

# 氯氧化對純化藻體三鹵甲烷生成潛能之影響研究

陳秀瑜\* 葉俐伶\* 童淑珠\*\* 王奕軒\* 林財富\*\*\*

\*成功大學環境工程學系學生

\*\*崑山科技大學環境工程學系副教授

\*\*\*成功大學環境工程學系教授

## 摘要

加氯消毒是自來水場淨水程序中重要的處理單元之一，其成本低廉且具有強氧化力、殺菌特性與殘餘的效能，因此國內自來水廠幾乎都採用加氯消毒。然而當水中存在天然有機物質 (Natural organic matters, NOMs) 時，氯會和NOMs產生具致癌性的消毒副產物 (Disinfection by-products, DBPs)，如三鹵甲烷 (Trihalomethanes, THMs)。而這些消毒副產物都已經被證實具有致癌性，對於人體及動物具有相當大的威脅。目前國內外針對三鹵甲烷皆有訂定標準，台灣將其歸類為影響健康物質，其自來水水質標準為0.1ppb。

由於藻類細胞及其細胞外代謝物為水中有機物主要來源之一，其微三鹵甲烷生成的前驅物質，因此本研究將針對實驗室分離純化之藻種，探討加氯氧化後三鹵甲烷之生成量。本研究於實驗室培養兩種綠藻及一種矽藻，綠藻分別為小球綠藻(*Chlorella* sp.)及扭曲單殼縫藻(*Monaraphidium* sp.)，矽藻則為舟形藻(*Navicula* sp.)。由研究結果發現氯無法破壞小球綠藻和扭曲單殼細胞，且胞外代謝物為三氯甲烷生成之最主要的前驅物質。而加氯氧化矽藻能有效破壞藻體，氧化後三氯甲烷生成的前驅物質為藻體細胞和其代謝物。

## 一、研究緣起

由於經濟的發展使得自來水水源受到嚴重的污染，因而使原水中普遍含有天然有機物質。而目前國內自來水廠幾乎都採用加氯消毒，但是當水中存在天然有機物質 (Natural organic matters, NOMs) 時，氯會和NOMs產生具致癌性的消毒副產物 (Disinfection by-products, DBPs)，如三鹵甲烷 (Trihalomethanes, THMs)。而這些消毒副產物都已經被證實具有致癌性，對於人體及動物具有相當大的威脅。

近年來更有報導指出，當藻類細胞及其胞外代謝物經加氯後，會產生致癌性的三鹵甲烷，且有研究指出，當水中含有四尾柵藻 (*Scenedesmus quadricauda*) 時，三鹵甲烷生成潛能 (THMFP) 更會提

高 10% 至 30%。由此可知，三鹵甲烷對飲用水水質具有極負面的影響，其中藻類則扮演了重要的角色。

由於藻類細胞及其胞外代謝物為水中有機物主要來源，因而形成三鹵甲烷的前驅物質，故氯對於不同之藻體應也有不同的氧化效果。因此本研究的主要內容有：

1. 確認氯氧化對藻體細胞之損害程度。
2. 了解水體中藻細胞氯氧化之THMs生成潛能，及三鹵甲烷物種之相關性。

## 二、研究方法

本研究主要探討氯氧化對不同藻體基質生成三鹵甲烷的影響，主要測定加氯氧化後三鹵甲烷的生成量，並以光學顯微鏡鏡檢藻類細胞氧化前後的變化。研究方法詳述如下。

### (1) 三鹵甲烷之分析方法

本研究在臭味物質的分析方面，使用固相微萃取法(Solid Phase Micro-Extraction, SPME)，將水樣中臭味物質濃縮於吸附纖維(Fiber)上，吸附完畢後注入氣相層析質譜儀(gas chromatograph/mass spectrometry detector, GC/MSD)進行定性及定量分析。

固態微萃取法分析水中的化學物質，必須視水中物質種類的不同，而選擇使用不同的吸附劑的材質。其吸附纖維特點必須對欲分析物種有強選擇吸附性。本實驗使用 Supelco 公司所製的 No.57328-U 吸附纖維，其吸附纖維材質為 polydimethylsiloxane/ divinylbenzene polymer (PDMS/ DVB)。本實驗對於三鹵甲烷物質之分析參照 Stack 等人(1999)之分析方法。氣提瓶為雙層瓶，外層主要提供 20°C 的恆溫水浴，內瓶體積為 60 mL，分析水樣 50 mL，並加入 15 g 的 NaCl 以降低水的蒸氣壓。經攪拌均勻後於 20°C 恆溫水浴中氣提，然後插入吸附纖維在頂部空間吸附平衡 20 分鐘。

分析時將吸附後之纖維打入 GC/MS 分析，以 200°C 脫附分析。GC 的烘箱升溫程式為 40°C 維持 5.0 分鐘，然後以每分鐘 18°C 升溫至 220°C，在 220°C 維持 5 分鐘，以確定揮發性有機物完全分離，分析時間共為 20.0 分鐘。以 He 為載流氣體(carrier gas)，並且注入口之 He 不分流(splitless)，定壓 23.5kPa。

### (2) 藻類分離純化及培養方法

本實驗培養的藻類有兩種綠藻、及一種矽藻，綠藻分別為小球綠藻(*Chlorella* sp.)及扭曲單殼縫藻(*Monaraphidium* sp.)，矽藻則選用舟形藻(*Navicula* sp.)。球藻及扭曲單殼縫藻以 BG-11 培養基(Allen and Stanier, 1968)培養，舟形藻為矽藻的一種，因此以矽藻培養基(Cohn and Pickett-Heaps, 1988)培養。

而藻類培養及分離純化方法，主要是參考“Algal Culturing Techniques, edited by Robert A. Andersen, 2005 出版”及“生物起因の異臭味水對策の指針”(日本水道協會 1999 年出版)等兩本書中介紹的培養及分離純化技術。

小球綠藻及扭曲單殼縫藻以 BG-11 之人工培養基培養，雖然 BG-11 是一般常用的藍綠藻培養基，但是培養綠藻效果也很好，以 25°C 恆溫曝氣培養於培養箱中，連續照光 24 小時，照度約 1500 lux。舟形藻以矽藻人工培養基培養，並且以 20°C 之恆溫環境進行培養，連續照光 24 小時，照度約 500 lux。

### (3) 藻類計數方法

本實驗藻類細胞計數採用濾膜法及血球計數器，濾膜法主要用於計數矽藻，計數方法參照環檢所 NIEA E504.41T；而血球計數器用於計數小球綠藻及扭曲單殼縫藻。

血球計數器法優點為計數迅速方便、不需前處理濃縮，但是缺點為無法計數自然環境中的藻類、只能計數顆粒狀的藻體，本實驗將此方式應用於培養之小球綠藻及扭曲單殼縫藻之計數。其步驟描述如下：

- a. 用水清洗蓋玻片以及血球計數器的計數池(counting chamber)表面，並分別以拭鏡紙擦拭；再噴 70%的酒精於蓋玻片和計數池表面之上，等兩者完全乾燥後，將蓋玻片置於血球計數器之上，使覆蓋住兩個計數池。
- b. 以微量移液管吸取 10  $\mu$ L 並將藻細胞懸浮液自血球計數器的一端注入計數池內，而細胞樣本須均勻填滿於計數池內，勿使樣本滿出計數池，並且填入樣本後，勿使蓋玻片發生滑動，否則易導致兩個計數池內的樣本相互混合。
- c. 計數藻細胞：將血球計數器置於顯微鏡底下，以放大倍率 400 倍觀察，並利用計數池中的小方格計算藻細胞的數目。
- f. 計算培養基中藻細胞密度：

$$\text{計算公式: } \frac{2N}{2} \times 10 \times 1000 = \text{cell} / \text{mL}$$

N 為每一大方格所得的活細胞數，將 2 個大方格中的總藻細胞數目加總起來，除以 2，可得到每一大方格內的平均藻細胞數目。並且由於每一個大方格的體積為  $0.1 \text{ mm}^3$ ，所以將所得的平均數，乘以 10，可得每  $1 \text{ mm}^3$  內的總藻細胞數目，再乘於 1000 可得每 1 mL 的活細胞數目。

#### (4) 氯氧化試驗

加次氯酸鈉氧化實驗採用批次式反應，將試驗水樣置入 135 mL 棕色反應瓶，再加入適當體積之次氯酸鈉儲備溶液，使其氯濃度維持在 10ppm。實驗過程於室溫下(約  $28^\circ\text{C}$ )攪拌，使溶液成為完全混合狀態，反應結束後再加入適當體積之 0.1 N 硫代硫酸鈉，並且立刻分析總三鹵甲烷。

氧化反應為確保加氯量足夠，反應 1 小時後測定餘氯。餘氯分析方法採用綜合水質分析儀(NOVA 60, Merck, Germany)內附之方法 No.14828-Chlorine(free and total)，可測出自由餘氯及總餘氯，測試範圍為  $0.1\sim 7.5 \text{ mg/L Cl}_2$ (for 10-mm cell)。

### 三、結果與討論

#### 3.1 四種三鹵甲烷(THMs)之檢量線之製備

將配製完成之  $20000 \mu\text{g/l}$  的 THMs 標準儲備溶液分別取出 12.5、25、50、125 及  $250 \mu\text{l}$  加入二段水中，定量為 50ml，濃度分別為 5、10、20、50 及  $100 \mu\text{g/l}$ 。進行固相微萃取吸附後，經 GC-MS 熱脫附及偵測所得之層析圖如圖 1，即得四種三鹵甲烷之檢量線方程式(詳表 1)。

表 1. 四種 THMs 之檢量線方程式

化合物	檢量線方程式
$\text{CHCl}_3$	$Y=98310X+10^6$
$\text{CHCl}_2\text{Br}$	$Y=170377X+20^6$
$\text{CHClBr}_2$	$Y=285134X+50^6$
$\text{CHBr}_3$	$Y=40008X+30^6$

註：X 為濃度(ppb)；Y 為面積值。

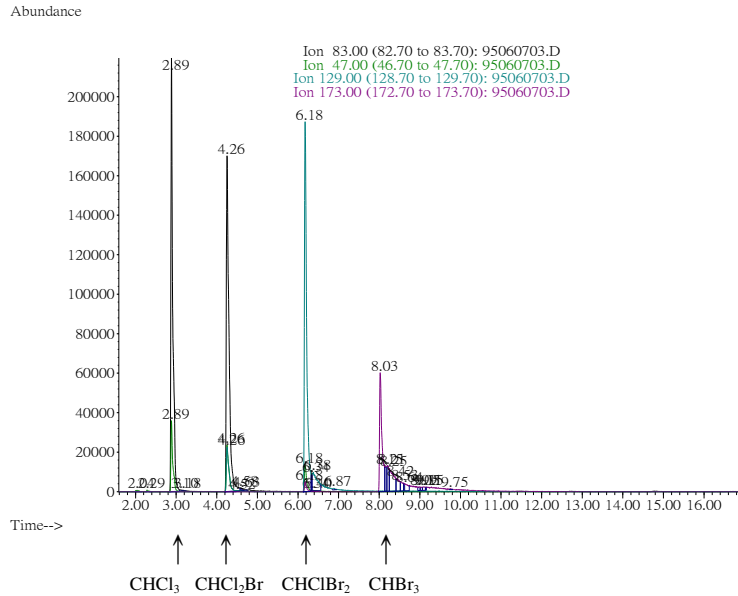


圖 1. 固相微萃取四種 THMs(皆為 100 $\mu$ g/l)氣相層析定量分析圖譜

### 3.2 純藻加氯氧化之三氯甲烷生成量

氧化培養一週以上之純藻及其濾液，將藻液之三氯甲烷的生成量扣除其濾液的分析結果視為藻體氧化後三氯甲烷的生成量，以探討三鹵甲烷生成之前驅物與藻體和其代謝物之關聯性。

氧化前先行計算藻數，氧化前之 pH 控制於 8.5 至 9.5 之間，並固定加氯量為 10 mg Cl<sub>2</sub>/l。氧化反應瓶置於室溫下，約 28~30 $^{\circ}$ C。為使其有充分的氯可進行反應，氧化後餘氯控制在 1~5mg/l，因此在氧化後測其餘氯，以便調整反應樣品之藻細胞數量。由圖 2~4 可得知，固定加氯量時，藻數和三氯甲烷的生成量有很好的正相關。

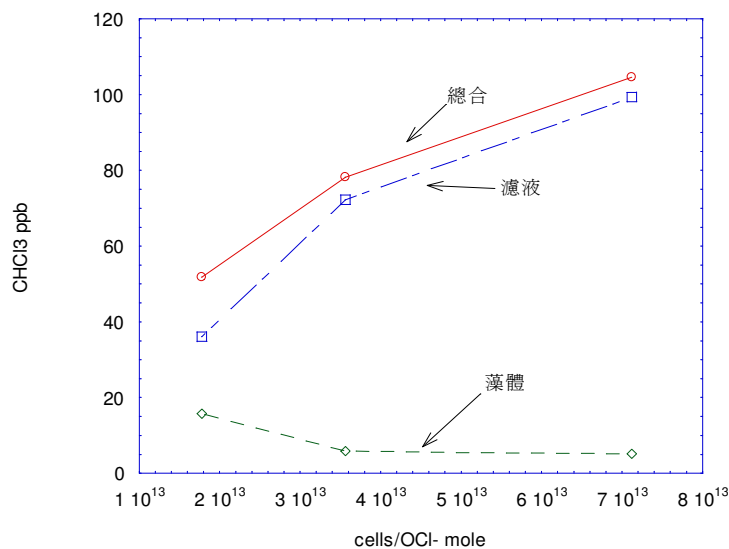


圖 2. 小球綠藻氯氧化之三氯甲烷生成量

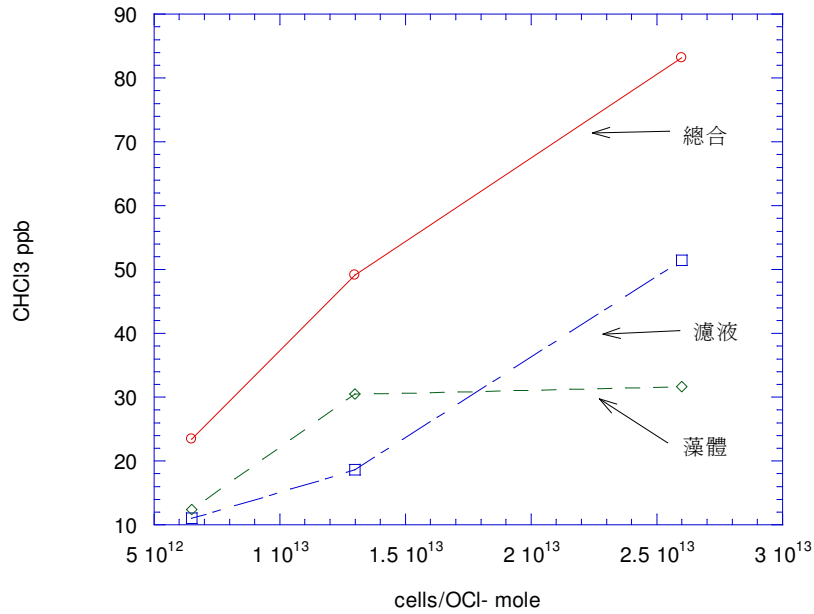


圖 3. 扭曲單殼縫藻氣氧化之三氯甲烷生成量

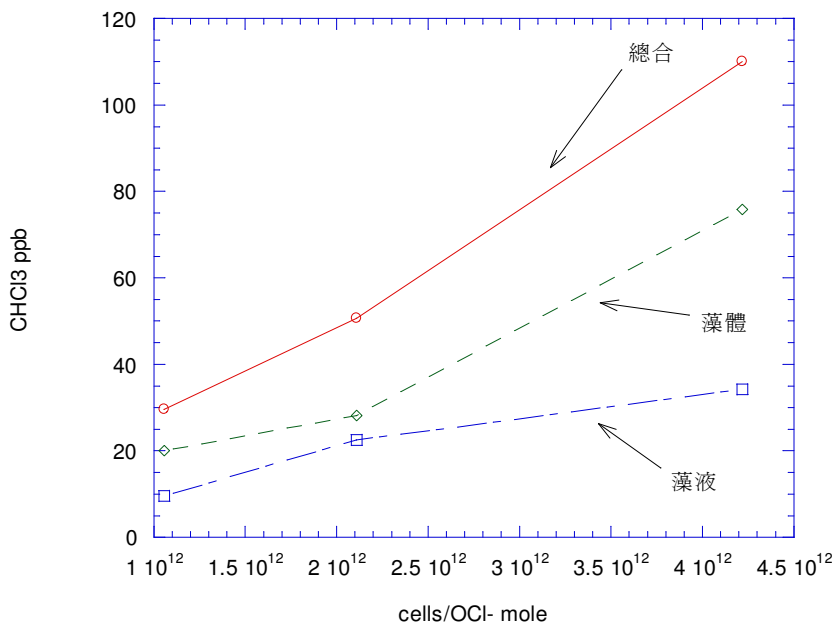


圖 4. 矽藻氣氧化之三氯甲烷生成量

將三種純藻氧化後三氯甲烷的生成量進行比較，由於三種藻體細胞由大到小分別為矽藻、扭曲單殼縫藻及小球綠藻，且藻液加氣氧化後，三者生成三氯甲烷的量由多到少也分別為矽藻、扭曲單殼縫藻及小球綠藻，故藻體大小和生成三氯甲烷的量有明顯正相關。

由圖 6，扭曲單殼縫藻及小球綠藻之濾液氧化後生成之三氯甲烷的量並無明顯差異；而由圖 7，扭曲單殼縫藻之藻體氣氧化後之三氯甲烷生成量大於小球綠藻之藻體，故可了解二者代謝物做為三鹵甲烷

前趨物之濃度相差不多，而由於扭曲單殼縫藻之藻體較大，故可做為三鹵甲烷前趨物之量也較多，因此扭曲單殼縫藻之藻體氯氧化後之三氯甲烷生成量大於小球綠藻。

因氧化實驗採用固定加氯量，因此隨著藻數的增加，加氯量明顯不足，導致氯無法將藻體破壞，多數的三氯甲烷由氧化藻體代謝物產生(詳圖 5~7)。

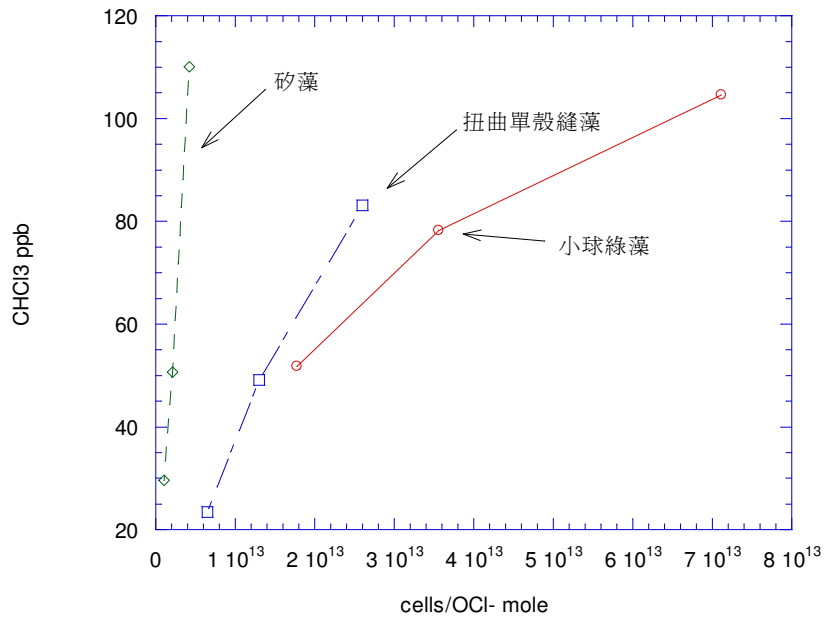


圖 5. 藻液氯氧化後三氯甲烷生成量之比較

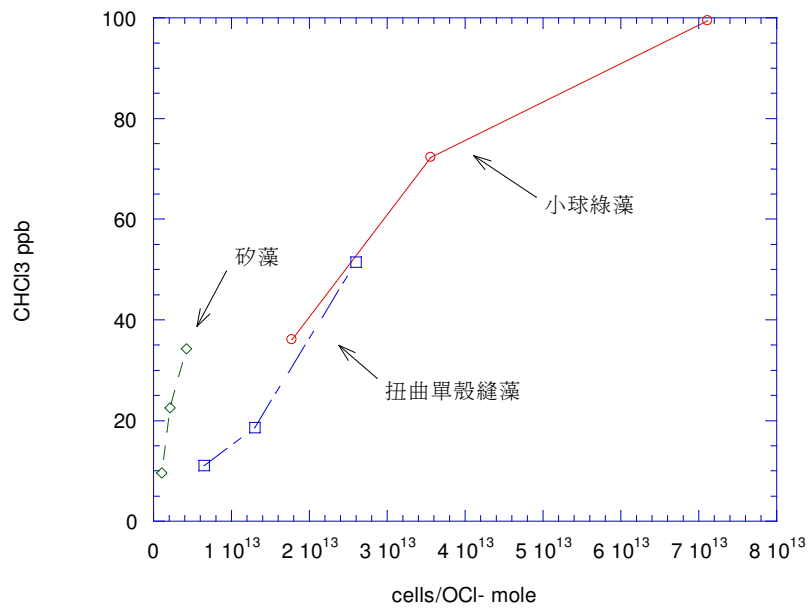


圖 6. 純藻濾液氯氧化後三氯甲烷生成量之比較

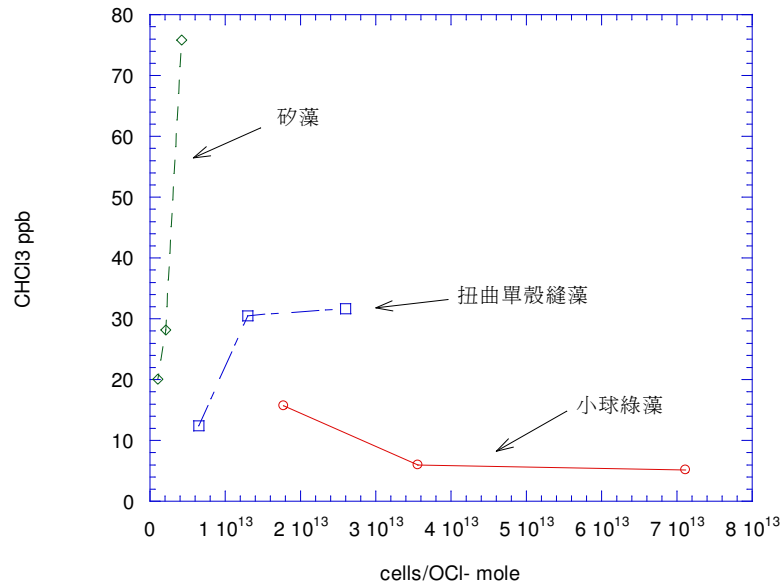


圖 7.三種純藻藻體氧化後生成三氯甲烷之比較

### 3.3 氧化前後純藻藻體之比較

由光學顯微鏡分別觀察三種藻體氧化前後之差異，發現小球綠藻(圖 8)和扭曲單殼縫藻(圖 9)氧化前後，藻體外觀上皆無明顯不同，可能原因為藻液中有機代謝物濃度過高與藻體競爭氧化劑所致，因此氯氧化並未破壞藻體，且氧化後三氯甲烷的生成主要的前驅物為濾液中藻細胞的代謝物。

而矽藻(圖 10 與圖 11)氧化後，藻體內色素明顯變淡，得知加氯能氧化矽藻的葉綠素而導致顏色變淡，並了解氧化後三氯甲烷生成的前驅物質是藻體本身和其代謝物。

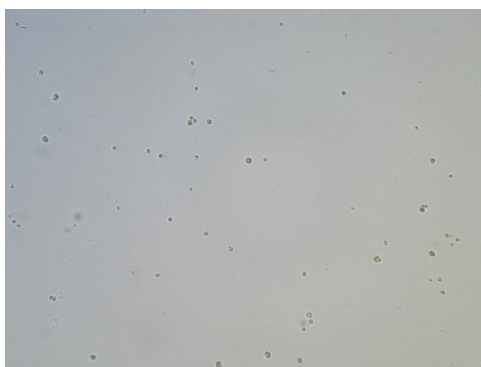


圖 8. 小球綠藻顯微照片(400X)

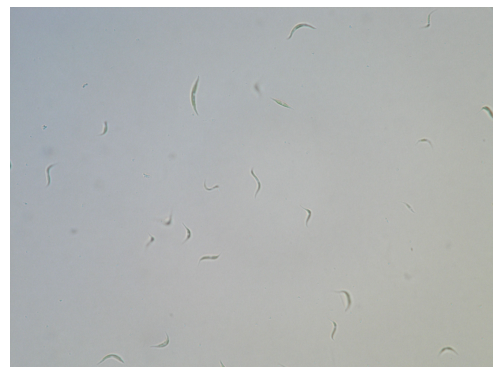


圖 9. 扭曲單殼縫藻顯微照片(400X)

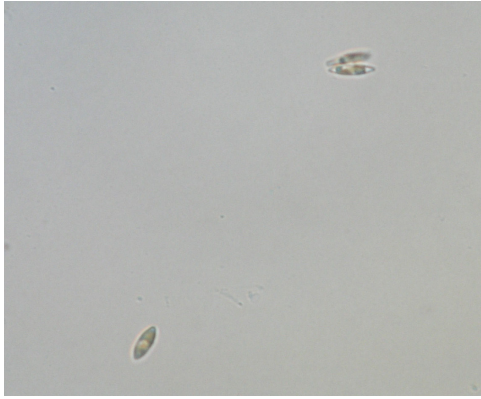


圖 10. 矽藻細胞氧化前顯微照片  
(400X)

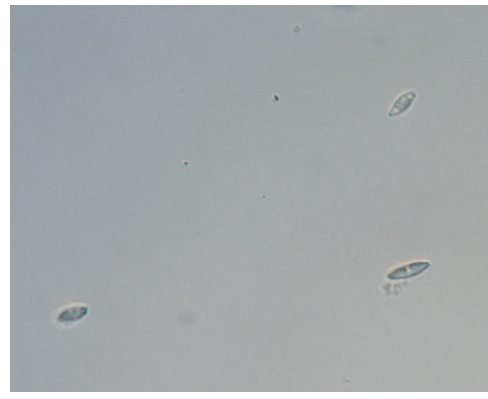


圖 11. 矽藻細胞氧化後顯微照片  
(400X)

### 3.4 pH 對藻體氧化後生成三氯甲烷之影響

由於使用純藻進行氧化，樣品中並無  $\text{Br}^-$  存在，因此氧化後只生成三氯甲烷，即氯仿，故只針對氯仿作討論。

不同藻類適合生長的 pH 值不盡相同，因 pH 會影響加氯氧化之氯的物種為  $\text{OCl}^-$  或  $\text{HOCl}$ ，故針對矽藻進行不同 pH 值下氧化後生成三氯甲烷之影響。因矽藻培養基最終 pH 值調整至 6.75，且隨著矽藻的生長，pH 值也會隨著變化，故進行氧化前使用  $\text{HCl}$  及  $\text{NaOH}$  調整 pH 值至所需數值。圖 12 之藻液包含矽藻藻體和其代謝物，濾液則為矽藻代謝物，而藻體即為藻液扣除濾液。因培養基的成分為無機鹽類，故氧化後不會干擾三氯甲烷的生成。

由圖 12 得知隨著 pH 值的增加，生成的三氯甲烷也明顯增加。在 pH 值 9 時之三氯甲烷生成量約為 pH 值 7 時的兩倍，與 Thurman(1985) 實驗結果之 pH 值 11.5 時三氯甲烷生成量約為 pH 值 6.5 時的兩倍相似。

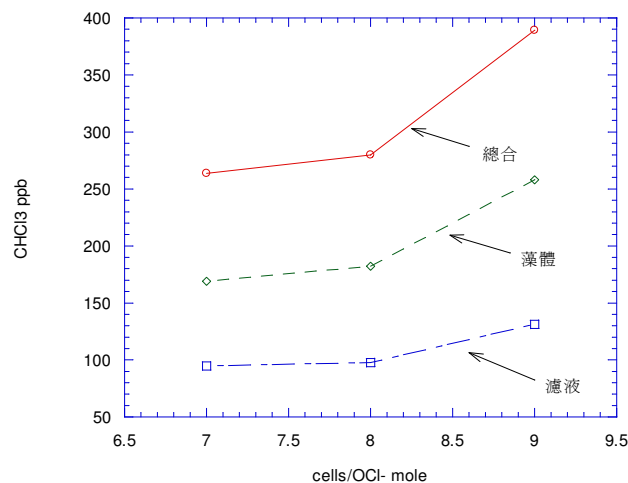


圖 12. 矽藻在不同 pH 值下氧化生成三氯甲烷之驅勢

#### 四、結論

1. 固定加氯量時，小球綠藻、扭曲單殼縫藻及矽藻之藻數和三氯甲烷的生成量皆有很好的正相關。
2. 不同藻體其外觀大小和生成三氯甲烷的量有明顯正相關。
3. 當加氯量不足時，便無法將藻體破壞，三氯甲烷生成的前驅物主要為藻體代謝物。
4. 矽藻氧化後，由藻體內色素明顯變淡可知氯能有效破壞藻體，且三氯甲烷生成的前驅物是藻體本身和其代謝物。
5. pH 值和加氯氧化後所生成之三氯甲烷有明顯正相關，pH 值為 9 時可生成較多三氯甲烷。

#### 參考文獻

1. Frederick L. Cardinali, David L. Ashley, John C. Morrow, Deborah M. Moll, and Benjamin C. Blount, "Measurement of Trihalomethanes and Methyl Tertiary-butyl Ether in Tap Water Using Solid-phase Microextraction GC-MS", 2004.
2. Jeanine D. Plummer and James K. Edzwald, "Effect of Ozone on Disinfection By-product Formation of Algae", 1998.
3. Mary A. Stack, Gillian Fitzgerald, Sharon O'Connell, Kenvin J. James, "Measurement of trihalomethanes in potable and recreational waters using solid phase micro extraction with gas chromatography-mass spectrometry", 1999.
4. Robert A. Andersen, "Algal Culturing Techniques" 2005.
5. Thurman, E. M., "Organic Geochemistry of Natural Water", the Netherlands, p.105&p.274, 1985.
6. 日本水道協會 (1999) 生物起因の異臭味水對策の指針。
7. 王奕軒, "自來水中木頭味物質  $\beta$ -cyclocital 之來源及去除之研究", 國立成功大學環境工程學系碩士班碩士論文, 民國 95 年。
8. 林三能, "自來水中總三鹵甲烷快速偵測方法之研究", 淡江大學水資源及環境工程學系碩士班碩士論文, 民國 88 年。
9. 吳家興, "地區水庫水源特性分佈及消毒副產物生成潛能之探討", 東海大學環境科學學系碩士班碩士論文, 民國 88 年。
10. 洪慧鈞, "水庫優養化評估指標與優養化水體三鹵甲烷生成潛勢之探討" 中興大學環境工程學系碩士班碩士論文, 民國 90 年。