

甲烷分解菌及酚分解菌對水中揮發性氯化有機物 喜氣分解的影響*

盧至人**

關鍵詞：共代謝作用，三氯乙烯，三氯甲烷，甲烷分解菌，酚類分解菌

摘 要

二種發展中的生物處理技術可應用於處理自來水中低濃度氯化有機物。此二種方法是甲烷分解菌(Methanotrophs)的共代謝作用及環酚類分解菌(Phenol-degrading Microorganisms)的氧化酵素的催化作用。

甲烷分解菌的共代謝作用乃微生物利用甲烷為生長所需的碳源與能源。甲烷分解菌於甲烷分解中所引發的甲烷單氧化酵素可用以促使揮發性氯化有機物的無償性分解。例如在喜氣與甲烷存在的狀況下，經12天後，98%的100 μ g/L氯仿與50%的三氯乙烯被分解成二氧化碳。

環酚類分解菌在喜氣狀況下於分解環酚類時所引發的單氧或雙氧化酵素可同時促使揮發性氯化有機物的分解。和共代謝作用不同的是在此作用中環酚類分解菌可同時利用揮發性氯化有機物為生長的碳源與能源。例如經一個月的培養，45%的100 μ g/L的三氯甲烷與87%的100 μ g/L的三氯乙烯可被分解成二氧化碳。然而只有7%的三氯甲烷與11%的三氯乙烯可直接為環酚類分解菌生長所利用。

前 言

揮發性氯化有機物是地下水中最常見的有機污染物之一。在自來水處理過程中亦會因氯化而產生揮發性或非揮發性氯化有機物，如三氯甲烷即是其中常見的一種。氯化有機物業經證實為致癌性化合物；且大部份的氯化有機物無法有效的為微生物所分解(1,6)。雖然在厭氣狀況下，揮發性氯化有機物能被微生物所分解(1)，然而厭氣分解在自來水處理程序上較不

適合；而且在還原性條件下揮發性氯化有機物經生物分解後會產生同等毒性或更不易分解的中間產物，如三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)會被分解成氯乙烯(Vinyl Chloride)或二氯乙烯(Dichloroethylene)。在自來水處理程序中，氯化有機物雖可藉氣體提除法或活性炭吸附以去除；然而此二方式只是將污染物做“相”的轉移，並未真正將氯化有機物的毒性去除。

喜氣生物分解可將毒性有機物分解成毒性較低的中間產物或二氧化碳及水。然而大部分

* 本文部份內容曾發表第六屆自來水論文發表會

** 國立中興大學環境工程研究所副教授

的揮發性氯化有機物卻極不易為喜氣性微生物所分解，而存留在自然界或飲用中，對人體健康造成危害。本研究擬以喜氣生物分解方式，以去除自來水或地下水中低濃度的揮發性氯化有機物。擬以共代謝作用(Cometabolism)及環酚類分解菌(Phenol-degrading Microorganisms)的分解作用促進揮發性氯化有機物的喜氣生物分解。共代謝作用在研究中乃指甲烷分解菌(Methanotrophs)利用甲烷為生長基質，而在甲烷分解過程中所引發的甲烷單氧化酵素(Methane Monooxygenase)可同時無償性的分解揮發性氯化有機物；亦即揮發性氯化有機物只被分解，而微生物卻無法利用其為生長所需的碳源或能源。環酚類分解菌於分解環酚類化合物時所引發的單氧或雙氧氧化酵素(Mono- and dioxygenase)可用以同時分解揮發性氯化有機物，並可能利用其為生長所需的碳源。本文將以三氯甲烷(Trichloromethane)及三氯乙烯(Trichloroethylene)為代表性的單碳及雙碳揮發性氯化有機物。

實驗方法與步驟

1. 甲烷分解菌

甲烷分解菌是以 Chemostat 培養。菌種乃由湖泊沈積污泥與土壤中取得，直接殖入 Chemostat 中。Chemostat 體積為一升；水力停留時間為 2.5 天。進流水乃以經臭氣滅菌後的蒸餾水配製。進流水的主要成分如表一所示。

表一、Chemostat 進流水營養劑濃度

營養劑	濃度(mg/L)
K_2HPO_4	245
KH_2OP_4	240
$CaCl_2$	11.6
$MgSO_4$	4.3
NH_4Cl	3.5

甲烷的進流濃度乃控制在 20 mg/L 左右，其乃以 99% 純度的甲烷氣經活性碳吸附管柱與消毒綿過濾而直接曝氣，使進流水甲烷濃度約近

於飽和 (24 mg CH_4 / L)。

甲烷分解菌亦以洋菜(Agar)培養。由湖泊沈積污泥與土壤中所分離出的微生物直接殖於洋菜表面，接著以厭氣培養箱(Anaerobic Jar)在 5% 甲烷，95% 空氣比例於室溫下培養。

2. 環酚類分解菌

環酚類分解菌一樣是以 Chemostat 培養。菌種乃取自工業含酚廢水處理的污泥直接殖入 Chemostat 中。進流水的營養劑如表一所示。進流水含酚 15 mg/L 與二氯酚(2,4-dichloro-phenol) 1 mg/L。

3. 批式反應瓶

本試驗均以琥珀色 250 或 125 毫升的血清瓶進行。血清瓶經酸洗後在 550°C 高溫下烘烤 30 分鐘後直接使用。

4. 放射性三氯甲烷與三氯乙烯

放射性化合物在生物分解中可做為一極靈敏的追蹤劑。含碳十四放射性三氯甲烷或三氯乙烯的配製乃將已知放射性強度(mCi/m mole)的該化合物(先行於液態氮冷卻情況下溶於微量甲醇中)與適量的非放射性該化合物水溶液於冰封狀況下混合，使其達到所需的濃度。同時即測定其放射性強度的初始值(DPM/mL)與濃度(mg/L)。於本實驗中，亦假設放射性與非放射性化合物的分解亦依此混合比例分解。即放射性與非放射性的三氯甲烷或三氯乙烯經適當混合後，其生物分解速率是一致的。

5. 共代謝作用實驗

於血清瓶中加入經完全曝氣後的甲烷分解菌溶液 50 mL，溶液的含菌量約為 10^7 cells/mL。再經適量的曝氣後，以 Teflon 瓶蓋密封。以注射筒注入適量的 99% 純度的甲烷氣，使達到甲烷的濃度為 3% 或 6% (V/V)。注入甲烷氣的同時，以另一空的注射筒收集外逸的空氣，而維持瓶內壓力的正常。接著將冰封的放射性三氯甲烷或三氯乙烯以微量注射筒加入瓶內，使其初始濃度為 100 μ g/L (含放射性與非放射性的三氯甲烷或三氯乙烯)。經適當混合後，將瓶倒立於溫度控制箱中 (20°C)，定期取出分析。

6. 環酚類分解菌氧化酵素的分解作用實驗

於血清瓶中加入50mL含環酚類分解菌的溶液，其含菌量約為 10^7 cells/mL。同時於該溶液中加入酚與二氯酚，使其濃度分別為330 μ g/L與200 μ g/L。經適當曝氣後加上Teflon蓋，接著以微量注射筒將放射性三氯甲烷或三氯乙烯加入，使其濃度為100ug/L。接著將血清瓶倒立於溫度控制箱(20°C)，定期取出分析。

7. 取樣與樣品分析

樣品定期由溫度控制室中取出，直接加入1.5毫升2N的NaOH溶液，置於搖動儀激烈搖動30分鐘，靜置5分鐘後，以氣封式注射筒取5毫升溶液分析總放射性強度（其內含放射性二氧化碳，放射性原化合物，放射性微生物量，及中間產物）。另取二個5毫升水樣，其中一個加2毫升6N HCl後，二樣品以同流量(40 mL/min)的氮氣曝氣6分鐘，接著量測其放射性強度。經加酸曝氣後，其放射性強度含放射性微生物量與中間產物。未加酸而直接在高pH下曝氣者，其放射性強度含放射性二氧化碳，微生物量，與中間產物。揮發性氯化有機物則經曝氣而逸出。另取5毫升的溶液直接以0.2 μ m的濾膜過濾後，再以15毫升的50%酒精溶液沖洗濾膜。濾膜上殘留的放射性強度即為微生物量。其相互關係可以下式表示：

$$[\text{微生物量}] = [\text{濾膜上的截留量}]$$

$$[\text{二氧化碳}] = [\text{未加酸曝氣}] - [\text{加酸曝氣}]$$

$$[\text{化合物量}] = [\text{總量}] - [\text{未加酸曝氣}] \text{ 或}$$

$$[\text{化合物量}] = [\text{總量}] - [\text{二氧化碳}] - [\text{微生物量}]$$

放射性強度以Beckman LS 3081液態閃爍計數器分析，每一樣品分析時間十分鐘。

水樣除以放射性強度分析外，並以戊烷(n-Pentane)萃取，以三氯乙烷(1,1,1-trichloroethane)為內標化合物，再以氣體層析儀分析三氯甲烷或三氯乙烯的液相濃度。血清瓶內的氣相濃度(O₂, CO₂及CH₄)亦以氣體層析儀分析其濃度。三氯乙烷或三氯甲烷以HP 5890氣體層析儀分析，其分析條件為：注射口溫度150°C，偵測器溫度250°C，

管柱烘箱溫度為100°C，七分鐘，再以10°C/min升溫至200°C。管柱氣體為95% Argon及5% Methane；偵測器為ECD。氣體分析(氧及甲烷)則以Fisher Gas Partitioner 1200儀器分析。以Helium為管柱氣體，分析溫度為50°C。

結果與討論

1. 共代謝作用

(a) 三氯甲烷

三氯甲烷在含6% 甲烷的血清瓶中的生物分解結果列於表二。在此實驗中。微生物利用甲烷為唯一的生長碳源。如表三所示，實驗開始後，甲烷濃度逐漸減少。甲烷由初始濃度的6% 經12天後降為3.3%。而氧的濃度亦降到10% 左右。在此同時，三氯甲烷濃度由100% 降到1%，且幾乎全部的三氯甲烷均分被分解成二氧化碳。放射性二氧碳由0% 增加到98% (表二)。雖然三氯甲烷能有效的被甲烷分解菌所分解，然而，放射性微生物產量卻微不可測(<1% 的總放射性量)。換言之，甲烷分解菌無償性的分解三氯甲烷。三氯甲烷的分解符合了“共代謝作用”的原則，即共代謝化合物(Cosubstrate)不作為微生物生長的基質(2,3,5)。

表二、三氯甲烷的生物分解與二氧化碳的形成

時間(天)	放射性強度百分比(%)		
	三氯甲烷	二氧化碳	微生物
0	100	0	0
1	96	4	—
2	87	11	—
4	66	28	—
6	38	57	—
8	18	79	—
10	9	90	—
12	1	98	—

— : < 1%

表三、血清瓶中甲烷與氧的氣相濃度百分比及甲烷液態濃度

時間(天)	濃度(%)*		甲烷液相濃度 (mg/L)
	甲烷	氧	
0	6	—	—
1	6.1	15	1.5
2	6.1	13	1.5
4	5.5	13	1.3
6	4.8	12	1.15
8	4.1	11.5	1.0
10	3.6	10.7	0.82
12	3.3	10.2	0.80

*氣態濃度百分比

(b) 三氯乙烯

三氯乙烯是雙碳揮發性氯化物，和三氯甲烷一樣，極難在喜氣狀態下為微生物所分解，然而卻可做為甲烷分解菌的共代謝化合物。表四為三氯乙烯在4% 甲烷濃度下為甲烷分解菌分解的結果。甲烷的氣相濃度由初始的4% 於10天內完全被分解。於此間，三氯乙烯的濃度由100% 降為53%。而在甲烷完全被分解後，三氯乙烯的濃度仍由53% 再經20天而降為35%。表示在無甲烷的情況下，溶液中殘存的微生物仍能分解三氯乙烯。而另一方面，在甲烷的濃度趨近於零之後，二氧化碳的比例仍隨著三氯乙烯的降低而增加；由10天時的29% 增加到30天的50%。表示溶液中的甲烷分解菌在甲烷濃度很低時仍能將三氯乙烯分解成二氧化碳。換言之，甲烷單氧化酶並未因甲烷的消失而完全失去其活性。和三氯甲烷共代謝作用比較，三氯乙烯的分解過程中有顯著的中間產物的形成。由表四知，中間產物並未持續的累積。經10天後，中間產物占總量的13%，而後即逐漸的降到7%。換而言之，中間產物仍可被微生物所分解。表四顯示，三氯乙烯的共代謝作用中，仍有極微量的三氯乙烯或中間產物可做為微生物生長所需的碳源。然而微生物

的形成是否為甲烷分解菌仍不確定。甲烷分解菌於甲烷分解中，耗氧量約是0.9 mole-O₂ / mole-CH₄。然而在三氯甲烷與甲烷的生物分解中，耗氧量約是1.0 mole-O₂ /mole-CH₄。這耗氧量比單純甲烷分解的耗氧量稍高；可推論是三氯甲烷在無償性分解時所耗的氧量。此點符合了共代謝作用的原則(3,4,5)。在三氯乙烯與甲烷的共代謝作用中，由於三氯乙烯生物分解亦使耗氧量達0.96mole-O/mole-CH₄，稍高於甲烷分解的耗氧量。

表四、三氯乙烯在4% 甲烷濃度(氣相)下分解結果

時間(天)	放射性強度百分比(%)			
	三氯乙烯	二氧化碳	非揮發性 中間產物	微生物
0	100	—	—	—
2	85	5	5	2
5	67	16	11	6
10	53	29	13	5
15	44	39	11	4
20	39	42	9	4
25	36	47	8	4
30	35	50	7	4

2. 環酚類分解菌

三氯甲烷與三氯乙烯被環酚類分解菌分解的結果列於表五。環酚類分解菌能有效的分解三氯乙烯與部份的三氯甲烷。經35天的培養，98% 的三氯乙烯被分解成二氧化碳(87%)及形成新的微生物(11%)。由微生物的累積量可知，隨著時間的增加，由三氯乙烯分解而形成的微生物量由初始的小於1% 增加到11%。這結果表示三氯乙烯可為微生物生長所需的碳源。三氯甲烷的分解效率較三氯乙烯低。約只有一半的三氯甲烷可被環酚類分解菌所分解。同時，該菌利用三氯甲烷為生長碳源的效果亦不顯著。經35天後，只有7% 的三氯甲烷為微生物生長所利用。環酚類分解菌在分解環酚類化合物所引發的單氧或雙氧化酶雖被認為是促使三

氯乙烯分解的重要誘因(7,8)，然而何種環酚化合物最能有效的促使揮發性氯化有機物的分解仍未明朗。就基質使用率而言，此二種方法共代謝作用及環酚類分解菌的分解作用對三氯甲烷或三氯乙烯的分解效果均相當低。例如甲烷分解菌對三氯甲烷的利用率僅為0.2 u g / mg-day。過低的基質使用率使得此二方法仍未能達到實用的目的。

表五、環酚類分解菌分解三氯甲烷或三氯乙烯

時間(天)	佔總量的比例 (%)			
	三氯甲烷		三氯乙烯	
	二氧化碳	微生物	二氧化碳	微生物
3	<1	<1	<1	<1
7	7	—	21	4
14	11	3	47	8
20	12	4	62	9
29	34	4	75	10
35	45	7	87	11

結 論

1. 低濃度的三氯甲烷與三氯乙烯可被甲烷分解菌以共代謝作用無償的分解成二氧化碳。
2. 共代謝作用具有增加耗氧量與共代謝化合物本身無法提供微生物生長所需的碳源的特性。
3. 環酚類分解菌能在喜氣狀況下分解三氯甲烷與三氯乙烯。且能利用三氯甲烷或三氯乙烯以形成微生物量的增殖。
4. 共代謝作用與環酚類分解菌對三氯甲烷或三氯乙烯的去除率尚待提昇，以符合實用原則。

參考文獻

1. Bouwer, E. J. "Transformations of Trace Halogenated Organic Compounds in

Biofilms," PhD Dissertation, Stanford University (1983).

2. Colby, J., D. I. Sterling, and H. Dalton "The Soluble Methane Monooxygenase of *Methylococcus Capsulatus*... Its Ability to Oxygenate N- Alkanes, n-Alkenes, Ethers, and Alicyclic, Aromatic and Heterocyclic Compounds," *Biochem. J.*, Vol. 165, pp. 395-402 (1977).
3. Dalton, H. D. and D. I. Stirling "Co-metabolisms," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, Vol. 297, pp. 481-496 (1982).
4. Haber, C. L. et al. "Methylotrophic Bacteria; Biochemical Diversity and Fermentics," *Science*, Vol. 221, pp. 1147-1153 (1983).
5. Horvath, R. S. "Microbial Cometabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature," *Bact. Rev.*, Vol. 36, pp. 146-155 (1972).
6. Infante, P. F. and T. A. Tsongas, "Mutagenic and Oncogenic Effects of Chloromethanes, Chloroethanes, and Halogenated Analogs of Vinyl Chloride," *Environ. Sci. Res.*, Vol. 25, pp. 301-327 (1982).
7. Nelson, M. J. K. et al. "Biodegradation of Trichloroethylene and Involvement of an Aromatic Biodegradative Pathway," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 53, pp. 949-954 (1987).
8. Shielde, M. S. et al. "Novel Pathways of Toluene Catabolism in the Trichloroethylene-degrading Bacterium G4," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, pp. 1624-1629 (1989).

論文收稿日期：81年09月18日

論文修訂日期：81年11月20日

論文接受日期：81年12月11日

EFFECTS OF METHANE- AND PHENOL-DEGRADING MICROORGANISMS ON THE AEROBIC BIODGRADATION OF VOLATILE CHLORINATED ALIPHATICS

Chih-Jen Lu

National Chung Hsing University
Department of Environmental Engineering

Key Words: Cometabolism, Trichloroethylene, Trichloromethane, Methane-Utilizing Microorganisms, Phenol-degrading Microorganisms.

Abstract

Volatile chlorinated organic chemicals could be aerobically biodegraded by methane- and phenol-degrading microorganisms. Methane-degrading microorganisms use methane as the growing substrate. Methane monooxygenase is required during the process of methane utilization. The methane monooxygenase could be used to gratuitously biodegrade volatile chlorinated organic chemicals which were aerobically non-biodegradable. The results showed that 98 percent of trichloromethane and 50 percent of trichloroethylene were aerobically biotransformed to carbon dioxide by methane-utilizing microorganisms after 12 days of operation. The results also indicated that 45 percent of trichloromethane and 87 percent of trichloroethylene were biotransformed to carbon dioxide by phenol-degrading microorganisms after 30 days of operation. However, 7 percent of trichloromethane and 11 percent of trichloroethylene were used as the carbon source for microbial growth.

National Chung Hsing University