

國立交通大學

環境工程研究所

碩士論文

Ralstonia sp. P-10 以甲苯為主要基質好氧共代謝降解三氯
乙烯之研究

**Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene by *Ralstonia*
sp. P-10 using Toluene as the Primary Substrate**

研究生：郭彥汝

指導教授：林志高 博士

郭明錦 博士

中華民國九十六年

Ralstonia sp. P-10 以甲苯為主要基質好氧共代謝降解三氯
乙烯之研究

**Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene by *Ralstonia*
sp. P-10 using Toluene as the Primary Substrate**

研究生：郭彥汝
指導教授：林志高 博士
郭明錦 博士

Student : Yen-Ru Kuo
Adviser : Dr. Jih-Gaw Lin
Dr. M.C. Tom Kuo

國立交通大學
環境工程研究所



A Thesis

Submitted to Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master

In

Environmental Engineering

August 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年

國立交通大學

論文口試委員會審定書

本校環境工程研究所 郭彥汝 君

所提論文 純菌 HYL-Q11 (Ralstonia sp. P-10) 以甲苯為主要基質好
氧共代謝三氯乙烯之研究

合於碩士資格標準，業經本委員會評審認可。

口試委員：

林志高

林志高

郭明錦

郭明錦

曾怡祺

曾怡祺

陳勝一

陳勝一

指導教授：

林志高

教授

所 長：

蔡春進

教授

Ralstonia sp. P-10 以甲苯為主要基質好氧共代謝降解三氯乙烯之 研究

研究生：郭彥汝

指導教授：林志高 博士

郭明錦 博士

國立交通大學環境工程研究所

摘 要

本研究針對 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 進行批次試驗，主要目的為驗證 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯之功能性，及求取生物降解三氯乙烯的一階反應動力參數。經過七天的培養，微生物系中 7.7 mg/L 甲苯的移除率達 100%；同時，由添加甲苯試驗組與未添加甲苯試驗組三氯乙烯移除率 13% 的差異證實 HYL-QT1 能以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯。此外，根據三氯乙烯一階反應動力試驗結果顯示 HYL-QT1 好氧共代謝三氯乙烯的一階反應速率常數範圍在 $0.16 \pm 0.05/\text{day}$ 。

經甲苯基質多次注入試驗結果證實，當甲苯存在於微生物系的有效反應時間由數小時增加至數天，HYL-QT1 好氧共代謝三氯乙烯的移除率由 21% 提升到 33%，菌落數由 10^6 增加到 10^8 CFU/mL。因此，延長基質存在於微生物系中的有效反應時間，有助於提高目標污染物的移除率。

關鍵字：*Ralstonia sp.* P-10、甲苯、三氯乙烯、好氧共代謝

Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene by *Ralstonia sp.* P-10 using Toluene as the
Primary Substrate

Student : Yen Ru Kuo

Advisors : Dr. Jin Gaw Lin

Dr. M.C. Tom Kuo

Institute of Environmental Engineering

National Chiao Tung University

ABSTRACT

The aims of this study were to confirm the function of aerobic co-metabolism of trichloroethylene(TCE) by *Ralstonia sp.* P-10 using toluene as primary substrate and to estimate the first-order rate coefficient of TCE cometabolic biodegradation. After a batch experiment, the toluene removal efficiency was up to 100%, and the TCE removal efficiency was 13%. The 13% TCE removal efficiency proved *Ralstonia sp.* P-10 could cometabolize biodegrade TCE in the presence of toluene. The first-order rate coefficient of TCE cometabolic biodegradation was $0.16 \pm 0.05/\text{day}$.

According to the toluene multi-injection experiment, the effective time duration of toluene presence from 1 day to 3 days, the TCE cometabolic-biodegradation efficiency was from 21% improve to 33%, and the bacteria count were enriched from 10^6 to 10^8 CFU/mL. The duration of primary substrate (toluene) presence in the microcosms was the key to achieve higher TCE removal.

Keywords: *Ralstonia sp.* P-10, toluene, trichloroethylene, aerobic cometabolism

致 謝

這份論文能夠順利的完成，感謝恩師成功大學資源系 郭明錦老師給予我最學業上最細心的指導，老師不管是在生活態度及研究精神都讓我受益良多。同時，也要感謝指導教授 林志高老師在我身體不適需要接收治療的時候也不放棄我，甚至在研究上給予大力的支持。口試期間，承蒙成功大學生命科學系 曾怡禎老師，高雄第一科大 陳勝一老師撥冗指導論文，提供寶貴意見，方能使這份論文更加完整。

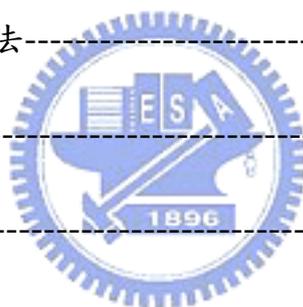
學生生涯即將告一個段落，謝謝所有交大環工所的教授、學長姐、同學及學弟妹的這一年多來陪伴及鼓勵。更要感謝的是成大資源系 郭明錦老師實驗室的所有好朋友：氣質出眾、身材高挑可人又親切的龍龍，如果沒有你，我一定無法順利完成碩論；桂花鄉刺青主婦鄭姐，每天跟你在實驗室讓我心智年齡有不同的成長；資源一姐小恣，相識六年謝謝你一直照顧我；娘砲團團長湯姆衛，謝謝你替大家出頭；陽光男兒閔森學長、胸圍傲人愷軍學長及末代好人哥逸群學長，謝謝你們給予的幫忙及支持。

謝謝郭爸、郭媽及老姐，你們給予我的全部已經無法用筆墨來形容我對你們的感謝；親愛的宋爽爽小姐、Allen 哥，你們對我的好我會謹記於心的。謝謝你們。

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
致謝	III
目錄	IV
表目錄	VIII
圖目錄	IX
第一章 前言	1
1-1 研究目的	1
1-2 研究流程	3
第二章 文獻回顧	4
2-1 地下水及土壤主要污染物	4
2-1-1 地下水污染	4
2-1-2 土壤污染	7
2-2 甲苯及三氯乙烯之污染特性	10
2-2-1 甲苯的物化特性及用途	10
2-2-2 甲苯的環境危害性	12
2-2-3 三氯乙烯的物化特性及用途	14
2-2-4 三氯乙烯的環境危害性	17

2-2-5 國內外相關法規規範-----	19
2-3 生物復育技術-----	21
2-4 三氯乙烯之生物降解-----	23
2-4-1 三氯乙烯生物厭氧處理-----	23
2-4-2 三氯乙烯生物好氧處理-----	25
2-5 基質競爭效應-----	28
2-6 三氯乙烯對微生物之毒性-----	31
2-7 甲苯分解菌共代謝三氯乙烯機制-----	33
第三章 實驗材料與分析方法-----	37
3-1 實驗材料-----	37
3-1-1 實驗用水-----	37
3-1-2 主要基質-----	37
3-1-3 目標污染物-----	37
3-1-4 無機營養鹽-----	38
3-1-5 瓊脂平板營養鹽-----	38
3-2 分析方法與設備-----	40
3-2-1 甲苯及三氯乙烯分析-----	40
3-2-2 溶氧測定-----	42
3-2-3 酸鹼值測定-----	42



3-2-4 OD ₆₀₅ 測定-----	42
3-2-5 菌落數分析-----	42
3-3 試驗菌種-----	44
3-3-1 菌種來源及保存-----	44
3-3-2 菌種活化及增殖馴養-----	44
3-4 甲苯分解菌好氧共代謝三氯乙烯批次培養試驗-----	46
3-5 甲苯基質多次注入試驗-----	49
第四章 結果與討論-----	55
4-1 甲苯生物降解需氧量-----	55
4-2 純菌 HYL-QT1 共代謝三氯乙烯批次試驗-----	57
4-3 批次試驗生物降解動力探討-----	59
4-3-1 三氯乙烯生物降解效率-----	59
4-3-2 溶氧量及 OD ₆₀₅ 變化-----	65
4-3-3 菌落數及菌相變化-----	67
4-3-4 酸鹼值變化-----	67
4-4 甲苯基質多次注入試驗-----	71
4-5 比較甲苯基質多次注入試驗-----	73
4-5-1 三氯乙烯生物降解比較-----	73
4-5-2 溶氧量變化比較-----	77

4-5-3 酸鹼值變化比較-----	78
4-5-4 OD ₆₀₅ 及菌落數變化比較-----	79
第五章 結論與建議-----	82
5-1 結論-----	82
5-2 建議-----	84
參考文獻	



表 目 錄

表 2-1 國內有機污染物污染案件-----	6
表 2-2 甲苯之基本特性-----	11
表 2-3 甲苯對人體健康的危害效應-----	13
表 2-4 三氯乙烯之基本特性-----	15
表 2-5 三氯乙烯之產生源及污染途徑-----	16
表 2-6 三氯乙烯對人體健康的危害效應-----	18
表 2-7 國內環保署公告地下水管制標準-----	20
表 2-8 甲苯分解菌生物降解三氯乙烯反應動力參數整理-----	30
表 2-9 甲苯好氧分解菌代謝途徑及產物整理-----	36
表 3-1 無機營養鹽成分及濃度-----	39
表 3-2 Nutrient Broth 營養鹽成分-----	39
表 3-3 批次試驗實驗操作設計-----	47
表 3-4 甲苯基質多次注入實驗操作設計-----	51
表 4-1 甲苯分解菌 HYL-QT1 好氧共代謝三氯乙烯批次試驗結果-----	58
表 4-2 甲苯基質多次注入試驗結果-----	72
表 4-3 比較甲苯基質多次注入試驗結果-----	74

圖 目 錄

圖 1-1 研究流程圖-----	3
圖 2-1 土壤污染來源-----	9
圖 2-2 四氯乙烯還原性脫氯反應轉換成二氧化碳的可能途徑-----	24
圖 2-3 不同甲苯分解菌的好氧代謝途徑-----	35
圖 3-1 純菌 HYL-QT1 活化及馴養步驟-----	45
圖 3-2 純菌 HYL-QT1 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯流程圖 -----	48
圖 3-3 甲苯基質多次注入 A 組及 B 組實驗設計流程圖-----	52
圖 3-4 甲苯基質多次注入 C 組實驗設計流程圖-----	53
圖 3-5 甲苯基質多次注入 D 組實驗設計流程圖-----	54
圖 4-1 批次試驗中 HYL-QT1 微生物系內甲苯及三氯乙烯殘餘濃度隨時間的 變化-----	61
圖 4-2 擬合之三氯乙烯一階反應速率常數-----	64
圖 4-3 批次試驗中 HYL-QT1 微生物系中的甲苯殘餘濃度、溶氧量及 OD ₆₀₅ 隨時間的變化-----	66
圖 4-4 批次試驗中 HYL-QT1 微生物系中菌落數隨時間的變化-----	68
圖 4-5(a)及 4-5(b) 分別為批次試驗前後的菌相-----	69
圖 4-6 批次試驗中 HYL-QT1 微生物系中酸鹼值隨時間的變化-----	70
圖 4-7(a)及 4-7(b) 分別為 B 組及 D 組甲苯及三氯乙烯殘餘濃度隨時間的變	

化-----75

圖 4-8 甲苯基質多次注入試驗中溶氧消耗量的比較-----77

圖 4-9 甲苯基質多次注入試驗中酸鹼值變化的比較-----78

圖 4-10 甲苯基質多次注入試驗中 OD₆₀₅ 變化的比較-----80

圖 4-11 甲苯基質多次注入試驗中菌落數變化的比較-----81



第一章 前言

1-1 研究目的

含氯脂肪族碳氫化合物(如三氯乙烯、四氯乙烯等)具有低可燃性、低沸點、高溶解力、高蒸氣壓密度、可爆性及化學安定性等特殊的物化特性，並廣泛應用在電子清洗業、工業上脫脂程序及乾洗業等製程當中，常因不當的處置、意外洩漏或惡意的排放，造成土壤及地下水的嚴重持久性污染 (Yang and McCarty, 2000; Rivett *et al.*, 2001)。台灣工業區土壤及地下水質污染調查工作顯示三氯乙烯為常見地下水有機污染物 (Kuo *et al.*, 2000)。

受三氯乙烯污染的地下水整治技術有許多，如氣提法 (air sparging) (Rabideau *et al.*, 1999)、化學氧化法 (chemical oxidation) (Schroth *et al.*, 2001)、及生物降解法 (biodegradation) (McCarty *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2004)。由於以物理或化學方法處理，通常只是污染相的轉移，並非對污染物完全的破壞，且成本較高。因此具有將污染物減毒或去毒，整治後尚能維持污染場址原有用途，以及經濟效益較佳等優點的生物處理法，在應用上最具發展潛力。目前已知可被微生物當作主要生長基質有效共代謝三氯乙烯的有甲烷、酚及甲苯。根據文獻指出，甲苯分解菌如 *Pseudomonas putida* (Heald and Jenkins, 1994)、*Burkholderia cepacia* G4、*Ralstonia pickettii* PKO1、及 *Pseudomonas mendocina* KR1 (Leahy *et al.*, 1996) 等為具有共代謝三氯乙烯能力的菌種。

Han *et al.* (2007) 在實驗室以半連續培養泥漿法 (Semicontinuous slurry method) 進行甲苯好氧共代謝三氯乙烯試驗，並透過微生物 16S rDNA 序列分析鑑定穩態操做條件下半連續生物處理系統中的甲苯分解菌。根據 16S rDNA 序列比對的結果顯示生物處理系統中的甲苯分解菌分別為 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 及 HYL-QT2 (*Pseudomonas putida*)。根據文獻指出 HYL-QT2(*Pseudomonas putida*) 為具有分解甲苯能力的菌種。而 *Ralstonia sp.* 種的菌群在文獻上指出為具有分解酚能力的菌種，其主要以酚為基質好氧共代謝降解三氯乙烯。(Nakamura *et al.*, 2000; Futamata *et al.*, 2001)；Futamata *et al.* (2001) 更以菌株 *Ralstonia sp.* P-10 進行酚好氧共代謝三氯乙烯動力參數的研究。

本研究的目的是藉以甲苯為主要基質，以批次試驗探討 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝三氯乙烯之功能性及降解動力。根據降解動力試驗結果，本研究更進一步執行甲苯基質多次注入試驗，探討甲苯存在於生物處理系統的有效反應時間對三氯乙烯生物降解效率的影響。

1-2 研究流程

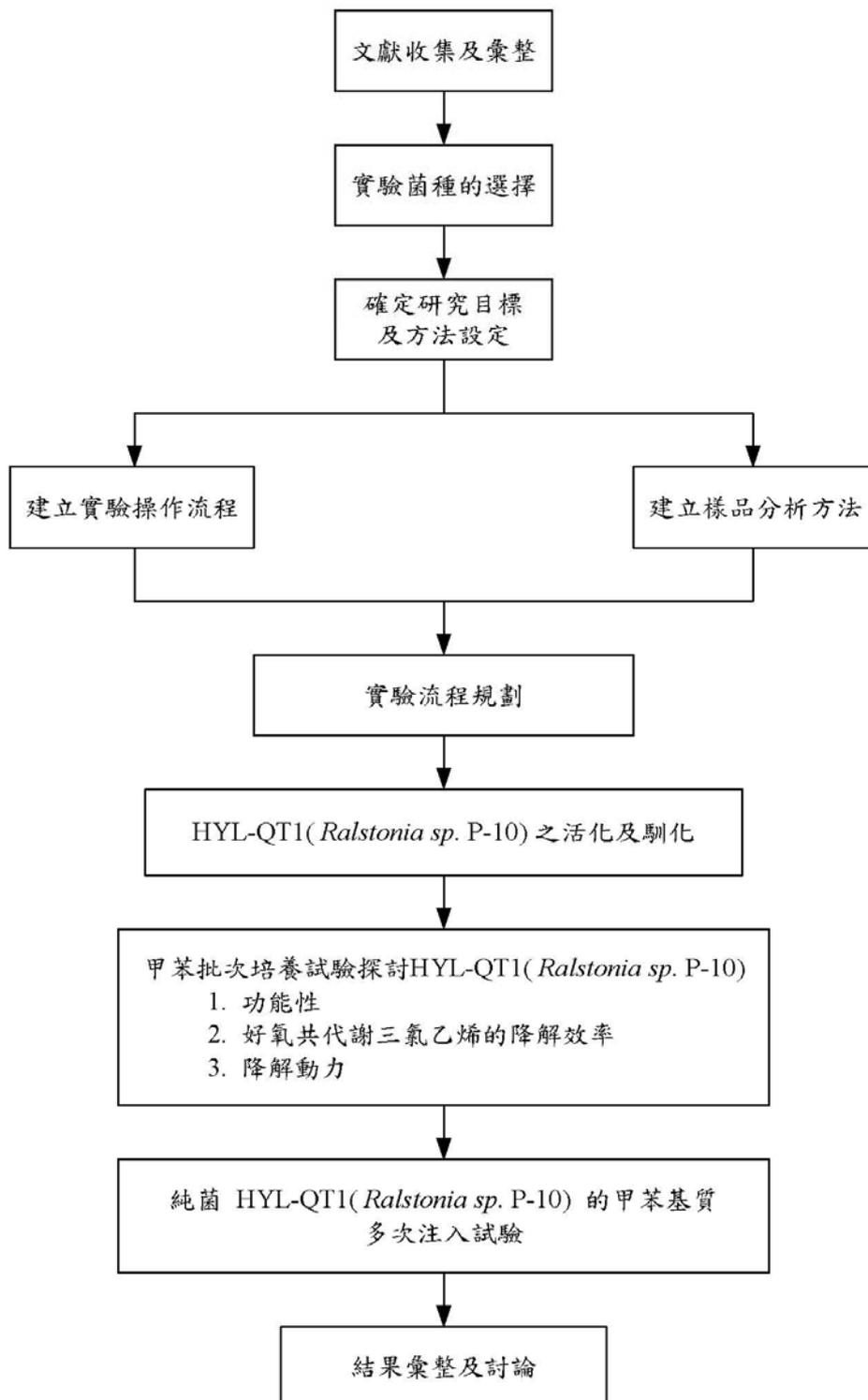


圖 1-1 研究流程

第二章 文獻回顧

2-1 地下水及土壤主要污染物

2-1-1 地下水污染

地下水儲蓄於地表下的含水層 (aquifer)。我國含水層總面積約 10,330 平方公里。地下水年使用量約 71 億立方公尺，佔總用水量的 40.6%。地下水為我國農、工、民生用水重要來源，尤其為枯水期或乾早期的補充水源。隨著人口增加，農業轉型、工業發展、氣候變化，許多含水層已遭到不同污染物質侵入，造成地下水質惡化，不僅減少珍貴的水資源，也形成環境保護工作的負擔與隱憂。

含水層為透水、儲水性能佳的地層，如砂質層或砂岩層。含水層本身沒有造水功能，它所孕藏的地下水來自地表水。地表水經由含水層的補注源進入地層後儲於其中而成地下水。當非含水層原有的物質滲入含水層後即有可能造成地下水污染：如農業施肥、噴灑殺蟲劑後殘留的肥料或殺蟲劑隨雨水或灌溉水的入滲現象達到地下水源，石化、電子等工廠的有機油料、溶劑或其它化學物品，因管線破裂、人為疏失、刻意排放等因素也會造成地下水污染。

地下水污染物大致分為有機污染物及無機污染物，常見的有機污染物包括 BTEX，農藥，含鹵素有機污染物如四氯乙烯 (PCE)、三氯乙烯 (TCE)、

多氯聯苯 (PCB) 等，而無機污染物一般多為重金屬，如汞、砷、鉛等。1997 年美國超級基金 (Superfund) 編列得眾多污染場址當中，以含氯有機污染物為主要處理對象，而其中三氯乙烯的污染場址有 336 個為首要處理污染物，其次為四氯乙烯有 170 個場址，其餘的為多氯聯苯、二氯乙烯、氯乙烯分佔 100 多個場址。由污染場址整治數目可之三氯乙烯為美國地下水最主要之污染物，其中間產物二氯乙烯、氯乙烯，也同樣受到重視。

目前我國較為矚目的地下水污染及土壤案例如表 2-1，包括：桃園縣境內美商無線電廠址的地下水中已發現相當濃度的含氯有機溶劑，三氯乙烯 (TCE)。三氯乙烯為電子工業、化學製造業所大量使用的除脂清洗劑。因有致癌性，所以三氯乙烯污染問題對環境、健康的衝擊相當地大。中國石油公司高雄煉油廠管線破裂漏出燃油，污染農地面積達十數公頃。雖已做緊急回收漏油處理，是否對地下水造成污染有待觀察。此外高雄中油總廠燃油污染，台南安順中石化工廠的五氯酚污染，桃園東北亞化工廠的酚類污染都為較著名的案例。

表 2-1 國內有機污染物污染案件 (行政院環境保護署, 2007)

場址	縣市別	發現時間	污染物	目前狀況
台灣美國無線電公司 (RCA) 原桃園廠	桃園縣 八德市	83.6.3	三氯乙烯 四氯乙烯	1. 受影響地區接裝自來水 2. 土壤污染區已完成整治 3. 地下水部分正整治中
台灣美國無線電公司 (RCA) 原竹北廠	新竹縣 竹北市	83.6.3	三氯乙烯 四氯乙烯	1. 受影響地區接裝自來水 2. 污染濃度低
台灣氯乙烯公司 頭份廠	苗栗縣 頭份鎮	82.7	二氯乙烷 氯乙烯	1. 受影響地區接裝自來水 2. 土壤嚴重區部份已挖除處理 3. 地下水在廠區內設置井抽取處理
中國石油化學工業開發公司安順廠	台南市 安南區	78	五氯酚、汞(可能還有戴奧辛)	1. 緊鄰污染區之漁塭停養 2. 土壤污染嚴重區挖除處理 3. 地下水抽取處理，污染濃度已下降
中國石油公司高雄煉油廠	高雄市 左營區	82	汽油 航空燃料油 柴油	繼續抽取回收浮油
中國石油公司苓雅區	高雄市 苓雅區	78.6	汽油 航空燃料油	1. 浮油抽取回收工作已完成 2. 進行土壤現地生物處理
東北亞公司	桃園縣 楊梅鎮	86	酚類	由桃園縣環保局委託元智大學處理完成
統一精工小北加油站	台南市	95	苯、甲苯、三氯乙烯	民國 95 年列為控制場址
中國石油公司高雄煉油廠	後勁月眉小段	96	苯環類	1. 已列入控制場址 2. 整治進行中
台灣氯乙烯公司林園廠	彰化縣 線西鄉	94	二氯乙烷、三氯乙烯、四氯乙烯	民國 94 年列為汙染控制場址

2-1-2 土壤污染

土壤是由礦物固體、有機物、水分及空氣所組成，為固相、液相及氣相三相共存之結構。土壤除了供應植物生長所需之養份和水分外，也提供了動物和人類活動場所，它具有過濾、吸附、氧化、還原、溶解、沉澱和轉化外界輸入物質的能力，以維持整個生態的平衡。

土壤污染是指任何物質特別是由人類所產生的廢水、廢棄物及廢氣介入土壤，導致土壤喪失原有的忍受力及自淨能力，以致農作物生長不良、破壞生態環境以及危害到人類的健康之現象產生。土壤污染雖不像空氣或水會直接影響人體，但土壤供給食用作物生長，一旦遭受污染，輕則影響農作物的品質，重則在農作物內累積有害物質，經食物鏈被人、畜攝取，長期食用會影響人類健康，其潛在之危害將不容忽視。

一般而言，土壤污染來源包括都市廢棄物、家庭污水、事業廢水、事業廢棄物、畜牧廢棄物、落塵、酸雨及可溶性鹽類等，如圖 2-1 所示（鄭顯榮、吳文娟，1990）；其中以事業廢水及廢棄物不當處置、地下輸油管線破裂儲存槽洩漏等為國內土壤污染之主要因素。依污染途徑可分為污染物直接滲入土壤稱一次污染，及經由水和空氣所造成的稱二次污染（王銀波，1997）。若以污染物性質區別，可分為有機污染物和無機污染物兩大類。有機污染物可分為下列三大類（王銀波等，1995）：

一、工業污染方面

工業化學產品在生產、使用過程中均可造成土壤污染，如生產原料、產品、廢棄物、廢水及廢氣等未經處理或處理完善，及任意傾倒或排放造成。此外，加油站、軍事基地、工廠地下儲存槽的滲漏及輸送管線的洩露亦是污染來源。

二、農業使用方面

農業污染方面包括農業上大量使用肥料和農藥、畜牧的排泄廢棄物及洗潔污水。

三、都市和家庭生活方面

包括廚房、衛浴所排出的廢水，及餐廳和旅館等服務業之廢棄物。根據調查都市與家庭生活廢棄的垃圾，其中有八成是有機廢棄物。



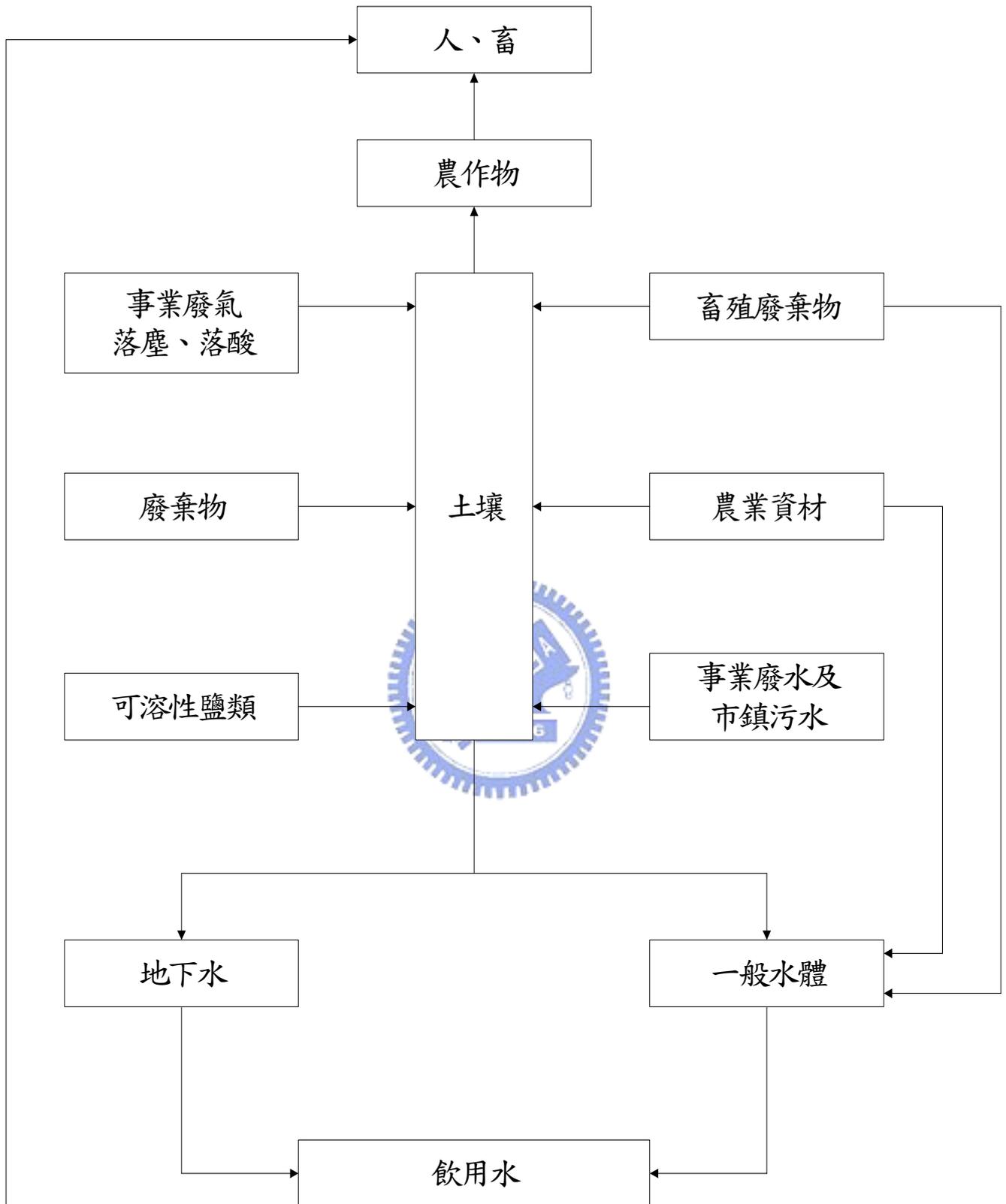


圖 2-1 土壤污染來源 (鄭顯榮、吳文娟，1990)

2-2 甲苯及三氯乙烯之污染特性

2-2-1 甲苯的物化特性及用途

本研究中所使用的主要基質甲苯是一種無色液體，溶於乙醇、苯及乙醚，不溶於水，由焦油中分餾而獲得。被普遍應用於化學工業、橡膠業及製藥工業等，作為染料製造、有機化合物合成、人造皮、凡士林、醫藥用品、石蠟、樹脂等物品製程之溶劑，此外，甲苯也可用來製造油漆、橡皮、清潔劑、黏著劑等，其基本物理化學特性詳列於表 2-2。

由表 2-2 可知，甲苯具有密度小、低溶解性與高揮發性的特性，在工業上的應用十分廣泛，所以在製程中甲苯廢氣的洩漏是其主要的污染來源，其次，各地加油站地下儲槽洩漏的油氣、都市污水處理廠處理過程中揮發性有機物的逸散，以及受揮發性有機物污染的地下水及土壤，於進行復育工作時的揮發，皆會產生甲苯廢氣，進而污染我們的生活環境及危害人體的健康。

表 2-2 甲苯之基本特性 (行政院環保署, 1996)

辨識 資料	名稱	甲苯 (Toluene)
	同義名稱	Methylbenzene、Methylbenzol、Phenylmethane
	化學式	C ₆ H ₅ CH ₃
物理 及化 學特 性	分子量	92.14
	沸點	110.6°C
	熔點	-95 °C
	外觀	澄清無色
	氣味	芳香族的特性味道
	蒸氣密度(空氣=1)	3.1
	蒸氣壓	22mmHg (20 °C)
	比重(水=1)	0.86 (20 °C)
	水中溶解度	54~58 mg / 100 mL
Henry 常數(atm · m ³ /mol)	6.68 × 10 ⁻³ (at 25°C)	
反應 特性	安定性	空氣中穩定 在光及溼氣下會慢慢分解
	不相容物	1.強酸：會起激烈的放熱反應 2.過氯酸鹽：形成爆炸性的混和物 3.強氧化劑：增加火災和爆炸的危險 4.二氧化硫：激烈反應，鐵和氯化鐵會加速反應

2-2-2 甲苯的環境危害性

由於甲苯的揮發性很高，一經排放即會揮發至大氣，造成空氣污染，美國環境保護署即將其列為優先管制的 31 種揮發性有機物之一 (Den, 1998)，此外，我國環保署亦將甲苯列為優先調查之 30 種有害空氣污染物名單的第七位，此顯示其重要性。另外，美國環保署估計，美國都市污水處理廠每年排放 11000 噸的有害空氣污染物，其中甲苯氣體排放的濃度約 26-40 ppbv (Den, 1997；Webster *et al.*, 1996)。又研究指出 (Quigley *et al.*, 1995)，下水道系統亦會有甲苯的排放，曾測得單一人孔的最大排放量 100 g/hr，而根據國內的研究顯示，台灣目前公民營的加油站已超過 1200 家，推估每年從加油站逸散的揮發性有機物總量約 20000 萬噸，而甲苯是其中主要的污染物，以上這些甲苯氣體若不能確實處理，對附近的居住環境及自然生態即會造成不小的衝擊。

此外，甲苯是一種麻醉劑，當人體吸入之後所產生的急性症狀是有醉意、興奮及暈眩、頭痛、噁心，若曝露於高濃度甲苯氣體的環境下，甚至會引起昏迷、死亡。長時間曝露於含低濃度甲苯氣體的環境中，也會引起中樞神經損害 (行政院環保署, 1996)。其他有關甲苯對人體健康的危害整理於表 2-3。

表 2-3 甲苯對人體健康的危害效應 (行政院環保署, 1996)

健康危害效應	急性	吸入	<ol style="list-style-type: none"> 1. 在 50~100 ppm 下，其蒸氣會刺激鼻及咽喉和呼吸到 2. 在 100~500 ppm 下，造成暈眩、頭痛、噁心及過度疲勞 3. 高濃度下(約 1000 ppm)下，導致無意識和死亡；嚴重暴露可能引起腎衰竭
		皮膚接觸	與液體接觸過久可能會造成嚴重的刺激和皮膚炎(皮膚紅、乾)
		眼睛接觸	<ol style="list-style-type: none"> 1. 其蒸氣會刺激眼睛 2. 其液體會造成角膜損害但可復原
		食入	可能造成嘔吐、腹瀉、心臟衰竭、肺出血、神經系統損害及失明。
	慢性	 <ol style="list-style-type: none"> 1. 長期暴露會造成肝損害及行為問題 2. 長期暴露影響聽力 3. 暴露於 200 ppm 濃度以下，無明顯腎臟受損；500 ppm 以下無肝臟受損 	
暴露之徵兆及症狀	鼻子、喉嚨、呼吸道、眼睛刺激、昏睡、暈眩、頭痛、噁心、失去意識、顫抖、視覺異常、皮膚炎。精神混亂		

2-2-3 三氯乙烯的物化特性及用途

本研究的目標污染物三氯乙烯 (TCE) 屬於含氯脂肪族化合物 (Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons, CAHs)，其基本物理化學特性如表 2-4 所示 (U.S.EPA, 2000)。三氯乙烯為一揮發性有機化合物 (VOCs)，密度為 1.46 g/cm^3 (20°C) 為比重比水重的非水相液體，因此又被定義為 DNAPLs (Dense Non-Aqueous Phase Liquids)。三氯乙烯在大氣中因光氧化作用故半衰期甚短，約為 1 天左右，若在水體中，半衰期可長達 300 天 (Zylstra *et al.*, 1989; Schaumburg, 1990)。所以當其存在於土壤或地下水時，容易造成土壤及地下水的永久性污染 (Yang and McCarty, 2000)。

由於三氯乙烯具有水溶解度低、低可燃或可爆性、高蒸氣密度、化學安定性、低沸點及高蒸氣壓等特殊性質，所以被用來替代碳氫化合物，廣泛地應用於工業用途，包括電子業、乾洗業、化學製造業和鋼鐵業之清洗劑；脫脂、樹脂和塑膠類溶劑；石化工業和煉油工業之有機物萃取溶劑以及金屬表面處理劑等 (盧滄海和賴龍山，1989；林建芬，1994)。三氯乙烯主要的產生源及主要污染途徑如表 2-5 所示 (行政院環保署，2000)。

表2-4 三氯乙烯之基本特性(行政院環保署，1996)

辨識 資料	名稱	三氯乙烯(Trichloroethylene)
	同義名稱	Ethylene Trichloride、Trichloroethylene
	化學式	$\text{Cl}_2=\text{CHCl}$
物理 及化 學特 性	分子量	131.4
	沸點	87.2 °C
	熔點	-73 °C
	外觀	澄清
	氣味	似氯仿的味道
	蒸氣密度(空氣=1)	4.54
	蒸氣壓	57.8mmHg(20 °C)
	比重(水=1)	1.4649(20 °C /4 °C)
	水中溶解度	100mg/L at 25 °C
	Henry 常數(atm · m ³ /mol)	1.17×10^{-3} (at 25 °C)
反應 特性	安定性	空氣中穩定 在光及溼氣下會慢慢分解
	不相容物	1. 鋁粉：極少量酸存在時會劇烈反應 2. 顆粒狀的鋁或鎂：劇烈反應 3. 強氧化劑(如過氧化物、過氯酸鹽)：可能劇烈反應 4. 強鹼：可能形成可燃性氣體二氯乙炔

表 2-5 三氯乙烯之產生源及污染途徑 (行政環境保護署土壤污染評估技術規範之研究計畫, 2000)

	事業別	產生源	污染途徑
三氯乙烯	石油化學原料業	製造二氯乙烯之蒸餾重餾份、製造氯乙烯單體之氯乙烯蒸餾重餾份、製造氯乙烷之分餾塔重餾份	管線及儲槽洩漏
	其他電子零組件業	廢溶劑、IC 電路板/電阻/半導體清洗液	儲槽洩漏、置放洩漏
	電子管業、電線及電纜業、發輸配電機械業	馬達清洗之廢溶劑、錄放影機、電視、冰箱製造之廢溶劑	儲槽洩漏、置放洩漏
	合成樹脂及橡膠業	典型合成樹脂之縮合與加成聚合殘留原料或自槽體、管線、閥洩漏之原料	管線及儲槽洩漏



2-2-4 三氯乙烯的環境危害性

研究指出，三氯乙烯具有致癌性與致腫瘤性，且因環境中自然轉化的速度甚為緩慢 (Vogel *et al.*, 1987)，故已列為環境毒性污染物質(林建芬，1994)。三氯乙烯也無法直接被微生物所分解，需透過共代謝 (cometabolism) 機制才能進行生物降解 (Ishida and Nakamura, 2000)。且降解過程的中間產物，如三氯乙烯環氧化物 (TCE epoxide) 等也會對微生物產生抑制，甚至累積於環境中，造成更多且複雜的污染問題產生。表 2-6 所示，為工研院安全衛生研究中心編印之物質安全資料中，關於三氯乙烯對人體健康危害效應的資料。表中顯示，三氯乙烯危害人體之處即包括肺、腎、皮膚、心臟、呼吸系統及中樞神經系統等多個重要部位。



表 2-6 三氯乙烯對人體健康的危害效應 (工研院安衛中心)

健康危害效應	急性	吸入	<ol style="list-style-type: none"> 1.在 30 ppm 下，其蒸氣會刺激鼻及咽。 2.在 100~600 ppm 下，可能會抑制中樞神經系統，造成暈眩、頭痛、噁心及過度疲勞。 3.高濃度下(1000 ppm 以下)會造成意識喪失、顫抖、肌肉協調能力喪失及視覺異常
		皮膚接觸	與液體接觸過久可能會造成嚴重的刺激和皮膚炎
		眼睛接觸	<ol style="list-style-type: none"> 1.其蒸氣會刺激眼睛 2.其液體會造成角膜損害但可復原
		食入	可能造成嘔吐、腹瀉、心臟衰竭、肺出血、神經系統損害及失明。
	慢性	<ol style="list-style-type: none"> 1.長期暴露會造成肝損害及行為問題 2.可能造成神經系統傷害，其特徵為顫抖、暈眩、焦慮、心跳速率減慢、手的知覺減弱和失眠。 3.暴露於 100~630 ppm 高濃度下，會使男性性能力降低，女性月經的不規則，也會引起神經系統混亂。 	
暴露之徵兆及症狀	刺激感、暈眩、頭痛、噁心、失去意識、顫抖、視覺異常、皮膚炎。		

2-2-5 國內外相關法規規範

甲苯和三氯乙烯同屬於致癌物質，且為我國環保署公告之毒性化合物之。根據民國 90 年環保署公告之地下水管制標準，甲苯的第一類與第二類管制值，分別為 1.00 與 10.00 mg/L。三氯乙烯的第一類與第二類管制值，分別為 0.005 與 0.050 mg/L，如表 2-7 所示。

因為三氯乙烯據化學安定性，在環境中轉化過程很慢，加上具潛在致基因突變性、致癌性等毒性特徵，美國國家職業安全衛生研究院 (NIOSH) 建議將三氯乙烯列為毒性化學物質。美國在 1990 年通過的「清淨空氣法修正案」(CAAA) Title III 中，亦將其列為毒性空氣汙染物 (air toxics)。據「勞工安全衛生法」第三條第一項規定，依其有機溶劑對人體健康危害程度大小而區分成三大類有機溶劑，三氯乙烯屬於對人體健康危害程度最大之第一類之一。故聯合國世界衛生組織 (WHO) 將引用水中三氯乙烯之限制濃度定為 0.03 mg/L，美國環境保護署定定最大汙染濃度 (MCL) 為 0.005 mg/L，最低建議值為零 (Barkach *et al.*, 1990)。於日本方面，規定地下水及土壤檢驗需小於 0.03 mg/L (日本環境六法，1998)。

表 2-7 國內環保署公告地下水管制標準

污 染 物 項 目	管 制 值 (mg/L)	
	第一類	第二類
單環芳香族碳氫化合物		
苯 (Benzene)	0.005	0.050
甲苯 (Toluene)	1	10
多環芳香族碳氫化合物		
萘 (Naphthalene)	0.04	0.40
氯化碳氫化合物		
四氯化碳 (Carbon tetrachloride)	0.005	0.050
氯苯 (Chlorobenzene)	0.1	1.0
氯仿 (Chloroform)	0.1	1.0
氯甲烷 (Chloromethane)	0.03	0.30
1,4-二氯苯 (1,4-Dichlorobenzene)	0.075	0.750
1,1-二氯乙烷 (1,1-Dichloroethane)	0.85	8.50
1,2-二氯乙烷 (1,2-Dichloroethane)	0.005	0.050
1,1-二氯乙烯 (1,1-Dichloroethylene)	0.007	0.070
順-1,2-二氯乙烯 (cis-1,2-Dichloroethylene)	0.07	0.70
反-1,2-二氯乙烯 (trans-1,2-Dichloroethylene)	0.1	1.0
總酚 (phenols)	0.014	0.140
四氯乙烯 (Tetrachloroethylene)	0.005	0.050
三氯乙烯 (Trichloroethylene)	0.005	0.050
氯乙烯 (Vinyl chloride)	0.002	0.020
農 藥		
2,4-地 (2,4-D)	0.07	0.70
加保扶 (Carbofuran)	0.04	0.40
可氯丹 (Chlordane)	0.002	0.020
大利松 (Diazinon)	0.005	0.050
達馬松 (Methamidophos)	0.02	0.20
巴拉刈 (Paraquat)	0.03	0.30
巴拉松 (Parathion)	0.022	0.220
毒殺芬 (Toxaphene)	0.003	0.030
重 金 屬		
砷 (As)	0.05	0.50
鎘 (Cd)	0.005	0.050
鉻 (Cr)	0.05	0.50
銅 (Cu)	1	10
鉛 (Pb)	0.05	0.50
汞 (Hg)	0.002	0.020
鎳 (Ni)	0.1	1.0
鋅 (Zn)	5	50
一 般 項 目		
硝酸鹽氮 (以氮計) (Nitrate as N)	10	100
亞硝酸鹽氮 (以氮計) (Nitrite as N)	1	10

2-3 生物復育技術

生物復育技術 (bioremediation) 的定義是利用微生物或微生物程序，將受污染的土壤、污泥或殘渣中的有機化合物經異化(氧化)、同化(還原)或共代謝作用，分解或轉化成較簡單的有機物或是二氧化碳及水等無害產物，以達到整治之目標。採用生物技術的優點包括可現址處理、處理費用較低、生態相容、確實分解破壞污染物、具有持續性效果等，但也有其缺點如技術選擇困難、處理時間較長、可能產生副產物等。就有機污染物而言，經生物復育技術整治後的污染場址其性質未有重大改變，有利後續使用或維持原有用途 (盧至人，1997)。

相較其他技術而言，生物復育的優點是能將污染物去除而非僅是相的轉移、無額外污染性副產物產生及經濟成本較低。以土壤污染整治來說，用生物復育的方式進行整治受污染的土壤，經處理過後的土壤性質不會有重大的改變，有利於後續使用或是維持原有用途。

現地 (in-situ) 生物復育重點工作為提供適當的環境因子，以提高現地微生物族群的數量，促進現地微生物族群代謝污染物之活性，使其得以有效分解污染物 (Roberts *et al.*, 1990; Semprini *et al.*, 1990; Semprini *et al.*, 1991)。目前已發展之處理技術大致可分為下列幾項：

1. 生物活化法 (biostimulation)：添加生物可分解之介面活性劑或營養鹽於污染場址，活化場址內既有的微生物族群。

2. 生物添加法 (bioaugmentation)：利用基因工程技術直接添加對污染物具有分解能力的特殊菌種於污染場址。由於基因重組微生物添加至自然生態環境中，必需考量其毒性及對生態系之影響，因此必須經過嚴密而謹慎的審查後才可實施。
3. 生物處理法 (biological treatment)：將污染物經通氣 (bioventing)或土壤洗滌 (soil flushing) 後送至特殊生物反應器或是生物濾床、生物洗滌塔去除污染物，或是採用地耕法 (landfarming)、堆肥處理 (composting)。



2-4 三氯乙烯之生物降解

2-4-1 三氯乙烯生物厭氧處理

在厭氧條件下，三氯乙烯利用污染場址中原有的微生物族群，將氯原子脫除置換上氫原子，獲得能量提供細胞代謝和生長。三氯乙烯經由厭氧還原性脫氯 (reductive dehalogenation) 的過程形成順-1,2-二氯乙烯 (*cis*-1,2-dichloroethene)、反-1,2-二氯乙烯 (*trans*-1,2-dichloroethene)及 1,1-二氯乙烯 (1,1-dichloroethene)，繼之形成氯乙烯 (vinyl chloride) 及二氧化碳，其代謝途徑如圖 2-2 所示 (Vogel and McCarty, 1985)。厭氧脫氯過程中，若脫氯不完全，會產生毒性比三氯乙烯更高的二氯乙烯及氯乙烯累積 (Kleopfer *et al.*, 1985; Vogel *et. al.*, 1987; Zylstra *et al.*, 1989)。美國 EPA 已將氯乙烯列為致癌性物質，故目前大多採用生物好氧的方式處理受三氯乙烯污染的場址。

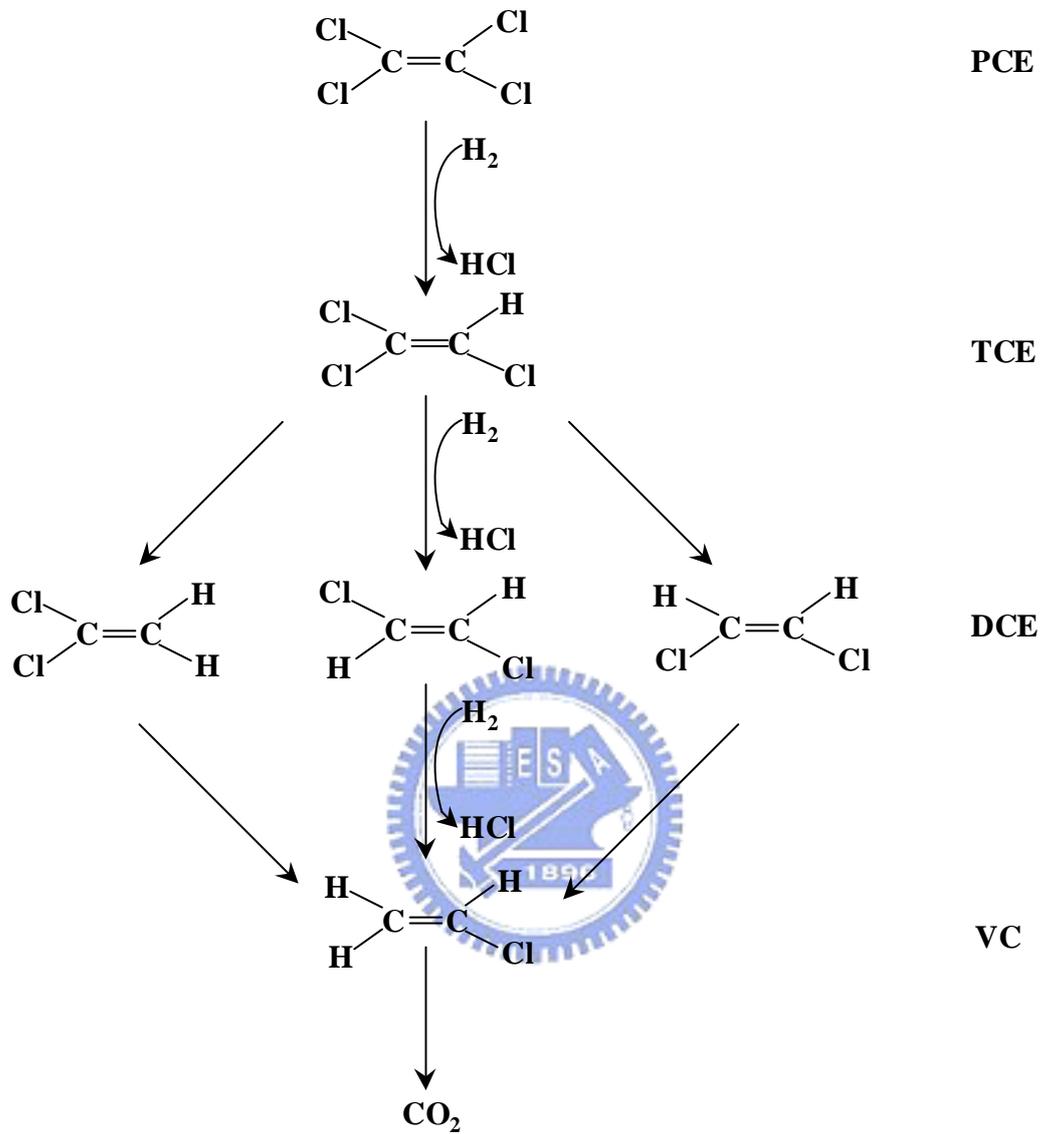


圖 2-2 四氯乙烯經還原性脫氯反應轉換成二氧化碳的可能途徑

(Vogel and McCarty, 1985)

2-4-2 三氯乙烯生物好氧處理

在好氧狀況下，由於微生物無法直接以三氯乙烯作為生長基質進行生物降解 (Bouwer *et al.*, 1981)，但可經由分解結構與三氯乙烯相似或易分解的基質作為主要生長基質而獲得能量。當微生物獲得主要生長基質做為碳源及能量來源時，會被誘導產生氧化酵素 (oxygenase) 來分解主要生長基質，促使菌體增長。由於氧化酵素的專一性較低，不僅能分解生長基質，同時具有分解三氯乙烯的能力，將三氯乙烯分解成無毒害性的二氧化碳和水等 (Criddle *et al.*, 1993)。此種藉由主要生長基質所誘導產生的氧化酵素將三氯乙烯分解的處理方式，稱為好氧共代謝 (aerobic cometabolism)。

Wilson and Wilson(1985) 首先在實驗室發現將天然氣(甲烷)及氧氣曝於裝有受三氯乙烯污染的土壤管柱中可順利馴養現地微生物族群，經由生物好氧共代謝作用將三氯乙烯移除。

目前發現具有共代謝三氯乙烯能力之微生物：

1. 甲烷 (methane) 氧化菌 (Wilson and Wilson, 1985; Vogel and McCarty, 1985; Fogel *et al.*, 1986; Little *et al.*, 1988; Semprini, 1990; Eguchi *et al.*, 2001)
2. 苯環類分解菌：含甲苯、酚、氯酚分解菌等 (Wackett and Gibson, 1988; Hopkins *et al.*, 1993a; Hopkins *et al.*, 1993b; Nelson *et al.*, 1986; Nelson *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1988; Hopkins and McCarty, 1995; Jenal-Wanner and McCarty, 1997; McCarty *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2004; Morono *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007)

3. 丙烷 (propane) 分解菌 (Wackett *et al.*, 1989)
4. 氨 (ammonia) 氧化菌或硝化菌 (Vannelli *et al.*, 1990)
5. 丙烯 (propene) 分解菌 (Ensign *et al.*, 1992)
6. 異戊二烯 (isoprene) 分解菌 (Ewers *et al.*, 1991)
7. 異丙基苯 (isopropyl benzene) 分解菌 (Dabrock *et al.*, 1992)

其中甲烷氧化菌及苯環類分解菌中的甲苯分解菌、酚分解菌，更是目前應用於三氯乙烯共代謝研究之三大族群。

Wackett and Gibson(1988) 分別以甲苯分解菌 *Pseudomonas putida* F1 及甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 共代謝三氯乙烯，結果顯示甲苯分解菌對三氯乙烯的初始移除率明顯大於甲烷氧化菌。

至於在現地復育之應用上，則應分別考慮不同菌種在不同污染環境中所表現之代謝活性，就污染之性質及污染區是否同時受到酵素誘導物(甲苯、酚、甲烷)之污染等化學因子選擇適當的代謝族群。針對三氯乙烯地下污染場址，現地生物復育技術可利用不同生長基質如酚、甲苯、甲烷及氨成功馴養現地具共代謝三氯乙烯能力之菌株 (Semprini, 1990; Hopkins *et al.*, 1993a; Hopkins *et al.*, 1993b; Hopkins and McCarty, 1995; Jenal-Wanner and McCarty, 1997; McCarty *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007)，有效降解三氯乙烯達到現地生物整治效果。Hopkins *et al.* (1993a) 以酚、甲苯、甲烷及氨為主要基質，探討現地微生物族群對三氯乙烯生物共代謝能力，結果指出在不同基質下，生物共代謝三氯乙烯需氧量分別為 2.4

g-DO/g-phenol 、 3.1 g-DO/g-toluene 、 4.0 g-DO/g-methane 及 3.8 g-DO/g-ammonia，同時指出以甲苯或酚為主要基質時，微生物易於馴養，且三氯乙烯移除率較佳 ($\approx 90\%$)。



2-5 基質競爭效應

共代謝機制中，微生物需要生長基質維持酵素活性來共代謝三氯乙烯，由於氧化酵素專一性較低，除分解主要生長基質外，亦具有分解三氯乙烯之能力，故生長基質會與三氯乙烯共同競爭相同的酵素，進而影響微生物分解基質與共代謝三氯乙烯的效率，此現象即所謂的基質競爭效應 (competition)。Hubert *et al.*, (2005) 指出甲苯對於三氯乙烯的抑制大於三氯乙烯對甲苯的抑制。酵素競爭結果主要視氧化酵素與化合物的親和性而定，親和性可由 Monod 方程式中之半飽和常數 (half-saturation coefficient) 來判定，半飽和常數表示微生物與生長基質之親合力 (Alexander, 1994)，當分解基質的半飽和常數愈小，基質競爭效應愈顯著 (Speitel and McLay, 1993)。表 2-8 列出在文獻上曾證實為甲苯分解菌的菌種進行共代謝三氯乙烯的動力參數。

Folsom *et al.* (1990) 以酚作為 *Pseudomonas cepacia* G4 菌株唯一碳源共代謝三氯乙烯，試驗過程中酚的降解速率顯著的比三氯乙烯快許多；但當三氯乙烯濃度增加時，三氯乙烯會抑制酚的降解，使酚的降解速率減慢。張峻嘉等人 (1999) 利用批次試驗及砂管柱連續流試驗探討酚分解菌共代謝三氯乙烯效應，試驗結果顯示當酚濃度超過 4 mg/L 時，高濃度的酚會因為基質競爭抑制及溶氧不足而影響微生物共代謝三氯乙烯的效率。

Fuller *et al.*, (1997) 指出現地土壤微生物族群在甲苯及三氯乙烯個別單

獨存在下，由菌相的型態證實微生物族不會有明顯的改變，但是甲苯及三氯乙烯共同存在時，微生物族群的菌相會有明顯的改變，三氯乙烯的移除也會提高，但是在甲苯濃度高於 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 會抑制現地微生物族群分解碳源的能力。

黃如玉等人 (1999) 利用氣泡床生物反應器與三相活性碳生物濾床反應器來處理三氯乙烯及甲苯廢氣，當進流甲苯濃度提高時，三氯乙烯移除率也隨之上升，一旦進流甲苯濃度超過 $8.96 \text{ g}/\text{m}^3$ ，三氯乙烯移除率便下降。由此可知，在微生物可負載的情況下，提高進流甲苯濃度有助於微生物誘導較多的甲苯氧化酵素，提高微生物對三氯乙烯的降解，一旦進流甲苯濃度超過微生物可負載量時，便會產生基質競爭抑制的現象，造成三氯乙烯移除率明顯降低。同時，當三氯乙烯濃度過高時，亦會影響其本身及甲苯的去除效率和去除能力。

表 2-8 甲苯分解菌生物降解三氯乙烯擬合 Monod 反應動力式的參數

Strain	Batch/Continuous/ Semicontinuous	K _{s, TOL} (mg/L)	k _{TCE} (h ⁻¹)	K _{s, TCE} (mg/L)	Reference:
<i>P. cepacia</i> G4	Chemostat	0.79	0.040	0.79	Landa <i>et al.</i> , 1994
Mixed culture	Batch	1.02	0.00708	8.64	Chang and Alvarex-Cohen., 1995
<i>P. cepacia</i> G4	Fed-batch	-	0.0035	-	Mars <i>et al.</i> , 1996
<i>P. mendocina</i> KR1	Batch	-	0.066	0.96	Sun and Wood, 1996
Mixed Culture	Biofilm	0.027	0.016	0.173	Arcangeli and Arvin, 1997
In situ community	-	1.0	0.029	10	McCarty <i>et al.</i> , 1998
<i>P. putida</i> B2	Batch	2.7	0.054	6.4	Kelly <i>et al.</i> , 2000
<i>P. putida</i> TVA8	CSTR	2.7	0.054	6.4	Kelly <i>et al.</i> , 2000
Mixed Culture	Batch	0.80	0.095	14	Lee and Liu, 2006
In situ community	Semicontinuous	-	0.025	-	Han <i>et al.</i> , 2007

2-6 三氯乙烯對微生物之毒性

許多研究指出當環境或生物處理系統中三氯乙烯濃度過高時，會對微生物造成毒害性，抑制微生物族群代謝三氯乙烯的活性 (Mu and Scow, 1994)。Oldenhuis *et al.* (1989) 將不同濃度三氯乙烯注入 0.42 mg-cells/mL 菌懸液中進行三氯乙烯生物降解試驗，結果顯示當水溶液中三氯乙烯濃度大於 0.2 mM 時，菌株 *Methylosinus trichosporium* OB3b 共代謝三氯乙烯的效率會受到影響。此外，Wackett and Householder(1989) 指出三氯乙烯藉由 *Pseudomonas putida* F1 產生的甲苯雙氧氧化酵素 (TDO) 進行生物共代謝時，代謝過程產生的有毒物質會抑制 *Pseudomonas putida* F1 的生長，使得三氯乙烯之代謝速率漸緩。Lu and Lee(2003) 指出當三氯乙烯初始濃度由 11.1 $\mu\text{g-TCE/g-soil}$ 增加到 105 $\mu\text{g-TCE/g-soil}$ 時，三氯乙烯的生物共代謝效率由 65% 降至 20%，若進一步將三氯乙烯的初始濃度增加到 169 $\mu\text{g-TCE/g-soil}$ 時，三氯乙烯無法經由共代謝作用被去除。

不同菌種對於三氯乙烯毒性有不同程度的反應。Mars *et al.* (1998) 以批次培養測定四種甲苯分解菌 *Pseudomonas putida* mt-2、*P. putida* F1、*P. putida* GJ31 及 *Burkholderia cepacia* G4 對三氯乙烯的影響，三氯乙烯未加入時，四種菌株的菌落數相當，當三氯乙烯加入後，*Burkholderia cepacia* G4、*P. putida* F1 和 *P. putida* GJ31 三種菌株的生存能力在一個月內降低 50~1000 倍。由動力分析結果得知在三氯乙烯加入後，三種菌株對甲苯的親和力降

低了 9 倍，顯示三氯乙烯會抑制微生物對基質的分解。為控制三氯乙烯毒性的影響，可藉由菌株的重複添加來維持微生物共代謝三氯乙烯的能力，或停止菌株與三氯乙烯的接觸，使菌株活性恢復（呂淑惠等人，1999）。



2-7 甲苯分解菌共代謝三氯乙烯機制

甲苯分解菌共代謝三氯乙烯的機制，是利用基質氧化時所產生的甲苯單氧化酵素 (monooxygenase) 或甲苯雙氧化酵素 (dioxygenase) 共代謝三氯乙烯。甲苯單氧化酵素之作用乃是催化一個氧原子併入甲苯分子中形成甲酚 (cresol) 或苯甲酸 (benzoic acid)，其中催化形成甲酚之酵素可同時促進三氯乙烯氧化，氧原子會併入三氯乙烯的碳雙鍵，使三氯乙烯被單氧化酵素轉化為環氧化物 (TCE epoxide) 結構的中間產物。甲苯雙氧化酵素之作用則是直接將兩個氧原子併入甲苯分子中形成 *cis*-toluene dihydrodiol，若以雙氧化酵素共代謝三氯乙烯，則藉由氫氧化作用 (hydroxylation)，氧原子會併入三氯乙烯的碳氫鍵，使三氯乙烯轉化為氯化烷醇結構的中間產物。

甲苯分解菌雖然皆以甲苯為誘導基質，但不同菌株所產生的氧化酵素會有所差異。其中，*P. putida* F1 可視為產生甲苯雙氧化酵素的代表菌種，在甲苯雙氧化酵素作用下，甲苯會轉化為 *cis*-toluene dihydrodiol；而 *P. cepacia* G4、*P. pickettii* PKO1 及 *P. mendocina* KR-1 分別能夠以甲苯單氧化酵素將甲苯氧化為鄰-甲酚、間-甲酚及對-甲酚。另外，含有甲苯單氧化酵素的 TOL 質體，亦能夠於苯環上的甲基官能基進行氧化作用而形成苯甲醇，但該單氧化酵素卻無法進行三氯乙烯的共代謝作用。除了 TOL 質體外，所有苯環類分解菌共代謝三氯乙烯的酵素均作用在苯環上。此現象

說明作用在芳香族苯環上的氧化酵素才是可同時催化芳香族化合物及三氯乙烯之反應。Wackett *et al.* (1988) 指出甲苯雙氧氧化酵素不僅能夠進行雙氧化作用，同時可進行單氧化作用，將一個氧原子併入苯環類化合物。推測甲苯分解菌 *P. putida* F1 共代謝三氯乙烯應是雙氧氧化酵素進行單氧化作用所致。目前已知的甲苯好氧代謝途徑起始氧化程序及其代謝菌種如圖 2-3 所示 (Shields *et al.*, 1991)，其代謝途徑整理於表 2-9。



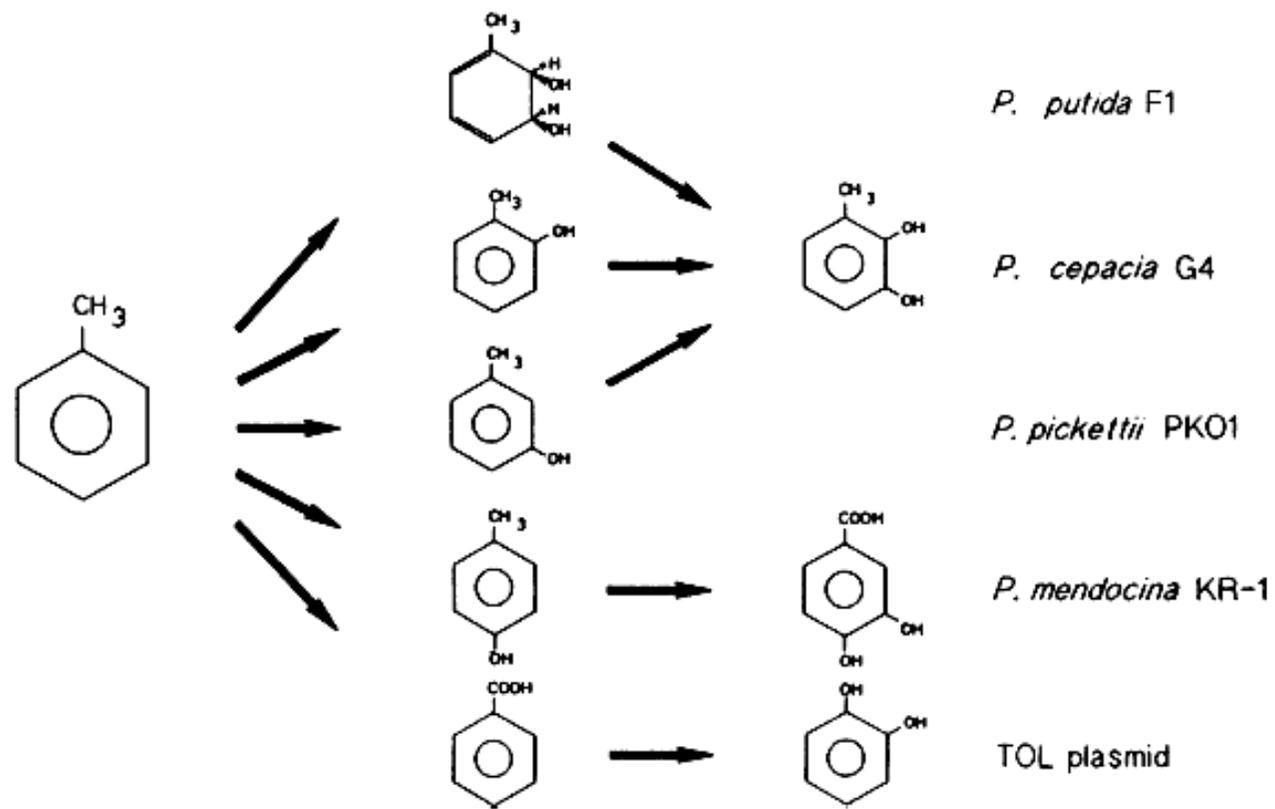
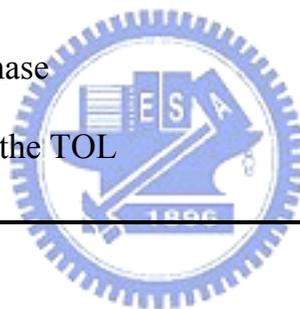


圖2-3 不同甲苯分解菌的好氧代謝途徑 (Shields *et al.*, 1991)

表2-9 甲苯好氧分解菌代謝途徑及產物整理 (Shields *et al.*, 1991)

Organism	Enzyme	Enzyme attack position	Intermediate
<i>P. putida</i> F1	toluene dioxygenase	benzenyl	cis-toluene dihydrodiol
<i>P. cepacia</i> G4	toluene 4-monooxygenase	ortho-	o-cresol
<i>P. pickettii</i> PKO1	toluene 3-monooxygenase	meta-	m-cresol
<i>P. mendocina</i> KR-1	toluene 4-monooxygenase	para-	p-cresol
TOL plasmid	toluene monooxygenase of the TOL plasmid (pWWO)	CH3-	benzoic acid



第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗材料

3-1-1 實驗用水

為減少實驗干擾，本研究實驗藥品的配製以及實驗中所使用的去離子水皆先經逆滲透、活性碳吸附及 UV 照射系統處理過 (ELGA, Ultra-pure water system)，再經滅菌釜 (REXALL, LS-2D) 於 121°C、20 psi 條件下溼熱滅菌 20 分鐘。

3-1-2 主要基質

本研究以甲苯 (MERCK, GR grade) 作為 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 之主要生長基質，以好氧共代謝的方式探討對於目標污染物三氯乙烯的降解效率影響。使用前先以無菌水配製成約 400 mg/L 之儲備溶液，並置於 4°C 冰箱冷藏備用。

3-1-3 目標污染物

三氯乙烯 (MERCK, GR grade) 為 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要生長基質共代謝之目標有機污染物。使用前以無菌水配製成濃度約 131.79 mg/L 之儲備溶液，倒置於 4°C 冰箱冷藏備用。

3-1-4 無機營養鹽

微生物生長除需水、適當的電子提供者及能量碳源外，尚需氮、磷及微量元素以供微生物細胞之合成及酵素作用。添加適當營養鹽能刺激微生物族群生長和提升代謝作用，進而提高復育效果。一般而言，氮、磷為微生物在自然狀況下容易缺乏的營養元素，通常建議生物生長所需之 C:N:P 為 100:10:1。本研究使用之無機營養鹽成分及濃度如表 3-1。其中硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄)、硫酸鎂 (MgSO₄·7H₂O)、硫酸鈣 (CaSO₄·2H₂O)、硫酸鐵 (FeSO₄·7H₂O)、硫酸鋅 (ZnSO₄·7H₂O)、硫酸錳 (MnSO₄·H₂O) 及硫酸銅 (CuSO₄·5H₂O) 等供作微量元素，磷酸氫二鉀 (K₂HPO₄) 及磷酸氫二鈉 (Na₂HPO₄) 除提供微生物生長所需之磷、鉀及鈉外，亦對培養液具緩衝作用。以上化學試藥皆為德國 MERCK 公司的產品。

3-1-5 瓊脂平板培養基

本研究使用 Nutrient Broth 瓊脂平板培養基進行 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 菌數之測定及繼代培養。NB 瓊脂平板培養基配製方式為：取 6.5 g Nutrient Broth(HIMEDIA, 成份如表 3-2) 和 7.0 g Agar powder(HIMEDIA, CAS No. :9002-18-0) 溶於 500 mL 無菌水中，混合均勻後，置於 121°C、121 psi 下高壓濕熱滅菌 20 分鐘。待 NB 液態培養基溫度降至 45 ~ 50°C，於無菌操作台內將適量 NB 培養基倒入無菌培養皿中。待無菌培養皿中的液態 NB 培養基凝固後，置於 4°C 冰箱冷藏備用。

表 3-1 無機營養鹽成分及濃度

Component	Concentration (mg/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.7
K_2HPO_4	1.23
Na_2HPO_4	3.57
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.62
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0031
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0062
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0062
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0031
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0062
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0062

表 3-2 Nutrient Broth 營養鹽成分

Ingredients	Concentration(g/L)
Peptic digest of animal tissue	5.00
Yeast extract	1.50
Beef extract	1.50
Sodium chloride	5.00

3-2 分析方法與設備

3-2-1 甲苯及三氯乙烯的分析

本研究參考行政院環境保護署所公告之水中揮發性有機化合物檢測方法 (NIEA W785.53B, 2003)，利用氣相層析質譜儀 (Gas Chromatograph Mass)，配合吹氣捕捉濃縮系統 (Purge and Trap Concentration) 分析水樣中甲苯及三氯乙烯等揮發性有機物濃度。根據甲苯及三氯乙烯初始及殘留濃度的變化量可了解生物共代謝情形。吹氣捕捉濃縮裝置及氣相層析質譜儀之操作條件分述如下：

一. 吹氣捕捉濃縮系統 (Purge and Trap Concentration, TECKMAR)

- (1) 吹氣捕捉濃縮系統型號：Teckmar Velocity XPT
- (2) 氣體捕捉管型號：Teckmar Purge Trap K
- (3) 使用氣體及壓力：高純氮 (Nitrogen)，70 psi
- (4) 吹氣時間及流量：11 min，36 mL/min
- (5) 脫附時間、溫度及流量：4 min，260°C，300 mL/min
- (6) 傳輸管溫度：150°C
- (7) 傳輸管烘烤時間、溫度及流量：15 min，270°C，300 mL/min

二. 氣相層析質譜儀 (Gas Chromatograph Mass, AGILENT)

- (1) 氣相層析儀型號：hp 6890 gas chromatograph
- (2) 質譜儀型號：hp 5973 MSD

- (3) 使用氣體：高純氦 (Helium)
- (4) 氦氣壓力及流量：4.24 psi，25 mL/min
- (5) 注射口溫度及分流比：265°C，25:1
- (6) 氣象層析管柱型號：Hp 624(60 m × 0.32 mm × 1.8 μm)
- (7) 管柱升溫程式
- 初溫及持溫時間：40°C，5 min
- 升溫速度：8°C/min
- 末溫及持溫時間：180°C，11 min
- 總共所需時間：33.5 min
- (8) 揮發性有機物滯留時間及儀器偵測極限
- 甲苯：17.02 min，1.1 μg/L
- 三氯乙烯：14.78 min，2.6 μg/L

3-2-2 溶氧測定

本研究使用溶氧電極量測甲苯共代謝三氯乙烯過程中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的耗氧量，藉以評估甲苯經生物降解的需氧量。儀器機型為 YSI, 5100。

3-2-3 酸鹼值測定

本研究使用酸鹼值測定儀量測樣品溶液之酸鹼度，藉以確認 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 於中性環境下成長。儀器機型為 WTW, pH/Codi 340i。



3-2-4 OD₆₀₅ 測定

本研究使用分光光度計量測 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 在單一可見光波長 605 nm 下菌液的吸光度，藉由菌液及空白水樣所吸收光度差異，可測定出實驗過程中微生物系內細胞量之吸光值變化。儀器機型為 MERCK, Spectroquant NOVA 60。

3-2-5 菌落數分析

為了解 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 在試驗過程中成長與衰減的情形，本研究菌落計數採用塗抹法 (spread plate; NIEA E203.54B, 2005)。首先使用無菌水將水樣連續稀釋成 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 系列濃度 (serial dilution)，再各取

50 μL 稀釋濃度水樣以無菌三角彎棒均勻塗抹於 NB 瓊脂平板培養基表面。倒置瓊脂平板培養基於 36°C 恆溫培養箱中，48 小時後計數瓊脂平板培養基中所產生的菌落數。將稀釋倍數乘以菌落數介於 30 ~ 300 之間者，以推算水中總菌落數。菌落數以 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) 表示之。



3-3 試驗菌種

3-3-1 菌種來源及保存

本研究使用成大資源工程系 郭明錦老師實驗室由甲苯生物處理系統純化分離出的菌株 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 為實驗菌種來源 (Han *et al.*, 2007)。分離菌株 *Ralstonia sp.* P-10 保存於 20% 的甘油中，並於 -20°C 下進行冷凍保存。

3-3-2 菌種活化及增殖馴養

在實驗進行前以接種環沾取儲存於 20% 甘油中的菌株，利用劃碟法於 NB 瓊脂平板培養基上進行單一菌株的再純化及活化。菌株活化之後，為了避免菌株養分不足、阻礙生長，每隔 3 ~ 4 天於新鮮的瓊脂平板培養基上以劃碟的方式進行菌種繼代培養。

為了取得大量菌體供純菌批次試驗的進行，以接種環將活化後的菌落加入以高度純氧曝氣至溶氧飽和 ($DO \approx 32 \text{ mg/L}$) 的無機營養鹽中，室溫下以甲苯 ($\approx 10 \text{ mg/L}$) 作為唯一碳源，進行甲苯分解菌的增殖培養。在裝有 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 菌懸液的血清瓶底部以攪拌裝置使菌體維持懸浮狀態，有助於基質的傳輸。

菌體增殖培養期約 14 天，7 天後以新鮮無機營養鹽置換 0.5 倍體積的菌懸浮液並曝氣至飽和溶氧、重新添加甲苯。馴養步驟如圖 3-1 所示。

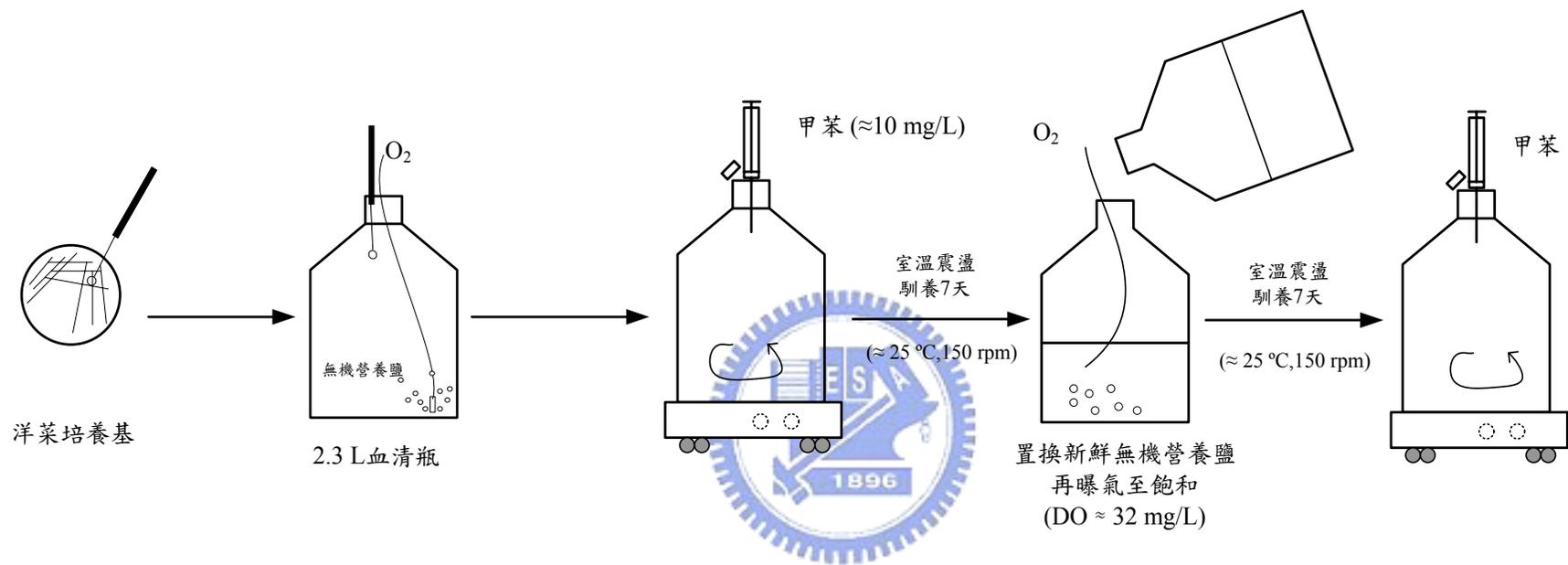


圖 3-1 純菌 HYL-QT1(*Ralstonia* sp. P-10) 活化及馴養步驟

3-4 甲苯分解菌好氧共代謝三氯乙烯批次培養試驗

為了評估 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝降解三氯乙烯的功能性。將增殖培養 14 天的 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 菌懸液以純氧曝氣至溶氧飽和 (≈ 32 mg/L) 後，分裝至 126 mL 的褐色樣品瓶中，並以含鐵氟龍墊片之瓶蓋將樣品瓶鎖緊。為避免甲苯基質毒性的產生，3000 μ L 的甲苯儲備溶液 (400 mg/L) 於 12 小時內分三次注入。換言之，有 3×1000 μ L 的 400 mg/L 甲苯儲備溶液注入每罐微生態系，每次注入後，微生態系內的甲苯濃度約為 3.3 mg/L。450 μ L 的三氯乙烯儲備溶液 (131.79 mg/L) 與注入第一針甲苯時一同注入。實驗設計如表 3-3 所示。為確保菌種存在的單一性，避免外界雜菌的污染，所有的試驗器材皆經過滅菌，且在無菌操作檯上進行。視樣品瓶為微生態系 (microcosm)。批次培養試驗中甲苯添加試驗組詳細操作步驟見圖 3-2。

本部分研究以兩組不同的批次試驗於室溫下 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$, 150 rpm) 進行。其中一組批次試驗在進行 7 天的單一培養期程後，分析植入菌株 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的三重微生態系中甲苯及三氯乙烯殘餘濃度，評估甲苯分解菌以甲苯為基質好氧共代謝三氯乙烯的功能性及降解效率。另一組批次試驗則利用 16 罐植入菌株 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的微生態系，在為期 4 天的單一培養期程內，於不同時間分析微生態系中甲苯及三氯乙烯殘餘濃度，評估 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 共代謝三氯乙

烯的生物降解反應動力參數。為了確認微生態系三氯乙烯的減少為 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝所致，在進行批次試驗的同時，亦進行不添加甲苯的控制組。另進行一組以無菌水添加濃度約 500 µg/L 的甲苯及三氯乙烯，評估整個試驗過程中因洩漏造成的損失。洩漏組甲苯的濃度低於試驗組是為了避免濃度超過儀器偵測極限。

表 3-3 批次試驗實驗操作設計

Batch test Microcosms	Conditions
Toluene-fed microcosmes	HYL-QT1
	3 × 1000 µL toluene 1 × 450 µL TCE
Non-toluene fed microcosmes	HYL-QT1
	1 × 450 µL TCE
Leakage Controls	Sterilized water
	1 × 450 µL TCE 1 × 160 µL toluene ^a

^a Avoid toluene concentration higher than the Instrument detection limit.

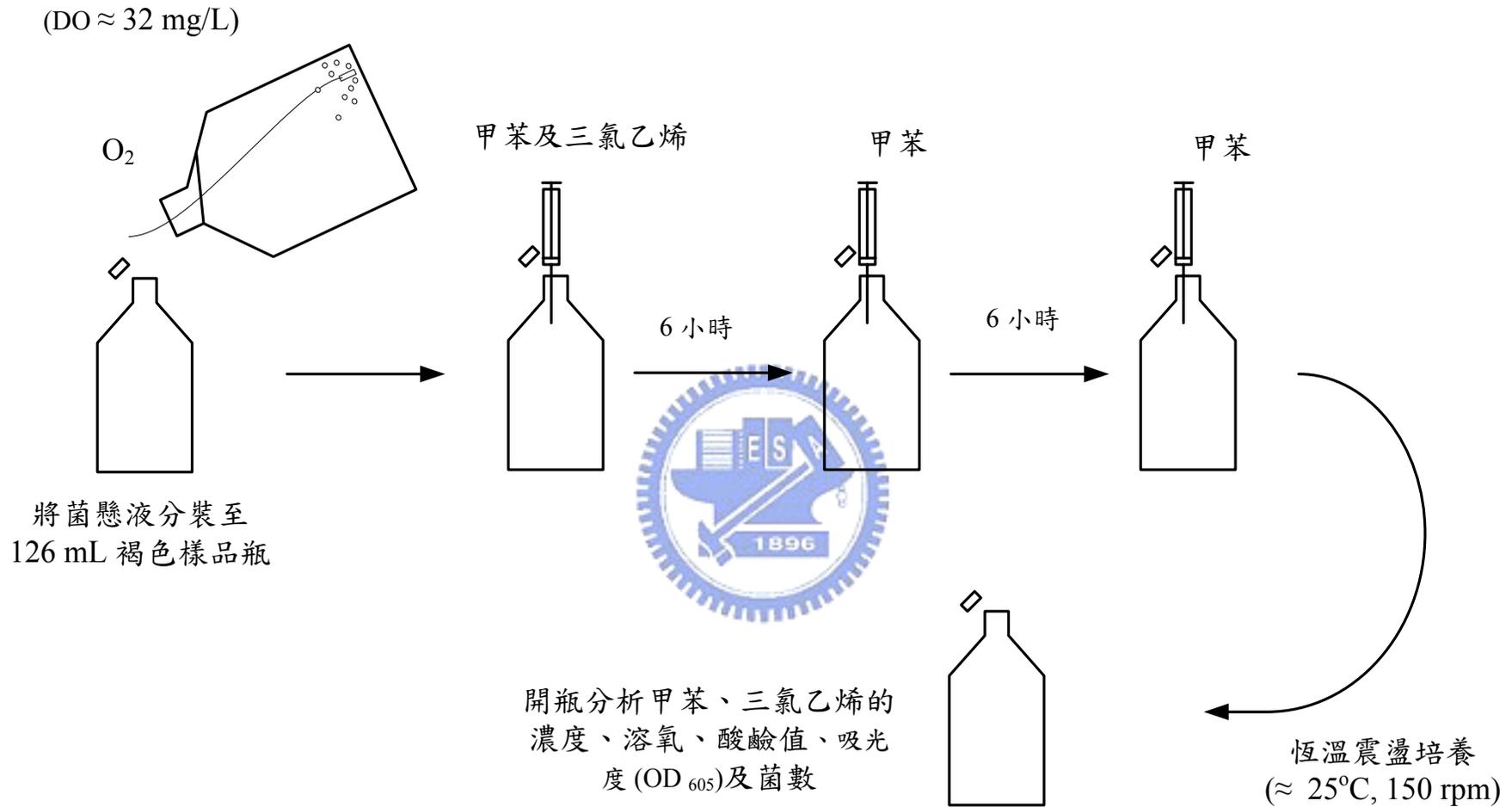


圖 3-2 純菌 HYL-QT1(*Ralstonia* sp. P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯批次試驗流程圖

3-5 甲苯基質多次注入試驗

甲苯基質多次注入試驗之目的在以不同的注入次數及注入體積，將相等質量的甲苯注入 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的微生態系內，探討甲苯存在有效反應時間對三氯乙烯生物降解效率的影響。HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 增殖培養的操作步驟如 3-3-2 節所示。甲苯基質多次注入試驗共分為四組，各組以不同的甲苯注入次數及注入體積於恆溫培養箱中 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$, 150 rpm) 進行 5 天的單一培養期程。各組別的實驗設計詳見表 3-4 及流程圖如 3-3、3-4 及 3-5 所示。

於 126 mL 的微生態系內，甲苯儲備溶液 (約 400 mg/L) 總注入體積為 3000 μL ，總注入質量為 1.2 mg，微生態系內甲苯濃度約為 10 mg/L。以 A 組而言，在實驗開始時，即以一針注入 3000 μL 的甲苯儲備溶液於微生態系中 (1 \times 3000 μL 的 400 mg/L 甲苯儲備溶液)；B 組則在 12 小時內分 3 次注入 (3 \times 1000 μL 的 400 mg/L 甲苯儲備溶液)；C 組在 2 天內分 6 次注入 (6 \times 500 μL 的 400 mg/L 甲苯儲備溶液)；D 組在 3 天內分 9 次注入 (6 \times 350 μL , 3 \times 300 μL 的 400 mg/L 甲苯儲備溶液)。450 μL 的三氯乙烯儲備溶液 (131.79 mg/L) 在與注入第一針甲苯時，一同注入微生態系中，系統中的三氯乙烯濃度約為 500 $\mu\text{g/L}$ 。本部份試驗另進行不添加菌株及甲苯的控制組，評估整個試驗過程中三氯乙烯因洩漏造成的損失。

甲苯基質多次注入試驗除了探討基質存在有效時間對於三氯乙烯生物

降解的效率影響之外，另外在 B 組及 D 組的試驗分別注入的次數為三針及九針，在 100 小時內分析微生態系中溶氧、酸鹼值、OD₆₀₅、甲苯及三氯乙炔濃度變化，評估 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝三氯乙炔生物降解影響因子的變化及一階反應動力速率參數。



表 3-4 甲苯基質多次注入實驗操作設計

Toluene-injection schedules				
	A	B	C	D
Day 1	1 × 3000 μL	3 × 1000 μL	3 × 500 μL	3 × 350 μL
Day 2			3 × 500 μL	3 × 350 μL
Day 3				3 × 300 μL



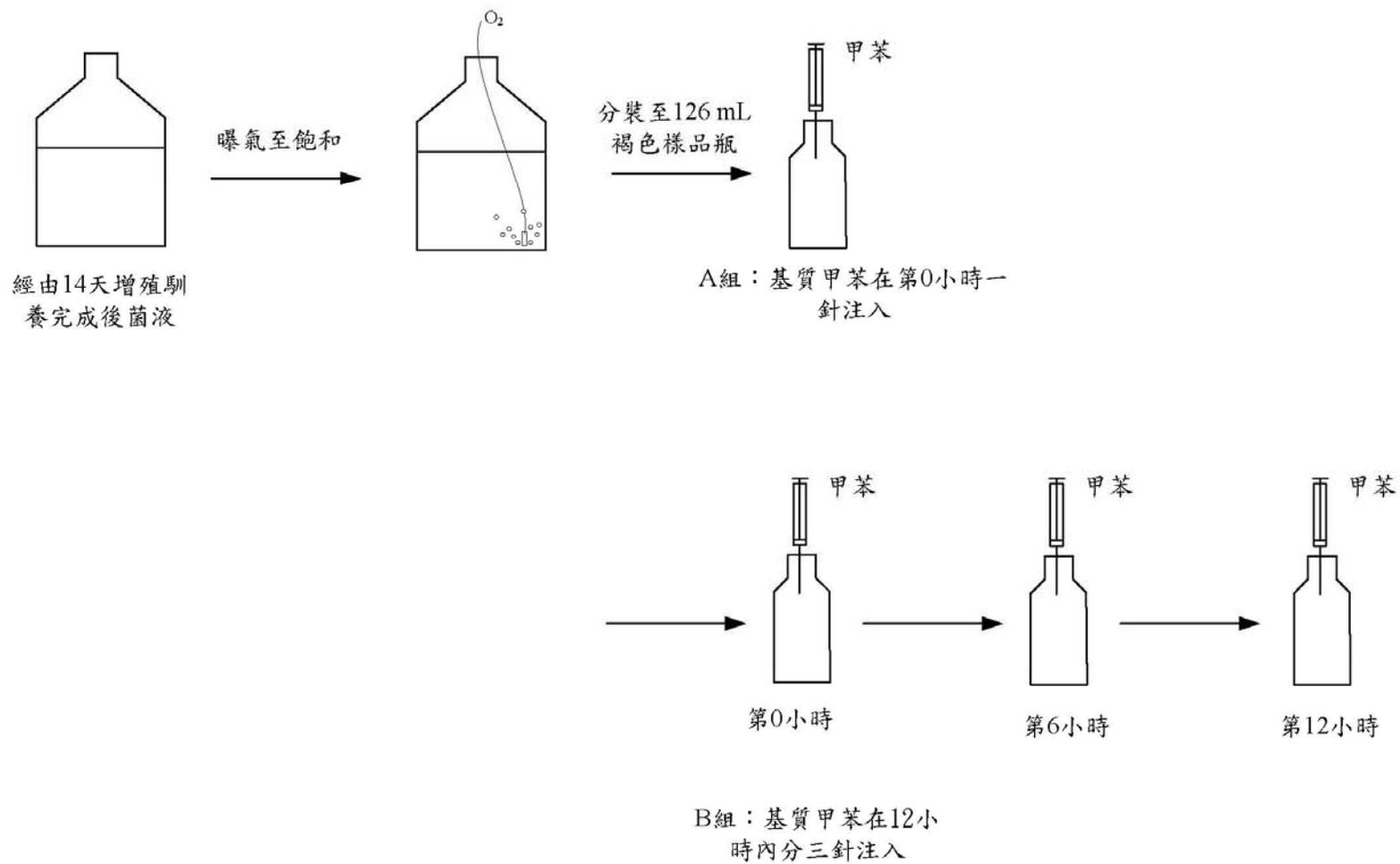


圖 3-3 甲苯基質多次注入 A 組和 B 組實驗設計流程圖

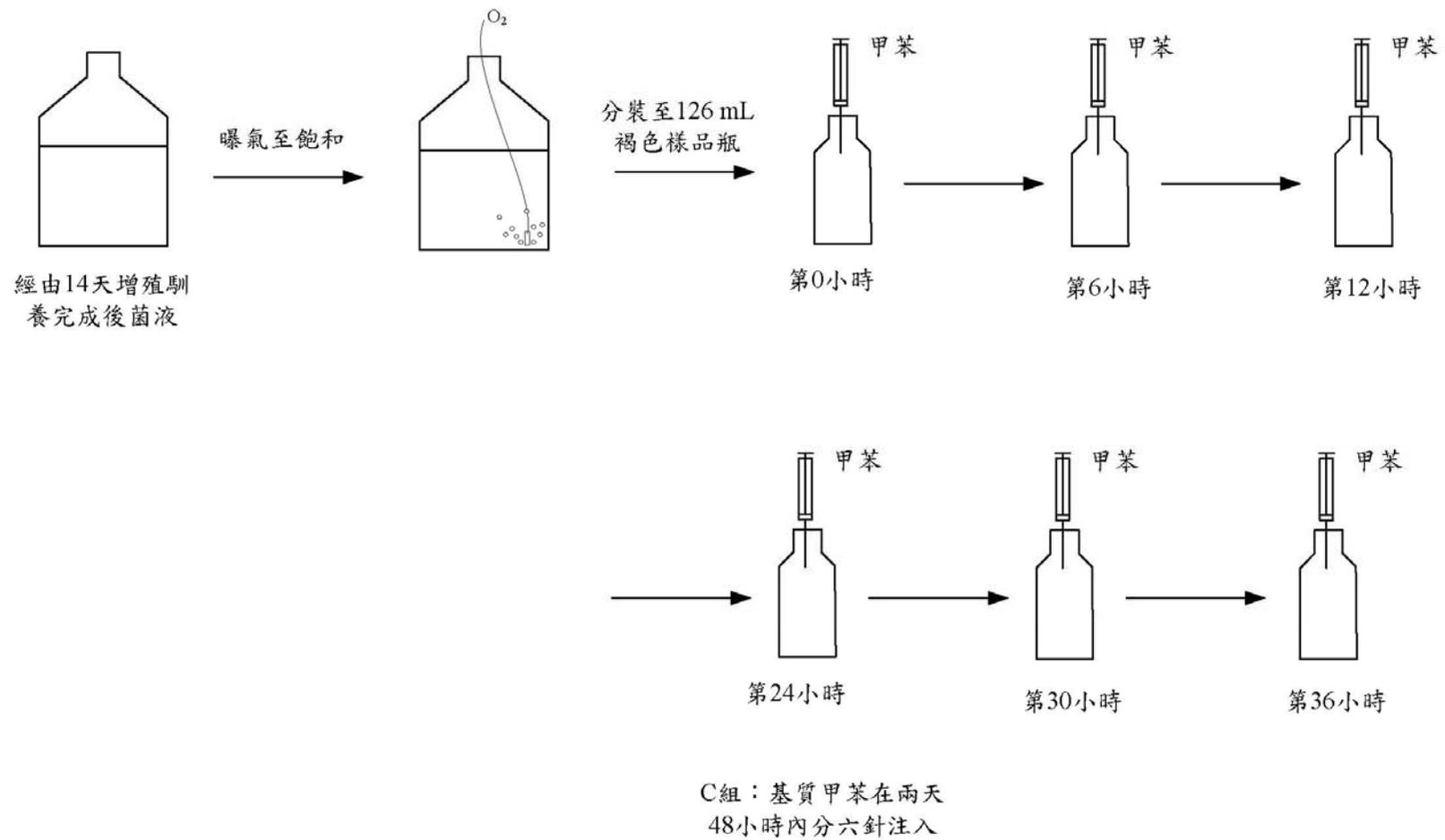
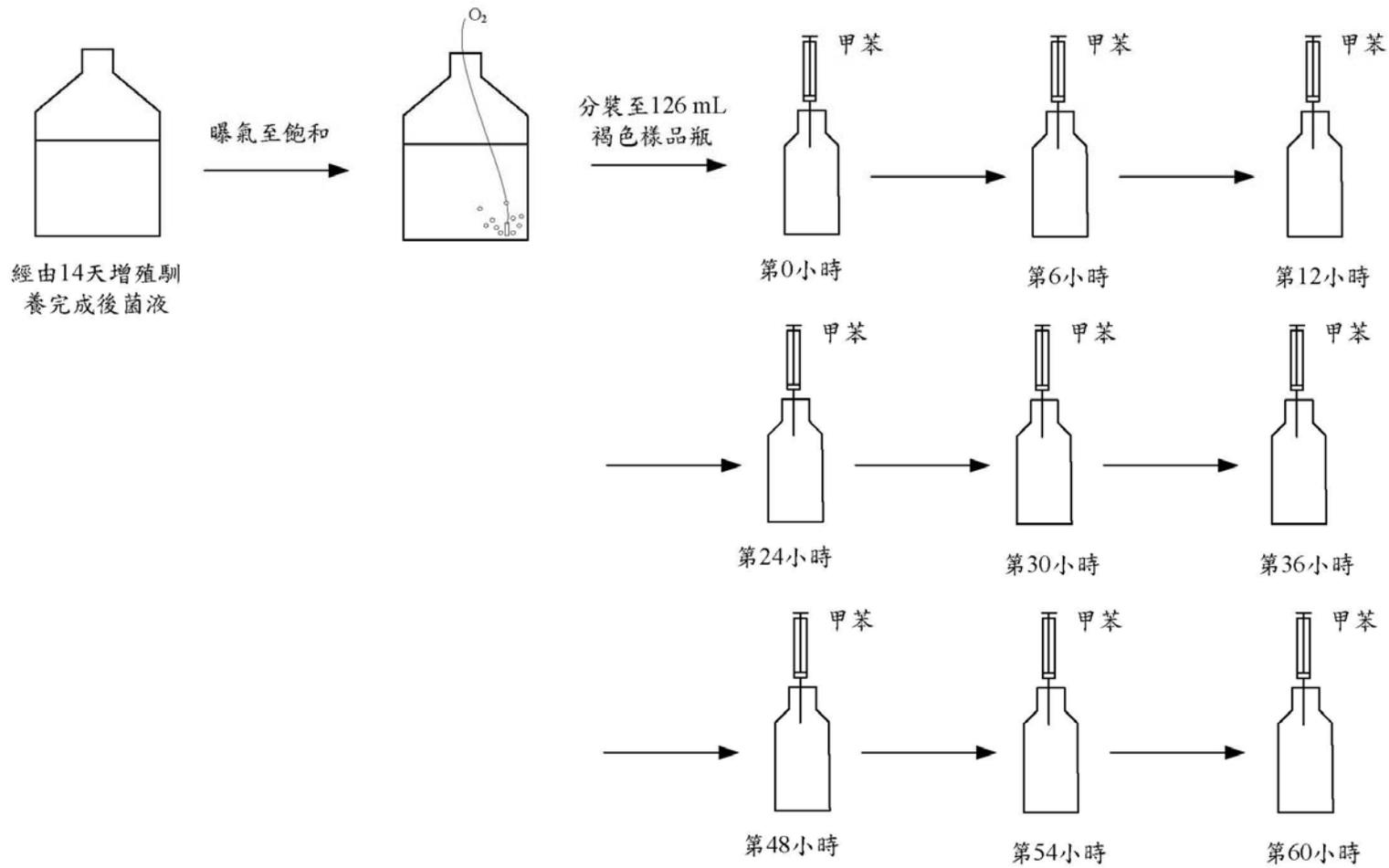


圖 3-4 甲苯基質多次注入 C 組實驗設計流程圖



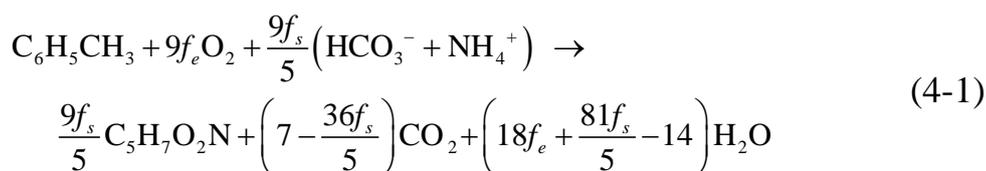
D組：基質甲苯在3天72
小時內分九次注入

圖 3-5 甲苯基質多次注入實驗 D 組設計流程

第四章 結果與討論

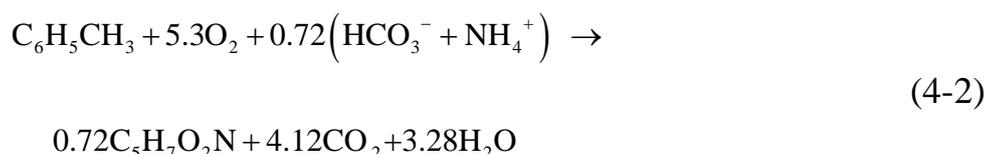
4-1 甲苯生物降解需氧量

根據前人研究指出微生物族群以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯時，生物處理系統中的溶氧量為重要的限制因子 (Jenal-Wanner and McCarty, 1997; Lu *et al.*, 1998)，溶氧之消耗大都用於甲苯之代謝。甲苯經生物降解時的需氧量會隨著甲苯濃度的增加而增加，當生物處理系統中溶氧量不足時，甲苯的生物降解會受到限制，進而限制了甲苯分解菌好氧共代謝三氯乙烯的活性。本研究以硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄) 作為氮源，其甲苯氧化及細胞合成反應的化學計量式根據 Jenal-Wanner and McCarty(1997) 所列之通式修改如下所示：



其中 C₅H₇O₂N 為假設的細胞分子式；f_e 為甲苯氧化時產生能量的分率；f_s 為甲苯氧化時用來合成細胞的分率 (f_s = 1 - f_e)。Jenal-Wanner and McCarty(1997) 經由半連續培養泥漿試驗指出甲苯生物降解的需氧量為 6.0 ± 0.1 mole-oxygen/mole-toluene；Lu *et al.* (1998) 經由批次試驗指出甲苯生物降解的需氧量為 4.5 mole-oxygen/mole-toluene。Han *et al.*, 由半連續泥漿

培養試驗指出甲苯生物降解的需氧量為 5.1 mole-oxygen/mole-toluene。本研究根據純菌 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為基質好氧共代謝三氯乙烯的批次試驗所測得的甲苯生物降解需氧量為 5.3 ± 0.2 mole-oxygen/mole-toluene。當 $9f_e = 5.3$ 時， $f_e = 0.6$ 。本研究以銨氮作為氮源，以氧氣當作電子提供者的甲苯生物降解化學計量式如下：



根據甲苯生物降解化學計量式 (4-2) 指出甲苯生物降解的需氧量為 1.84 mg-oxygen/mg-toluene。

在開始進行 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 批次培養試驗時，將馴養 14 天的懸菌液曝氣至溶氧飽和，微生態系內的溶氧量為 4.0 mg-O₂(126 mL × 32 mg/L)。400 mg/L 甲苯儲備溶液於批次試驗期間的注入量為 3000 μL，其提供了 1.2 mg 甲苯於微生態系中供甲苯分解菌成長所需。根據甲苯生物降解時 1.84 mg-oxygen/mg-toluene 的需氧量，可求得微生態系內 1.2 mg 甲苯完全被生物降解之需氧量為 2.2 mg-O₂，顯示批次試驗中微生態系內 4.0 mg-O₂ 的溶氧量足以提供甲苯分解菌分解 1.2 mg 甲苯所需。因此，在批次試驗的過程中，*Ralstonia sp.* P-10 的活性不會因溶氧量不足而受到抑制。

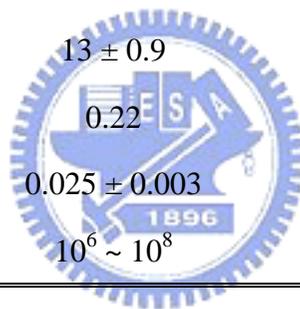
4-2 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 共代謝三氯乙烯批次試驗

HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯功能性批次試驗結果列於表 4-1。微生物系中甲苯及三氯乙烯初始濃度分別為 7.7 ± 0.2 mg/L 及 503 ± 13 μ g/L。經過 7 天的震盪培養， 7.7 ± 0.2 mg/L 甲苯在 *Ralstonia sp.* P-10 微生物系中被降解到低於儀器偵測極限 (1.1 μ g/L)，移除率為 100%。甲苯及三氯乙烯在洩漏控制組(無菌水中僅注入與試驗組等量的甲苯與三氯乙烯)中僅移除了 $1 \pm 0.8\%$ 及 $1 \pm 1.5\%$ ，顯示在批次試驗進行過程中，三氯乙烯並無顯著的洩露損失。

在甲苯添加試驗組三氯乙烯濃度由初始的 503 ± 13 μ g/L 降至 430 ± 10 μ g/L，移除率為 $15 \pm 2\%$ ；在未添加甲苯試驗組三氯乙烯的濃度僅降至 491 ± 1.4 μ g/L，移除率為 $2 \pm 0.3\%$ 。微生物系中溶氧的消耗在甲苯添加試驗組及未添加甲苯試驗組分別為 21 ± 0.9 mg/L 及 6.8 ± 0.4 mg/L。在未添加甲苯的試驗組，HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 因為缺乏主要供給微生物生長的碳源，因此微生物系中溶氧的消耗顯著低於甲苯添加組試驗組。由甲苯添加試驗組及不添加甲苯試驗組間 13% 三氯乙烯移除率的差異，以及溶氧消耗的差異。證實 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 能以甲苯為主要基質，並藉由分解甲苯所產生的氧化酵素共代謝降解三氯乙烯。

表4-1 甲苯分解菌 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝三氯乙烯批次試驗結果

	Toluene-fed Microcosms	Non-toluene-fed Microcosms ^e	Leakage Controls ^g
TCE Remaining Concentration ($\mu\text{g/L}$) ^a	430 \pm 9.9	491 \pm 1.4	498 \pm 3.9
TCE Removal (%)	15 \pm 2.0	2 \pm 0.3	1 \pm 0.8
Toluene Remaining Concentration (mg/L)	ND ^b	NA ^c	357 \pm 5.4
Toluene Removal (%)	100	NA	1 \pm 1.5
Dissolved Oxygen Remaining (mg/L)	13 \pm 0.9	27 \pm 0.4	NA
TCE-degradation Rate Coefficient (day^{-1})	0.22	NA	NA
OD ₆₀₅ ^d	0.025 \pm 0.003	0.008 \pm 0.001	NA
Bacteria Count (CFU/mL) ^g	10 ⁶ ~ 10 ⁸	10 ³ ~ 10 ⁴	NA



^a Results are averages and standard deviations of triplicates. Initial TCE concentration and dissolved oxygen concentration were 503 \pm 13 $\mu\text{g/L}$ and 34.1 \pm 0.5 mg/L, respectively. Total toluene injection per microcosms was 0.97 mg.

^b Not detectable.

^c Not applicable.

^d Initial OD₆₀₅ was 0.004 \pm 0.001.

^e Non-toluene Fed Microcosmes were HYL-QT1 plus TCE only.

^f Leakage Controls were sterilized water plus toluene and TEC respectively.

^g Initial bacteria count was 10⁵ CFU/mL.

4-3 批次試驗生物降解動力探討

本研究在確認 HYL-OT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯之功能性後，另進行為期 4 天的批次試驗，藉由在培養期程內密集測得的甲苯及三氯乙烯殘餘濃度隨時間變化的情形評估 *Ralstonia sp.* P-10 好氧共代謝三氯乙烯之反應動力參數。同時亦根據微生態系中的溶氧量變化、酸鹼值、菌數及菌相隨時間的變化，探討環境條件對 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 共代謝降解三氯乙烯的影響。

4-3-1 三氯乙烯生物降解效率

圖 4-1 為批次試驗中甲苯和三氯乙烯殘餘濃度隨時間變化的情形，圖中的每個數據點分別由單獨的微生態系於不同時間下測得。整個培養期程根據甲苯存在微生態系的時間可分為兩階段來看。三氯乙烯生物降解現象在甲苯存在的第一階段顯著高於甲苯耗盡時的第二階段；在甲苯耗盡的第二階段，只要氧化酵素尚未完全失去活性，三氯乙烯生物共代謝現象則仍會持續發生，只是降解速率較甲苯存在的第一階段低許多。Lu *et al.* (1998) 指出當甲苯耗盡時，殘餘的甲苯氧化酵素無法持續有效的共代謝三氯乙烯。Lu and Lee (2003) 指出該試驗結果 86% 的三氯乙烯生物共代謝效率中，有 90% 發生在甲苯存在階段，在甲苯完全耗盡的階段，三氯乙烯生物共代謝效率僅有 10%。而在本研究中發現給予基質甲苯的 *Ralstonia sp.* P-10 試驗組共代謝三氯乙烯的移除率為 32.3%。基質甲苯存在的第一階段

有 71% 的三氯乙烯共代謝移除效率，在甲苯完全耗盡的階段，三氯乙烯生物共代謝效率僅有 29%。

在甲苯與三氯乙烯同時存在的第一階段，三氯乙烯的降解可能會受到基質競爭氧化酶的影響，進而抑制三氯乙烯的代謝。Lu *et al.* (1998) 觀察到當甲苯初始濃度高於 5 mg/L 時，甲苯對三氯乙烯降解的抑制性才會發生。Lee and Liu (2006) 更指出當甲苯初始濃度為 30 mg/L 時，三氯乙烯的降解才會受到甲苯抑制的影響。實驗室微生態系試驗於單一批次試驗內分三次注入 7.7 ± 0.2 mg/L 的甲苯，每次注入甲苯濃度為 2.6 ± 0.1 mg/L，此濃度相較於 Lu *et al.* (1998) 及 Lee and Liu (2006) 指出的甲苯濃度低許多，因而判斷本研究三氯乙烯的降解應該不會受到甲苯競爭抑制作用。同時，本研究三氯乙烯初始濃度並不高 (503 ± 13 μ g/L)，三氯乙烯對甲苯的抑制亦應該不會發生。Fan *et al.* (1993) 亦指出土壤微生物需經添加主要基質(甲苯)後才具有共代謝三氯乙烯的能力，當土壤中甲苯分解完後，三氯乙烯生物共代謝現象亦終止。根據文獻及本研究結果的相同現象再次證實了當甲苯耗盡時，無法維持三氯乙烯代謝活性，殘餘的甲苯氧化酶無法持續有效的共代謝三氯乙烯，使得三氯乙烯的生物降解速率在甲苯不存在(第二階段)時顯著降低。

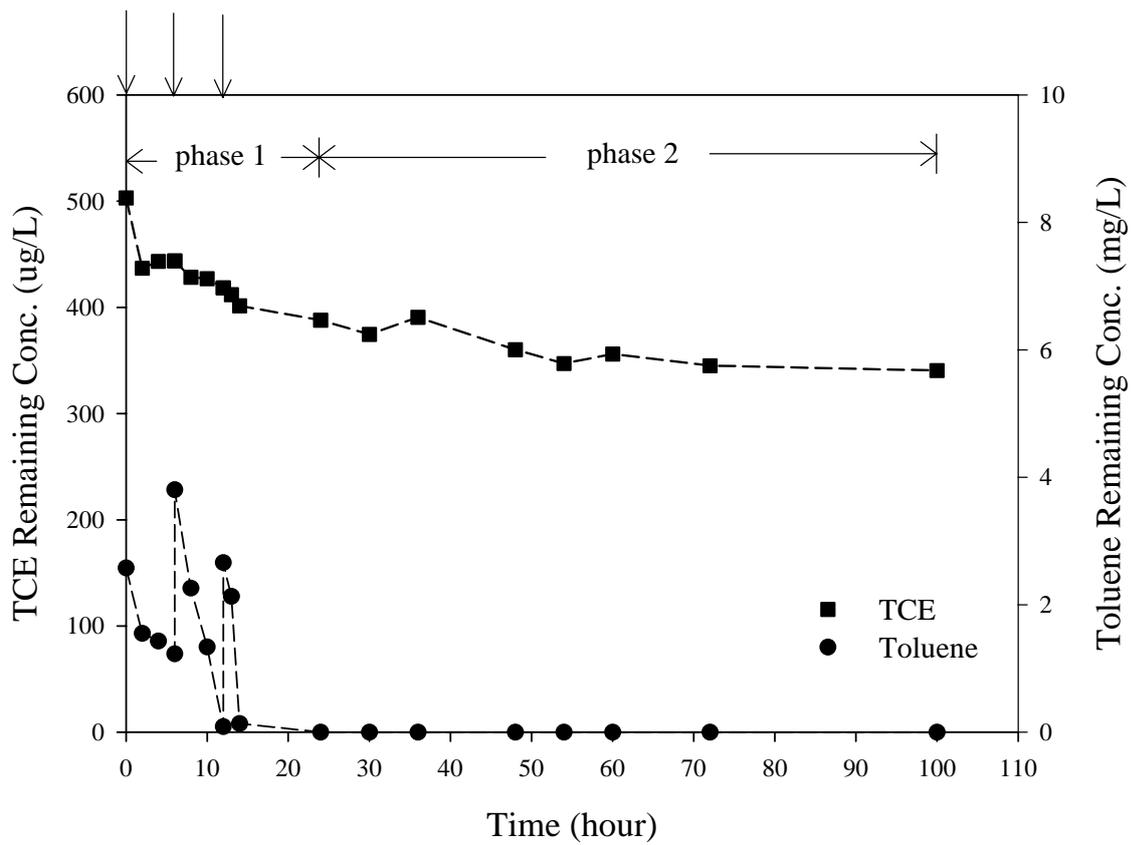


圖 4-1 批次試驗中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生態系內甲苯及三氯乙烯殘餘濃度隨時間的變化(箭頭代表甲苯注入時間點)

實驗室微生物系在甲苯存在(第一階段)時求得的三氯乙烯降解反應動力參數，對於數學模式及現地試驗結果的預測相當有用。Jenal-Wanner and McCarty(1997) 使用 Michaelis-Menten 方程式 (Eckenfelder, 1970) 及 Monod 方程式 (1949) 求取生物共代謝三氯乙烯反應速率參數，式子如下所示：

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_s S}{K_s + S} X_a \quad (4-3)$$

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{k_c C}{K_{sc} + C} X_a \quad (4-4)$$

其中 S 和 C 為主要基質 (甲苯) 以及目標污染物 (三氯乙烯) 濃度 ($\mu\text{g/L}$)； X_a 為活性細胞濃度 (mg/L)； k_s 和 k_c 為甲苯每小時消耗速率以及三氯乙烯每小時被共代謝降解之最大速率 (hour^{-1})； K_s 和 K_{sc} 分別為甲苯和三氯乙烯的親和常數 ($\mu\text{g/L}$)。當三氯乙烯濃度遠小於親和常數 K_{sc} ($C \ll K_{sc}$)，方程式 (4-4) 可改寫成下式：

$$-\frac{dC}{dt} \approx \frac{k_c}{K_{sc}} X_a C = k' X_a C \quad \text{when } C \ll K_{sc} \quad (4-5)$$

若活性細胞濃度 X_a 在樣品瓶中呈均勻分布，方程式 (4-5) 可整合成下式：

$$C = C_i e^{-k' X_a t} \quad (4-6)$$

其中 C 及 C_i 分別為三氯乙烯進流及在單一培養期程結束時的濃度

($\mu\text{g/L}$); t 為反應時間 (hour)。HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系統中可利用方程式 (4-6) 來評估三氯乙烯生物降解反應動力參數。

Han *et al.*, (2007) 針對現地污染場址、實驗室半連續培養泥漿法及純菌 HYL-QT2(*Pseudomonas putida*) 求得之三氯乙烯一階反應動力參數分別為 2.0/day、0.6/day 及 0.5/day。圖 4-2 為本研究中擬合之三氯乙烯一階反應速率常數，圖中顯示甲苯存在微生物系統的時間非常短，在為期 4 天 (100 小時) 的單一培養期程內，甲苯存在的第一階段只有 1 天。根據方程式 (4-6)，以最小平方擬合的第一階段三氯乙烯生物共代謝降解一階反應速率回歸方程式如下：


$$C = 468.62 e^{-0.0094 t} \quad (4-7)$$

由相關係數平方值 ($R^2 = 0.77$) 得知一階反應動力模式適用於生物共代謝降解速率方程式。當微生物菌落數為 10^8 CFU/mL 時，三氯乙烯生物共代謝一階反應速率參數 ($k'X_a$) 在甲苯存在的第一階段為 0.22/day(0.0094/hour \times 24 hour/day)。

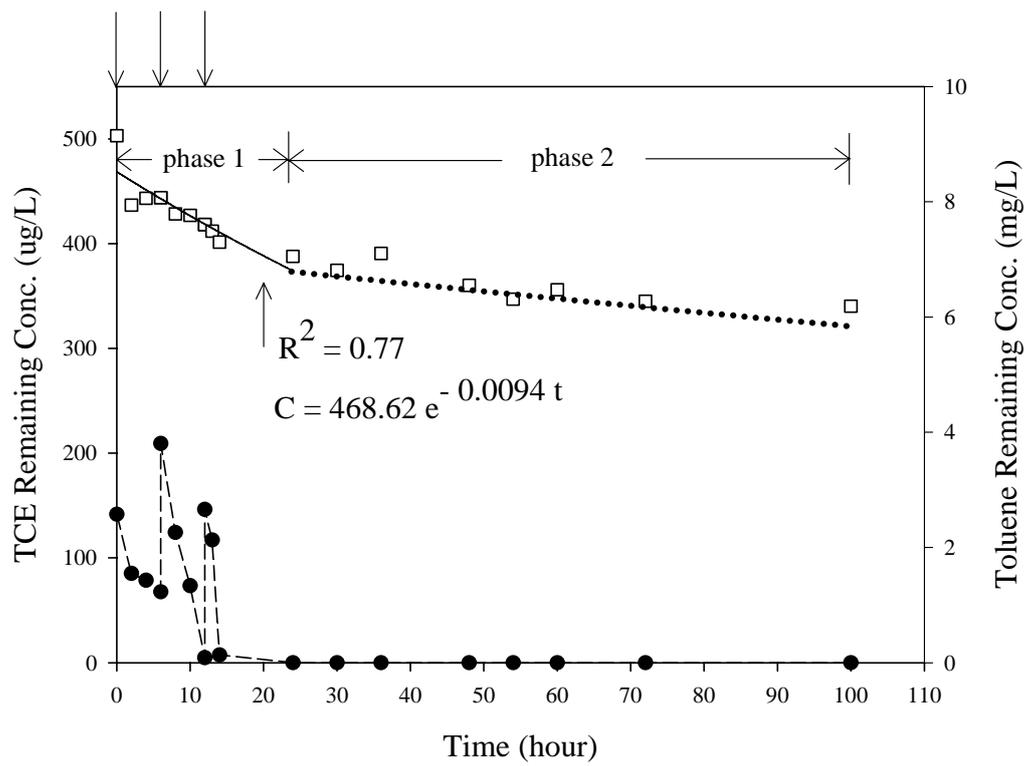


圖 4-2 擬合之三氯乙烯一階反應速率常數(箭頭代表甲苯注入時間點)



4-3-2 溶氧量及 OD₆₀₅ 變化

由三氯乙烯生物降解試驗得知，除了三氯乙烯的降解效率與甲苯存在的有效反應時間有著密切關係外，微生物系中的溶氧量與 OD₆₀₅ 亦隨著甲苯存在的有效時間區分成兩個階段。由圖 4-3 所示，甲苯基質仍存在的第一階段，微生物系的溶氧量隨著反應時間的增加而減少，溶氧量由一開始的 34.3 mg/L 降到 17.4 mg/L，當甲苯完全耗盡時(第二階段)微生物系中的溶氧量幾乎穩定維持在一定值。同時，微生物系的 OD₆₀₅ 在甲苯存在的第一階段呈現顯著的增長，OD₆₀₅ 在 24 小時的反應時間內由初始的 0.004 急遽攀升至 0.026；而甲苯不存在時，OD₆₀₅ 僅有些許的變化。

根據試驗期間溶氧量及 OD₆₀₅ 隨甲苯存在於微生物系內有效反應時間變化的趨勢，再次證實純菌 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 能在好氧環境下分解甲苯，並藉由分解甲苯時所產生的 ATP(adenosine triphosphate) 進行細胞合成，促進菌體的增長。

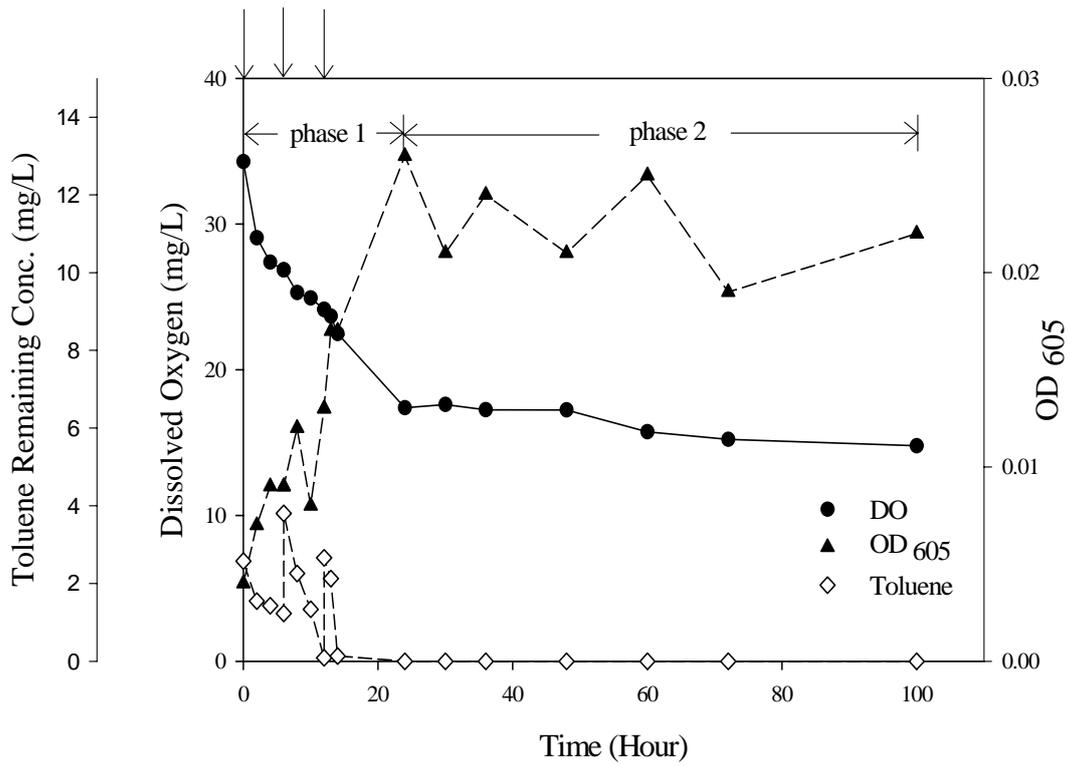


圖 4-3 批次試驗中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生態系中的甲苯殘餘濃度、溶氧量及吸光度(OD₆₀₅) 隨時間的變化(箭頭代表甲苯注入時間點)

4-3-3 菌落數及菌相變化

微生物系中菌體的增長除了可由 OD_{605} 作為依據外，亦可由菌落數變化的情形來證實。反應初期，菌落數在 24 小時的反應時間內(第一階段)由 10^5 CFU/mL 迅速增長到 10^8 CFU/mL；在第二個試驗階段，因為甲苯已消耗殆盡，加上三氯乙烯的毒性抑制進而降低的微生物的代謝行為，菌落數也從 10^8 CFU/mL 緩慢降到 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL。根據批次試驗前後 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的菌相圖(圖 4-5(a) 及圖 4-5(b)) 可看出在批次試驗進行期間，微生物系沒有受到外來菌種的污染且菌種型態呈現一致，此結果可再次證實純菌 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 確實能以甲苯為主要基質，利用分解甲苯產生的氧化酵素，以好氧共代謝的作用將微生物系中的三氯乙烯移除。



4-3-4 酸鹼值變化

環境中酸鹼值是影響微生物生長的一個主要因素，在進行批次試驗時，隨著時間點監測酸鹼值的變化，以確定微生物是在合適的環境中生長。如圖 4-6 所示，試驗期間微生物系中的酸鹼值為 8.36 降至 7.18，HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系的酸鹼值維持在 6~8 之間，為最適合微生物生長的範圍。在本研究中，酸鹼值的變化不會影響到 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝三氯乙烯的效率。

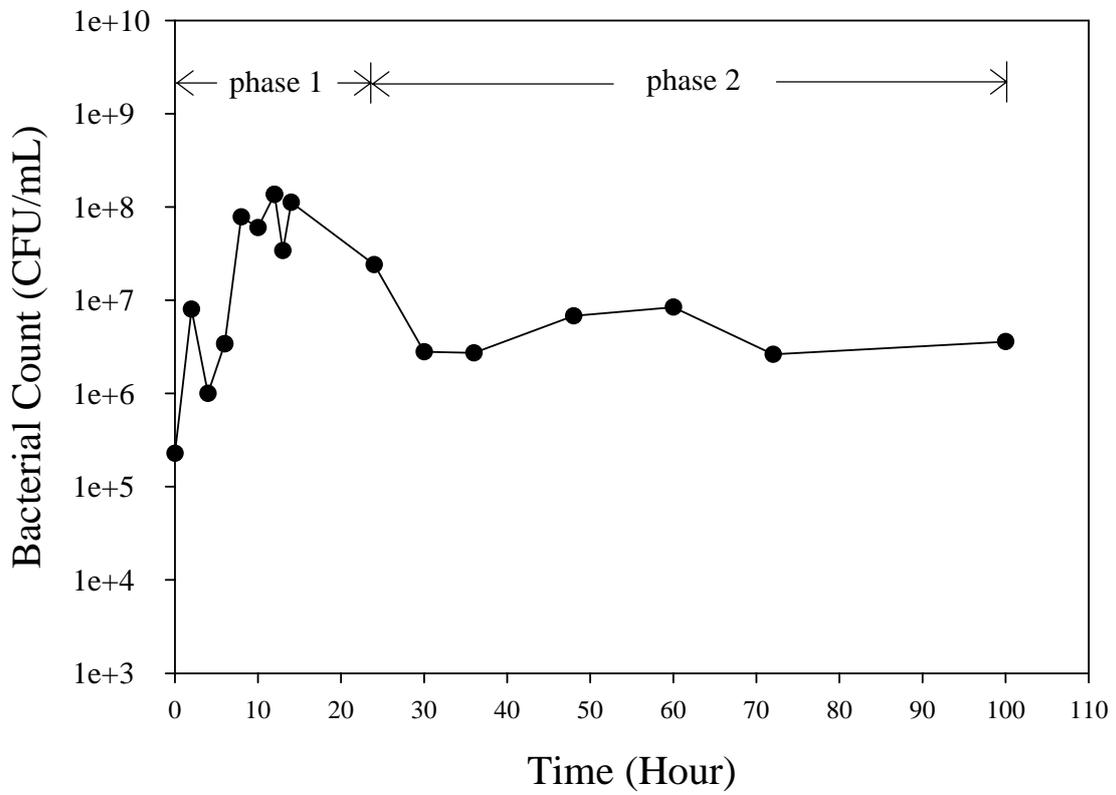
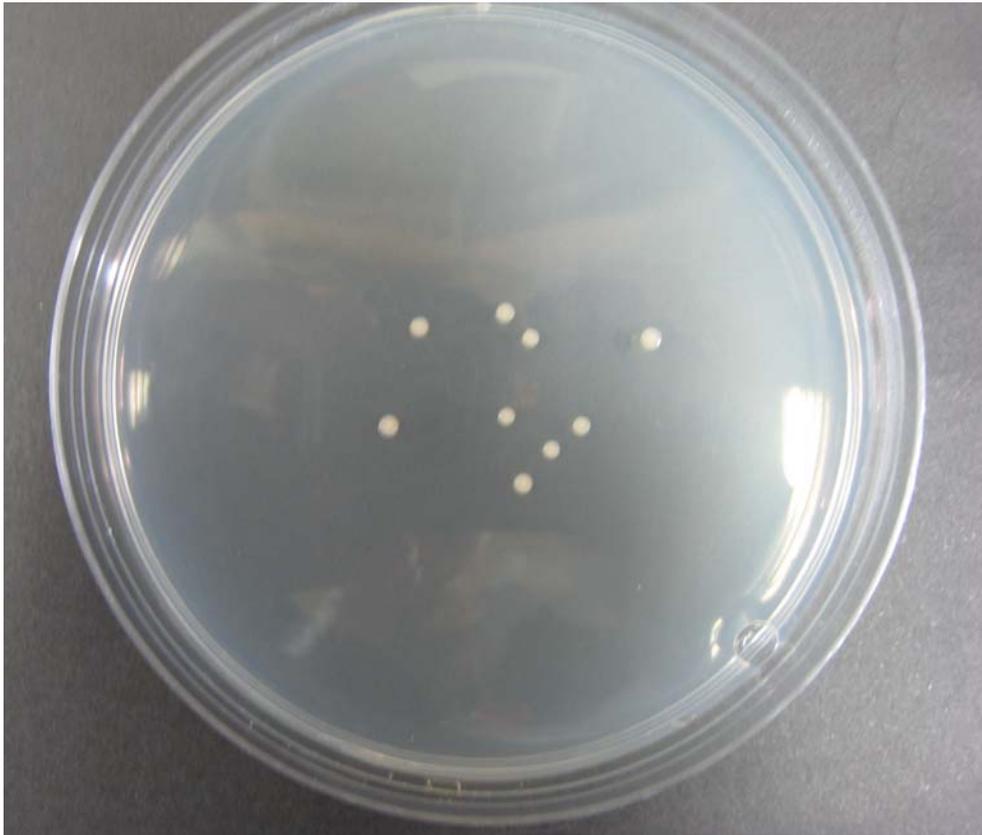


圖 4-4 批次試驗中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系中的菌落數隨時間的變化

(a)



(b)



圖 4-5(a) 及 4-5(b) 分別為批次試驗前後的菌相

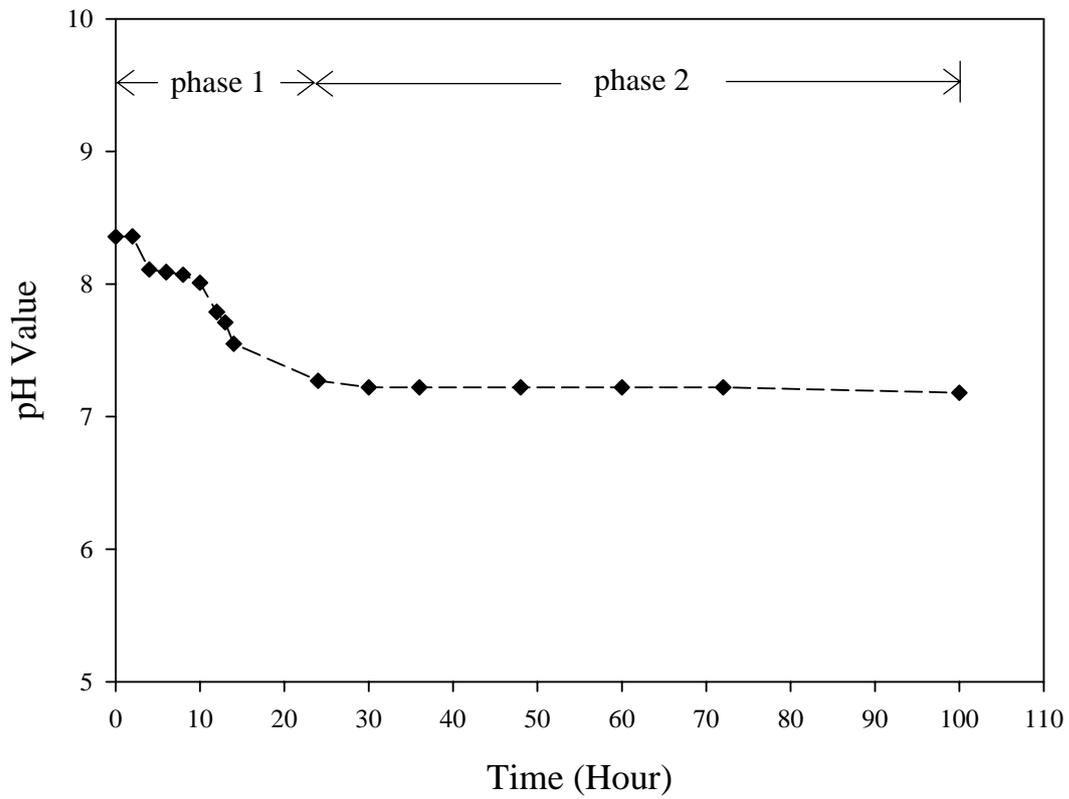


圖 4-6 批次試驗中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系中的酸鹼值隨時間的變化

4-4 甲苯基質多次注入試驗

為了證實甲苯存在生物處理系統中的有效反應時間對三氯乙烯生物降解效率影響的假設，甲苯基質多次注入試驗以四組 (A 組 ~ D 組) 不同的甲苯注入次數及注入體積，將等質量的甲苯注入 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系中，各組甲苯注入次數及注入體積見表 3-3。甲苯注入的頻率以 D 組最密集 (3 天內分 9 次注入)，A 組則相反(一針注入)。

在為期 4 天的單一培養期程，A 組 ~ D 組三氯乙烯濃度由 465 ± 25 $\mu\text{g/L}$ 分別降至 370 ± 10 $\mu\text{g/L}$ (A 組)、 349 ± 3 $\mu\text{g/L}$ (B 組)、 345 ± 9 $\mu\text{g/L}$ (C 組) 及 312 ± 21 $\mu\text{g/L}$ (D 組)；三氯乙烯生物共代謝效率依序為 $21 \pm 2\%$ ， $25 \pm 1\%$ ， $26 \pm 2\%$ 及 $33 \pm 4\%$ ，甲苯基質多次注入的結果列於表 4-2。根據甲苯基質多次注入試驗結果證實三氯乙烯生物共代謝效率與甲苯注入頻率成正比，甲苯存在於 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生物系的有效時間愈長，共代謝生物降解三氯乙烯效率愈高。因此，藉由增加基質甲苯存在生物處理系統中的有效時間，可有效提升三氯乙烯生物共代謝效率。

表 4-2 甲苯基質多次注入試驗結果^a

	Toluene injection schedule			
	A	B	C	D
TCE Remaining (µg/L)	370 ± 10	349 ± 3	345 ± 9	312 ± 21
TCE Removal (%)	21 ± 2	25 ± 1	26 ± 2	33 ± 4
Toluene Remaining (mg/L)	ND ^b	ND ^b	ND	ND
Toluene Removal (%)	100	100	100	100
Dissolved Oxygen Remaining (mg/L)	17 ± 0.5	16 ± 0.5	16 ± 0.5	14 ± 0.7
Oxygen Consumption (mol-DO/mol-toluene)	5.7 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.2	6.6 ± 0.2
Final Bacteria Count (CFU/mL)	2.67 E + 06	3.36 E + 06	7.70 E + 06	1.36 E + 08
OD ₆₀₅ ^d	0.038 ± 0.003	0.038 ± 0.003	0.039 ± 0.003	0.054 ± 0.003

^a Results are averages and standard deviations of triplicates. Initial TCE concentration and dissolved oxygen concentration were 465 ± 25.4 µg/L and 32.9 ± 1.2 mg/L, respectively. Total toluene injection per microcosms was 1.03 mg.

^b Not detectable.

^c Initial OD₆₀₅ was 0.040 ± 0.002.

^d Non-toluene Fed Control plus TCE only.

4-5 比較甲苯基質多次注入試驗

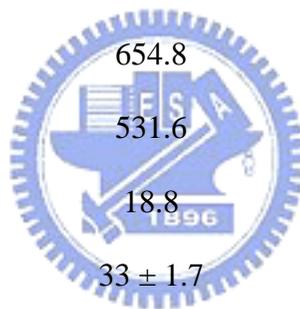
在本研究中，為了更深入探討甲苯基質多次注入對 HYL-QT1 (*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝降解三氯乙烯的影響。將 B 組(甲苯分三針注入)及 D 組(甲苯分九針注入)試驗組在為期 4 天(100 小時)內密集採樣分析甲苯、三氯乙烯濃度及環境因子的變化。並以最小平方法擬合的第一階段三氯乙烯生物共代謝一階反應速率回歸方程式，期望可以更深入了解多次注入對於提升三氯乙烯生物降解的因素。在本次試驗中每一個數據點都是由個別微生態系在不同時間所取得。試驗結果如表 4-3。

4-5-1 三氯乙烯生物降解效率比較

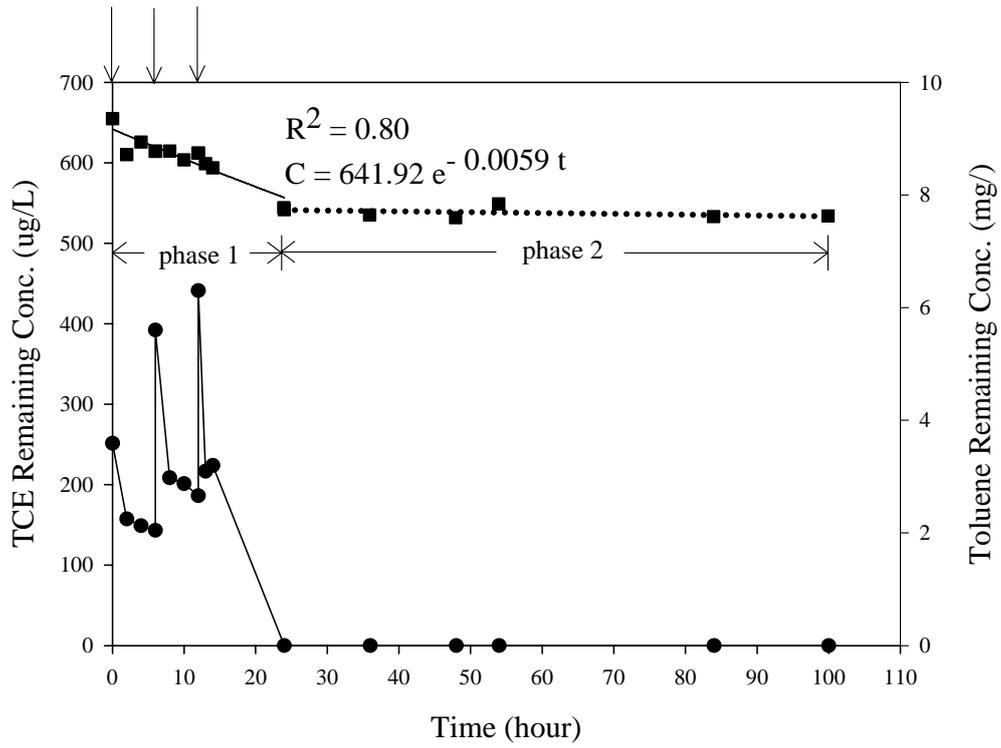
由圖 4-7(a) 及 4-7(b) 可以看到基質甲苯分三針及九針注入時，甲苯及三氯乙烯的濃度隨著時間點而變化。甲苯注入的次數越多，代表甲苯存在於微生物處理系統的時間越久(第一階段越長)，表示微生物作用的時間越長，HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 有較長的時間可以分解甲苯，即分解甲苯氧化酵素的時間越長，共代謝生物降解三氯乙烯的時間也隨之增加。本研究中三氯乙烯的移除率由 B 組的 18.8% 上升到 D 組的 29.6%。證實在相同的培養期程內，基質甲苯存在的有效反應時間越長，HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 好氧共代謝三氯乙烯移除效率越高。

表 4-3 比較甲苯基質多次注入試驗結果總表

	B	D
Injection Frequency	3 times / 1 day	9 times / 3 days
Toluene Remaining	ND	ND
Toluene Removal (%)	100	100
Initial TCE ($\mu\text{g/L}$)	654.8	545.3
TCE Remaining	531.6	383.9
TCE Removal (%)	18.8	29.6
Initial Dissolved Oxygen (mg/L)	33 ± 1.7	30 ± 0.4
Dissolved Oxygen Remaining	14.78	11.18
TCE-degradation Rate Coefficient (day^{-1})	0.14	0.12
Initial OD ₆₀₅	0.005	0.011
OD ₆₀₅	0.022	0.037



a.



b.

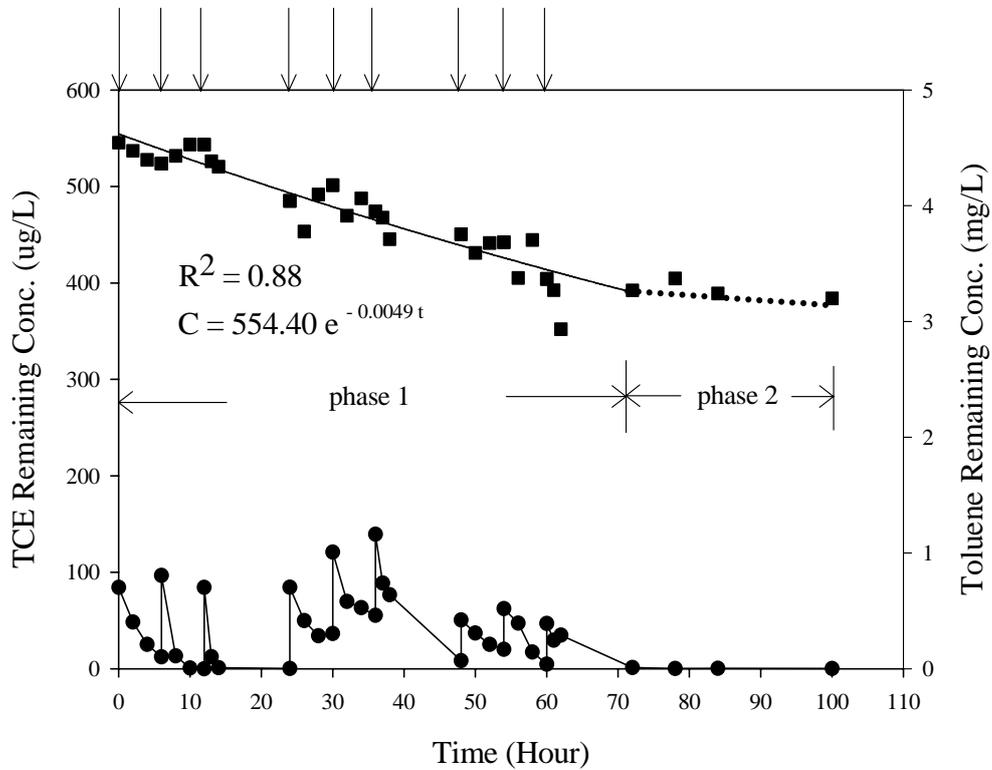


圖 4-7 (a) B 組及 (b) D 組甲苯及三氯乙烯殘餘濃度隨時間的變化圖

根據方程式 (4-6)，B 組以最小平方擬合的第一階段三氯乙烯生物共代謝一階反應速率回歸方程式如下：

$$C = 641.92 e^{-0.0059 t} \quad (4-8)$$

$$R^2 = 0.80$$

三氯乙烯生物共代謝一階反應速率參數 ($k'X_a$) 在甲苯存在的第一階段為 0.14/day(0.0059/hour \times 24 hour/day)。

D 組以最小平方擬合的第一階段三氯乙烯生物共代謝一階反應速率回歸方程式如下：

$$C = 554.40 e^{-0.0049 t} \quad (4-9)$$

$$R^2 = 0.88$$

三氯乙烯生物共代謝一階反應速率參數 ($k'X_a$) 在甲苯存在的第一階段為 0.12/day(0.0049/hour \times 24 hour/day)。

4-5-2 溶氧量變化比較

由圖 4-8 比較 B 組及 D 組的甲苯存在時間(第一階段)長短,在甲苯注入九針的 D 組裡,其甲苯存在的有效反應時間為 B 組的三倍,所以在 D 組試驗 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的溶氧需求量較 B 組來的高。兩組的氧氣消耗量皆在甲苯耗盡後趨於平緩。由溶氧消耗量的差異可證實,甲苯存在於微生態系時間越長,*Ralstonia sp.* P-10 以甲苯為基質好氧共代謝三氯乙烯的效率越高。

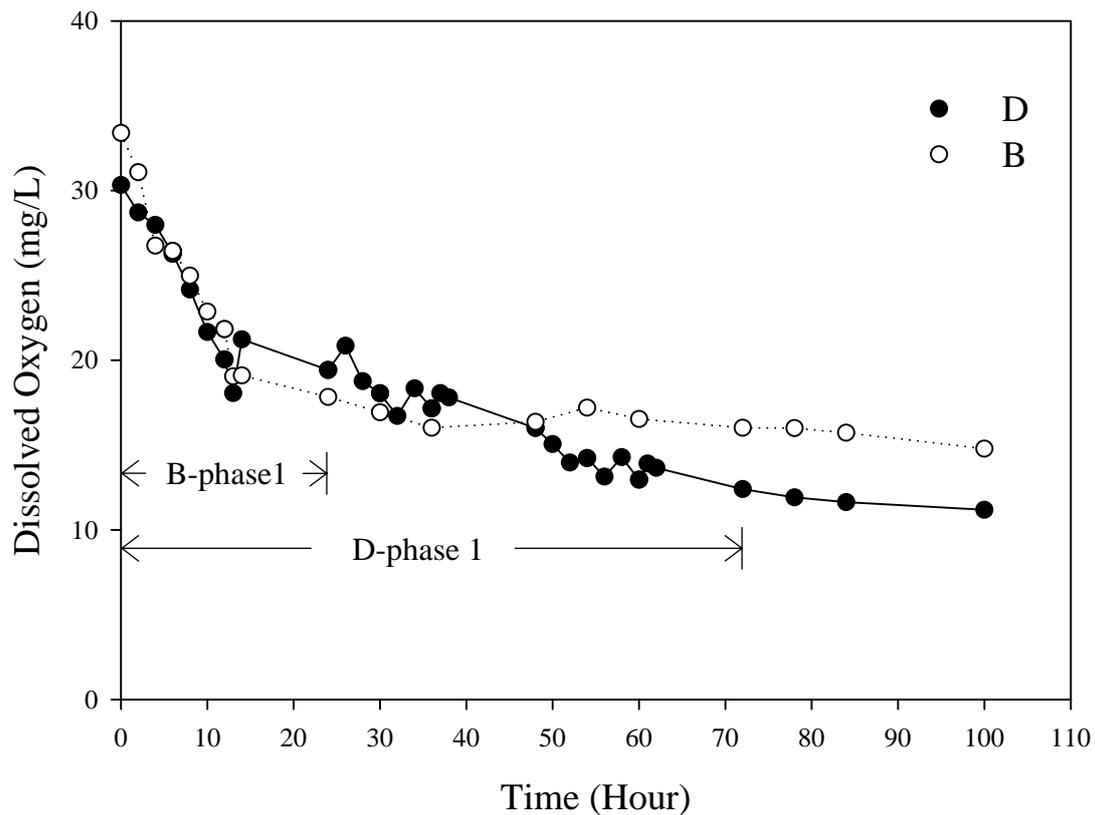


圖 4-8 甲苯基質多次注入試驗中溶氧消耗量的比較

4-5-3 酸鹼值變化比較

由圖 4-9 比較 B 組及 D 組在試驗期間內的酸鹼值變化。可以看出 B 組及 D 組的酸鹼值在試驗初期皆為中性偏鹼 (pH 8~9)，經過 4 天之後酸鹼值則偏中性 (pH 7~8)。由圖中同樣可以觀察到在 D 組試驗中，前 72 小時甲苯仍然存在於微生態中，所以其酸鹼值變動幅度較大，但在末期甲苯耗盡，酸鹼值變動幅度則大為減少。在兩組試驗中 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 的微生物作用沒有因為酸鹼值而受到影響。

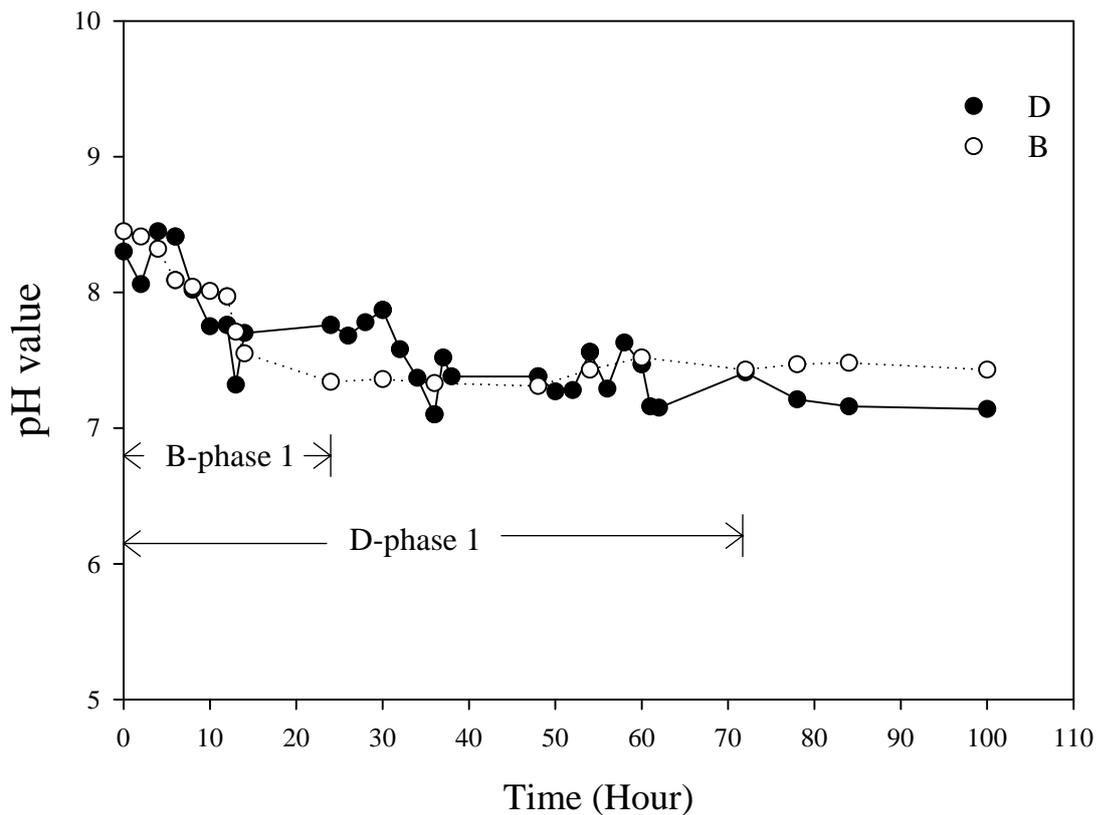


圖 4-9 甲苯基質多次注入試驗中酸鹼值變化的比較

4-5-4 OD₆₀₅ 及菌落數變化比較

觀察圖 4-10 可以比較 B 組及 D 組在試驗期間內的吸光度 OD₆₀₅ 的變化。B 組及 D 組的 OD₆₀₅ 在第一階段的試驗期都是呈現一個成長的趨勢，顯示微生物在此階段是在利用甲苯作為生長基質而進行活動。但在末期甲苯耗盡後，24 小時後，B 組微生物的活動呈現趨緩的現象。D 組的試驗因為甲苯到 72 小時後才消耗完全，所以微生物活動減緩的現象較不明顯。甲苯存在的有效時間會影響到菌體的增長。

從不同時間點的微生態系中取樣 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 做菌落數分析，同樣的可以將菌落數分作兩個階段說明。無論是注入三針甲苯的 B 組或是注入九針的 D 組，在基質存在的第一階段，因為有充分的能源可以維持微生物生長，所以可以從菌落數的變化觀察到 *Ralstonia sp.* P-10 的活動情形；但在甲苯不存在的第二階段，兩組的菌落數變化皆非常的微弱，除了缺乏碳源的供給之外，三氯乙烯的毒性抑制也是一個不容忽視的因素。

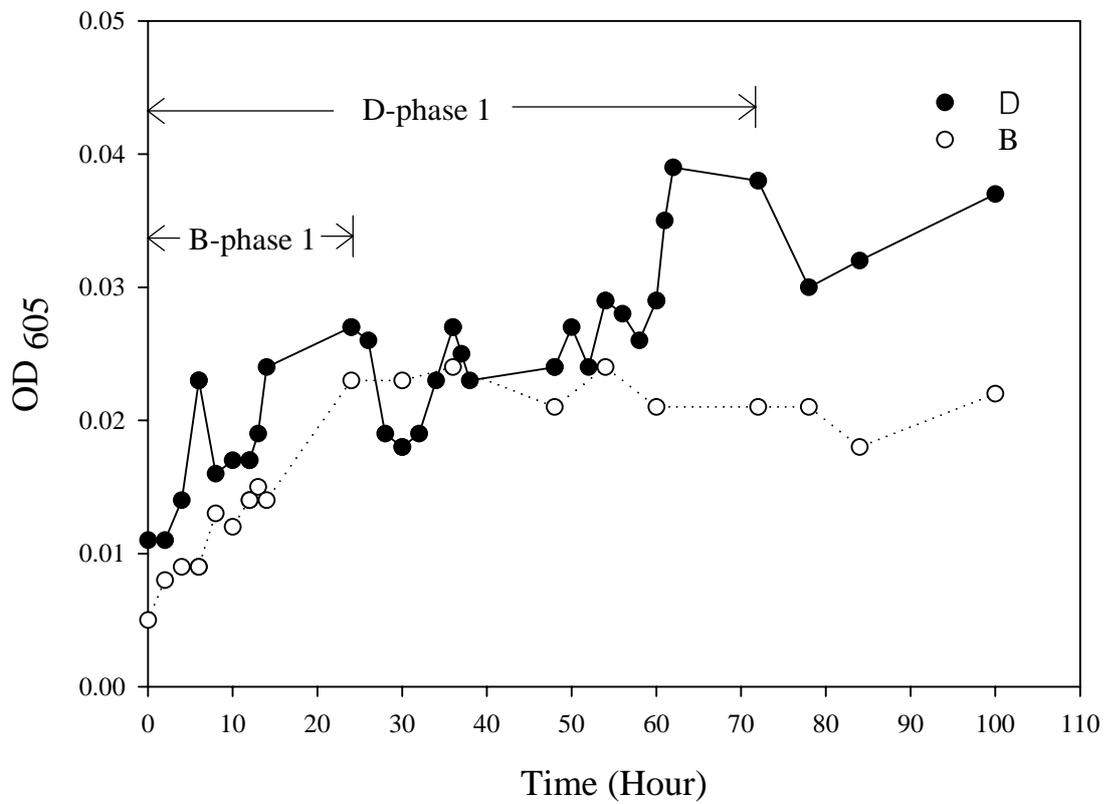


圖 4-10 甲苯基質多次注入試驗中吸光度 OD₆₀₅ 變化的比較

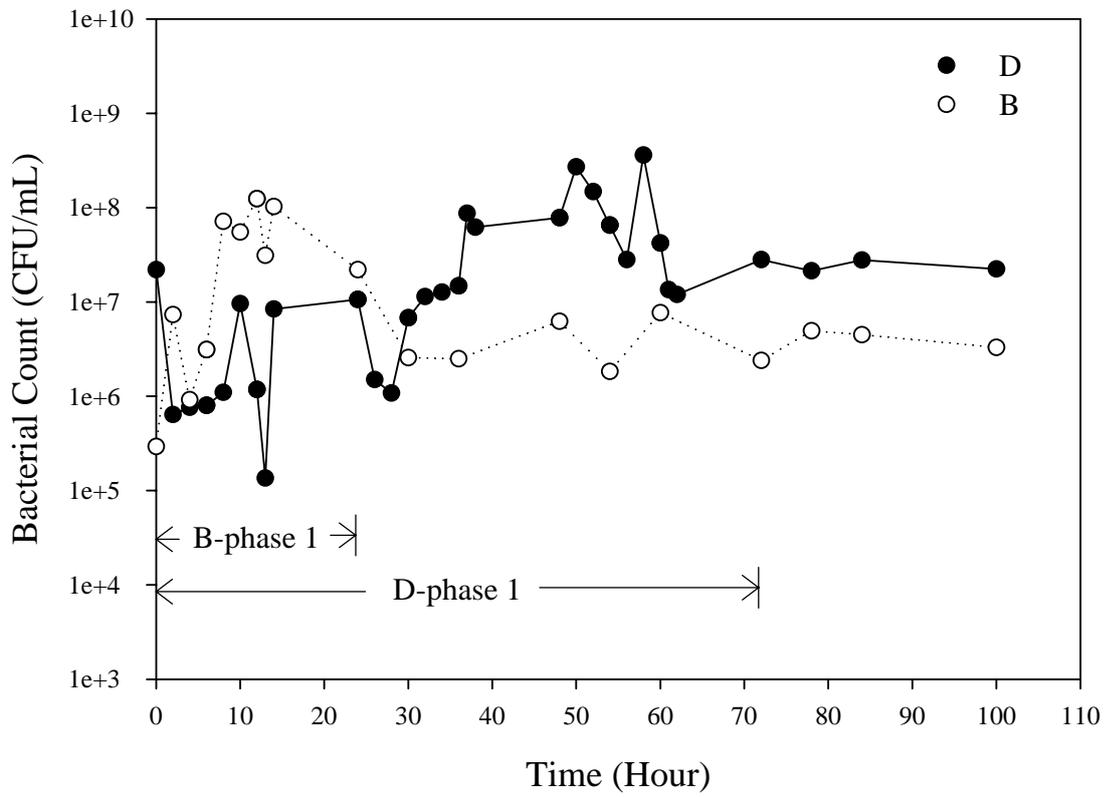


圖 4-11 甲苯基質多次注入試驗中菌落數變化的比較



第五章 結論與建議

5-1 結論

本研究以 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 作為實驗菌種應用批次培養法進行微生態系試驗，主要目的為(1) 探討 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為基質好氧共代謝三氯乙烯的功能性，(2) 求取 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 微生態系中好氧共代謝三氯乙烯的生物降解效率及一階反應速率常數，(3) 執行甲苯基質多次注入試驗，探討甲苯存在生物處理系統中的有效反應時間對三氯乙烯生物降解效率的影響。綜合本研究所得之結論如下：

(1) 批次試驗結果證實中，HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 能將微生態系中甲苯濃度由 7.7 ± 0.2 mg/L 降解至儀器偵測極限 ($1.1 \mu\text{g/L}$) 以下，移除率為 100%。同時，由甲苯添加試驗組及未添加甲苯試驗組間 13% 三氯乙烯移除率的差異證實 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯的功能性。

(2) 在單一培養期程的反應時間內 (4 天)，甲苯被 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 耗盡的速度非常快，相較之下，三氯乙烯的移除則相對顯得非常緩慢。在 24 小時的反應時間內，微生態系中所注入的甲苯被降解至低於儀器偵測極限 ($1.1 \mu\text{g/L}$) 以下。根據微生態系中甲苯與三氯乙烯移除速率的關係，可看出甲苯對生物共代謝三氯乙烯的重要性。甲苯存

在時，三氯乙烯的移除非常顯著；當甲苯完全耗盡時，只要殘餘的氧化酵素尚未完全失去活性，三氯乙烯生物共代謝現象仍會持續發生，只是降解速率減緩許多。

- (3) 根據批次培養試驗的結果，擬合一階反應動力參數方程式，在基質甲苯分三針及九針注入時，三氯乙烯的一階反應動力參數分別為 0.22/day、0.14/day 及 0.12/day。在本研究中，甲苯存在的有效反應期間，三氯乙烯的一階反應速率參數範圍為 $0.16 \pm 0.05/\text{day}$ 。
- (4) 根據甲苯基質多次注入試驗結果顯示，當甲苯存在微生態系中的有效反應時間由數小時增加至 3 天，三氯乙烯的生物降解效率由 21% 提升到 33%，溶氧消耗及 OD_{605} 明顯提升及菌落數也由 10^6 增加到 10^8 CFU/mL。因此，藉由延長基質甲苯存在生物處理系統中的有效反應時間，可使 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 代謝活性提升，進而有效增加三氯乙烯生物共代謝效率。

5-2 建議

本研究探討單一菌種 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 以甲苯為基質好氧共代謝三氯乙烯的可行性，並深入研究甲苯存在時間的長短對於三氯乙烯移除率的影響。以下針對本研究結果提出幾點建議，作為後續研究之參考。

- (1) 本研究以 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 進行批次培養試驗時，因為考慮到現地的環境條件，對於會影響生物降解的因子(如酸鹼值、溫度及導電度等)僅僅只有監測其變化。建議未來可以增加環境因子變化對於 *Ralstonia sp.* P-10 好氧共代謝三氯乙烯的影響，配合實驗設計找出最佳操作條件。
- (2) 本研究已證實 HYL-QT1(*Ralstonia sp.* P-10) 可以甲苯為主要基質好氧共代謝三氯乙烯，但對於分解甲苯時所產生的甲苯氧化酵素類型尚未明確。建議未來可以更深入研究甲苯氧化酵素類型。
- (3) 由甲苯基質多次注入試驗結果證實，基質存在於生物反應系統中的時間越長，三氯乙烯的移除效率越高。而基質不存在於反應系統後，三氯乙烯的生物降解效率幾乎沒有發生。建議由 *Ralstonia sp.* P-10 在試驗期間的酵素活性的變化去探討其代謝機制。
- (4) 由甲苯基質多次注入試驗的結果，在本研究中，僅有擬合在甲苯基質存在的第一階段反應速率常數。建議未來可以擬合兩個階段的其兩階段反應動力速率式，求取反應動力速率常數。由兩階段的反應動力速

率常數，應用到現地受三氯乙烯污染場址，提供給國內土壤及地下水
污染整治技術作為參考。



參考文獻

- 土壤中酸鹼值測定方法。行政院環境保護署。NIEA S410.60C, 1995。
- 土壤及地下水污染整治網。行政院環境保護署。<http://sgw.epa.gov.tw/public/>
- 水中揮發性有機化合物檢測方法-吹氣捕捉/氣相層析質譜儀。行政院環境保護署。NIEA W785.53B, 2003。
- 水中總菌落數檢測方法-塗抹法。行政院環境保護署。NIEA E203.54B, 2005。
- 王銀波、吳繼光、黃衍龍、趙雲慶，「污染土壤中囊叢枝菌根菌族群數及重金屬耐性之研究」。中華農學會報，第 169 期，55-69，1995。
- 王銀波，「土壤污染區整治之準則及考慮」，第五屆土壤污染防治研討會論文集，17-18，1997。
- 呂淑慧、李季眉、盧至人。酚分解菌共代謝三氯乙烯之連續流試驗。第二十四屆廢水處理技術研討會論文集，481-492，1999。
- 黃如玉、蔡坤隆、黃世傑。利用微生物共代謝三氯乙烯之研究。第七屆生化工學研討會論文集，171-177，2002。
- 環境微生物檢測通則 I-細菌。行政院環境保護署。NIEA E101.01C, 1999。
- 劉文得，「抑制性基質之生物降解動力學：鹽度影響與參數可檢定性」，博士論文，國立海洋大學河海工程學系，2006。
- 林建芬、趙聖傑、盧至人、李季眉，「甲烷分解菌對三氯乙烯喜氣生物分解之影響」，第十八屆廢水處理技術研討會論文集，1993。
- 盧滄海、賴龍山，「廢溶劑回收可行性探討」，工業污染防治，第 29 期，102-177，1989。
- 盧至人。地下水的污染整治。國立編譯館，台北。1997。
- 韓吟龍，「以甲苯為主要基質現地好氧共代謝三氯乙烯之實驗室及現地研究」，博士論文，國立成功大學資源工程學系，2007。
- 張峻嘉、盧至人、李季眉、黃錦怡、邱明良。酚分解菌共代謝三氯乙烯之研究-砂管柱連續流試驗。第二十四屆廢水處理技術研討會論文集，179-184，1999。

鄭顯榮、吳文娟，「土壤污染防治基本政策與推動方向」，第二屆土壤污染防治研討會論文集，21-36，1990。

蔡文田、邱伸彥，「蒸氣脫脂用含氯溶劑之特性管制和污染預防」，工業污染防治，第41期，145-160，1992。

Alexander M. “Biodegradation and Bioremediation” . Second edition, 1994.

Ball BR, Edwards MD. Air stripping VOCs from groundwater: process design considerations. Environ. Prog. 11(1):39-48, 1992.

Bouwer EJ, Rittmann BE, McCarty PL. Anaerobic degradation of halogenated 1- and 2-carbon organic compounds. Environ. Sci. Technol. 15(5): 596-599, 1981.

Criddle CS. The kinetics of cometabolism. Biotechnol. Bioeng. 41: 1048-1056, 1993.

Dabrock B, Riedel J, Bertram J, Gottschalk G. Isopropyl-benzen(cumene) - a new substrate for the isolation of trichloroethylene - degrading bacteria. Arch. Microbiol. 158: 9-13, 1992.

Dorigo U, Volatier L, Humbert JF. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. Wat. Res. 39(11): 2207-2218, 2005.

Eguchi M, Kitagawa M, Suzuki Y, Nakamura M, Kawai T, Okamura K, Sasaki S, Miyake Y. A field evaluation of *in situ* biodegradation of trichloroethylene through methane injection. Wat. Res. 35(9): 2145-2152, 2001.

Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58(9): 3038-3046, 1992.

Ewers J, Clemens W, Knackmuss HJ. Biodegradation of chloroethenes using isoprene as co-substrate . International Symposium on Environmental Biotechnology. Royal Flemish Society of Engineers, Ostend Belgium: 77-84, 1991.

- Fan S, Scow KM. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(6):1911-1918, 1993.
- Fogel MM, Taddeo AR, Fogel S. Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(4):720-724, 1986.
- Folsom BR, Chapman PJ, Pritchard PH. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5): 1279-1285, 1990.
- Fuller ME, Scow KM, Lau S, Ferris H. Trichloroethylene and toluene effects on the structure and function of the soil community. *Soil. Biol. Biochem.* 29(1):75-89, 1997.
- Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Diversity in kinetics of trichloroethylene-degrading activities exhibited by phenol-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* 55(2): 248-253, 2001.
- Gavaskar AR. Design and construction techniques for permeable reactive barriers. *J. Hazard. Mater.* 68(1): 41-71, 1999.
- Han YL, Kuo MC Tom, Tseng IC, Lu CJ. Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. Accepted by *J. Hazard. Mater.*, 2007.
- Heald S, Jenkins RO. Trichloroethylene removal and oxidation toxicity mediated by toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12): 4634-4637, 1994.
- Hinchee RE. *Air Sparging for Site Remediation, Air sparging state of the art.* CRC Press Inc., USA,; 1-13, 1994.
- Hopkins GD, Munkata J, Semprini L, McCarty PL. Trichloroethylene concentration effects on pilot field-scale in-situ groundwater bioremediation by phenol-oxidizing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 27(12): 2542-2547,

1993a.

- Hopkins GD, Semprini L, McCarty PL. Microcosm and in situ field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7): 2277-2285, 1993b.
- Hopkins GD, McCarty PL. Field evaluation of in situ aerobic cometabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates. *Environ. Sci. Technol.* 29(6): 1628-1637, 1995.
- Hubert C, Shen Y, Voordouw G. Changes in soil microbial community composition induced by cometabolism of toluene and trichloroethylene. *Biodegradation* 16: 11-22, 2005.
- Ishida H, Nakamura K. Trichloroethylene degradation by *Ralstonia* sp. KN1-10A constitutively expressing phenol hydroxylase: transformation products, NADH limitation, and product toxicity. *J. Biosci. Bioengine.* 89(5): 438-445, 2000.
- Jenal-Wanner U, McCarty PL. Development and evaluation of semicontinuous slurry microcosms to simulate in situ biodegradation of trichloroethylene in contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* 31(10): 2915-2922, 1997.
- Kelly CJ, Bienkowski PR, Saylor GS. Kinetic analysis of a *tod-lux* bacterial reporter of toluene degradation and trichloroethylene cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (3): 256-265, 2000.
- Kleopfer RD, Easley DM, Haas BB, Jr., Deihl TG, Jackson DE, Wurrey CJ. Anaerobic degradation of trichloroethylene in soil. *Environ. Sci. Technol.* 19(3): 277-280, 1985.
- Kuo MC Tom, Liang KF, Han YL, Fan KC. Pilot studies for in-situ aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene-vapor as the primary substrate. *Wat. Res.* 38(19): 4125-4134, 2004.
- Kuo MC Tom, Chen CM, Lin CH, Fang HC, Lee CH. Surveys of volatile organic compounds in soil and groundwater at industrial sites in Taiwan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65(5): 654-659, 2000.

- Leahy JG, Byrne AM, Olsen RH. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 825-833, 1996.
- Lee CY, Liu WD. The effect of salinity conditions on kinetics of trichloroethylene biodegradation by toluene-oxidizing cultures. *J. Hazard. Mater. B137*, 541-549, 2006.
- Little CD, Palumbo AV, Herbes SE, Lidstrom ME, Tyndall RL, Gilmer PJ. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(4): 951-956, 1988.
- Lu CJ, Lee CM, Chung MS. The comparison of trichloroethylene removal rates by methane- and aromatic-utilizing microorganisms. *Wat. Sci. Technol.* 38(7): 19-24, 1998.
- Lu CJ, Lee MS. The effect of toluene on the cometabolic trichloroethylene removal from soil. *Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering* 13(1): 7-15, 2003.
- Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 2000.
- Mars AE, Prins GT, Wietzes P, Koning WD, Janssen DB. Effect of trichloroethylene on the competitive behavior of toluene-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1): 208-215, 1998.
- McCarty PL, Goltz MN, Hopkins GD, Dolan ME, Allan JP, Kawakami BT, Carrothers TJ. Full-scale evaluation of in situ cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ. Sci. Technol.* 32(1): 88-100, 1998.
- Monod J. The growth of bacteria cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 3: 371, 1949.
- Morono Y, Unno H, Hori K. Correlation of TCE cometabolism with growth characteristics on aromatic substrate in toluene-degrading bacteria. *Biochem. Engineering Journal.* 31: 173-179, 2006.

- Mu DY. and Scow KM. Effect of trichloroethylene and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7): 2661-2665, 1994.
- Nakamura K, Ishida H, Iizumi T. Constitutive trichloroethylene degradation led by *tac* promoter chromosomally integrated upstream of phenol hydroxylase genes of *Ralstonia* sp. KN1 and its nucleotide sequence analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 89(1): 47-54, 2000.
- Nelson MJK, Montgomery SO, O'Neill EJ, Pritchard PH. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(2): 383-384, 1986.
- Nelson MJK, Montgomery SO, Mahaffey WR, Pritchard PH. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(5): 949-954, 1987.
- Nelson MJK, Montgomery SO, Pritchard PH. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(2): 604-606, 1988.
- Oldenhuis R, Vink RLJM, Janssen DB, Witholt B. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(11): 2819-2826, 1989.
- Rabideau AJ, Blayden JM, Ganguly C. Field performance of air-sparging system for removing TCE from groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 33(1): 157-162, 1999.
- Rivet MO, Feenstra S, Cherry JA. A controlled field experiment on groundwater contamination by a multicomponent DNAPL: creation of the emplaced-source and overview of dissolved plume development. *Journal of Contaminant Hydrology* 49: 111-149, 2001.
- Roberts PV, Hopkins GD, Mackay DM, Semprini L. A field evaluation of in-situ

- biodegradation of chlorinated ethenes: Part 1, methodology and field site characterization. *Ground Water* 28(4): 591-604, 1990.
- Schaumburg FD. Banning trichloroethylene: responsible reaction or overkill? *Environ. Sci. Technol.* 24(1): 17-22, 1990.
- Schroth MH, Ostrom M, Wietsma TW, Istok JD. In-situ oxidation of trichloroethene by permanganate: effects on porous medium hydraulic properties. *J. Contam. Hydrol.* 50(1-2): 79-98, 2001.
- Semprini L, Roberts PV, Hopkins GD, McCarty PL. A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes: Part 2, results of biostimulation and biotransformation experiments. *G. Wat.* 28(5): 715-727, 1990.
- Semprini L, Hopkins GD, Roberts PV, Grbic-Galic D, McCarty PL. A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes: Part 3, studies of competitive inhibition. *G. Wat.* 29(2): 239-250, 1991.
- Shields MS, Montgomery SO, Cuskey TM, Chapman PJ, Pritchard PH. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(7): 1935-1941, 1991.
- Speitel GE, McLay DS. Biofilm reactors for treatment of gas streams containing chlorinated solvents. *J. Envir. Engrg.* 119(4): 658-678, 1993.
- Vannelli T, Logan M, Arciero DM, Hooper SR. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4): 1169-1171, 1990.
- Vogel TM, McCarty PL. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5): 1080-1083, 1985.
- Vogel TM, Criddle CS, McCarty PL. Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21(8): 722-736, 1987.
- Wackett LP, Gibson DT. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.*

54(7): 1703-1708, 1988.

Wackett LP, Householder SR. Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 55(10): 2723-2725, 1989.

Wilson JT, Wilson BH. Biotransformation of trichloroethylene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 49(1): 242-243, 1985.

Yang Y, McCarty PL. Biologically enhanced dissolution of tetrachloroethene DNAPL. Environ. Sci. Technol. 34(14): 2979-2984, 2000.

Zylstra GJ, Wackett LP, Gibson DT. Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes. Appl. Environ. Microbiol. 55(12): 3162-3166, 1998.

