

以呼吸儀評估水體中之生物降解研究

蘇世昌¹ 莊慶芳² 盧至人³ 江舟峰⁴ 許以樺¹

NSC88-2211-E005-011

摘 要

本研究之目的乃以生物馴化方式培養出可降解之混合優勢菌種，並評估在水體中之生物降解特性。實驗採用血清瓶 (Serum bottle) 測定法及呼吸儀 (Respirometer) 測定法，兩種測定法均為密閉式測定法，故可避免因揮發所產生的非生物性降解。前者可藉由定時之採樣，直接了解的生物降解特性；後者乃以線上連續監測方式，了解進行好氧分解時所需之耗氧量。藉由上述兩種測定法實驗結果之比較，可以評估在水體中因不同實驗條件 (如濃度、攪拌強度及供氧方式等) 對生物降解之影響。根據血清瓶實驗結果顯示，在水體中之毒性門檻閾值 (THL) 為 23 mg/L，當濃度小於 THL 時，分解菌能將降解至本試驗之偵測極限 (約為 0.1 mg/L) 以下。當濃度為 3 ~ 23 mg/L 時，其擬零階反應速率常數 (k) 平均值為 0.61 mg/L-hr (0.45 ~ 0.77 mg/L-hr)，而濃度為 26 mg/L 時，則有明顯之抑制現象。另根據呼吸儀測試實驗結果顯示，當濃度為 6.2 ~ 26 mg/L 時，其擬零階反應速率常數為 0.95 mg/L-hr (0.8 ~ 1.26 mg/L-hr)，約較血清瓶實驗測試結果高 55 %。顯示攪拌強度、溶氧濃度與氧傳效率對於在水體中之生物降解有顯著之影響。

keyword：多環芳香族碳氫化合物，生物降解，血清瓶測定法，呼吸儀測定法

前 言

環境中多環芳香族碳氫化合物 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 污染之主要來源為高溫不完全燃燒及含 PAHs 廢棄物與廢水之任意棄置或排放。由於其具有致癌性與致腫瘤性，故環境中 PAHs 之污染

問題已深受重視 (Crittenden *et al.*, 1976)。為 PAHs 之一種，其在工業上之用途主要為製造丸、農藥、合成樹脂及染料等，由於其具有毒性，並可在一般土壤及水體環境中發現 (Gibson, 1984)，故美國環保署已將其列為 129 種優先污染物 (priority pollutants) 之一，其生物降解特性亟待進一步研究。

本研究所採用之氣泡式呼吸儀為 Dr. James Young 於 1980 年間所研發，主要係利用一種稱為細胞元件

1：中興大學環境工程學系碩士班

2：聯合技術學院環境工程科講師；中興大學環境工程學系博士班

3：中興大學環境工程學系教授

4：朝陽科技大學環境管理系副教授

(cell) 的設備，將從純氧鋼瓶輸入反應瓶之氧氣產生一穩定的氣泡，以計數方式正確量測供氧量，並以電腦進行連續監控 (江, 1998)。國外利用呼吸儀進行各類之生物分解研究已相當普遍，如 Goudar 等人曾利用氣泡式呼吸儀求取 BTEX 降解時之動力參數，結果發現氣泡式呼吸儀所測得之相關數據較傳統方法為準確 (Goudar, 1998)。而國內學者亦利用氣泡式呼吸儀從事石化廢水脫硝反應研究，證明其準確性與再現性良好 (鄭, 1997)。因此本研究將以生物馴化方式培養出可降解之混合優勢菌種，並採用血清瓶 (Serum bottle) 測定法及呼吸儀 (Respirometer) 測定法分別評估在水體中之生物降解特性與在水體中因不同實驗條件 (如濃度、攪拌強度及供氧方式等) 對生物降解之影響。

研究方法

1. **菌種來源:** 本研究菌種來源主要取自本實驗室長期馴養之酚分解菌 chemostat，經由一系列馴化步驟馴養而得。
2. **碳源:** 水溶液。
3. **營養源:** NH_4Cl 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及小善存水溶液。
4. **批次實驗步驟:** 以 Chemostat 培養之菌種，在實驗進行前需先經增殖培養以取得大量菌體。菌體經大量增殖後，取此高濃度菌體之培養液，置於低溫高速離心機中，在溫度 4°C 、轉速 10000 rpm 的操作條件下離心 10 分鐘，取下層濃縮菌體備用。實

驗共分為三組，分別為實驗組、滅菌組及空白組。實驗組設置之目的乃為了解分解菌對不同濃度之降解程度，而滅菌組與空白組設置之目的乃為了解微生物菌體及 44 mL 血清瓶壁對之吸附程度，以做為對照之用。上述三組中，實驗組與滅菌組添加相同體積之菌液，空白組則以同體積經滅菌之超純水代替菌液。滅菌組經高壓滅菌釜滅菌 50 分鐘後，與實驗、空白二組一同加入相同體積之營養鹽與水溶液。其中實驗組與滅菌組配製完畢後之混合液初始菌數皆控制為 10^5 cfu/mL 左右，營養鹽濃度事先經計算、滅菌及以超純水調整，使添加後之混合液濃度為該批實驗所需營養鹽濃度之 2~3 倍，水溶液添加體積亦事先計算，使添加後之混合液濃度為該批實驗所需之濃度。以上之實驗組、滅菌組及空白組配製完畢後置於恆溫水浴槽，以 35°C 、150 rpm 震盪培養，不定時取出量測 pH 及總菌數，並以高效能液相層析儀 (HPLC) 分析之殘餘濃度。本研究所使用的 HPLC 為 Hitachi 公司所製。偵測器波長為 254.2 nm，沖提液流速為 1.0 mL/min，樣品注入體積為 20 μl ，滯留時間為 3.78 分鐘。沖提液配置方法為將氰甲烷 (CH_3CN) 與超純水依 9:1 的比例混合均勻後，再以 0.2 μm Lida Nylon 濾膜過濾。水溶液在分析之前須以 0.2 μm Lida Nylon 濾膜 (13 mm) 過濾後，方能以微量注射器注入 HPLC 中。

5. **呼吸儀實驗步驟:** 本研究所使用的氣泡式呼吸儀為 CHALLENGE

ENVIRONMENTAL SYSTEM 公司所製造，型號為 AER-200 型，兼具偵測好氧呼吸與厭氧產氣的功能，其基本配件包括攪拌底座、紅外線計數器與細胞基座 (cell base)、界面組合及數據接收之電腦等。為了避免溫度與電壓不穩對實驗結果產生影響，另行加裝恆溫水浴槽與不斷電系統，並使用氧氣鋼瓶做為供氧來源。實驗共分為三組，分別為實驗組、植菌空白組及試劑空白組。實驗組設置之目的乃為了解分解菌對不同濃度之降解程度，試劑空白組設置之目的乃為了解微生物在無基質存在情況下之背景耗氧情況，而植菌空白組設置之目的乃為了解在該濃度時，在無菌體存在下經由非生物作用(揮發及瓶壁吸附等)所造成之損失，以做為對照之用。上述三組中，實驗組均設為三重複組，為了使植種均勻及減少瓶間差異，故以 2000 mL 三角瓶為統一預先調配試液之容器。首先加入所需之營養鹽、菌液與超純水，其中菌液均為經調整吸光度後之分解菌，營養鹽之濃度及添加體積經事先計算，使配製後之濃度為該次實驗所需濃度之 2 倍，超純水則視調整該次實驗濃度之所需而決定添加體積。在攪拌及調整 pH 至 7.0 左右後，即迅速分裝入反應瓶內，且在裝入二氧化碳吸收管與攪拌磁石後，隨即密閉並迅速置入呼吸儀恆溫水浴槽並啟動實驗。

試劑空白組配製方法及實驗步驟均與實驗組相同，惟以超純水代替實驗組添加之體積。植菌空白組則以超純水代替實驗組菌液添加之體積。實驗組與試劑空白組配製完畢後

之混合液初始菌數皆控制為 10^5 cfu/mL 左右。為了使實驗過程中氧傳效率不成為反應之限制因子，故攪拌速率調整至 500 rpm，使反應瓶內之試液能充分攪拌。為避免實驗室日夜溫差影響實驗，故恆溫水浴槽溫度設定為較室溫為高之 35°C 。實驗過程中則視耗氧累積圖之曲線平穩與否，而不定時取出量測 pH、DO 及總菌數，並以 HPLC 分析之殘餘濃度。根據多次呼吸儀實驗相關準備之測試結果可知，在實驗組攝氧累積曲線首度達到平緩之際，取出反應瓶內之試液以 HPLC 分析時，瓶中之濃度均已接近或低於偵測極限以下，顯示此時反應瓶中之多已降解完畢，故本實驗相關於呼吸儀實驗部份，均於攝氧累積曲線首度達到平緩之時，各取出一實驗組與試劑空白組反應瓶，並分析相關數據，且將該段時間扣除遲滯期時間後，稱之為反應期。

結果與討論

1. 批次實驗- 之濃度效應

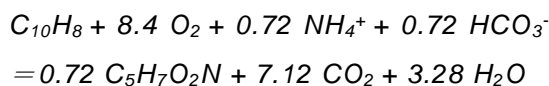
實驗結果如圖 1 所示，由圖中可以看出，當濃度分別為 3、6、10、16、21 及 23 mg/L 時，分解菌最終均能降解至 HPLC 偵測極限以下，顯示經過長期馴養之分解菌確能有效地以 為單一碳源及能源。而滅菌組與對照組實驗結果亦顯示在以上濃度時，細菌菌體與批次瓶瓶壁對之吸附現象並無明顯之變化，顯然在實驗過程中並無其他非生物性因素之影響，故實驗組中濃度之消滅應為分解菌之生物作用所導致。

另根據實驗結果可發現，之初始濃度越高，遲滯期與總反應時間亦越長，其中遲滯期之定義時間為經過若干時間後，批次瓶內之殘留濃度為初始濃度的 90 % 之所需時間，總反應時間與遲滯期時間如表 1 所示。由於本節實驗所使用之菌種為經過以 15 mg/L 濃度增殖培養數週之分解菌，故在之初始濃度為 3、6 及 10 mg/L 時之各實驗組，遲滯期雖有隨濃度增加而增長之趨勢，但並無顯著之差距。但當之初始濃度為 16、21 及 23 mg/L 時，各實驗組之遲滯期則由 20 小時明顯增加至 40 小時，顯示在較馴養濃度為高之濃度下，分解菌需要更長的時間適應之毒性。以上各濃度之擬零階反應速率常數(k)經計算，平均值為 0.61 mg/L-hr (0.45 ~ 0.77 mg/L-hr)。在之初始濃度為 26 mg/L 時，則可發現分解菌在 144 小時之實驗時間內，並無明顯降解現象產生，故推測該濃度已超過本實驗分解菌之生物毒性門檻閥值 (THL)，所以造成微生物之毒害而抑制之分解或是須有更長之適應時間。

2. 呼吸儀實驗- 之濃度效應

圖 2、3 及 4 分別為濃度在 6.2、15 及 26 mg/L 之呼吸儀實驗結果。由圖 2 可以看出，當濃度為 6.2 mg/L 時，分解菌之遲滯期僅為 0.5 小時，而在遲滯期之後隨即大量攝氧，並在 7.5 小時左右耗氧累積圖首度趨於緩和。而由圖 3 可以看出，當濃度為 15 mg/L 時，分解菌之遲滯期為 1 小時，耗氧累積圖並

在 13 小時左右圖形首度趨於緩和。另由圖 4 亦可以看出，當濃度為 26 mg/L 時，分解菌之遲滯期為 1 小時，耗氧累積圖並在 17 小時左右圖形首度趨於緩和。另根據呼吸儀所記錄之數據經整理比較後可知，當濃度為 6.2 mg/L、15 mg/L 及 26 mg/L 時，其達反應期後之實際耗氧量分別為 2.32、6.04 及 11.11 mg-O₂ (已將試劑空白組所得之背景耗氧量扣除)。根據 McCarty 化學計量式：



之推估，分解菌降解一莫耳的，需要 8.4 莫耳的氧，若將植菌空白組所得之非生物性損失比例(即植菌空白組在反應期時間後之 C/C₀)部份扣除，則可推算出以上三種濃度降解所需之理論需氧量分別為 4.1、9.3 及 15.1 mg-O₂。由於實驗組揮發於瓶頂空間之應於溶液中濃度逐漸減少後，將再度溶回於試液中而被微生物所降解，故以上之非生物性損失比例應會高估。

以上結果綜合於表 2，可知當濃度越高時，遲滯期與反應期亦越長。然而呼吸儀實驗部份與批次實驗所得之結果不同的是，分解菌在濃度為 26 mg/L 時，並未有抑制現象發生，推測原因可能是因呼吸儀為避免供氧機制受阻而把攪拌磁石轉速提高至 500 rpm，在溫度較室溫為高且高攪拌轉速之下，易揮發於瓶頂空間之中而降低試液中濃度。另經植菌空白組之實驗結果可知，在反

應期後之濃度減少量約為 20 %，因此分解菌於呼吸儀實驗中並未有明顯受抑制之現象。若將所得之反應期實際耗氧量與理論耗氧量相互比較，則可得當濃度為 6.2 mg/L、15 mg/L 及 26 mg/L 時，其比值分別為 0.53、0.65 與 0.74，推測其原因為分解菌在反應期間降解為中間代謝產物，故分解菌在基質漸少之情況下，攝氧逐漸趨於緩和而於耗氧累積圖上呈現一平緩區，故此時期應為分解菌適應中間代謝產物之時期，而非降解完全之時期，經若干時間後並再度攝氧直至累積耗氧曲線再度平緩為止。依此將實驗最終實際耗氧與理論耗氧量相互比較，則可得當濃度為 6.2 mg/L、15 mg/L 及 26 mg/L 時，其比值分別為 0.51、0.98 與 0.91，最終實際耗氧較趨近於理論耗氧量，故推測最終耗氧應包含完全礦化或同化之耗氧值。若計算各濃度之擬零階反應速率常數 (k)，則發現當濃度為 6.2 ~ 26 mg/L 時，其擬零階反應速率常數為 0.95 mg/L-hr (0.8 ~ 1.26 mg/L-hr)。

3. 呼吸儀實驗結果再現性與準確性評估：

由於呼吸儀實驗時之實驗組均設為三重複組，若計算三重複組間最終耗氧量之變易係數 (Cv)，則可發現當濃度為 6.2 mg/L、15 mg/L 及 26 mg/L 時，其重複組間之變易係數分別為 1.8 %、5.3 % 及 4.9 %。如此之結果顯示呼吸儀測試法之再現性十分良好。若將實驗最終實際耗氧量與經 McCarty 化學計量式計算而

得之理論耗氧量相互比較，則可得當濃度為 15 mg/L 及 26 mg/L 時，其比值分別為 0.98 與 0.91 (即回收率為 98 % 與 91%)，顯示經由呼吸儀所測得之相關數據準確性頗佳。

由於氣泡式呼吸儀針對好氧生物分解可行性研究時，其供氧裝置能在測試過程中連續供氧，故待測水樣不須大量稀釋即可進行測試，且其準確性遠較傳統 BOD 測定法為高 (BOD 測定法誤差範圍約為 20 %)，因此氣泡式呼吸儀應可取代傳統方法，做為好氧生物分解可行性研究之有效儀器。

4. 批次實驗與呼吸儀實驗結果之比較：

根據批次實驗結果可知，在水體中之毒性門檻閾值 (THL) 為 23 mg/L，當濃度小於 THL 時，分解菌能將降解至本試驗之偵測極限 (約為 0.1 mg/L) 以下，且各濃度之實驗組實驗終止時之總菌數均有明顯之增加 (約從 10^5 cfu/mL 增加至 10^7 cfu/mL)。當濃度為 26 mg/L 以上時，則有明顯之毒害抑制現象。另根據呼吸儀測試實驗結果顯示，當濃度為 26 mg/L 時，則無明顯之抑制現象。由於血清瓶測試法係由恆溫水浴槽利用振盪方式使血清瓶內之試液得以均勻混合，供氧來源為瓶頂空間之氧氣，相較於呼吸儀利用氧氣鋼瓶供氧，並以高速攪拌使得氧傳效率不致成為反應速率限制因子，故呼吸儀測試法可以確實量測出生物降解之潛能。且呼吸儀測試法乃利用電腦自動接收耗氧數據，可避免因採樣間距

過長而產生之誤差。另根據血清瓶測試法所得之擬零階反應速率常數平均值為 0.61 mg/L-hr (0.45 ~ 0.77 mg/L-hr)，呼吸儀測試法所得之擬零階反應速率常數平均值為 0.95 mg/L-hr (0.8 ~ 1.26 mg/L-hr)，約較血清瓶實驗測試結果高 55 %。亦證明呼吸儀測試法確能有效地評估生物降解之潛能，且顯示攪拌強度、溶氧濃度與氧傳效率對於在水體中之生物降解有顯著之影響。

結 論

1. 批次實驗結果顯示，當 濃度在 23 mg/L 以下時，分解菌最終均能降解至 HPLC 偵測極限以下，顯示經過長期馴養之分解菌確能有效地以 為單一碳源及能源。當 濃度為 26 mg/L，則有明顯之抑制現象。
2. 根據呼吸儀實驗結果可看出，當 濃度為 26 mg/L 時，並未有毒害抑制現象。且呼吸儀測試法所得之擬零階反應速率常數平均值為 0.95 mg/L-hr，約較血清瓶實驗測試結果高 55 %。亦證明呼吸儀測試法確能有效地評估生物降解之潛能，且顯示攪拌強度、溶氧濃度與氧傳效率對於在水體中之生物降解有顯著之影響。
3. 呼吸儀實驗結果顯示，經由呼吸儀所測得之數據，再現性與準確性均十分良好，應可做為好氧生物分解可行性研究之有效儀器。

本研究承蒙國科會專題研究計畫提供經費補助（計畫編號 NSC88-2211-E005-011），得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

1. Crittenden, B. D. and R. Long. 1976. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon : Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis*. Freudenthal, R. I., Jones, P. Eds. Raven Press. New York.
2. Gibson, D. T. 1984. *Microbial Degradation of Organic Compounds*. vol. 13. Marcel Dekker, Inc., N.Y., U.S.A.
3. Goudar C. T. and K. A. Strevett. 1998. Comparison of Relative Rates of BTEX Biodegradation Using Respirometry. *Jour. of Indust. Microbiol. and Biotechn.*, 21:11-18.
4. 江舟峰, 1998, 以呼吸儀評估染整廢水高溫好氧處理可行性研究, 朝陽科技大學, 台中.
5. 鄭幸雄, 周素圓, 蔡宗岳, 1997, 氣泡呼吸儀應用於石化廢水生物脫硝反應之特性研究, 第二十二屆廢水處理技術研討會論文集, 第 577-583 頁.

誌 謝

圖 表

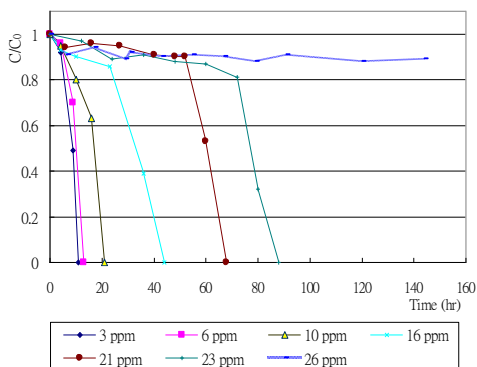
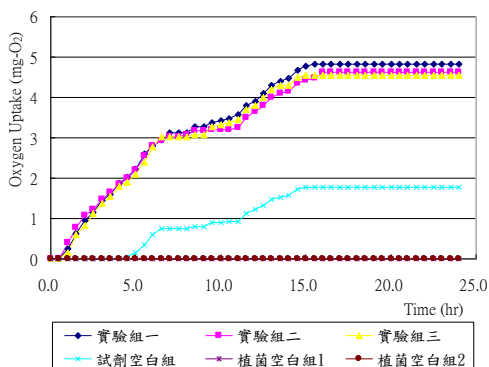


圖 4-1 水相批次實驗- 分解菌對不同 濃度之生物降解情形

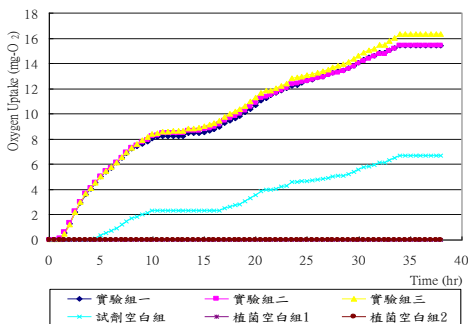
表 4-1 批次實驗-實驗組 濃度與生物降解之比較

濃度 (mg/L)	項 目			
	總反應時間 (hr)	遲滯期 (hr) ^a	反應期 (hr) ^b	生物反應速率常數 (mg/L-hr) ^c
3	11	4.3	6.7	0.45
6	13	5.2	7.8	0.77
10	23	7.9	15.1	0.66
16	44	20	24	0.66
21	68	36	32	0.66
23	88	40	48	0.48
26	144	-	-	-

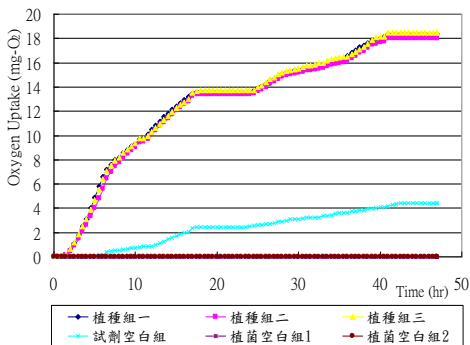
a : 遲滯期 = 實驗組 濃度 C/C₀ = 0.9 時之時間
 b : 反應期 = (總反應時間) - (遲滯期時間)
 c : 生物反應速率常數 = 降解量 / 反應期時間



圖二、呼吸儀濃度效應實驗- 濃度為 6.2 mg/L 時之好氧累積圖



圖三、呼吸儀濃度效應實驗- 濃度為 15 mg/L 時之好氧累積圖



圖四、呼吸儀濃度效應實驗- 濃度為 26 mg/L 時之好氧累積圖

表 2 水相呼吸儀濃度效應試驗- 濃度為 6.2、15 及 26 mg/L 時之耗氧數據綜合表

項 目	植 種 組 濃 度		
	6.2 mg/L	15 mg/L	26 mg/L
植菌組反應期實際耗氧 (mg)	3.06	8.4	13.52
植菌組最終實際耗氧 (mg)	4.06	15.8	18.22
試劑空白組反應期實際耗氧 (mg)	0.74	2.36	2.41
試劑空白組最終實際耗氧 (mg)	1.77	6.69	4.43
理論耗氧 (mg)	4.1	9.3	15.1
(反應期耗氧量 / 理論耗氧量)	0.57	0.65	0.74
(最終耗氧量 / 理論耗氧量)	0.56	0.98	0.91
遲滯期 (hr)	0.5	0.5	1
反應期 (hr)	7	12.5	16.5
反應速率常數 (mg/L-hr)	0.8	1	1.26
最高攝氧速率 (mg-O ₂ /hr)	0.88	1.94	1.84
最高攝氧速率之時間 (hr)	1.25	2.5	5.5