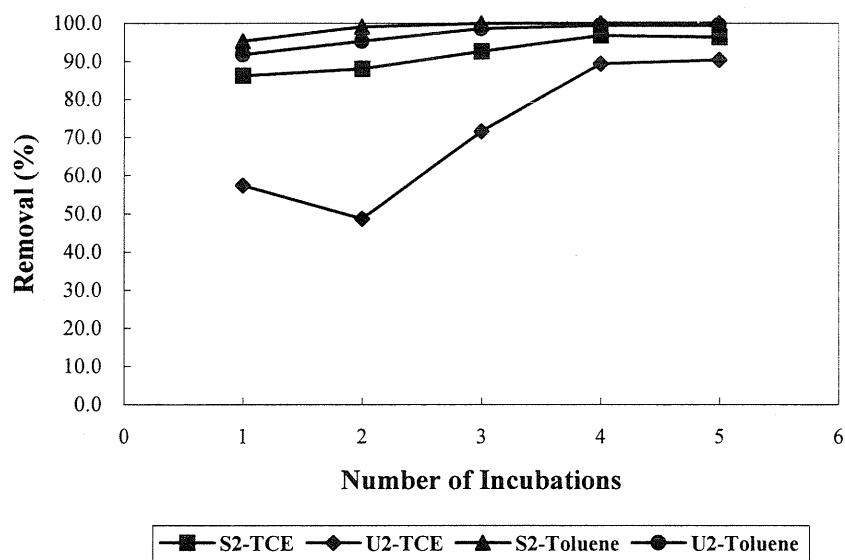


圖 3 植種組(S2 組)與未植種(U2 組)之甲苯(20 ppm)及三氯乙烯濃度(0.5 ppm)降解率變化

### 3.3 不同濃度甲苯之三氯乙烯共代謝效率

表 2 及表 3 分別為植種組與未植種組在不同甲苯濃度下，共代謝三氯乙烯之生物降解速率及共代謝效率。在植種組中，S1 組(甲苯 10 ppm)與 S2 組(甲苯 20 ppm)之三氯乙烯生物降解速率分別為 0.0048 ppm/hr 與 0.0050 ppm/hr，差異不大。甲苯方面則分別為 0.1039 ppm/hr 與 0.2079 ppm/hr，後者為前者兩倍，推測由於甲苯之酵素競爭力大於三氯乙烯，氧化酵素優先分解甲苯；S2 組由於甲苯濃度較高而產生較多之氧化酵素，進而能較快降解甲苯。然而，在共代謝效率方面，S1 組(0.0467)卻約為 S2 組(0.0242)兩倍，表示甲苯與三氯乙烯添加配比以 20:1 較 40:1 為適合。至於未植種組方面，其變化趨勢類似於植種組。

表 2 植種組在不同甲苯濃度下之三氯乙烯(0.5 ppm)生物降解速率及共代謝效率  
(包含非生物性降解)

甲苯濃度 (ppm)	降解率(%)		生物降解速率(ppm/hr)		甲苯共代謝三氯乙烯效率 (ppm-TCE/ppm-Toluene)
	甲苯	三氯乙烯	甲苯	三氯乙烯	
10	99.7	93.2	0.1039	0.0048	0.0467
20	99.8	96.6	0.2079	0.0050	0.0242

表 3 未植種組在不同甲苯濃度下之三氯乙烯(0.5 ppm)生物降解速率及共代謝效率  
(包含非生物性降解)

甲苯濃度 (ppm)	降解率(%)		生物降解速率(ppm/hr)		甲苯共代謝三氯乙烯效率 (ppm-TCE/ppm-Toluene)
	甲苯	三氯乙烯	甲苯	三氯乙烯	
10	99.8	85.2	0.1040	0.0044	0.0427
20	99.2	89.9	0.2067	0.0047	0.0227

### 3.4 穩定期之甲苯及三氯乙烯生物降解

當半連續泥漿培養一段時間至穩定期後，始進行此階段實驗，藉由短時間(為期僅一個培養期程)內密集監測甲苯及三氯乙烯隨時間之降解情形，以期更進一步瞭解甲苯分解菌及現地混合菌之降解能力及機制。圖 4 為植種組(S1 組)及未植種組(U1 組)在甲苯濃度 10 ppm 及三氯乙烯濃度 0.5 ppm 時之穩定期降解曲線圖。圖中顯示，植種組之三氯乙烯降解主要發生於培養時間約 18~20 小時的時候，在 40 小時的時間點後漸趨緩慢。未植種組之三氯乙烯殘餘率約在培養 50 小時後大為降低。在甲苯降解方面，植種組及未植種組有類似趨勢，幾乎於培養 12 小時後即降解約 90%，然而之後分解極為緩慢。江美幸<sup>(4)</sup>及李茂山<sup>(5)</sup>之研究顯示，利用甲苯分解菌共代謝三氯乙烯，在初期降解較快，隨時間增長降解速率減緩。江氏認為此現象可能為受三氯乙烯毒性影響及還原能耗盡所致。

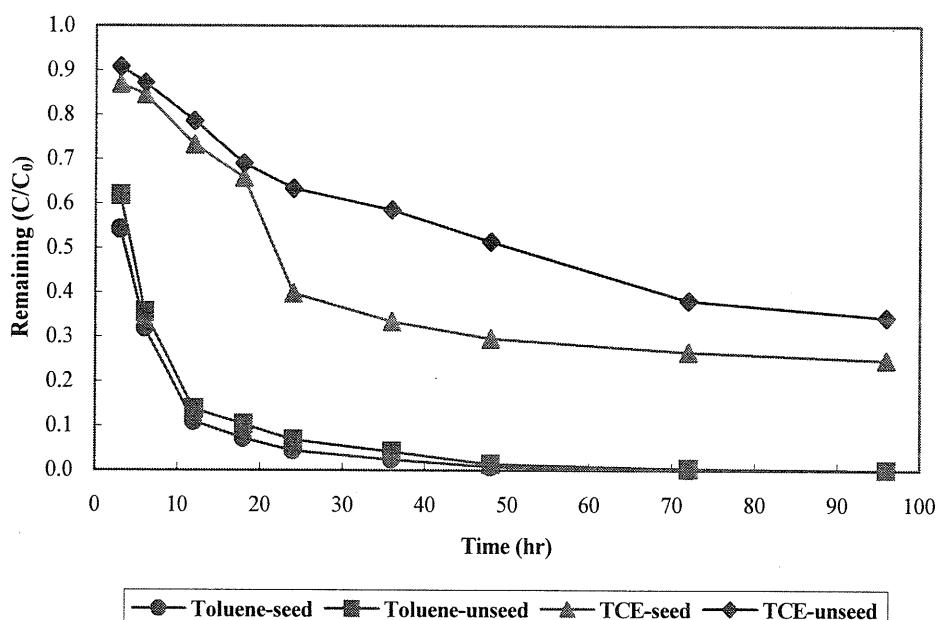


圖 4 植種組(S1 組)及未植種組(U1 組)在甲苯濃度 10 ppm 及三氯乙烯濃度 0.5 ppm 時之穩定期單一期程降解曲線

圖 5 為植種組(S2組)及未植種組(U2組)在甲苯濃度 20 ppm 及三氯乙烯濃度 0.5 ppm 時之穩定期降解曲線圖。甲苯及三氯乙烯降解趨勢皆類似於圖 4。總言之，圖 4 及圖 5 顯示出三氯乙烯必須等甲苯先行分解並產生甲苯氧化酵素後，才能利用此一酵素進行生物共代謝反應。推測原因為當三氯乙烯與甲苯競爭氧化酵素時，氧化酵素會優先選擇代謝甲苯。此外，由於未植種組(現地混生菌)經甲苯馴化存留下之微生物未必能產生可共代謝三氯乙烯之甲苯氧化酵素，故未植種組之三氯乙烯主要降解時間較植種組為遲且降解趨勢異於植種組。

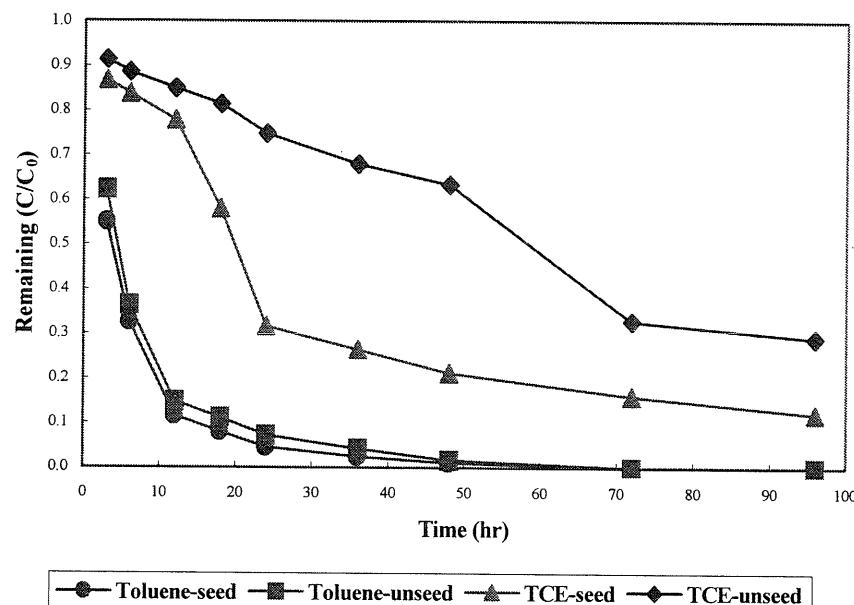


圖 5 植種組(S2組)及未植種組(U2組)在甲苯濃度 20 ppm 及三氯乙烯濃度 0.5 ppm 時之穩定期單一期程降解曲線

在三氯乙烯共代謝效率方面，表 4 及表 5 所列分別為植種組與未植種組在不同甲苯濃度下之穩定期單一期程三氯乙烯(0.5 ppm)生物降解速率及共代謝效率。表中將非生物性降解(吸附及洩漏)列入計算，植種組中當甲苯/三氯乙烯濃度配比為 10 ppm/0.5 ppm 及 20 ppm/0.5 ppm 時，在穩態操作下之三氯乙烯生物降解率降低為 71.3% 及 74.7%。至於三氯乙烯共代謝降解效率則分別為 0.0470 及 0.0259。未植種組中在穩態操作下之三氯乙烯生物降解率則為 63.3% 及 68.0%。至於三氯乙烯共代謝降解效率則分別為 0.0417 及 0.0238，與忽略非生物性降解因素時差異不大。因此，若只考慮求取共代謝效率時，可忽略包含吸附及洩漏等非生物性降解因素。

表 4 植種組在不同甲苯濃度下之穩定期單一期程三氯乙烯(0.5 ppm)生物降解速率及共代謝效率(扣除非生物性降解)

甲苯濃度 (ppm)	降解率(%)		生物降解速率(ppm/hr)		甲苯共代謝三氯乙烯效率 (ppm-TCE/ppm-Toluene)
	甲苯	三氯乙烯	甲苯	三氯乙烯	
10	75.8	71.3	0.0790	0.0037	0.0470
20	72	74.7	0.1500	0.0039	0.0259

表 5 未植種組在不同甲苯濃度下之穩定期單一期程三氯乙烯(0.5 ppm)生物降解速率及共代謝效率(扣除非生物性降解)

甲苯濃度 (ppm)	降解率(%)		生物降解速率(ppm/hr)		甲苯共代謝三氯乙烯效率 (ppm-TCE/ppm-Toluene)
	甲苯	三氯乙烯	甲苯	三氯乙烯	
10	75.9	63.3	0.0791	0.0033	0.0417
20	71.4	68	0.1486	0.0035	0.0238

## 四、結論

- 1.以植種組(甲苯分解菌，T1 菌)而言，若未考慮非生物性降解因素，在穩態操作下，當甲苯/三氯乙烯濃度配比為 10 ppm/0.5 ppm 及 20 ppm/0.5 ppm 時，三氯乙烯之平均共代謝降解率分別為 93.2% 及 96.6%。三氯乙烯共代謝降解效率(ppm-TCE/ppm-Toluene)則分別為 0.0467 及 0.0242。在氧氣充足的條件下，三氯乙烯在低濃度時，添加配比為 40/1 時可降解稍多之三氯乙烯，但降解效率仍以 20/1 為佳。
- 2.將非生物性降解(吸附及洩漏)列入計算，當甲苯/三氯乙烯濃度配比為 10 ppm/0.5 ppm 及 20 ppm/0.5 ppm 時，植種組在穩態操作下之三氯乙烯降解率降低為 71.3% 及 74.7%。然而三氯乙烯共代謝降解效率分別為 0.0470 及 0.0259，與忽略非生物性降解因素時差異不大。若只考慮求取共代謝效率時，可忽略包含吸附、再脫附及水解等複雜之非生物性降解因素。
- 3.無論高低甲苯濃度，T1 菌對於甲苯及三氯乙烯的降解率皆高於原生混合菌；且可較早達到降解平衡。但 T1 菌對三氯乙烯之共代謝能力隨時間增長而有緩慢下降之趨勢，原生混合菌則相對平穩。其可能為原生混合菌組之微生物相較多元，對三氯乙烯共代謝期間可能產生之毒性中間產物或生長環境條件之變化較具緩衝能力。

## 參考文獻

1. McCarty, P. L., Reinhard M., and Rittmann B. E., Trace organics in groundwater, Environ. Sci. Technol., Vol. 15, No. 1, pp. 40~42, 1981。
2. 李正怡、李春樹、高銘木，利用甲苯共代謝三氯乙烯之生物濾床效率提升之研究，第十六屆空氣污染控制技術研討會論文集，pp.737~742，1999。
3. 周孟琦，三氯乙烯在土壤之吸附反應及其代謝生物降解之研究，碩士論文，國立成功大學環境工程學系，台南，2002。

- 4.江美幸，甲烷分解菌及苯環類分解菌共代謝三氯乙烯之比較，碩士論文，國立中興大學環境工程研究所，台中，1995。
- 5.李茂山、盧至人，受三氯乙烯污染土壤之生物復育，第十三屆廢棄物處理技術研討會論文集，pp.246-252，1998。