

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Fenton 法處理五氯酚之氧化產物之分解微
生物的馴化與增殖研究

Acclimation and Enrichment of Microorganisms That Degrade the
Fenton Oxidation Products of Pentachlorophenol

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC-90-2313-B-041-005

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳意銘

共同主持人：盧明俊

執行單位：嘉南藥理科技大學環工系

中華民國九十一年十月三十一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Fenton 法處理五氯酚之氧化產物之分解微生物的馴化與增殖研究

Acclimation and Enrichment of Microorganisms That Degrade the Fenton

Oxidation Products of Pentachlorophenol

計畫編號：NSC-90-2313-B-041-005

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：陳意銘 嘉南藥理科技大學環工系

共同主持人：盧明俊 嘉南藥理科技大學環工系

一、中英文摘要

Fenton 反應具有強氧化力，能對難分解有機物進行氧化作用，但若要對五氯酚(pentachlorophenol, PCP)這類含氯量甚高之芳香族化合物達成完全礦化分解，則需要添加大量試劑，因此所費不貲，且於污染場址現地施行時，其過程對環境衝擊太大。結合化學氧化與生物分解程序進行有機毒性物質之排除，為近來頗受重視之研究方向，目的在於得到一整合處理方法兼具化學氧化之優點—迅速、確實，與生物分解之優點—成本低廉、衝擊性低。因此本研究對已經過 Fenton 反應後之 PCP 氧化產物之分解微生物進行研究，並測試台灣本土微生物對於五氯酚之 Fenton 氧化產物之分解能力。研究發現，利用馴化培養方式，微生物可存活在含五氯酚或五氯酚+麩氨酸鹽(glutamate)之培養基中，在經由連續轉移培養實驗，已培養出對五氯酚 Fenton 產物具利用能力之微生物。

關鍵詞：化學氧化、生物分解、五氯酚、馴化

Abstract

By using chemical oxidation, ex. Fenton system, can produce hydroxyl radicals with powerful oxidizing ability to degrade toxic contaminants. But for

pentachlorophenol(PCP) degradation, it is necessarily to add over-dosage of oxidation reagent to mineralize PCP completely. Recently, a combined method of chemical oxidation treatment and biological degradation treatment to deplete the PCP pollution was discussed. In this study, the biodegradability of the PCP oxidation products by indigenous microorganisms in Taiwan is evaluated. By using acclimation methods, microorganisms that viable in mineral medium amended with PCP + glutamate or PCP-oxidation products only are cultivated. And after continuously transferring, microorganisms with effective utilizing activity to PCP oxidation products are established.

Keywords : Chemical oxidation,
Biological degradation,
Pentachlorophenol, Acclimation

二、緣由與目的

氯酚類化合物(chlorinated phenols, CPs)自研發以來，因其特殊之理化與生物毒性，被廣泛利用於農、工業上，如殺蟲劑、殺菌劑、木材防腐劑與工業原料等。在氯酚化合物、木業製造工廠的長期不當

排放、非法棄置與粗心隙漏下已然造成環境的嚴重污染^(1,2)。氯酚化合物中，PCP 具有相當高的生物累積性，易隨食物鏈積累於高等水生生物甚至於人體的脂肪組織中⁽³⁾，且其毒性嚴重者會導致死亡。因此雖然現今 PCP 已減少工、商業化的製造販賣與使用，然而在長達數十年的忽視下，國內外水域及水生生物體內皆有報告指出受大量的氯酚化合物^(4,5)，甚至 PCP 的嚴重污染⁽⁶⁾。近來台灣地區一連串水產魚貝類之含毒性物質事件，顯示有機毒性物質之危害迫在眉睫，在在引起環境與衛生學界的注意，亟欲達成 CPs 等污染的防治及排除。

氯酚類化合物為有毒性物質，若利用傳統的生物處理法處理，則因氯酚類化合物對微生物的抑制性，容易造成整個生物系統的操作不良，而無法有效達到處理目的。然而利用高級氧化程序(Advanced Oxidation Processes, AOPs)，這些能產生氫氧自由基等活性中間產物以破壞目標污染物質與中間毒性產物之反應，可有效降低該類物質之毒性

AOPs 方法甚多，其中以 Fenton 系統為例，它兼具方便、經濟、有效等特性，能針對 1.生物難分解化合物、2.含有大量生物可分解的化合物與少量不易分解的化合物、3.生物難分解之中間產物進行處理，然而 Fenton 系統一有其限制，其中一重要因子為待反應化合物之分子結構與理化特性，Fenton 反應產生之氫氧游離基為一強氧化劑，可以氧化許多有機物，但有機物結構複雜種類繁多，理化性質差異大，故氧化速率與處理效能亦有很大的差別。以 Fenton 系統處理 CPs 為例⁽⁷⁾，氧化速率依次為 4-氯酚(4-CP) > 2,4-二氯酚(2,4-DCP) > 2,4,6-三氯酚(2,4,6-TCP) > 2,3,4,6-四氯酚(2,3,4,6-TeCP)，其反應速率常數(Kr)之比值為 4-CP : 2,4-DCP : 2,4,6-TCP : 2,3,4,6-TeCP = 1877 : 209 : 98 : 9，1 由此比值可知含氯數量對氯酚化合物之氧化反應進行影響極大，隨著氯取代基增加，氧化反應明顯受到壓抑，相同趨勢亦發生在其他化學氧化與光分解

之處理系統中。因此若僅採用 Fenton 法處理五氯酚，實不易達成完全分解之成效，因此次第結合化學氧化與微生物之分解作用為本研究之重心，主要研究目標為探討台灣地區微生物對 PCP 經 Fenton 反應之氧化產物之分解能力，研究內容包括：

1. PCP 氧化產物分解微生物馴化培養
2. 以固體基質培養分解微生物。
3. 分解微生物之加強增殖培養。
4. 分解微生物對五氯酚與其 Fenton 產物之利用。

三、 結果與討論

1.Fenton 反應條件對五氯酚分解狀況之測試

經多次實驗測試，五氯酚之氧化分解在 1 小時內即達到最大值，故 Fenton 反應時間均設定為 1 小時。

表一 不同 Fenton 條件下五氯酚之分解

五氯酚 (ppm)	pH 值	H ₂ O ₂ 35% (ml)	分解狀況
100	2.0	0.01	-*
100	2.0	0.1	++
100	2.0	0.2	++
100	2.0	0.5	++
100	2.5	0.01	-
100	2.5	0.1	++
100	2.5	0.2	++
100	2.5	0.5	++
100	3	0.01	-
100	3	0.1	+
100	3	0.2	+
100	3	0.5	+
100	3.5	0.01	-
100	3.5	0.1	-
100	3.5	0.2	+
100	3.5	0.5	+
100	4	0.01	-
100	4	0.1	-
100	4	0.2	+
100	4	0.5	+
100	4	1	+
100	5	0.01	-
100	5	0.1	-
100	5	0.2	-
100	5	0.5	-
100	5	1	-
200	2	0.1	+
200	2	0.5	++

200	2.5	0.1	+
200	2.5	0.5	+
200	3	0.1	-
200	3	0.5	+
50	2	0.1	++
50	2	0.5	++
50	2.5	0.1	++
50	2.5	0.5	++
50	3	0.1	+
50	3	0.5	+

* ”-“:表示分解率為 0~10%
 ”+“:表示分解率為 10~20%
 ”++“:表示分解率為 20~30%
 ”+++“:表示分解率為 30~100%

結果顯示，五氯酚在各條件下的分解率均小於 30%，氧化分解之狀況不佳，應與五氯酚之高氯取代數有關。然而本實驗目的在測試出一個合適的 Fenton 氧化條件，盡量能將 PCP 氧化成其他化合物，但不必須達到完全礦化的程度，且該條件須符合下列目標：

- (1) 反應時間不宜過長。
- (2) 過氧化氫與硫酸亞鐵的添加量盡量降低。
- (3) 酸鹼度不宜過低。

亦即找出一可盡量轉化 PCP 的 Fenton 反應條件，但過程及產物應盡量避免對微生物有害，以免阻礙進一步之微生物降解。因此接續之 Fenton 實驗條件即採用 pH = 2.5, H₂O₂ 0.1ml, PCP 濃度為 100ppm。

2. 馴化微生物之液體培養基存活性 (viability) 測試

微生物初步馴化過程之添加物如下 (馴化血清瓶內含底泥)：

- (1) 加入 PCP。
- (2) 加入 tetrachlorobenzoquinone (TeCQ) 與 chloranil (tetrachloro-hydroquinone)。
- (3) PCP-Fenton 反應後之溶液。
- (4) PCP-Fenton 反應溶液再經正己烷抽出部份 PCP 等非極性物質之水溶液。

經三個月之馴化再轉移至不含底泥之血清瓶中繼續二度馴化三個月後，取出部份菌液再加入含 yeast extract 或 glutamate 之

液態培養基，進行存活性測試。

表二 馴化微生物在液態培養基中之存活性測試

組別代號	存活測試培養基	Yeast extract	glutamate
	二度馴化方式		
P	PCP	-*	-
PG	PCP + glutamate	+	+
TC	TeCQ + chloranil	+	-
TCG	TeCQ + chloranil + glutamate	++	+
PF	PCP-Fenton 產物	-	-
PFG	PCP-Fenton 產物 + glutamate	++	++
ExP	經正己烷抽取後殘餘之 PCP-Fenton 產物	++	++
ExPG	經正己烷抽取後殘餘之 PCP-Fenton 產物 + glutamate	++	++

* ”-“:表示微生物生長不明顯，培養液為澄清狀。
 ”+“:表示微生物有生長跡象，培養液略微混濁。
 ”++“:表示微生物生長旺盛，培養液呈混濁狀。

由上表觀之，僅添加 PCP 之血清瓶中並無微生物存活，顯示該瓶中並無分解 PCP 之微生物，亦說明 PCP 之對微生物毒性甚強。添加 TeCQ + chloranil 之組別則有微生物存活，雖無法證明該瓶中具有分解 TeCQ、chloranil 之微生物，然而 TeCQ 與 chloranil 對微生物之抑制性明顯低於 PCP，同理，使用正己烷抽取後殘餘之 PCP-Fenton 產物進行馴化之血清瓶中，微生物之存活狀況甚佳。然而單純採用 PCP-Fenton 產物進行馴化之血清瓶則無微生物生存跡象，原因應與 Fenton 反應對 PCP 分解率不高 (< 30%)，導致產物中仍殘存大量具毒性之 PCP 有關。

3. 馴化微生物之固體基質培養實驗

採用含 PCP 等化合物之固體培養基可以有效地判斷馴化培養液中是否具有對 PCP 等具分解能力的微生物。針對二度馴化血清瓶中，經存活性測試證實仍有活菌之組別，取出菌液塗抹於含各種添加物之固體培養基上，進行培養，若菌液中含有具分解能力之微生物，則可在培養基存

活，甚至出現明顯菌落。

表三 馴化微生物之固體基質培養結果

固體培養基 添加物	馴化 代號	PG	TC	TCG
	PCP	-*	-	-
PCP + glutamate	+	+	+	+
TeCQ + chloranil	-	-	-	-
TeCQ + chloranil + glutamate	+	+	+	+
PCP-Fenton 產物	-	-	-	-
PCP-Fenton 產物 + glutamate	+	+	+	+
經正己烷抽取後殘餘 PCP-Fenton 產物	-	-	-	-
經正己烷抽取後殘餘 PCP-Fenton 產物 + glutamate	+	+	+	+
固體培養基 添加物	馴化 代號	PFG	ExP	ExPG
	PCP	-*	-	-
PCP + glutamate	+	+	+	+
TeCQ + chloranil	-	-	-	-
TeCQ + chloranil + glutamate	+	+	+	+
PCP-Fenton 產物	-	-	-	-
PCP-Fenton 產物 + glutamate	+	+	+	+
經正己烷抽取後殘餘 PCP-Fenton 產物	-	-	-	-
經正己烷抽取後殘餘 PCP-Fenton 產物 + glutamate	+	+	+	+

* ”-“:表示無明顯菌落生成。

”+“:表示有明顯菌落生成。

添加 glutamate 之固體培養基均可長出明顯菌落，但無法證明該菌落之微生物是利用 Glutamate 或是 PCP 等添加物進行生長，此外無明顯菌落亦非代表無細菌存活，因此尚須進行轉移培養實驗。

4. 固體培養基中微生物之轉移培養實驗

本實驗分為兩部份，第一部份為前一實驗結果中已形成菌落之微生物對於 PCP 等化合物之利用性測試，實驗方法如下：自固體培養基菌落取得微生物，轉殖至含無機培養基之血清瓶中，培養基中並加入

PCP 等各種特定化合物，進行培養，每週添加化合物一次，四週後，取出菌液，以 yeast extract 進行活菌測試。實驗結果顯示下列組別之微生物存活性。

表四 特定添加物培養之存活性測試

微生物來源	轉移培養 添加物	存活性 測試結果
PG-PCP + glutamate*	PCP	-**
TC-PCP + glutamate	PCP	-
TCG-PCP + glutamate	PCP	-
PFG-PCP + glutamate	PCP	-
ExP-PCP + glutamate	PCP	-
ExPG-PCP + glutamate	PCP	-
PG-TeCQ + chloranil+ glutamate	TeCQ + chloranil	-
TC-TeCQ + chloranil+ glutamate	TeCQ + chloranil	+
TCG-TeCQ + chloranil+ glutamate	TeCQ + chloranil	+
PFG-TeCQ + chloranil+ glutamate	TeCQ + chloranil	-
ExP-TeCQ + chloranil + glutamate	TeCQ + chloranil	+
ExPG-TeCQ + chloranil+ glutamate	TeCQ + chloranil	+
PG-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	-
TC-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	-
TCG-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	-
PFG-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	+
ExP-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	+
ExPG-PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 產物	+
PG-抽取後 PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	-
TC-抽取後 PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	+
TCG-抽取後 PCP-Fenton 產物+ glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	+
PFG-抽取後 PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	+
ExP-抽取後 PCP-Fenton 產物 + glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	+
ExPG-抽取後 PCP-Fenton 產物+ glutamate	PCP-Fenton 抽取後產物	+

* ”PG-PCP + glutamate“:表示表三之”馴化代號-固體培養基添加物”組別之微生物。

** ”-“:表示微生物生長不明顯，培養液為澄清狀。

”+“:表示微生物有生長跡象，培養液呈混濁狀。

結果顯示，各組微生物中，PCP 之利用狀況(亦即 PCP 利用菌)並不存在，而在含 TeCQ 與 chloranil 之培養基中馴化培養之微生物具有利用 TeCQ 與 chloranil 存活之能力。至於在含 PCP-Fenton 產物之組別以及含 PCP-Fenton 抽取後產物之組別的培養基所馴化培養之微生物亦同樣具有分別利用 PCP-Fenton 產物或 PCP-Fenton 抽取後產物而維持生存之能力。

第二部份為前一實驗結果中未形成菌落之培養皿中是否存在活菌之測試實驗，實驗方法如下：自未形成菌落之固體培養基表面刮取部份凝膠，轉殖至含 yeast extract 培養基之血清瓶中，進行活菌測試。實驗結果如下：

表五 未形成菌落培養皿之活菌測試

微生物來源	存活性 測試結果
PG-PCP*	**
TC-PCP	-
TCG-PCP	-
PFG-PCP	-
ExP-PCP	-
ExPG-PCP	-
PG-TeCQ + chloranil	-
TC-TeCQ + chloranil	-
TCG-TeCQ + chloranil	-
PFG-TeCQ + chloranil	-
ExP-TeCQ + chloranil	-
ExPG-TeCQ + chloranil	+
PG-PCP-Fenton 產物	-
TC-PCP-Fenton 產物	-
TCG-PCP-Fenton 產物	-
PFG-PCP-Fenton 產物	+
ExP-PCP-Fenton 產物	+
ExPG-PCP-Fenton 產物	+
PG-抽取後 PCP-Fenton 產物	-
TC-抽取後 PCP-Fenton 產物	-
TCG-抽取後 PCP-Fenton 產物	-
PFG-抽取後 PCP-Fenton 產物	+
ExP-抽取後 PCP-Fenton 產物	+
ExPG-抽取後 PCP-Fenton 產物	+

* "PG-PCP":表示表三之"馴化代號-固體培養基添加物"組別之微生物。

** "-":表示微生物生長不明顯，培養液為澄清狀。

"+":表示微生物有生長跡象，培養液呈混濁狀。

表三中未形成菌落之培養皿未必代表

其中必無存活之微生物，有可能是養分不足以提供微生物大量生長，因而無法生成菌落。經由活菌測試，顯示所馴化增值培養之微生物組別中，應存在可利用 TeCQ + chloranil、Fenton 產物 抽取後 PCP-Fenton 產物進行生長之微生物，但由實驗結果觀之，這些微生物數量不多亦不易培養，因此無法大量增殖以供後續測試。

然而無法大量培養五氯酚氧化產物分解微生物之主因應在於無法取得足夠之五氯酚分解產物，因為含氯芳香族化合物分子之含氯數量對其氧化反應影響甚巨，例如高含氯量之芳香族化合物較不易直接進行氧化分解，因為在某些情況下，氧化酵素受到分子上氯取代基的阻障而不能對苯環上的作用位置進行攻擊與裂環作用，因此雖然 Fenton system 等化學氧化分解污染物的研究上已卓然有成，在控制良好的實驗室條件中，結合超音波震盪與氧化程序並充分提供氧化劑確實可達成 90 % 以上 PCP⁽⁸⁾ 之去除率，然而在求取較高分解效果之要求下，試劑(如過氧化氫)之添加往往數十倍於待反應物之所需反應當量^(7,9)，而該條件下，反應後之溶液實不適於進行微生物培養實驗。因此如先前實驗所言，本研究採用之 Fenton 條件之最高分解率未達 30%，若以此分解產物提供給微生物，則微生物雖有 30% 之氧化產物利用，卻還須面對 70% 具毒性之 PCP，微生物存活之困難可想而知。

針對此點發現，本實驗室於後續計畫中，將結合含氯芳香族化合物之三種降解方式，厭氧生物脫氯、化學氧化反應、好氧生物礦化等之作用，依序採

厭氧脫氯→化學氧化裂解→好氧礦化等步驟逐步進行，應可獲致一穩定、經濟且高效率之降解機制，達成將 PCP、HCB 脫氯、裂環進而況化分解之目標。

四、計畫成果自評

1.針對五氯酚 Fenton 反應之條件進行研究，顯示 pH 值對於分解作用之影響最大，pH 若大於 4，則幾無分解作用可言。

2. 添加 glutamate 可幫助微生物存活於 PCP 或其氧化產物之環境中，然而對於促進其分解 PCP 或其氧化產物卻無明顯之功效。
3. 因為缺乏培養基質(PCP 氧化產物)之故，難以進行純菌培養，但實驗亦證明，僅含 PCP 氧化產物之培養基存有活性微生物，據此可以推知，馴化培養血清瓶中，應有 PCP 氧化產物分解菌之存在。

* 根據本計畫所提出之論文已獲得 Conference Secretariat, King Mongkut's University of Technology. 採用，將作為該校所舉辦之"Regional Conference on Environmental and Hazardous Waste Treatment Technologies. King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thungkru, Bangkok, Thailand, December 19. 2002." 之口頭發表論文。題目為 "Acclimation of degrading microorganisms for the fenton oxidation products of pentachlorophenol "。

- 物。行政院環保署研究報告。1991。
5. 郭烈銘。有害物質滲漏地下水層污染調查研究期末報告。行政院環保署。1990。p35-36。
6. Valo, R., J. Apajalahti, and M. Salkinoja-Salonen. Studies on the physiology of microbial degradation of pentachlorophenol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. 21:313-319.
7. Bennitez, F.J., J. Beltran-Heredia, J.L. Acero, and F.J. Rubio. Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation process. 2000. Chemosphere. 41:1271-1277.
8. Youssef, N.A., M.M. Selim, and E.S. Kamel, The Decomposition of Hydrogen Peroxide over Pure and Mixed Copper Oxide and Iron Oxide. Bull. Soc. Chem. 1991. 128:648-653.
9. Hirvonen, A., M. Trapido, J. Hentunen, and J. Tarhanen. Formation of hydroxylated and dimeric intermediates during oxidation of chlorinated phenols in aquatic solution. Chemosphere. 1999. 41:1211-1218.

五、參考文獻

1. Kawamoto, K., and K. Urano. Parameters for predicting fate of organochlorine pesticides in the environment (I) octanol-water and air-water partition coefficients. Chemosphere. 1989. 18:1987-1996.
2. Humpi, T. Observation of polychlorinated phenoxyanisoles in technical chlorophenol formulation and in sawmill environment. Chemosphere. 1985. 14:523-528.
3. Gobas, F.A.P.C., E. J. McNeil, L. Lovett-Doust, and G. D. Franks. Migration of wood-preserving chemicals in contaminated ground water in sand aquifer at Pensacola, Florida. Environ. Sci. Technol. 1985. 19:955-961.
4. 張碧芬。有機毒性物質在環境中的流布及對環境影響之評估—氯酚化合物。