

行政院環境保護署

103 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

利用耐鹽嗜油菌與微生物富集技術強化石油碳氫化合物污染

土壤之生物復育

期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：嘉南藥理大學／環境工程與科學系

計畫主持人：張家源 教授

計畫執行期間：102年11月25日起至

103年11月24日

中 華 民 國 103 年 11 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐ 已發表____篇；☒ 未發表之文稿1篇；☐ 撰寫中____篇；☐ 無

專利：☐ 已獲得____件；☐ 申請中____件；☐ 無

技轉：☐ 已技轉；☐ 洽談中；☐ 無

其他：(100 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500 字為限）

專案研究獲致具體成果如下：

- 一、 篩選分離本土甲苯降解菌 8 株，柴油降解菌 4 株，共有 6 株，甲苯降解菌分別為 T5、T6、T7、T10、T11 與 T12；柴油降解菌分別為 D2、D5、D6 及 D7。
- 二、 研究結果顯示本研究所篩選出的部分菌株具有良好的甲苯降解效能，菌株 T6、T7 與 T11 具有較佳之甲苯降解能力。
- 三、 研究結果顯示本研究所篩選出的菌株具有良好的柴油降解效能，菌株 D2、D5 與 D6 具有較佳之柴油降解能力，菌株 D5 具有最佳之乳化效果。
- 四、 本研究篩選之甲苯分解菌均能忍受 250 ppm Zn，柴油分解菌 D2, D5 與 D7 能忍受 250 ppm Zn，高 Zn 濃度則對多數菌種產生抑制作用，其中 T7 與 D5 可忍受高濃度(500 ppm)；菌種之生長較易受銅影響，篩選出之菌種中僅以 T7 與 D5 能耐受高濃度 Cu。本研究所分離的菌株對重金屬之吸收有良好效能。
- 五、 菌種之 16S rDNA 鑑定結果發現，主要的菌種是 *Achromobacter insolitus* (D2)，*Candida spp.* (D5)，*Xanthobacterpolyaromaticivorans* (D6 and T12)，*Ochrobactrum intermedium* (D7)，*Streptomyces caelestis* (T1 and T5)，*Gordonia amicalis* (T6)，*Brevibacillus brevis* (T10)，*Bacillus fumarioli* (T11)，另外，T7 經鑑定為真菌類。
- 六、 本研究利用不同性質土壤，模擬甲苯或柴油污染，利用界面活性劑進行洗提，評估界面活性劑濃度、用量、洗提時間、界面活性劑重複使用對洗提效果之影響，結果顯示本研究選用之界面活性劑對不同性質土壤皆有洗提效果，惟其洗提效果高低與土壤性質有關。
- 七、 本研究建構實驗室微生物富集反應器系統，並於反應槽中投入本研究分離純化的 3 種本土柴油降解菌株 (D2、D5、D6)，用以處理模擬柴油污染土壤經界面活性劑洗提後之混合液。研究結果顯示，實驗室微生物富集反應器系統對 COD 的處理效果達 95-97% 之間，穩定且有效地處理柴油-界面活性劑洗提液。
- 八、 投稿中 SCI 期刊一篇。

研究成果中英文摘要:

一、中文摘要：

利用耐鹽嗜油菌與微生物富集技術強化石油碳氫化合物污染土壤之生物復育

本研究為篩選分離柴油與甲苯降解菌，並以聚合酶連鎖反應放大菌種之 16S rDNA，進行菌種之鑑定，進而探討其生理與降解特性、乳化特性、重金屬之吸附競爭或抑制代謝、不同營養源添加之共同代謝等，瞭解此等雙效微生物在土壤中降解碳氫化合物與耐受重金屬銅、鋅的行為、環境影響因子等，並應用利用實驗室集的微生物富集技術強化污染土壤之界面活性劑洗提與生物復育運作，以提供後續實際污染環境整治的參考。

研究獲致具體成果如下：

1. 篩選分離本土甲苯降解菌 6 株，柴油降解菌 4 株，共有 10 株，甲苯降解菌分別為 T5、T6、T7、T10、T11 與 T12；柴油降解菌分別為 D2、D5、D6 及 D7。
2. 研究結果顯示本研究所篩選出的部分菌株具有良好的甲苯降解效能，菌株 T6、T7 與 T11 具有較佳之甲苯降解能力。
3. 研究結果顯示本研究所篩選出的菌株具有良好的柴油降解效能，菌株 D2、D5 與 D6 具有較佳之柴油降解能力，菌株 D5 具有最佳之乳化效果。
4. 本研究篩選之甲苯分解菌均能忍受 250 ppm Zn，柴油分解菌 D2, D5 與 D7 能忍受 250 ppm Zn，高 Zn 濃度則對多數菌種產生抑制作用，其中 T7 與 D5 可忍受高濃度(500 ppm)；菌種之生長較易受銅影響，篩選出之菌種中僅以 T7 與 D5 能耐受高濃度 Cu。本研究所分離的菌株對重金屬之吸收有良好效能。
5. 菌種之 16S rDNA 鑑定結果發現，主要的菌種是 *Achromobacter insolitus* (D2)，*Candida spp.* (D5)，*Xanthobacterpolyaromaticivorans* (D6 and T12)，*Ochrobactrum intermedium* (D7)，*Streptomyces caelestis* (T1 and T5)，*Gordonia amicalis* (T6)，*Brevibacillus brevis* (T10)，*Bacillus fumarioli* (T11)，另外，T7 經鑑定為真菌類。
6. 本研究利用不同性質土壤，模擬甲苯或柴油污染，利用界面活性劑進行洗提，評估界面活性劑濃度、用量、洗提時間、界面活性劑重複使用對洗提效果之影響，結果顯示本研究選用之界面活性劑對不同性質土壤皆有洗提效果，惟其洗提效果高低與土壤性質有關。

7. 本研究建構實驗室微生物富集反應器系統，並於反應槽中投入本研究分離純化的 3 種本土柴油降解菌株 (D2、D5、D6)，用以處理模擬柴油污染土壤經界面活性劑洗提後之混合液。研究結果顯示，實驗室微生物富集反應器系統對 COD 的處理效果達 95-97% 之間，穩定且有效地處理柴油-界面活性劑洗提液。

二、英文摘要：

Application of salt-tolerant oil-degrading bacteria and microorganism enhancement technology on bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil

This project is to screen and isolate the hydrocarbonoclastic bacteria that might be suitable for bioremediation purposes to remove toluene or diesel oil from soil in presence of zinc and copper. To achieve this goal, batch cultivation of bacteria and 16S rDNA is employed to identify the target bacteria. Several sub-study such as the characteristics of isolated bacteria, degradation performance of petroleum-hydrocarbon, biosorption of heavy metals and its inhibition of bacterial metabolism, the effects of different nutrients on co-metabolism and also a lab scale of microorganism enrichment reactor system is conducted to evaluate and enhance the treatment of surfactant washing liquid containing petroleum-hydrocarbon.

1. This project has already screened and purified 6 different kinds of toluene-degrading bacteria (T5, T6, T7, T10, T11 and T12) and 4 different kinds of diesel oil -degrading bacteria (D2, D5, D6 and D7) from different sources of oil slurry.
2. Toluene-degrading bacteria T6, T7 and T11 have the high performance on toluene degradation.
3. Diesel oil -degrading bacteria D2, D5 and D6 have the high performance on diesel degradation.
4. All toluene-degrading bacteria and diesel oil -degrading bacteria D2, D5 and D7 obtained from this study have Zn tolerance of 250 ppm, the further studies showed that T7 and D5 can tolerate high metal levels of Zn and Cu. The main mechanism of metal removal in this study is absorption.
5. Results of 16S rDNA approach showed that the dominate bacteria are *Achromobacter insolitus* (D2), *Candida spp.* (D5), *Xanthobacterpolyaromaticivorans* (D6 and T12), *Ochrobactrum intermedium* (D7), *Streptomyces caelestis* (T1 and T5), *Gordonia amicalis* (T6), *Brevibacillus brevis* (T10), *Bacillus fumarioli* (T11), strain T7 was identified as fungus by stain method.
6. The performance of surfactant on the flushing of diesel oil or toluene polluted soil was evaluated based on the parameters of surfactant

concentration 、 volume 、 washing time and the reuse of surfactant. Ethylene Glycol mono-Butyl Ether is available for the flushing of CC, CF and SI soils with diesel or toluene and the performance depended on the property of soil.

7. A lab scale microorganism enrichment reactor system was conducted for the treatment of washing liquid, the results showed that the system was operated stably and a high COD removal of 97% was achieved.

目 次

	目次	i
	圖次	iii
	表次	iv
一	前言	1
二	研究目的	2
三	文獻探討	3
四	研究方法與過程	12
	(一)採樣地點選擇	12
	(二)採樣地點概述	12
	(三)耐鹽嗜油菌之馴養與分離	14
	(四)耐鹽嗜油菌之鑑定	16
	(五)分離菌株對石油碳氫化合物之降解與乳化能力	20
	(六)代謝降解與重金屬耐受性研究	22
	(七)模擬土壤復育試驗	22
	(八)研究進度及完成之工作項目（甘特圖）	30
五	結果與討論	31
	(一)土壤性質分析結果	31
	(二)耐鹽嗜油菌之篩選	31

(三)菌落型態	32
(四) 菌株對石油碳氫化合物與重金屬之耐受性	34
(五)模擬柴油污染土壤與有機質檢測	48
(六)界面活性劑洗提與微生物富集反應器系統	48
(七)菌種之 16S rDNA 鑑定	57
(八)結論與建議	58
六 參考文獻	61

圖 次

圖 3-1	土壤微生物利用 SDHS 為碳源之結果	8
圖 3-2	空氣噴射輔助攪拌反應槽	8
圖 3-3	溫度、濃度、洗滌時間、體積/質量比對洗滌效果的影響	9
圖 3-4	活性劑 SDS 溶液處理土壤中柴油的效果	10
圖 4-1	實驗室微生物富集反應器系統示意圖	27
圖 4-2	實驗室微生物富集反應器系統 (a) 自製薄膜模組 (b) MBR 好氧反應槽(c) 微生物富集反應器系統	28
圖 5-1	甲苯分解菌塗抹於 NB 平板培養基之菌落型態	33
圖 5-2	柴油分解菌塗抹於 NB 平板培養基之菌落型態	33
圖 5-3	甲苯檢量線	34
圖 5-4	T5 菌株對甲苯之降解能力	36
圖 5-5	T6 菌株對甲苯之降解能力	37
圖 5-6	T7 菌株對甲苯之降解能力	37
圖 5-7	T10 菌株對甲苯之降解能力	38
圖 5-8	T11 菌株對甲苯之降解能力	38
圖 5-9	T13 菌株對甲苯之降解能力	39
圖 5-10	柴油經 GC/FID 之分析圖譜	40
圖 5-11	柴油檢量線	40

圖 5-12	D2 菌株對柴油之降解能力	41
圖 5-13	D5 菌株對柴油之降解能力	42
圖 5-14	D6 菌株對柴油之降解能力	42
圖 5-15	D7 菌株對柴油之降解能力	43
圖 5-16	不同濃度比例界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量	49
圖 5-17	界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CF 土壤 OC(%)含量之影響	52
圖 5-18	界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CC 土壤 OC(%)含量之影響	53
圖 5-19	模擬甲苯污染 CF 土壤洗提後土壤 OC(%)含量	54
圖 5-20	模擬甲苯污染 CC 土壤洗提後土壤 OC(%)含量	55
圖 5-21	微生物富集反應器系統對 COD 的處理效果	56
圖 5-22	T7 真菌顯微鏡下外觀	57

表 次

表 4-1	油泥收集區之代碼與座標編列表	12
表 4-2	Bushnell-Haas 培養基組成	14
表 4-3	Phosphate-Buffered Saline 培養基組成	15
表 4-4	16S rDNA 引子序列	17
表 4-5	PCR 反應條件試劑添加量	18
表 4-6	試驗菌株於 16S rDNA 之 PCR 操作條件	19
表 4-7	中空纖維膜特性	29
表 4-8	人工合成廢液組成	29
表 5-1	試驗土壤之理化特性分析	31
表 5-2	甲苯降解菌之乳化指數(E_{24})	36
表 5-3	試驗菌株之乳化指數(E_{24})	44
表 5-4	試驗菌株於含 Zn/甲苯 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試	45
表 5-5	試驗菌株於含 Zn/柴油 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試	45
表 5-6	試驗菌株於含 Cu/甲苯 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試	45
表 5-7	試驗菌株於含 Cu/柴油 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試	45
表 5-8	試驗菌株於含 Zn/甲苯 BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附 型態	46
表 5-9	試驗菌株於含 Zn/柴油 BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附 型態	46

表 5-10	試驗菌株於含 Cu/ BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附型態	47
表 5-11	三種土壤有機碳含量	48
表 5-12	三種模擬柴油污染土壤有機物含量	48
表 5-13	土壤有機碳含量與污染程度關係	49
表 5-14	離心操作對界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量之影響	50
表 5-15	不同體積界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量	51
表 5-16	不同洗提時間洗提後土壤 OC(%)含量	51
表 5-17	界面活性劑重複使用對柴油污染 CF 土壤之洗提效果	52
表 5-18	界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CC 土壤 OC(%)含量之影響	53
表 5-19	界面活性劑對模擬甲苯污染 CF 土壤的提洗效果	55
表 5-20	界面活性劑對模擬甲苯污染 CC 土壤的提洗效果	56
表 5-21	菌種鑑定結果	57

一、 前言

微生物降解油類碳氫化合物的過程非常複雜，若污染場址另含重金屬污染，將會增加生物復育的困難度與時程。根據環保署與相關文獻之導讀分析，目前國內外均有不少重金屬與有機物複合污染之案例，針對此類污染型態之土壤整治為重要課題之一。相關耐鹽嗜油菌之研究不多但國外已有少數成果，本研究著眼於此，乃針對國內不同場址油泥進行耐鹽嗜油菌的採集、汰選與純化培養，並進行菌種鑑定；除此之外，並利用界面活性劑與微生物富集反應處理系統處理模擬受污染土壤並評估其現地處理之可行性，期待本案成果將有別於過往之研究，有助於生物復育工法的發展與廣用性。

二、 研究目的

根據環保署資料與相關文獻之導讀分析，目前國內外均有不少重金屬與有機物複合污染之案例，針對此類污染型態之土壤整治為重要課題之一。TPH一般概分為 TPHG(總石油碳氫化合物 - 汽油類有機物，C6-C10) 和 TPHD(總石油碳氫化合物 - 柴油類有機物，C10-C28)，本研究各選擇一項 TPHD(柴油)與 TPHG(甲苯)污染物進行研究評估；另外，環保署統計資料顯示，國內土壤重金屬污染物種類以砷、鎘、鉻、銅、鉛、鋅、汞、鎳污染最多，本研究選擇重金屬 Cu、Zn 為試驗對象，利用批式反應與連續式系統，選定因子進行評估。主要研究工作如下：

- (一) 完成篩選分離油品降解菌；
- (二) 完成菌種之 16S rDNA 鑑定；
- (三) 完成菌種之乳化與降解特性；
- (四) 完成菌種對重金屬之吸收效能評估；
- (五) 完成生物分解試驗；
- (六) 完成批次混合菌相培養之效能評估；
- (七) 完成實驗室微生物富集反應器系統效能評估。

本計畫將透過上述工作的執行，達行下列研究目的：

- (一) 篩選兼具有效降解土壤中石油碳氫化合物與耐受重金屬的雙效菌種群。
- (二) 針對生質柴油槽之油泥，進行嗜油菌之純化及鑑定評估。
- (三) 建立實驗室級微生物富集反應器系統，評估其整治複合污染(有機物與重金屬)之潛力。

三、 文獻探討

台灣過去三十年間工、商業高速發展，環境污染因而伴隨而來。環保法令之發展軌跡，早期大都偏重於水與空氣之污染管制，但因土壤為各種污染之最終承受體。空氣、水、廢棄物處理不當所導致之土壤與地下水污染問題終將陸續顯現，我國於民國 89 年 2 月 2 日頒布施行「土壤及地下水污染整治法」，使環境保護工作邁入另一重要進程，達到污染整治階段。土壤為環境中的主要受體，富含疏鬆介質與微生物，因此對有機物與非保守性物質有極佳之涵容及自淨能力。但因其擴散、稀釋能力較低，因此對保守性或難分解毒性物質如重金屬與農藥之累積現象較為顯著，依「土壤及地下水污染整治法」中有關土壤污染管制標準訂定之分類，土壤污染物區分重金屬、有機化合物、農藥及其他有機化合物等四大類。依據歷年土壤重金屬含量調查顯示，台灣地區農田遭受銅、鋅、鉻、鎘、鉛、汞、砷、鎳等八種重金屬污染之威脅，使得表土中含量已達五級^[1]。

我國自 76 年開放加油站民營以來，依經濟部能源局「油價資訊管理與分析系統」資料顯示，截至 101 年度止汽車加油站數量共計有約 2,711 站，其中，依行政區區分以臺中市 334 站為最多，約占加油站總數之 12.3%，其次為臺南市 306 站（11.3%）及桃園縣 297 站（11%）。環保署累積至 101 年底加油站公告列管的場址共計 70 筆，各行政區歷年加油站列管情形，以臺南市列管比率較高，占加油站列管總比率之 17.1%；其次新北市（占加油站列管總比率之 15.7%）、高雄市（占加油站列管總比率之 12.9%）、桃園縣（占加油站列管總比率之 11.4%）。於 70 個列管公告污染場址中，土壤主要污染物以總石油碳氫化合物為主，所占的比率為 55.6%；其次以苯所占之比率 20.6% 為最高，故加油站土壤污染大多以汽、柴油污染較為嚴重。根據環保署針對 101 年列管之污染控制場址進行污染介質與污染物類型之分析，可得知單純為土壤污染之控制場址，其污染物類型主要為重金屬；而單純為地下水污染及土壤與地下水同時遭受污染之控制場址，其污染物類型則以有機物為主。

若單純為土壤污染之整治場址，其污染物類型為重金屬與有機物各一處，單純為地下水污染之整治場址，其污染物類型主要為有機物，而土壤與地下水同時遭受污染之控制場址，其污染物類型則以有機物為主，重金屬與複合式次之。另外，單純為土壤污染之限期改善場址，其污染物類型主要為重金屬、其次為有機物、複合式最少，而單純為地下水污染及土壤與地下水同時遭受

污染之限期改善場址，其污染物類型則以有機物為主。環保署統計資料顯示，土壤污染物種類比例方面，以重金屬（砷、鎘、鉻、銅、鉛、鋅、汞、鎳）污染場址數最多，占總比例之 86.97 %；其次是有機化合物，含苯、甲苯、乙苯、二甲苯及總石油碳氫化合物等有機化合物類，占總比例 12.46%；其他有機化合物（多氯聯苯、戴奧辛）則占總比例之 0.57%；土壤污染種類中，受重金屬污染最為嚴重，其中受銅金屬污染場址數最多，共有 168 處，其次是受鎳金屬污染 141 處，受鉻金屬污染 136 處，受鋅金屬污染 45 處。受有機化合物類污染中，受總石油碳氫化合物污染場址數最多，共有 41 處，其次是受苯污染共 7 處，受二甲苯污染共 5 處。含氯之其他有機化合物污染以多氯聯苯及戴奧辛污染為主，各有 1 處遭受污染。

目前常用的受油污染土壤之處理方法有^{[4][5][6][7][8]}：土壤淋洗（Soil Flushing）、氣提法（Stripping Method）、加熱處理法（Thermal Treatment）及現地固化/安定化法（In-Situ Solidification/Stabilization）及固化/安定化法（Solidification/Stabilization）、電動力分離法（Electrokinetic Separation）雙向萃取法（Dual Phase Extraction）以及生物復育等方法。

土壤淋洗法(Soil Flushing):把土壤掘出以水、溶劑和表面活性劑(surfactants)淋洗土壤，將土壤中的污染物洗出達到整治之目的。使用表面活性劑的原理在於任何化合物溶於水中或其水溶液時能減少表面張力，或能降低兩液體間或液體與固體間之表層張力者，此種物質採之其有三類：清潔劑、潤滑劑及乳化劑。

固化、穩定法（Solidification/Stabilization）：又可分為現地固化、穩定法及固化、穩定法。前者是將添加物如石灰與受污染土壤混合使其固化，污染物物理化學性固定於石灰土壤，此法污染物不會四處流竄，但亦不能有效分解。本方法對於金屬有效，但針對有機污染物的處理亦在發展與測試中。處理深度目前可達 20m 以上，但由於增量，長效性受質疑及充分混合的困難等因素，因此儘管本技術以商業化，但在地小人稠及礫石層分佈各處的台灣地區是否是用乃是未知數。

加溫處理法（Thermal Treatment）：其原理是熱水或熱蒸汽以注入井注入地下水中使污染物揮發至未飽和層土壤，在配合 SVE 系統將其抽出地面處理，整治費用受處理時間及處理速率之不同而差異極大。

氣提法（Stripping Method）：此法又稱為土壤通氣法、現地揮發法、加強揮

發法等，利用真空抽取（Vacuum extraction）井使產生氣流經土壤以增加揮發率，此法雖假設氣體會排至大氣層中，仍須把抽出的氣體以活性碳吸附熱焚法及其他來處理。

土壤蒸汽萃取法（Soil Vapor Extraction:SVE）污染土壤挖掘出後堆置於以設有抽/通氣管之地面處理區，利用抽氣井將土壤抽氣使產生真空，而隨壓力/濃度梯度而產生的氣體流動，使揮發性污染物從土壤中擴散並揮發成氣體並流至抽氣井，最後被抽出土壤處理。

電動力分離法（Electrokinetic Separation）：將電極通電插入土壤中，使帶正電的污染物往陰極移動，帶負電的污染物往陽極移動而分離不同類別之污染物。最後在利用沈澱法、抽水/抽氣法或離子交換法收集移除集中於電極附近的污染物。此技術所需費用不高，在一個先導性規模的實驗中，處理一立方米污染土壤大概在 50 美元左右。

雙向萃取法（Dual Phase Extraction）：以高壓真空抽取污染地下水，同時亦抽取 LNAPL（輕質非水相液 Light Non-Aqueous Phase Liquid）及土壤蒸汽至地面處理，因此此技術常與生物復育、空氣攪拌及生物通氣等技術一併使用。

生物復育^[3]包括地表生物反應槽（aboveground bioreactor）、堆肥法（composting）、土耕法（landfarming）及現地處理法（in situ treatment）。

地表生物反應槽：主要是處理液體（如工業廢水、抽取上來之污染地下水）、揮發性物質（如受污染地下環境所散發出之溶劑、工廠廢氣）或在泥漿中之固體物（如開鑿礦坑之土壤、廢棄污泥）。

堆肥法：屬於固態處理方式之一，以添加大量有降解能力之生物到受污染的物質中，通常維持好氧狀態持續幾個禮拜或數個月。堆肥進行期間需特別注意 C：N 比例的變化，且需經常地翻動堆肥，此為勞力密集的技術。

土耕法：在野外將受污染之土壤、底泥或沈積物攤開以類似耕作的方式加以犁田及施灑肥料進行整治，對受石油污染的土壤整治是較便宜且有效的方法（Sims et al., 1999）。雖然土耕法簡便，但因整治期間過長、污染範圍過大及有害污染物質種類等問題而失敗。許多具有毒性的物質並不適合土耕法，但對於可快速降解的污染物卻非常有效。

一般生物復育技術分為現地(in-situ)及離地(ex-situ)處理，現地生物復育是現今最受生物復育專家注重的方法。因為在現地復育期間不需要挖掘地下水位以上土壤，且對大範圍污染區域只需打氣、處理等重複操作步驟，因而可節省大量成本且在污染現場即可操作。現地復育是利用在地微生物族群新陳代謝能力來對污染物進行降解。現地生物復育有兩種方法。第一種是利用在地微生物族群代謝能力，其生物復育是靠環境因子修正完成，例如經過曝氣或添加營養鹽，克服在地微生物族群降解碳氫化合物速率之限制因子；第二種方式是以植種的方式添加外來微生物族群。

現地生物復育主要為微生物利用環境中之有機污染物以維持生長(生物分解)，一般現地生物復育技術有生物通氣法(Bioventing)、生物氣體注入法(Biosparging)、生物抽除法(Bioslurping)及植物復育法(Phytoremediation)等^[9] [10][11][12]。

土壤污染清除技術種類十分繁多，因此美國為提供正確技術評估資訊級提升污染場址復育技術，於1996年成立超級基金新技術評估計畫，其中約25%為生物整治技術^[3]，生物處理的優點在費用低、可進行現場整治並可與其他方法整合。以三種土壤污染清除技術處理方法為例來說：^[13]

土壤清除法：土壤清洗法為利用化學或物理方法將污染物油土壤中分離的技術，在化學方法方面為利用萃取液或具界面活性劑性質的物質，將污染物自土壤中移除；物理方法則是經由粒徑分離、重力分離、磨損洗滌等方式進行分離程序。

泥漿化生物復育法：泥漿化生物復育法是將受污染泥土挖出，置於反應槽中於控制環境條件下進行生物降解污染物之反應。它的優點在於生物生長環境變異性小，易於控制且在良好的傳輸環境下進行反應，可使得土壤污染的降解更為快速。

污染物預化學氧化法：預氧化處理乃是將一些生物難分解性或含氧有機物等不易為微生物所分解的物質，利用化劑將污染物減低毒性或使污染物氧化或較易微生物利用的物質。

石油碳氫化合物成分極微複雜，包括短鏈、長鏈之烷類、環烷類與芳香族化合物。原油(crude oil)主要由碳(83~87%)、氫(1~14%)所組成，其他尚有少量

的(0.1~0.2%)、氧(0.05~1.5%)、硫(0.05~8%)，以及金屬(0.03%)。大部分的石油產物是脂肪族的(aliphatic)碳氫化合物及芳香族的(aromatic)碳氫化合物，這些化合物含碳數目的範圍依物質的性質而從 C3~C40+，依照其分子結構區分組要成分可區分(1)石蠟烴(paraffins)(2)烯屬烴(olefins)(3)環烷烴(naphthenes)(4)芳香烴(aromatics)。

柴油是普遍用於所有類型運輸車輛的一個重要的石油燃料，其由不同複雜之化學物質組成，分為脂肪族的(aliphatic)碳氫化合物包括直鏈式的烷類，亦即正烷類(n-alkanes)，含支鏈式的烷類包括異烷類(iso-alkanes)或異戊二烯類(isoprenoids)，及環狀的(cyclic)脂肪族的碳氫化合物；而芳香族的(aromatic)碳氫化合物則包括如苯(benzene)，甲苯(toluene)，乙苯(ethylbenzene)，二甲苯(xylene)等俗稱為 BTEX 之單環芳香族化合物，及多環芳香族碳氫化合物(PAHs)以及它們的各種的含有烷基的同系物(homologues)，包括在其苯環上連接有脂肪族的(aliphatic)支鏈在內。

Urum 等人^[16]研究不同的界面活性劑沖洗污染土壤以去除土壤中原油，該研究使用的界面活性劑為 rhamnolipid, saponin and sodium dodecyl sulfate (SDS)的水溶液，評估不同的界面活性劑對原油的去除效率，並利用 GC / MS 分析以瞭解殘留在沖洗後的土壤樣品的烴的分佈比；研究結果顯示，SDS 可從土壤除去大部分原油，rhamnolipid 與 saponin 次之。然而，SDS 對脂肪族的去除優於芳香族烴，但 saponin 對兩者的去除則與 SDS 相反，Urum 等人的研究結果提供了利用界面活性劑沖洗污染土壤中原油的可行性與不同界面活性劑對污染物的選擇性。

Mathurasa 等人^[17]針對陰離子表面活性劑，二己基磺化鈉 (sodium dihexylsulfosuccinate，SDHS) 的加入對污染土壤中三丁基錫 (TBT) 的生物復育效果進行研究。研究利用好氧批式實驗測定吸附、脫附效果，並評估細菌降解三丁基錫化合物以及它的代謝產物，如二丁基錫 (dibutyltin, DBT) 和單丁基錫 (monobutyltin，MBT) 的效果。實驗結果顯示，高濃度的三丁基錫和 SDHS 對細菌會形成的協同毒性作用，但陰離子表面活性劑 SDHS 在 sub-CMCs 的條件下，微生物可利用 SDHS 為碳源 (如圖 3-1)，有利於對 TBT 污染場址的生物復育。

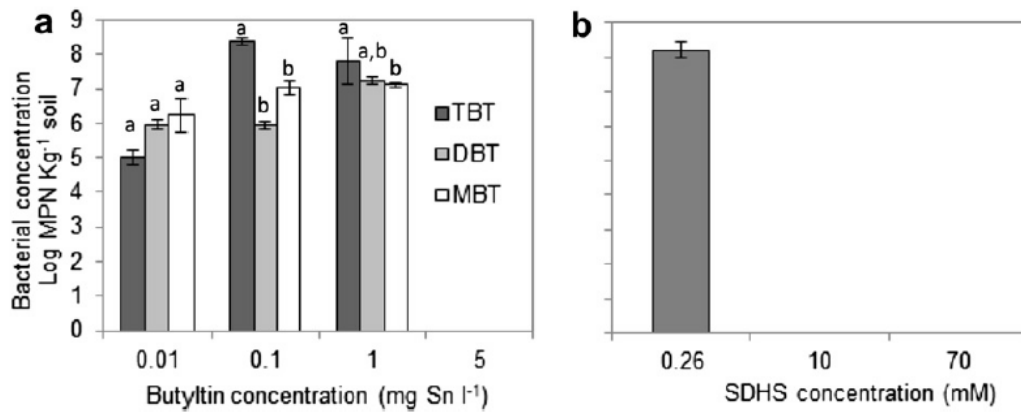


圖 3-1 土壤微生物利用 SDHS 為碳源之結果

Urum 等人^[18]利用空氣噴射輔助攪拌反應槽（如圖 3-2），配合兩種界面活性劑（rhamnolipid 及 sodium dodecyl sulfate, SDS）處理受原油污染土壤。研究根據不同的洗滌模式（即只有攪拌，空氣噴射），評估不同參數的影響（溫度，界面活性劑濃度，洗滌時間，體積/質量比，如圖 3-3）。研究結果顯示，SDS 能有效除去非風化土壤樣品 80% 以上的原油。

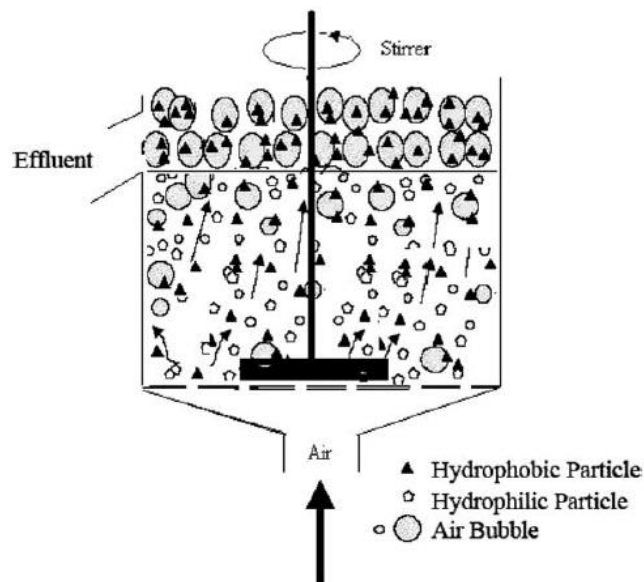


圖 3-2 空氣噴射輔助攪拌反應槽

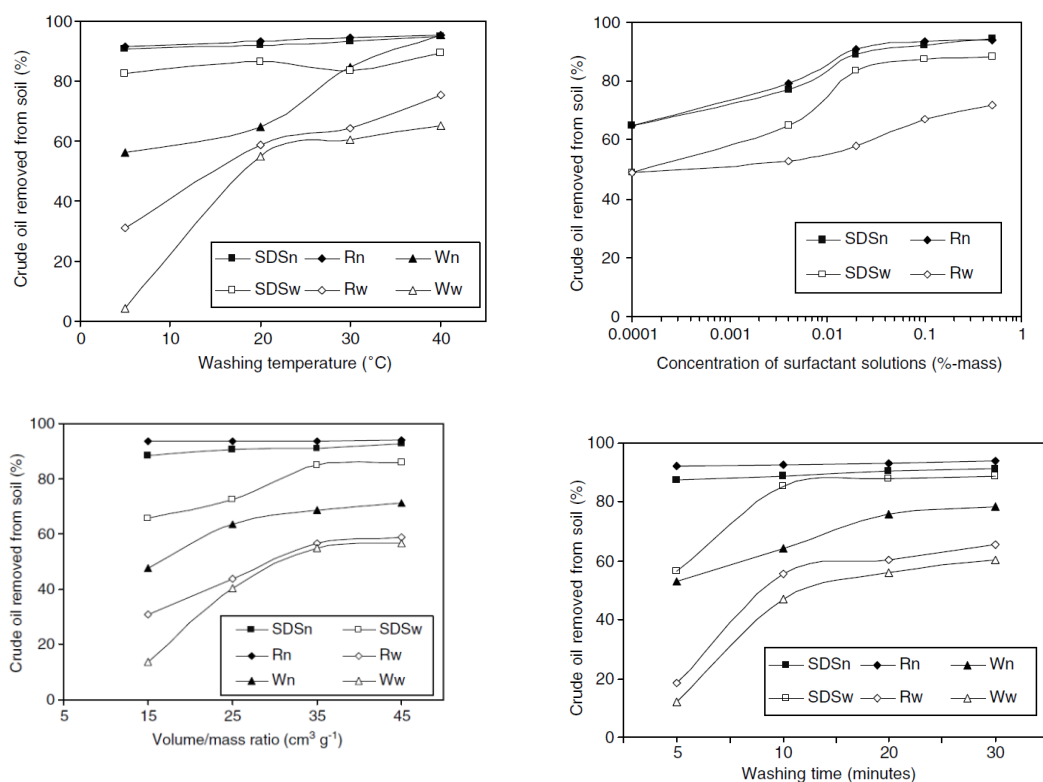


圖 3-3 溫度、濃度、洗滌時間、體積/質量比對洗滌效果的影響

Khalladi 等人^[19]利用界面活性劑十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate, SDS)處理柴油污染土壤,實驗以管柱式反應槽內填柴油污染土壤,利用 SDS 水溶液進行沖提,研究結果顯示 SDS 在濃度 8 mM 以上時對污染土壤中的柴油具有顯著的沖提效果,水本身在沖提作用中具有 24.7%的效果,用界面活性劑 SDS 溶液處理土壤中柴油(如圖 3-4),在 3.2mL/min 沖提速度下,可有 97%的柴油去除效果。

利用微生物降解法來進行土壤或地下水的石油污染整治工作在近年來獲得極大的重視,因為此種方法俱環境友善及環境永續功能與意義、且能有效處理大量污染場址的污染物。微生物降解碳氫化合物的過程非常複雜,若污染場址另含重金屬污染,將會增加生物復育的困難度與時程;換言之,篩選兼具有效降解土壤中石油碳氫化合物與耐受重金屬的高效菌種群,將有助於生物復育工法的發展與廣用性。

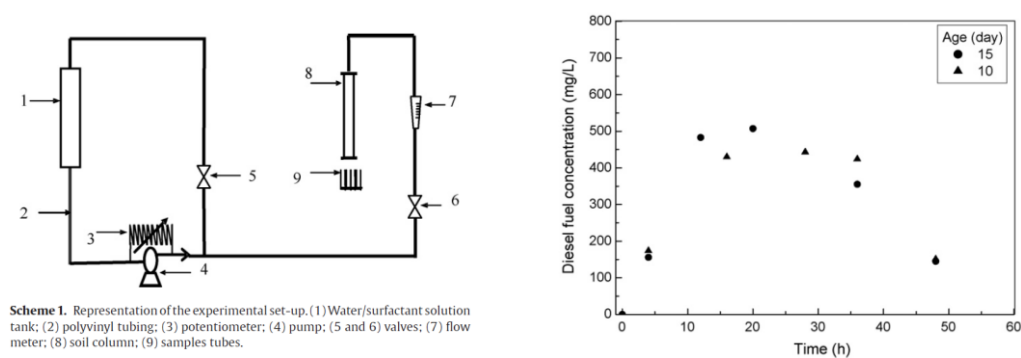


圖 3-4 活性劑 SDS 溶液處理土壤中柴油的效果

Gomes 等人^[20]利用 SBR 反應槽處理儲槽中的廢棄柴油，SBR 反應槽分四段操作，系統水力停留時間 72 小時，研究 pH 值，初始污染負荷，C：N 比和攪拌速度對系統效率之影響。研究結果顯示，在不同操作條件下，系統對柴油的去除可達 53.3，96.0，76.2 和 75.0%，微生物群體的研究顯示系統中俱微生物多樣性，此一現象有助於系統對柴油的去除。

McKenzie 等人^[21]利用兩個串連的 immobilized soil/sediment bioreactor (ISBRs) 處理含環烷酸(naphthenic acids，NAS)的油砂生產用水(OSPW)，該系統共操作達 16 個月，系統水力停留時間 160 小時，在以 OSPW 為唯一碳源條件下，系統對 NAS 的去除達 38%，16S rRNA 的研究結果顯示，生物膜中的微生物族群多達 235(第一槽)和 198(第二槽)種，且主要以 AOB(氨氧化菌)與 NOB(亞硝酸根氧化菌)為主要菌群。

Taccari 等人^[22]利用成熟的堆肥、生物界面活性劑 (β -cyclodextrin, β 環糊精) 結合一實驗室規模生物反應器處理柴油污染土壤，並利用 16S rDNA 進行菌種鑑定。實驗結果顯示，在最佳操作條件下，系統對總石油烴 (THP) 的去除率可達 96%。

界面活性劑在土壤和地下水污染的多環芳香烴 (PAHs) 的輔助整治潛力越來越受到重視。Lee 等人^[23]針對 12 種界面活性劑，研究土壤微生物對其之降解效果。研究結果顯示，降解 PAH 的土壤微生物部分使用的疏水性界面活性劑作為碳源 (初始劑量的 26.9-32.7%)，此一行為可讓臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC) 值增加了 61.9-88.0%，並使微胞溶解速率降低了 66.5-84.3%，此一現象說明了界面活性劑能夠促進土壤和地下水污染的多環芳香烴 (PAHs) 的部分原因。

沈氏利用土壤脲酶和脫氫酶^[14]，研究重金屬(Cd、Zn、Pb)和數種多環芳烴複合污染對土壤酶活性的影響。結果顯示，複合投加上述污染物能使土壤酶活性受到不同程度的抑制，脫氫酶最為敏感。對複合污染模型的建立與分析顯示，土壤環境中重金屬和多環芳烴複合污染的類型和強度與污染物的濃度和複合污染時間密切相關。影響土壤脲酶活性的主要因數依次為: Cd > Zn 與苯駢(a)芘的交互作用 > Zn > Pb > Zn 和菲的交互作用。影響土壤脫氫酶活性的主要因數依次為: Cd 和 Zn 的交互作用 > Cd > Zn > 苯駢(a)芘 > Cd 和菲的交互作用。其中，Zn 和苯並 a 芘相互作用對脲酶活性以及 Cd 和 Zn 交互作用對脫氫酶活性的影響均表現為拮抗作用。Zn 和菲，Cd 和菲之間的交互作用，無論是對脲酶還是脫氫酶均表現為協同作用。Benedek^[15]針對重金屬(Cd、Zn、Pb)和數種多環芳烴複合污染，利用 T-RFLP 方法鑒定出並分離出能同時去除重金屬和多環芳烴的細菌 *γ-Proteobacteria*。

相關耐鹽嗜油菌之研究不多但國外已有少數成果，如 Gurunathan 等人應用 *Escherichia fergusonii* KLU01 於重金屬與有機物複合污染之土壤，可為參考。*Escherichia fergusonii*(費格森埃希菌)為腸道桿菌之一種，應不難於本土環境中篩選純化分離。本研究另利用微生物富集反應器提高微生物濃度、增加微生物族群的歧異度並截留生長速率緩慢之菌群，除可處理界面活性劑沖排液外，亦是有效微生物之培養槽，且可為未來模廠與實場整治之混生菌種來源，強化生物復育。本研究之特點為：

- (一) 篩選兼具有效降解土壤中石油碳氫化合物與耐受重金屬的雙效菌種群。
- (二) 針對生質柴油槽之油泥，進行嗜油菌之純化及鑑定評估。
- (三) 建立實驗室級微生物富集反應器系統，評估其整治複合污染(有機物與重金屬)之潛力。

油品污染可能因高濃度而導致生物毒性，且隨著土壤之複雜，將使得實地生物復育之執行困難度升高，故後續研發將著重於耐鹽嗜油菌之最佳菌相生態組合及其於不同受污染土壤之降解效能評估，以及最後利用小型試驗場的微生物富集技術強化污染土壤之生物復育運作。本計畫的執行，將能瞭解的此等雙效微生物在土壤中降解碳氫化合物與耐受重金屬的行為、環境影響因子等，期能為污染土壤復育工作提供一替代方案，對污染土壤復育工作發揮實效性的助益。

四、 研究方法與過程

本計畫收集可能受到油類洩漏污染或污染場址之油泥作為分離菌種之來源，以篩選具有分解油品能力的細菌，在期中報告前進行嗜油菌的篩選與純化工作，主要工作為選擇一項 TPHD(甲苯, toluene)與 TPHG(柴油, diesel)污染物進行研究評估。

(一)採樣地點選擇

油品中富含多種多環芳香族碳氫化合物，故採樣點選定為可能受到油類洩漏污染之排水溝，周邊鄰近加油站以及化工廠之工業區。加油站之採樣點需要縝密篩選，挑選出年份久遠且附有洗車設備之加油站，原因為常有加油站因年久失修或疏於維護，地下儲油槽過於老舊而導致儲油槽體破裂、相關的連接管線洩漏、油灌車卸油時油品濺灑溢出等，或長時間清洗柴油車和汽車所排出帶有油污之廢水，皆可能隨著水流排至水溝內，進而污染鄰近河川與農田。本實驗為求菌株種類、數量及來源等豐富性，其菌種分離源近至台南仁德、遠到高雄鳳山進行採樣作業，一共採集 15 處，其中 10 處為加油站排水溝、剩餘 5 處為化工廠及工業區排水溝。

(1) 加油站採樣點：台南地區 - 仁德、金華、一心、小北、新力、福仁。

高雄地區 - 湖內、湖中、泓成、仁武。

(2) 化工廠及工業區採樣點：保安工業區外圍、三爺溪支流、二仁溪支流、

灣裡大排、茄萣大排。

(二)採樣地點概述

採樣點眾多，本研究僅將循畫出降解菌株之地點進行描述，各採樣點之油泥依代碼編設以利管理，其代碼與座標位置詳如表 4-1 (以下各採樣點表示方式皆以代碼為主)，於採樣時記錄各採樣點周邊狀況及採樣情形，方便分析及追蹤後續情況。

表 4-1 油泥收集區之代碼與座標編列表

區域別	代碼	座標
-----	----	----

左營油料儲槽 1	1	
左營油料儲槽 2	2	
	3	
泓成	4	22°59'10.12" 北 120°40'31.83" 東
仁武	5	22°69'70.04" 北 120°34'81.01" 東
湖內	6	22°54'44.90" 北 120°13'35.32" 東
三爺溪支流	7	22°92'76.66" 北 120°23'67.35" 東
金華	8	22°57'41.71" 北 120°11'20.45" 東
新力	9	22°92'23.92" 北 120°22'37.19" 東
湖中	10	22°90'61.57" 北 120°20'77.99" 東
小北	11	23°00'12.97" 北 120°12'15.93" 東
仁德	12	22°58'29.36" 北 120°14'38.14" 東

各採樣點離採樣日期前一個月皆無豪大雨情況或淹水情形，各加油站採樣點皆有大卡車、大貨車之柴油車或自小客車等車輛於站內進行洗車行為，但頻繁度不一，清洗過程中的污水順著坡道或管渠流入排水溝。採樣中除了點小北、新力與湖中加油站有污泥稀少的情況外，其餘加油站排水溝的底泥皆有約 5 公分之厚度，污泥量充足。採樣時，仁德、金華、新力、泓成、仁武加油站有車輛正在進行清洗動作，各站排水溝中的污水水面皆有些許油污光澤，其中金華、湖內和仁武的底層污泥在攪動時產生更多油污光澤，且底泥色澤為褐黑色，些微油臭味，其中幾站還帶有一點清潔劑的味道。三爺溪支流受化工廠、養豬場、家禽畜牧場及漁業養殖場環繞，排水溝飄散非常濃烈的臭味，渠中漂浮 2 隻死魚，推測是養殖場排出的魚類屍體，整條支流呈現厭氧狀態，水面除了漂浮大片油污光澤外，也充斥著大量黑色帶狀懸浮固體。

(三)耐鹽嗜油菌之馴養與分離

為篩選各分離源污泥中的降解菌株，需以目標污染物做為碳源，經過一段時間的污泥馴養後，進行稀釋塗抹及劃碟之方式純化單一菌落，再予以冰凍保存。

(1)種源馴養

依文獻之營養鹽配方配製 BHB(Bushnell Hass Broth)無機鹽培養基(如表 4-2 所示)，於三角錐瓶中，使用已校正過之 pH meter 測出無機鹽培養基的酸鹼值，而後添加數滴 1 M 氫氧化鈉溶液，用以調整培養基之酸鹼值至中性(約 pH6.9~7.1 之間)。栓上矽膠塞並套上鋁箔紙，以橡皮筋固定後置入滅菌籃，經由高溫高壓滅菌釜於 121°C、壓力 1.1 atm 條件下滅菌 20 分鐘。滅菌處理過後，待其降溫，後續所有動作皆移至無菌操作台進行，加入 TPHD(甲苯, toluene)或 TPHG(柴油, diesel)作為培養基之主要碳源，使三角錐瓶中含有 1% 石油碳氫化合物。再次均勻搖晃以混合三角錐瓶內溶液，各別植入 1 g 之污泥，搖晃攪拌後即進行馴養動作，置於 28°C、150 rpm 之恆溫培養箱培養。

表 4-2 Bushnell-Haas 培養基組成(ATC medium 1287)

藥品名稱	劑量	藥品名稱	劑量
------	----	------	----

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20g	KH ₂ PO ₄	1.0g
CaCl ₂	0.02g	FeCl ₂ soln(15g/25ml M.Q.water)	2drop
NH ₄ NO ₃	1.0g	K ₂ HPO ₄	1.0g
		*Trace element	5.0mL

加 M.Q. water 至 1000mL，使用 dilute NaOH 調整 pH 至 6.9-7.0，並高溫高壓滅菌 121°C 20 分鐘。

*Trace element : MgCl₂ · 6H₂O 54.23g ; CaCO₃ 2.0g ; ZnSO₄ · 7H₂O 1.44g ; MnSO₄ · H₂O 0.68g ; CuSO₄ · 5H₂O 0.25g ; CoSO₄ · 7H₂O 0.28g ; FeSO₄ · 7H₂O 4.5g ; H₃BO₃ 0.06g ; HCl (25% ; 7.7M) 10.00 mL 加 Milli-Q water 至 1000 mL。

(2) 菌種之純化與分離

為使馴養之各菌株易於挑選，故需配製含 1% 石油碳氫化合物之平 BHB 無機鹽平板培養基(1.5% agar)予以劃線分離篩選。為了後續菌株之保存，另配製 NB(Nutrient Broth)斜面培養基(8 g/L)。

從恆溫培養箱取出馴養中的三角錐瓶，於無菌操作台中，將馴養菌液以無菌水稀釋至適當倍數後，以塗抹法塗抹於製備好的含 1% 石油碳氫化合物之平板培養基上。於 28°C 培養箱中，每天進行觀察，若有菌落逐漸生成，挑選單一完整菌落，再以劃碟方式於新的 1% 石油碳氫化合物固體培養基上予以確認，判斷生長出來之菌落若為單一菌株，即可進行純菌保存步驟。將接種環沾取單一菌落，劃於 NB 斜面培養基生長，置入 28°C 恆溫培養箱進行培養，待菌株生長後，移至 4°C 冰箱內予以保存，做為進行後續研究之儲備菌株。後續欲進行菌種測試前，須先以 Phosphate-Buffered Saline 培養基(表 4-3)進行菌種活化

表 4-3 Phosphate-Buffered Saline 培養基組成

藥品名稱	劑量	藥品名稱	劑量
Na ₂ HPO ₄	1.44g	NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	0.24g	KCl	0.2g

加 M.Q. water 至 1000mL，調整 pH 至 7.4 並高溫高壓滅菌 121°C 20 分鐘。

(四)耐鹽嗜油菌之鑑定

將分離菌株之培養菌液進行菌種鑑定工作。菌種鑑定之流程分為菌種 DNA 萃取、聚合酶連鎖反應之 16S rDNA 基因放大，最後再至 NCBI 網站比對此序列以鑑定菌種。

(1)菌種 DNA 萃取

本研究利用快速萃取 DNA 之試劑組，為 Geneaid 公司(Taiwan)產品 Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)。將菌株培養於 28°C、150 rpm 下，當 OD₆₀₀ 達到 1 之菌液，離心收集其細胞，其 DNA 萃取步驟如下：

- A. 取 3mL 培養菌液，搖勻並分別倒入 2 mL 微量離心管，13,000 rpm 離心 1 分鐘後棄置上澄液。
- B. 離心後且倒完上澄液的微量離心管，添加 200 μ L GT Buffer，可以搖動或震盪的方式與底層的濃縮菌體混合完整，而後於常溫靜置 5 分鐘。
- C. 添加 200 μ L GB Buffer 於微量離心管中，輕搖 5 秒將其混合均勻。
- D. 放置於 70°C 水浴鍋 10 分鐘，每 3 分鐘取出輕搖 5 秒，此時一併將 Elution Buffer 置於水浴鍋預熱備用。
- E. 添加 200 μ L 無水酒精至已溶解之細胞樣品中，翻轉混合 10 秒後，將混合液倒入裝有濾管之微量離心管中，13,000 rpm 離心 2 分鐘。
- F. 離心後將濾管下層之微量離心管(包含菌液)丟棄，裝上新的離心管。
- G. 加入 400 μ L W1 Buffer 至濾管中離心 13,000 rpm，1 分鐘，取出並倒掉濾液，添加 600 μ L Wash Buffer 再次離心 1 分鐘。
- H. 倒掉濾液後，以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，並將濾管下層丟棄，裝上新的微量離心管。
- I. 添加 50 μ L 置於 70°C 水浴鍋的 Elution Buffer，靜置半小時之後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘並丟棄濾管，下層的微量離心管即有該菌株之 DNA，將

其冰存於-20℃冷凍備用。

(2)聚合酶連鎖反應及電泳分析

聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction，縮寫為 PCR)為使 DNA 迅速大量複製之技術，於 PCR 進行中的 DNA，反應過程主要分為三步驟：

- A. 雙股 DNA 變性(denaturation)
- B. 引子黏合(annealing of primers)
- C. 引子展延(extension of primers)

此三個步驟為一循環(cycle)，引子在 DNA 被變性後與其相對線混種定向，使聚合酶引發 DNA 合成在兩個引子間且繼續的延伸下去，經由此反應而製造出二個雙股(double-stranded)，此雙股可再次變性、混種與延伸，又於此階段後製造出二個雙線分子，在雙線之型態中精確的組成新的片段系統。在不斷重複的熱變性、引子混種與延伸下，目標之 DNA 以等比級數增加至 2^n 倍之數量，成為更多的雙股 DNA。

當樣品的 DNA 萃取出來，為使後續定序試驗更加完整，需確保其片段之大小與品質優劣，此時利用膠體電泳(agarose gel electrophoresis)加以觀察，依照所使用的膠體之密度而將 DNA 之分子分離。以瓊脂膠(agarose)做為電泳分析時所需的膠體材料，為顧及各 DNA 樣品於膠片中表示出的亮度清晰及完整，而將配製之膠體劃分為 0.7%、1.2%與 1.5%三種不同濃度。

(3)16S rDNA 引子設計

針對分離菌株 16S rDNA 保守區域加以設計。16S rDNA 保守性區域引子之選擇，參考 Lane⁽¹⁴¹⁾學者所設計之引子對：27f 與 1492r。核苷酸位置分別為 5~27 及 1492~1513，約可選取出 1465 bp 的 DNA 片段，引子序列如表 4-4 所示：

表4-4 16S rDNA 引子序列

Target gene	Primer set	Sequence
16S rDNA	27 f	5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'

1492 r 5' - TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3'

(4)聚合酶連鎖反應之操作條件

本研究之 16S rDNA 保守性區域引子的藥劑添加量及操作條件如表 4-5 和表 4-6 所示，所添加之藥劑組為波仕特生物科技公司(Protech Technology)產品，分別為 Taq 聚合酶(Pro Taq Polymerase)、10X Buffer、三磷酸去氧核苷酸(dNTP)、引子(primer)及無菌去離子水(sterile distilled water)等。當 PCR 結束後，再以 1.2%瓊脂膠片進行電泳分析，於影像分析系統檢視片段亮度後，決定是否進行後續定序分析。

表 4-5 PCR 反應條件試劑添加量

Components	Volume (μL)
Each primer (10 μM)	2
10X Buffer (MgCl ₂ ,15 mM)	5
dNTP (2.5 mM)	4
Pro Taq Polymerase (5 U/μL)	1
Template DNA	2
Distilled H ₂ O	36
Autocleave	50

本研究不斷測試最佳 PCR 條件，直到該反應由後續電泳分析測得之螢光亮度足夠且完整為止。操作條件如表 3-6，設定 95°C 加熱 10 分鐘，95°C，1 分鐘解離(denature)，56°C，1 分鐘黏合(annealing)，然後以 72°C，1 分鐘延伸(elongation)，共計 35 cycle 增幅產物，而後置於 72°C，10 分鐘以完成整個反應。每一反應樣品之總體積為 50 μL，包括抽取的 Sample DNA，最後以 1.2%瓊脂膠片進行產物電泳分析。

表 4-6 試驗菌株於 16S rDNA 之 PCR 操作條件

	Temperature (°C)	Retention time (mins)	Cycles
Hot Start	95	10	35
Denaturation	95	1	
Annealing	56	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	10	1

(5)產物純化

為了避免後續定序分析結果受到干擾物質之影響，利用 Geneaid 公司的 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 進行 PCR 產物之純化，其操作步驟如下：

- 取 100 μ L PCR 產物於微量離心管中，添加該產物五倍體積之 DF Buffer 並均勻混合，置於 55°C 水浴鍋加熱 15 分鐘。
- 將已混合之 PCR 產物倒入裝有濾管之微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 30 秒，將濾液丟棄。
- 添加 500 μ L Wash Buffer 至濾管中，以 13,000 rpm 離心 30 秒後，將濾液丟棄，再次以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，以確實使濾液完全分離。
- 將濾管移至新的微量離心管，添加 50 μ L 無菌去離子水，靜置 40 分鐘至 1 小時。
- 以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，將濾管丟棄，下層微量離心管即有純化之 DNA，將其以 -20°C 冰存。

(6)瓊脂膠片製作方式

秤取瓊脂(agarose) 1.2 g 並加入 100 mL 的 1X TBE 電泳緩衝溶液中，加熱溶解瓊脂成為液態狀。待其完全溶解後，將膠液均勻倒入製膠模具中，平穩插上造孔板(comb)，等待冷卻凝固後取出膠片，置於 1X TBE 電泳緩衝溶

液並移至冰箱保存。

(7)電泳分析試驗

- A. 將膠片置於水平式電泳槽，倒入 1X TBE 緩衝溶液，將DNA和 loading buffer 以1：4 (V/V)之比例均勻混合並注入膠片孔洞，再注入標記用之 RTU-100 於孔洞中。
- B. 蓋上電泳槽上蓋，接上正、負極電極線，以 100 V 電壓、100 mA 電流進行分析，待膠體中的分子移動至適當位置後，關閉電壓。
- C. 將膠片取出，置於 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide (EtBr, 溴化乙菲錠)約 30 分鐘，利用 XPLOER gel documentation systems (XPLOER D55-26M, Cat#1841-4101-1)影像系統觀察DNA亮帶顯現情形。

(8)DNA之定序

本研究之 DNA 定序作業，預定將 PCR 產物送至「國立成功大學醫學院分子醫學研究中心-自動核酸定序中心實驗室」，利用核酸自動序列定序儀代為定序，待取得定序結果，使用 DNA Star 之 SeqMan 軟體加以檢視序列。進入 NCBI (National Center for Biotechnology Information)網站，將修整完成之 DNA 序列利用 Nucleotide Blast 查詢並與已發表之序列進行比對，以確定該序列之相似菌種及相似度之高低。

(9)親緣樹狀圖及遺傳距離分析

將經由定序所得到之 DNA 序列以 Nucleotide Blast 和 GenBank 中，已發表之序列進行比對分析。並把相似之序列片段由 GenBank 中下載，再將定序後之 DNA 序列，利用 BioEdit 之 Cluster W Multiple alignment 軟體整理樣品序列，經 MEGA 4 軟體計算序列間的遺傳距離，利用聚類分析法 (Neighbor-joining, NJ)得到親緣樹狀圖，重複分析計算其可信度。

(五)分離菌株對石油碳氫化合物之降解與乳化能力

本研究使用氣相層析儀分析石油碳氫化合物之降解情形，以了解菌株對污染物之降解能力。將單一純化菌株以接種環植入 NB 培養基中，放置於恆溫震盪培養箱(28°C，150 rpm)，當測得 OD₆₀₀ 達 1 左右，取菌液 0.1 mL 植入內

含 1% 污染物之無機鹽培養基，並配製一未接種之空白對照組，定期採樣。

(1) 採樣方法

配置 Bushnell-Haas 培養基 1000mL，準備 500mL 的血清瓶，每罐血清瓶各 100mL Bushnell-Haas 培養基，使用高溫高壓滅菌府滅菌（121℃、20min），將培養 28℃、150 rpm 下振盪培養之菌液各吸 1mL，並分別將已過濾的甲苯/柴油 0.1、1 mL 加至已滅菌過的培養基，將血清瓶上蓋換上泡製在 75% 乙醇的中孔螺蓋和 PTFE 墊片，將中孔螺蓋鎖緊並在瓶蓋與瓶身密合處使用 PARAFILM 封起，採樣時間為每 12 小時 1 次。

以 GC/FID 分析污染物殘餘量。定期於無菌操作台取出菌液，利用正己烷進行污染物萃取，取 2μL 萃取液注入 GC 分析，另配製標準濃度甲苯/柴油做為檢量線，以計算樣品之殘餘濃度。甲苯與柴油之分析條件分述如下：

甲苯之 GC-FID 分析條件：分析甲苯使用的氣相層析儀為 CHINA CHROMATOGRAPHY CO., LTD.公司製，型號為 GC-2000，搭配火焰離子偵測器，層析管柱為思必可，型號 SE-30 毛細管柱，長 6ft，內徑為 2.0mm，使用的積分儀(Integrator)為 QChrom 數據處理系統。攜帶氣體為高純度氬氣，流速為 0.2 bar、氬氣 0.5 bar、空氣 1.5 bar、注射口溫度為 220 °C，偵測器溫度 240 °C。

柴油之 GC-FID 分析條件：分析柴油使用的氣相層析儀為 CHINA CHROMATOGRAPHY CO., LTD.公司製，型號為 GC-2000，搭配火焰離子偵測器，層析管柱為思必可，型號 SE-30 毛細管柱，長 6ft，內徑為 2.0mm，使用的積分儀(Integrator)為 QChrom 數據處理系統。攜帶氣體為高純度氬氣，流速為 0.2 bar、氬氣 0.5 bar、空氣 1.5 bar、注射口溫度為 250 °C，偵測器溫度 300 °C，升溫程式以 70 °C 為起始溫度 15 分鐘，70 到 270 °C 每分鐘升溫 13.3 °C。

以 GC/FID 分析污染物殘餘量。定期於無菌操作台取出菌液，利用正己烷進行污染物萃取，取 2μL 萃取液注入 GC 分析，另配製標準濃度柴油做為檢量線(相關係數 R 值需大於 0.995，方能使用)，以計算樣品之殘餘濃度。

(2) 乳化能力試驗

將於 28℃、150 rpm 振盪培養之菌液加入已滅菌過的離心管，以 9800 rpm、

25°C 下離心分離 20 min，取其上澄液 4mL，正十二烷(n-Dodecane) 6mL（比例為 2:3）分別加入已滅菌過的小試管中，Vortex 之最大轉速振盪 2 分鐘，靜置 24 小時後測定其乳化指數 E_{24} 。

$$E_{24} = \frac{\text{乳化層高度}}{\text{液相層總高度}} \times 100$$

(六)代謝降解與重金屬耐受性研究

本研究通常只給予菌株單一碳源，以目標污染物做為主要養份需求，但考慮到石油碳氫化合物之結構穩定，且除了無機鹽能提供菌類生長之營養外，無其餘能增加菌株數量或更容易被攝取之養份來源。因此提供自然界中易於取得且最快受生物所吸收利用之葡萄糖(glucose)，令微生物生長及代謝速度提升之外加碳源，藉著葡萄糖、蔗糖、甘露糖等碳源之添加，並配製一未接種之空白對照組；氮源則擬分別添加硫酸銨及硝酸鈉等於液體培養基，並以不加氮素為對照組，於 28°C 孵育，120 rpm 之速度下振盪培養，定期採樣並分析油品之殘餘量。藉以外加碳或氮源進行共代謝試驗，期望能提升菌株降解污染物之效益。

將純化之菌株以接種環沾取，植入 NB 培養基並予以培養(28°C，150 rpm)，測得 OD_{600} 約為 1 時，取 0.1 mL 菌液 添加於含有 1% 石油碳氫化合物及外加營養之無機鹽培養基三角錐瓶中，並配製一未接種之空白對照組，一併置於恆溫震盪培養箱。定期採樣並分析污染物殘餘量，依數據判斷額外添加營養源能否供菌株加速分解污染物。

菌種對重金屬之耐受性試驗，乃以接種環分別取試驗菌株，以 1mL 無菌稀釋水混合，並震盪使菌株充分混合均勻。取 0.1mL 懸浮菌液塗抹於 NA 培養基上當作空白，另取 0.1mL 懸浮菌液分別塗抹於含 100, 250 與 500 ppm Cu/Zn 的含甲苯/柴油之 BHB(Bushnell Hass Broth)無機鹽培養基培養基上。

菌種吸附重金屬型態分析，乃將菌種培養於含 100 ppm Cu/Zn 的甲苯/柴油之 BHB(Bushnell Hass Broth)無機鹽液體培養基。取培養 3 天之懸浮菌液，使用 Lombardi and Garcia (2002)化學連續萃取(Sequential chemical extraction SCE)法，依微生物細胞內外，依不同型式重金屬所形成之化學型態，利用各種化學試劑依序將其溶解，依其所產生之移動特性變化，使不同型式重金屬逐一

分離，分別以超純水(water soluble)、1M KNO_3 (exchangeable)、0.5M KF (adsorbed)、0.1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (organically bound)、0.1M EDTA (carbonate)與 6M HNO_3 (residue)依次萃取，每次萃取添加等量試劑，於 30°C 、150rpm 震盪萃取 24 小時，再於 3500rpm、離心 30 min，取上層液以感應耦合電漿光譜儀 (Inductively Coupled Plasma, 簡稱 ICP)分析 Cu/Zn 濃度。

(七) 模擬土壤復育試驗

本研究挑選能力較好之菌株進行試驗，主要模擬試驗菌株於三種不同特性的土壤中，降解污染物之變化過程，以獲得模擬現地復育之基本推估結果。

(1) 土壤性質分析

欲進行土壤復育試驗之使用土壤，先予以分析其物理性質，測定項目有土壤中含水量、土壤酸鹼值及有機質測定之比色法。實驗操作的方法參考土壤分析手冊：土壤質地分析之比重計法(hydrometer method)、土壤中酸鹼值測定方法、有機質測定之比色法與土壤電導度等。其分析之方法如下：

A. 土壤質地分析之比重計法

首先去除膠結物質(有機物、鐵鋁氧化物、鹽類)，以分散劑將土壤粒子拆散，將分散之土壤懸浮粒子加入 1000 mL 沈降筒內自然沈降，於一定時間內，將比重計放入懸浮液測定比重，由其讀數(g L^{-1})可求得土壤樣品中之砂粒、粉粒及粘粒之含量百分比，進而可決定土壤質地之名稱。

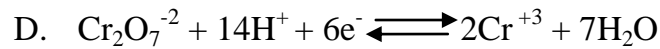
B. 土壤酸鹼值

本實驗採取 pH meter 測定法量測土壤之 pH 值，因簡單易操作且精準度高，其量測步驟如下：

- i. 秤取風乾之土樣 5 g。
- ii. 以土壤和水之比例 1：10 加入去離子水 50 ml，攪拌 10 分鐘，將土樣與去離子水均勻混合。
- iii. 靜置 30 分鐘，再以 pH meter (Suntex, SP-2200)量測其 H^+ 濃度。

C. 有機質測定之比色法

有機質測定比色法其原理為利用重鉻酸鉀與濃硫酸來氧化土壤中的有機物，其主要化學反應為：



反應後生成的濃度與土壤中被氧化之有機物含量成正比，測定反應後溶液中之濃度，即可得之土壤樣本中有機物的含量。有機質測定步驟如下：

- i. 秤取 0.5 g 土壤(已經過 0.5 mm 之篩網篩濾)於 500 mL 三角瓶。
- ii. 添加 10 mL 1 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 輕輕轉動三角瓶，使土壤分散於溶液中，迅速加入 20 mL H_2SO_4 ，立即輕輕轉動三角瓶使土壤與溶液混勻，然後較劇烈的搖動，全部約 1 分鐘，放置於石棉網上約 30 分鐘。
- iii. 添加蒸餾水 200 mL，如果混濁不易判斷滴定終點時，可以過濾。
- iv. 添加 3~4 滴 *O*-phenanthroline 指示劑，然後用 0.5 N FeSO_4 滴定，接近終點時先由淺綠變至深綠，此時一滴一滴滴下，直到突然間由藍色變為紅色或茶色為止。
- v. 用同一步驟滴定一個空白樣品(不加土壤)。

其公式如下：

$$\text{有機質(\%)} = 10(1 - S/B) \times 1.376$$

S = 土壤樣品所消耗 0.5 N $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之公升

B = 空白所消耗 0.5 N $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之公升

D. 土壤溶液之電導度

土壤溶液的電導度隨溶液中可溶性鹽類之含量而增加，而土壤中被抽出鹽分之多寡與組成成分也因土壤與水之比例不同而異，以 0.01 N KCl 溶液做為電導度標準液，以土水比 1 : 10 的土壤溶液測定溶液之電導度。

E. 有效性鐵

- i. 土壤中金屬離子之生物有效性萃取方法如下：
- ii. 抽取液(ammonium acetate-acetic acid-ethylene diaminetetraacetic acid)之配製：溶解 74.4 g 的 Na_2EDTA 於 57.1 mL 100% CH_3COOH 及 37.3 mL 25% NH_4OH 中，以 H_2O 稀釋至 1 L，再以 CH_3COOH 或 NH_4OH 調整其 pH 值至 4.56。
- iii. 取 3 g 土壤樣品置於離心管中，加入 30 mL 的抽取液，以 25°C 震盪

1 小時後，使用 0.2 μm 醋酸纖維濾膜過濾並利用 ICP-AES 測定鐵元素。

(2) 模擬石油污染土壤之生物復育

經土壤性質分析後的三種土壤：砂頁岩沖積土(粉質土)、紅壤(粘質土)及粘板岩沖積土(粘質土)，個別平鋪且不時的翻動使其自然風乾，於風乾後將其磨碎並以孔徑小於 2 mm 之篩網篩濾。為防止土壤中存在他種微生物干擾本實驗進行過程，將三種篩後土壤以高溫高壓滅菌釜進行滅菌，取出待其冷卻後，倒入大燒杯中並加入甲苯或柴油，使其中含有 1% 之污染物。加入 3 mL OD_{600} 值約為 1 的降解菌菌液個別倒入離心管中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後取出並倒掉上澄液，加入生理食鹽水將菌體充分混合，倒入各配製好之樣品血清瓶中。為減少溫度不均之變化，故將其移置 28°C 恆溫培養箱，採樣時固定秤取 1 g 土壤，採用環檢所公告「超音波萃取法」(NIEA M167.00C) 進行萃取，再取適量利用 GC/FID 分析樣品之污染物殘餘量。

(3) 石油碳氫化合物之分析 GC/FID

廠牌：CHINA CHROMATOGRAPHY

管柱：C16:0 Methyl, 2.5m

Temperature：Injector：280°C；Detector：250°C；Oven：初溫 120°C 維持 1min，再以 10°C/min 升溫至 230°C，維持 10 min。

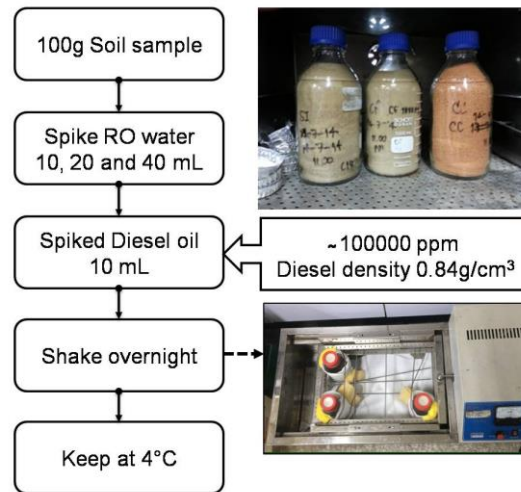
Carrier gas：N₂ (10mL/min)

H₂ flow：40mL/min

Air flow：300mL/min

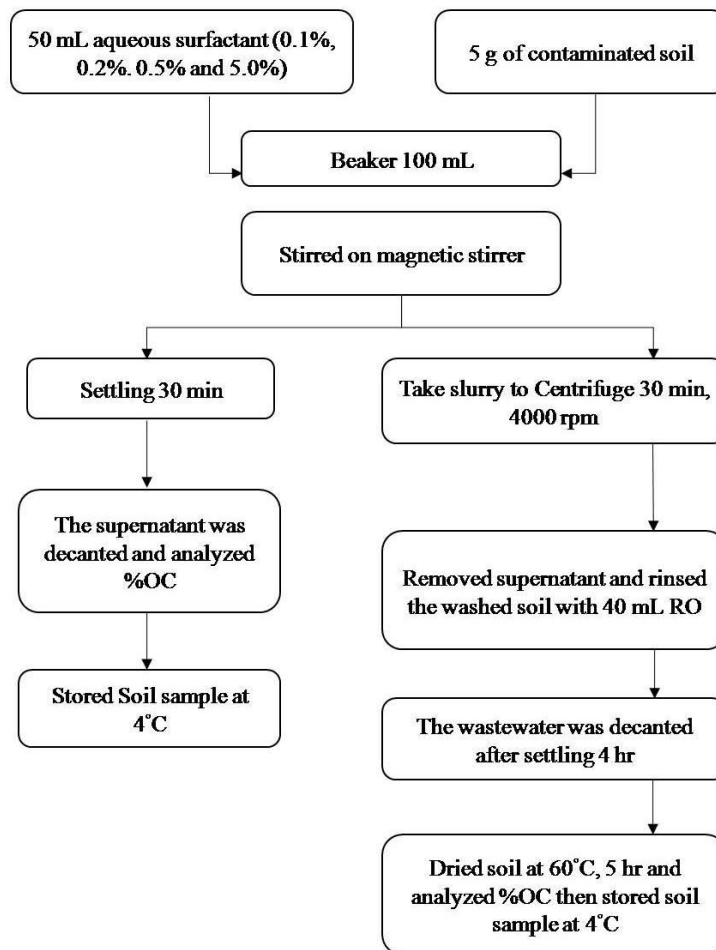
(4) 模擬柴油污染土壤製備

本研究利用市售 95 柴油，針對砂頁岩沖積土、紅壤、粘板岩沖積土等三種土壤製備柴油污染土壤，步驟如下。原始土壤與模擬柴油污染土壤均測定有機質含量，以為後續處理效率計算之依據。



(5) 界面活性劑洗提模擬柴油污染土壤

本研究先利用批式實驗方式，評估界面活性劑（Ethylene Glycol mono-Butyl Ether）對模擬柴油污染土壤之洗提效果，經界面活性劑洗提後之混合液將為後續生物處理之進流水。界面活性劑洗提模擬柴油污染土壤之步驟如下：



(6) 微生物富集反應器(MBR)

根據有關學者過去的研究成果顯示，界面活性劑沖排可某程度地同時移除 LNAPL 與 DNAPL，惟沖排液後續仍須有效處理。微生物富集反應器可有效提高微生物濃度、增加微生物族群的歧異度並截留生長速率緩慢之菌群，除可處理界面活性劑沖排液外，亦是有效微生物之培養槽，且可為未來模廠與實場整治之混生菌種來源。

本研究建構實驗室微生物富集反應器系統(如圖 4-1 與圖 4-2)，用以處理模擬柴油污染土壤經界面活性劑洗提後之混合液。微生物富集反應器系統主體為一 600mL 之薄膜生物反應槽，薄膜流通量(flux)設定操作為 $10 \text{ L/m}^2\cdot\text{day}$ ，每天流量為 4 公升，抽停操作設定 50 min/10 min，薄膜為一 PVDF 材質之中空纖維有機膜，中空纖維膜特性如表 4-7 所示。

系統先以人工合成廢液（組成如表 4-8 所示）進流，並植入活性污泥進行馴養，俟系統去除效果與污泥濃度達穩定後，於第 60 天開始進流柴油-界面活性劑洗提液，最初以體積比 1%（柴油-界面活性劑洗提液 / 人工合成廢液）進流，之後逐步提高柴油-界面活性劑洗提液比例，實驗於第 87 天在反應槽中投入本研究分離純化的 3 種本土菌株，評估微生物富集反應器系統處理柴油-界面活性劑洗提液之效能。

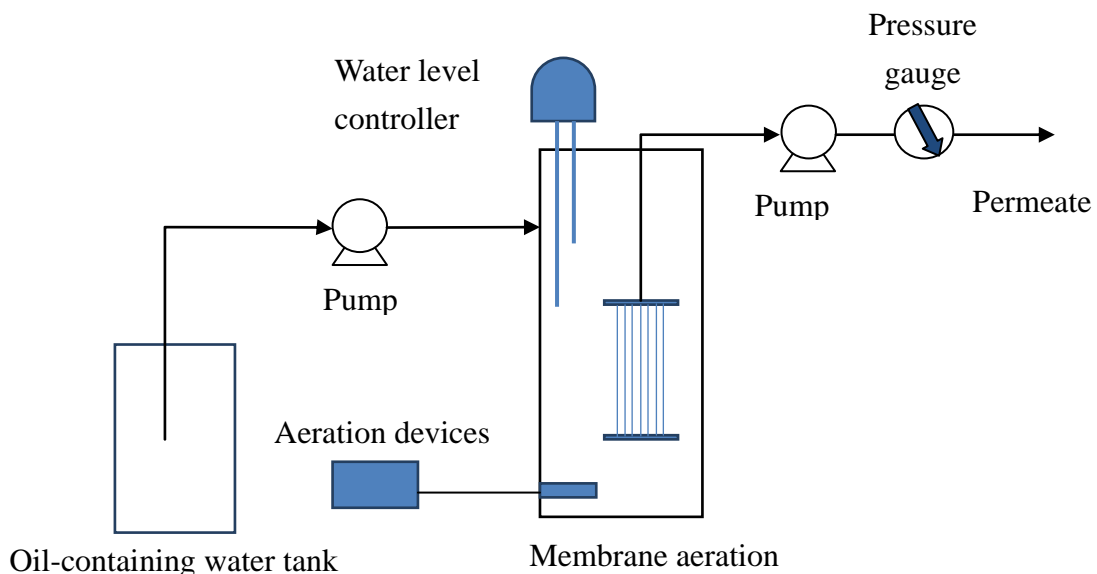


圖 4-1 實驗室微生物富集反應器系統示意圖



(a)



(b)



(c)

圖 4-2 實驗室微生物富集反應器系統 (a) 自製薄膜模組 (b) MBR 好氧反應槽(c) 微生物富集反應器系統

表 4-7 中空纖維膜特性

中空纖維膜特性	
Membrane length	8 cm
Pore size	0.1 μm
Radius	0.48 mm
Total membrane	7/1 unit
Total Area of membrane	0.0166 m^2

表 4-8 人工合成廢液組成

物質	濃度(mg/L)
Glucose	210
NH_4Cl	200
NaHCO_3	220
KH_2PO_4	22-34
Microelement solution	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.19
$\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0018
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.022
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.88
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.3

(八)研究進度及完成之工作項目 (甘特圖)

2014 年月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備 註	
工作項目														
篩選分離油品降解菌														
菌種之 16S rDNA 鑑定														
菌種之乳化與降解特性														
期中報告								※						
菌種對重金屬之吸收效能評估														
生物分解試驗														
批次混合菌相培養之效能評估														
實驗室微生物富集反應器系統效能評估														
期末報告												※		
工作進度估計百分比（累積數）	%	%	%	%	10%	20%	30%	40%	60%	75%	90%	100%		
查核點	期中			完成篩選分離油品降解菌 完成菌種之 16S rDNA 鑑定 完成菌種之乳化與降解特性										
	期末			完成菌種對重金屬之吸收效能評估 完成生物分解試驗 完成批次混合菌相培養之效能評估 完成實驗室微生物富集反應器系統效能評估										

五、 結果與討論

(一)土壤性質分析結果

本研究中的試驗土壤分別收集自嘉義義竹之砂頁岩沖積土(Cf，將軍系)、嘉義民雄之紅壤(Cc，陳厝寮系)與雲林刺桐之石灰性粘板岩沖積土(Si，秀水系)作為本研究之受測土壤，探討未來應用於現地土壤生物復育之分析與評估。各土壤之性質分析結果如表 5-1 所示，以砂頁岩沖積土之粘粒含量最少，土壤之酸鹼值偏中性，電導度為最高；紅壤之粘粒含量最高，酸鹼值經檢測後呈酸性，其電導度為三土壤中最低，有效性鐵含量也最少；而粘板岩沖積土，土壤酸鹼值呈弱酸性，但電導度並未隨化學物質之含量而有所提升。土壤特性之差異對微生物之生長與污染物降解有重要影響，本研究利用三種不同特性土壤來進行模擬試驗，可了解各菌株於不同土壤中之生長狀況及降解效率差異，未來在現地土壤生物復育時，可利用控制土壤之環境條件，以提升降解菌對污染物之降解成效。

表 5-1 試驗土壤之理化特性分析

	砂頁岩沖積土 (CF，將軍系)	紅壤 (CC，陳厝寮系)	石灰性粘板岩沖積土 (SI，秀水系)
質地	粉質土壤	粘質土壤	粘質土壤
砂粒(%)	24.3	25.6	27.8
粉粒(%)	64.5	40.2	41.2
粘粒(%)	11.2	34.2	31.0
pH	7.07	4.41	5.93
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	2191	882	1169
Fe (mg kg^{-1})	418 ± 11.6	43 ± 4.1	536 ± 20.3

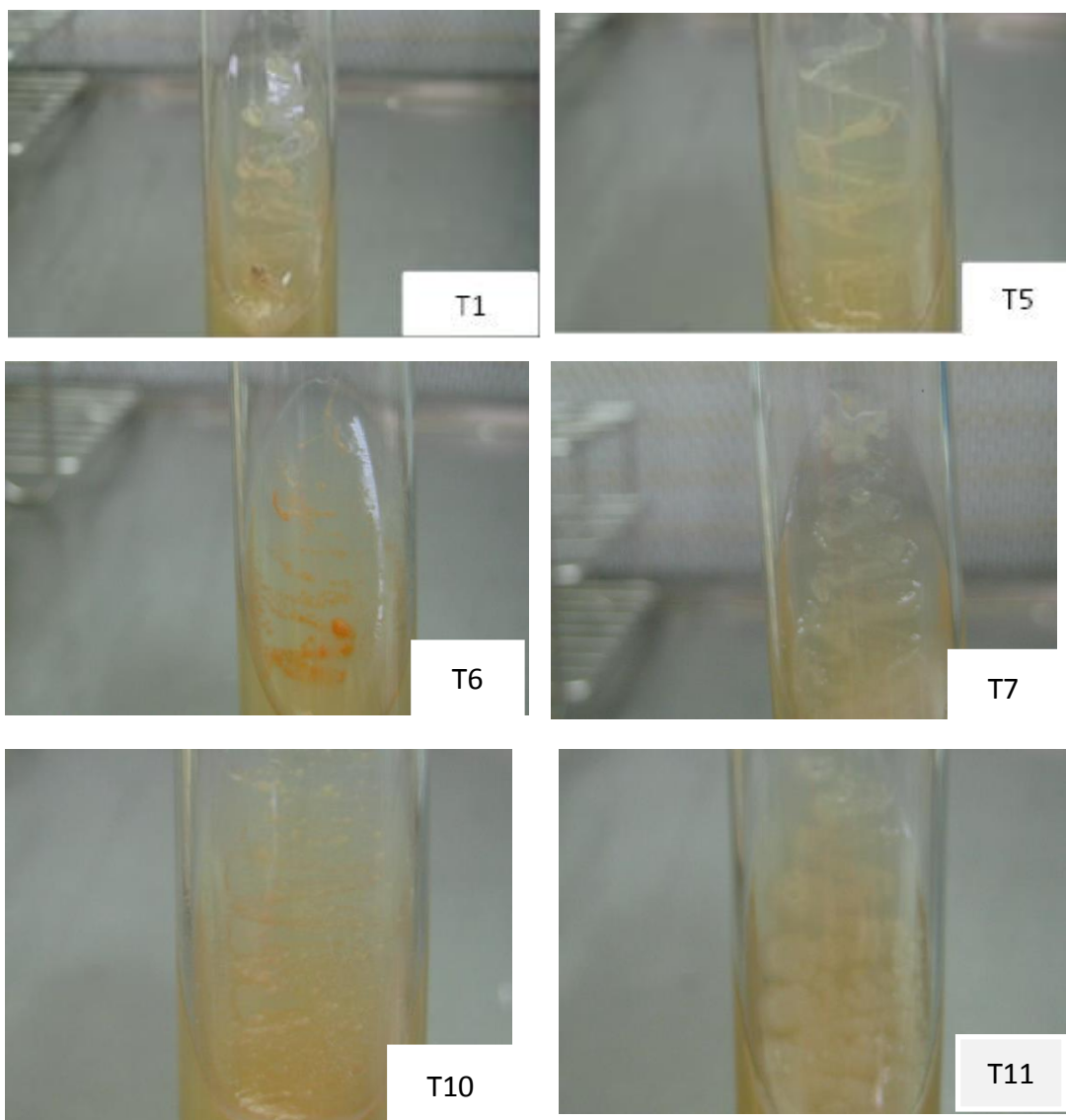
(二)耐鹽嗜油菌之篩選

採集不同加油站及化工廠周邊排水溝之污泥，並添加目標污染物-甲苯或柴油進行降解菌之馴養，於一段時間後，以稀釋塗抹及劃碟方式純化單一菌落，進而篩選各分離源污泥中之降解菌株，予以保存。放置於 28°C、150 rpm 恆溫震盪培養箱之分離源污泥，定期以塗抹法確認其中是否存在劇降解能力之菌株，而後再一次進行劃碟法做第二次的篩選與純化，陸續挑選出之甲苯降解菌 8 株，柴油降解菌 6 株，共有 14 株，甲苯降解菌分別為 T1、T5、T6、T7、T9、T10、T11 與 T12；柴油降解菌分別為 D2、D3、D4、D5、D6 及

D7，其中 D3、D4 與 T9 因於污染物降解測試中並無明顯成效或生長速度緩慢等因素，故不採納。

(三) 菌落型態

將降解菌分離純化後植於 NB 斜面培養基進行菌種保存，待菌株生長後觀察生長型態。7 株甲苯降解菌結果如圖 5-1 所示，為已培養 3 天後之生長型態，其中菌株 T6 呈橘色，其餘菌株之顏色多為半透明淡黃色，4 株甲苯降解菌結果如圖 5-2 所示，其中菌株 D6 呈橘紅色，其餘菌株之顏色多為半透明淡黃色。



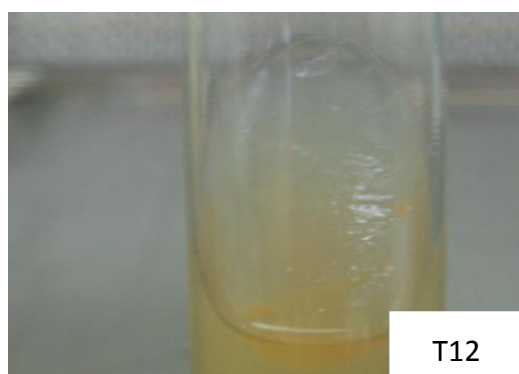


圖 5-1 甲苯分解菌塗抹於 NB 平板培養基之菌落型態

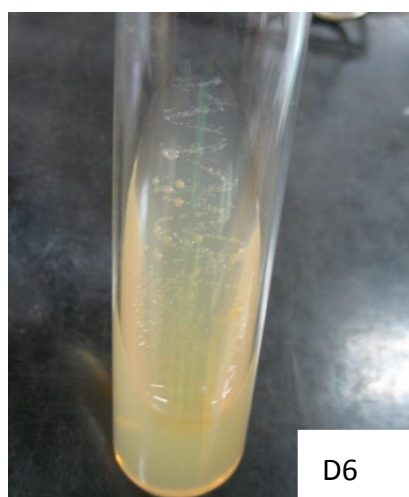
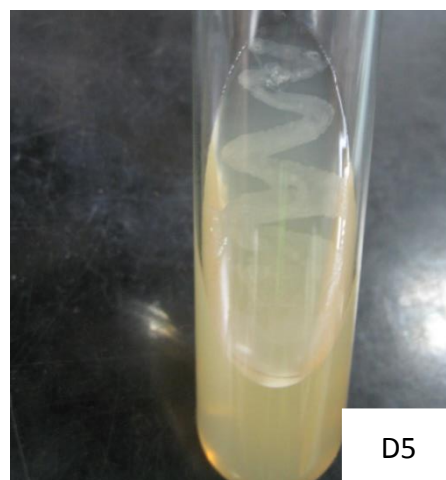
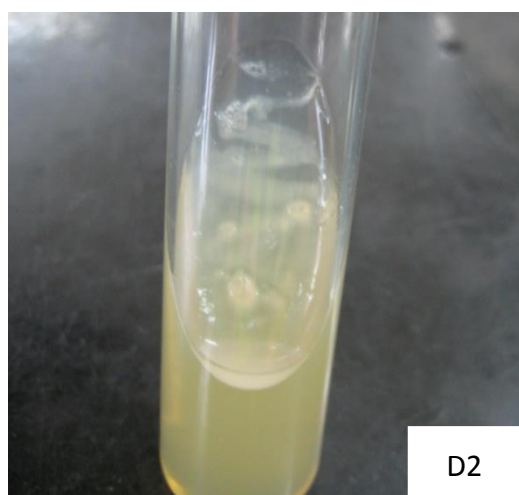


圖 5-2 柴油分解菌塗抹於 NB 平板培養基之菌落型態

(四) 菌株對石油碳氫化合物與重金屬之耐受性

藉配製不同污染物濃度平板培養基並接種已純化之單一降解菌株，以挑選出可於高濃度污染物中之生長良好者作為後續研究之試驗菌株。篩選 10 株菌株進行後續研究，各菌株均能於含 1% 甲苯或柴油之固體培養基中生存。其中 D3、D4、T1 與 T9 因於污染物降解測試中並無明顯成效或生長速度緩慢等因素，故不採納。分別將試驗菌株接種於含甲苯或柴油之 BHB 無機鹽培養基中，置於 28°C、150 rpm 恆溫震盪培養，以比較各試驗菌株對污染物降解情形。定期取樣並進行培養基之 pH 值、OD₆₆₀ 與污染物殘餘濃度之測定。甲苯檢量線示如圖 5-3，配製不同標準濃度之甲苯，與 GC/FID 所偵測得之面積利用線性迴歸求得檢量線，再進一步利用檢量線求得樣品之污染物殘餘濃度。

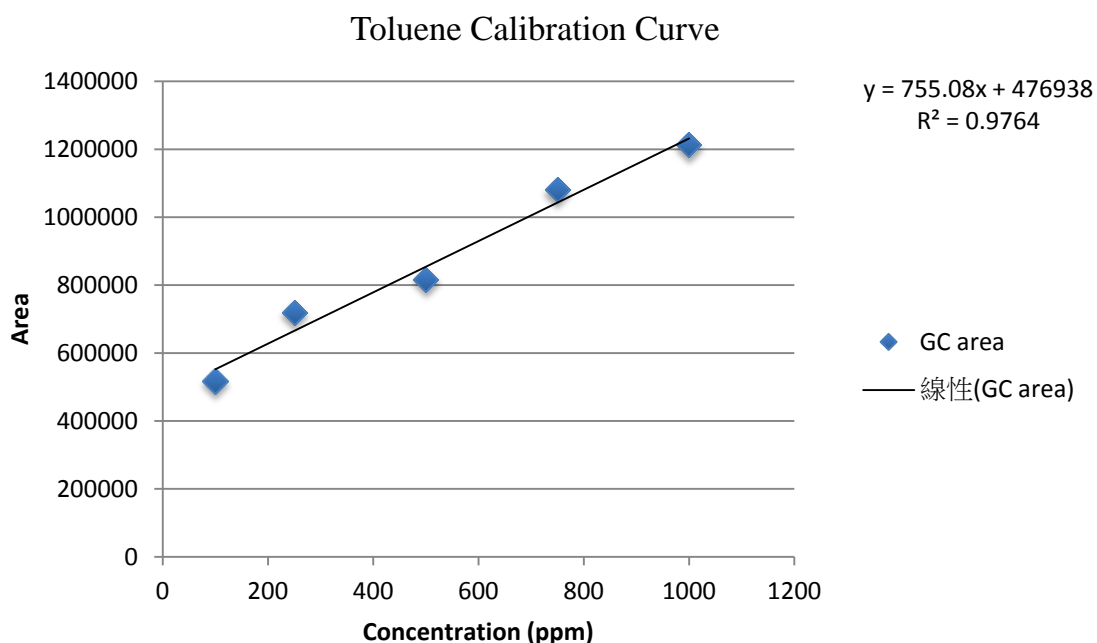


圖 5-3 甲苯檢量線

(1) 甲苯降解菌之生物降解

在環境中有許多微生物具有分解石油碳氫化合物的能力，其分佈及其菌屬種類非常廣泛，其分佈區域遍及海洋、淡水及土壤中，菌屬種類包括細菌、真菌、放線菌、酵母菌、黴菌以及藻類等，主要以細菌與真菌為主。土壤中碳氫化合物的生物分解速率取決於多種生化及物化反應步驟，由於此類化合物為疏水性，因此其生物利用性(bioavailability)的高低與該物質的溶解度及其在細胞膜穿越傳輸的速率有關。

為了解本研究分離的菌株對甲苯之生物降解能力，將篩選所得之 6 株試驗菌株接種於含 0.1% 甲苯 BHB 液體培養基，每隔 12 小時進行採樣分析，持續培養與分析至培養基中測不出甲苯的殘留，結果如圖 5-4 至圖 5-9 所示。其中以菌株 T6、T7 與 T11 具有較佳之降解能力，於培養至 36 小時，甲苯降解率分別為 80、65 及 57%，培養至 48 小時，即可達 100% 的甲苯去除率；菌株 T10 與 T12 分別培養至 96 與 72 小時，亦可達 100% 的甲苯去除率；菌株 T5 培養至 108 小時，僅約有 20% 的甲苯去除率。研究結果顯示本研究所篩選出的部分菌株具有良好的甲苯生物降解效能，經由批次液體培養基之培養可篩選未來應用於受污染土壤進行生物復育時之參考。未來仍持續探討各菌株對重金屬的耐受性，初步結果顯示，試驗菌株可生長於含 100 mg/L 銅或鋅的甲苯 BHB 液體培養基，目前正持續測試菌株對重金屬(銅或鋅)的最高耐受濃度，並進一步分析菌株於重金屬存在下是否對其甲苯生物降解能力有所影響、且菌株對於重金屬是否具有吸收重金屬之能力。

(2) 甲苯降解菌之乳化指數

生物復育(Bioremediation)是利用微生物(如細菌、真菌及放線菌等)或微生物程序，轉換或分解土壤或地下水中的危害性污染物，使其成為無害性之物質，達到整治標準，具有簡單操作、處理成本低對環境的友善的優點。應用生物復育技術可能受限之因子為微生物對疏水性有機物(Hydrophobic organic compounds, HOCs)的生物可及性。而解決此問題的其中一個方法為在土壤中添加界面活性劑，當其濃度大於臨界微包濃度(Critical micelle concentration, CMC)時會降低油與水之間界面的張力，以提高 HOCs 在水中的溶解度，並從而增加其生物可及性。過去大部分有關界面活性劑應用於生物復育的研究都集中在化學合成之界面活性劑，但此類界面活性劑會對微生物產生抑制作用，尤其是當其濃度大於 CMC 時。近年則有研究指出，具有分泌生物界面活性劑之微生物種類甚多。生物界面活性劑(biosurfactant)因為其本身是自然

界生成的物質，較適用於生物復育，對環境的影響相對較小，Barathi 和 Vasudevan(2001)指出 *Pseudomonas fluorescens* 利用其 *n*-alkanes 之長短鍵，使石油碳氫化合物污染土壤之 aliphatic 及 aromatic 碳氫化合物乳化而降解。本研究為瞭解篩選出之菌株對甲苯之乳化效應，進行於甲苯 BHB 液體培養基培養 2 天後的除菌液對甲苯所產生的乳化指數，結果示如表 5-2，菌株 T7 具有最佳之乳化效果，顯示培養 48 小時的除菌液已有生物界面活性劑產生，然其乳化效應與菌株對甲苯降解能力間並無一致的相關性。

表 5-2 甲苯降解菌之乳化指數(E_{24})

Strain	乳化層高(cm)	總液層高(cm)	E_{24}
T5	0.1	2.8	3.57
T6	0.1	3.2	3.13
T7	0.2	2.5	8
T10	0.1	2.7	3.70
T11	0.1	2.8	3.57
T12	0.1	2.6	3.85

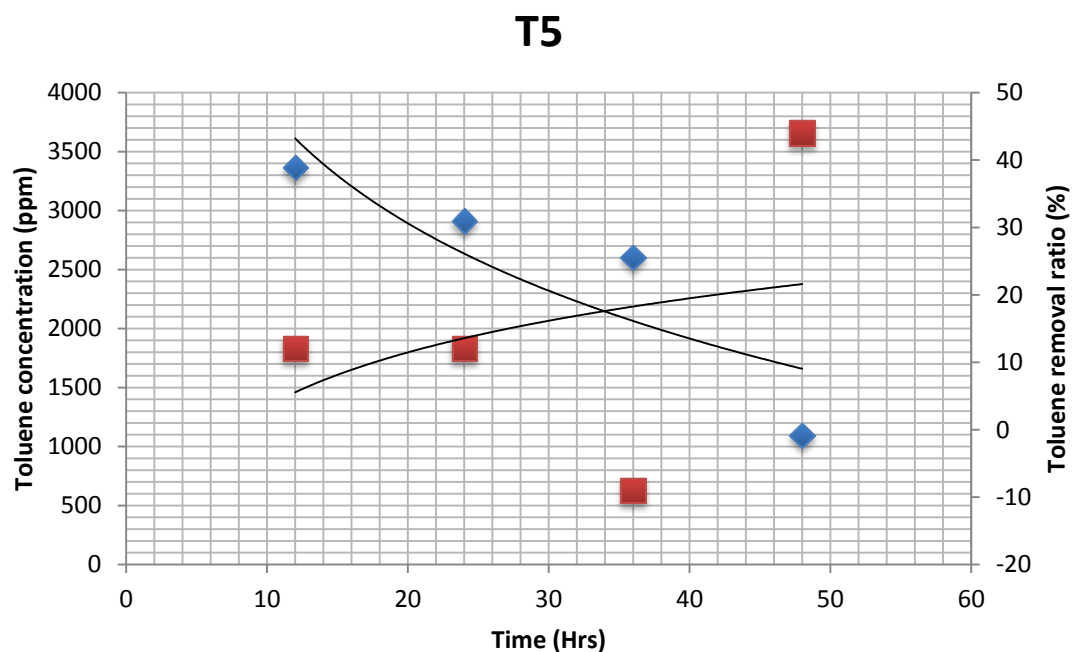


圖 5-4 T5 菌株對甲苯之降解能力

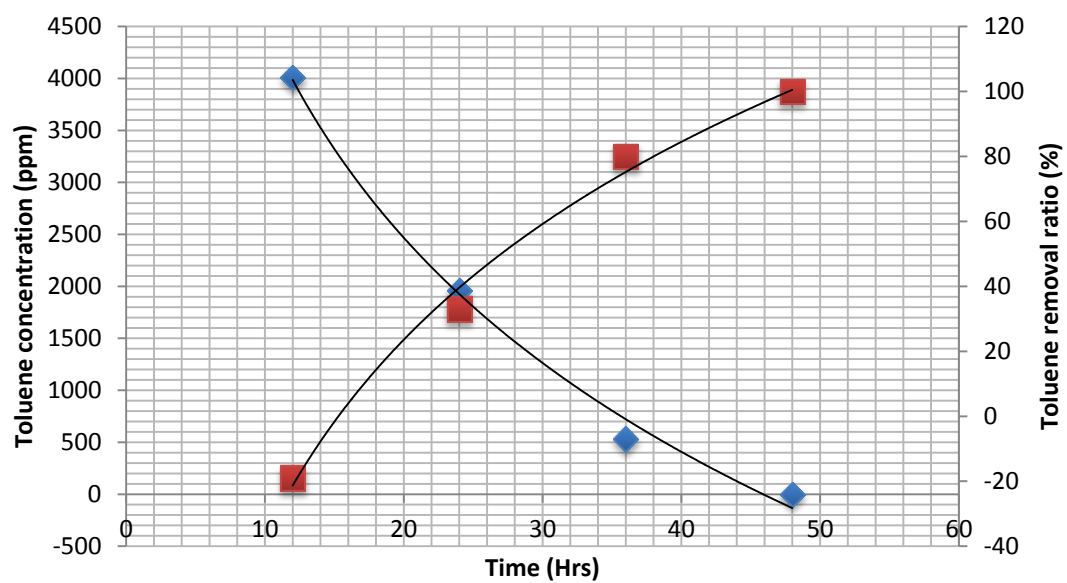
T6

圖 5-5 T6 菌株對甲苯之降解能力

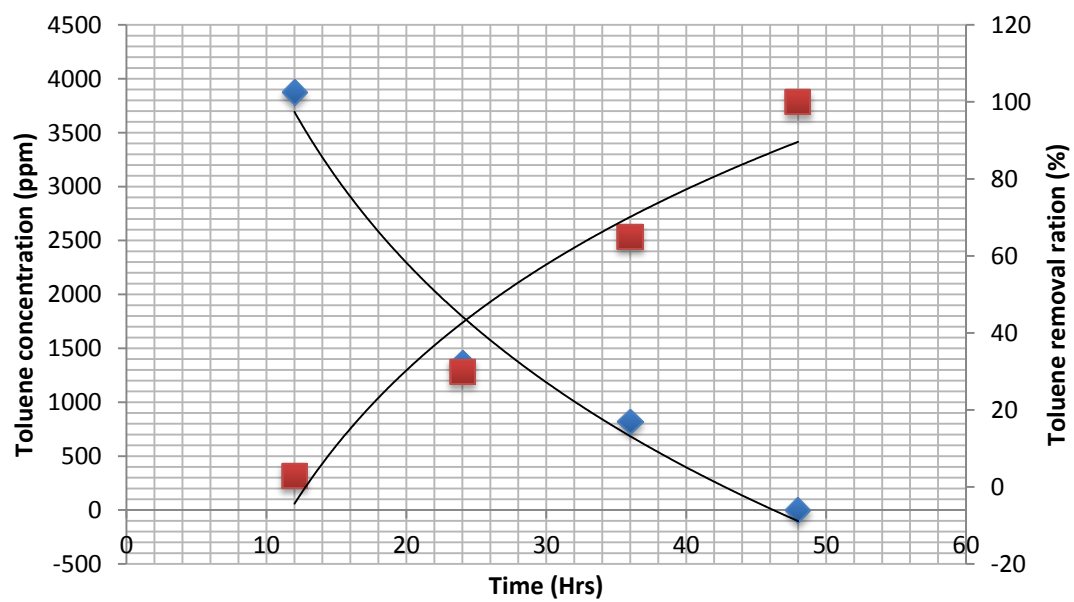
T7

圖 5-6 T7 菌株對甲苯之降解能力

T10

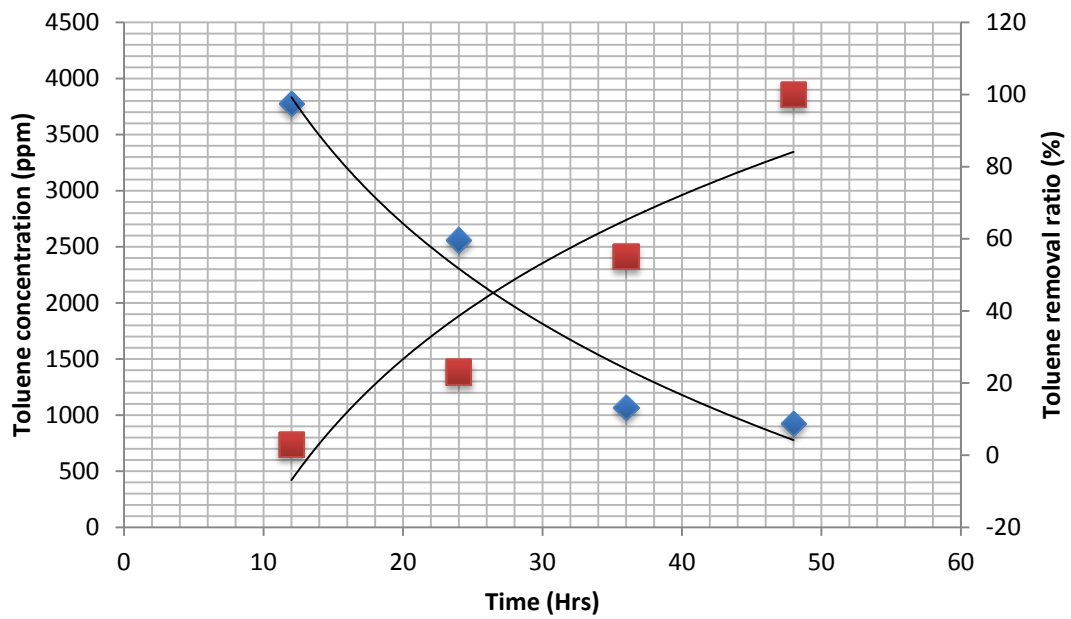


圖 5-7 T10 菌株對甲苯之降解能力

T11

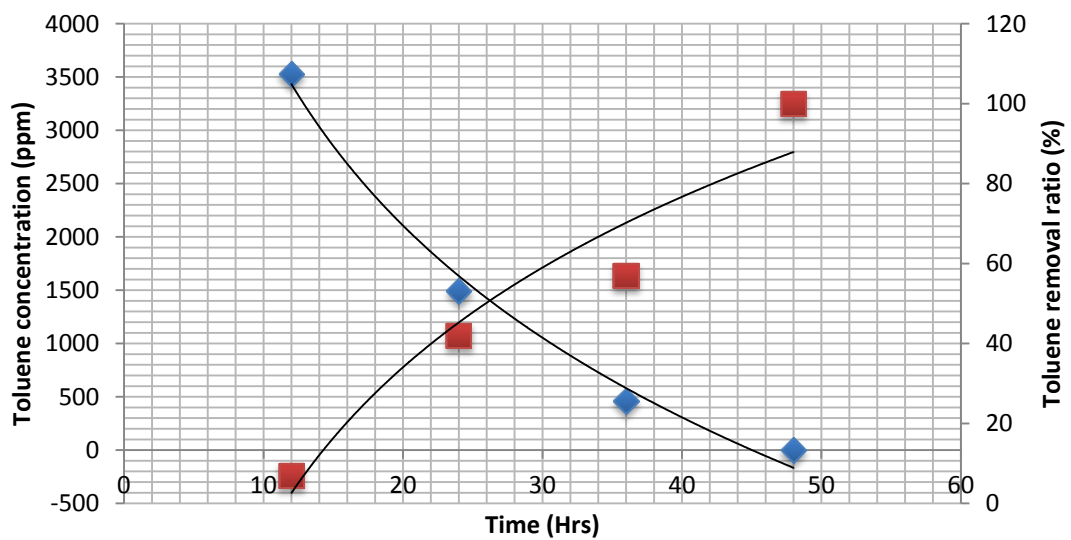


圖 5-8 T11 菌株對甲苯之降解能力

T12

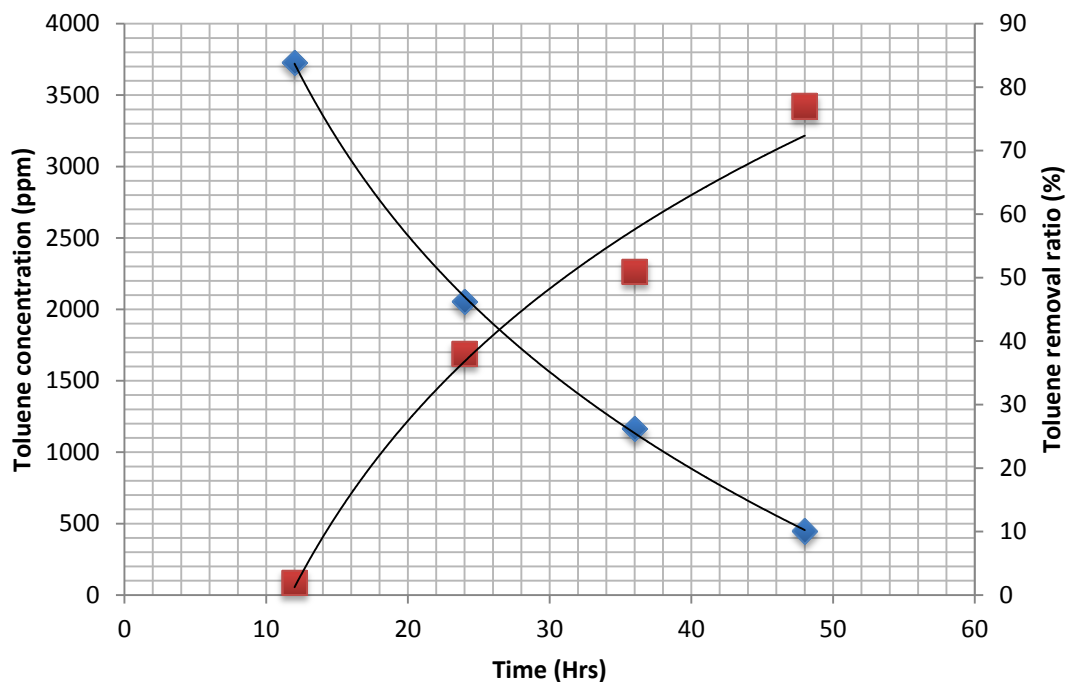


圖 5-9 T13 菌株對甲苯之降解能力

(3) 柴油降解菌之生物降解

柴油是石油在煉製過程中分餾的產品，具複雜之化合組成，主要是由烷烴、烯烴、環烷烴、芳香烴、多環芳烴與少量硫、氮及添加劑組成的混合物。經 GC/FID 分析之圖譜如圖 5-10 所示。藉高濃度柴油平板培養基篩選並純化單一柴油降解菌株，以進行後續研究。由收集的油泥篩選後，篩選出 4 株能耐高柴油濃度的菌株，分別將試驗菌株接種於含柴油之 BHB 無機鹽培養基中，置於 28°C、150 rpm 恆溫震盪培養，以比較各試驗菌株對柴油降解情形。定期取樣並進行培養基之 pH 值、OD₆₆₀ 與污染物殘餘濃度之測定。柴油之檢量線示如圖 5-11，配製不同標準濃度之柴油，與 GC/FID 所偵測得之面積利用線性迴歸求得檢量線，再進一步利用檢量線求得樣品之污染物殘餘濃度。

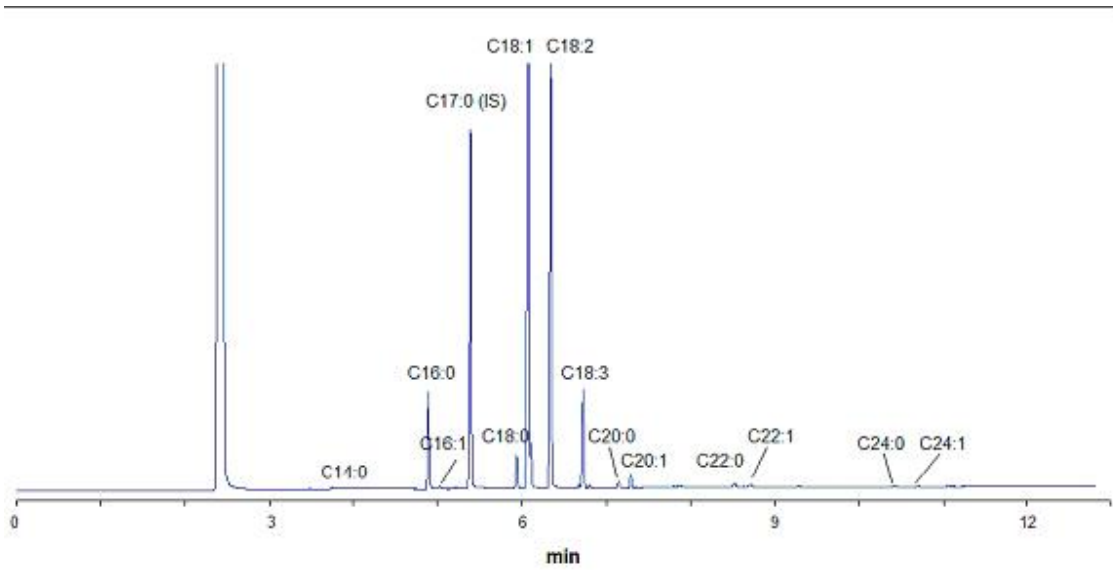


圖 5-10 柴油經 GC/FID 之分析圖譜

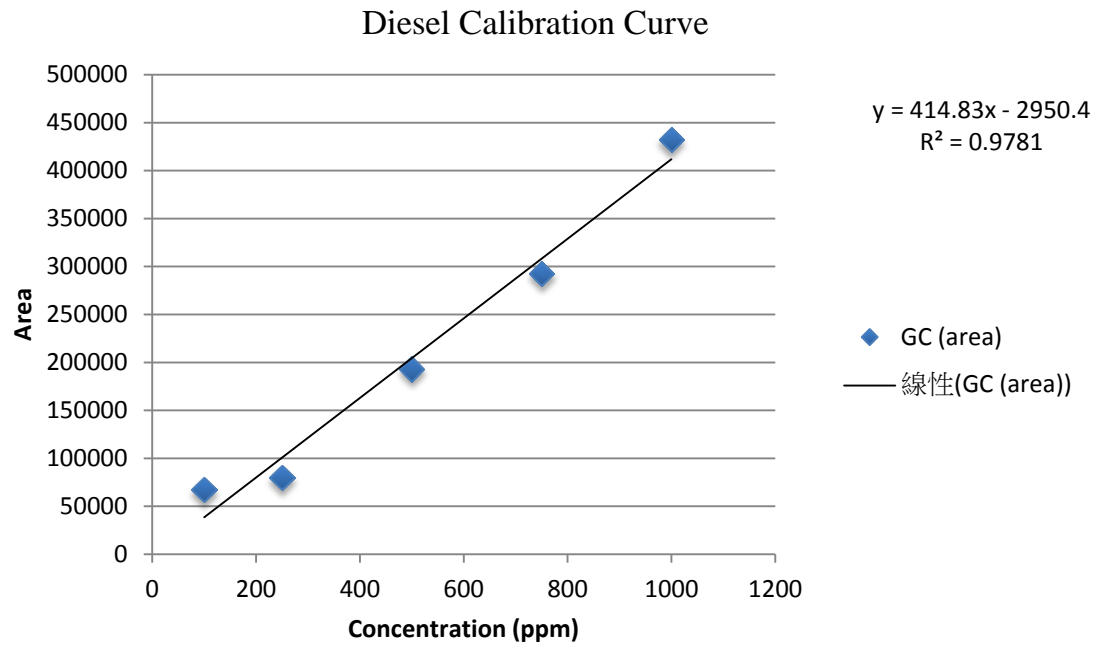


圖 5-11 柴油檢量線

為了解本研究分離的菌株對柴油之生物降解能力，將篩選所得之 4 株試驗菌株接種於含 0.1% 柴油 BHB 液體培養基，每隔 6 小時進行採樣分析，持續培養與分析至培養基中測不出柴油的殘留，結果如圖 5-12 至圖 5-15 所示。其中以菌株 D5 生長狀況最為良好，且培養後期培養基 pH 值下降較為明顯，菌株 D2、D5 與 D6 培養至 24 小時，即有 97-98% 的柴油去除率；菌株 D7 的降解效率略遜於其他菌株。研究結果顯示本研究所篩選出的菌株具有良好的柴油生物降解效能，經由批次液體培養基之培養特性可作為未來應用於受污染土壤進行生物復育時之參考。未來仍持續探討各菌株對重金屬的耐受性，初步結果顯示，試驗菌株可生長於含 100 mg/L 銅或鋅的柴油 BHB 液體培養基，目前正持續測試菌株對重金屬(銅或鋅)的最高耐受濃度，並進一步分析菌株於重金屬存在下是否對其柴油生物降解能力有所影響、且菌株對於重金屬是否具有吸收重金屬之能力。

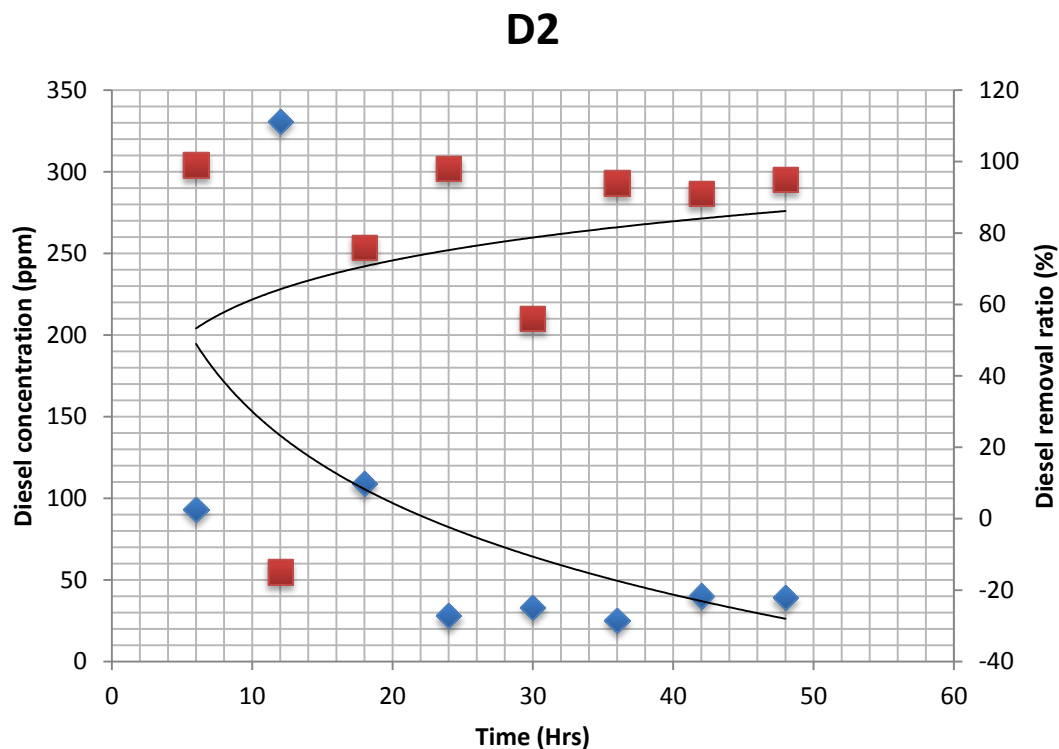


圖 5-12 D2 菌株對柴油之降解能力

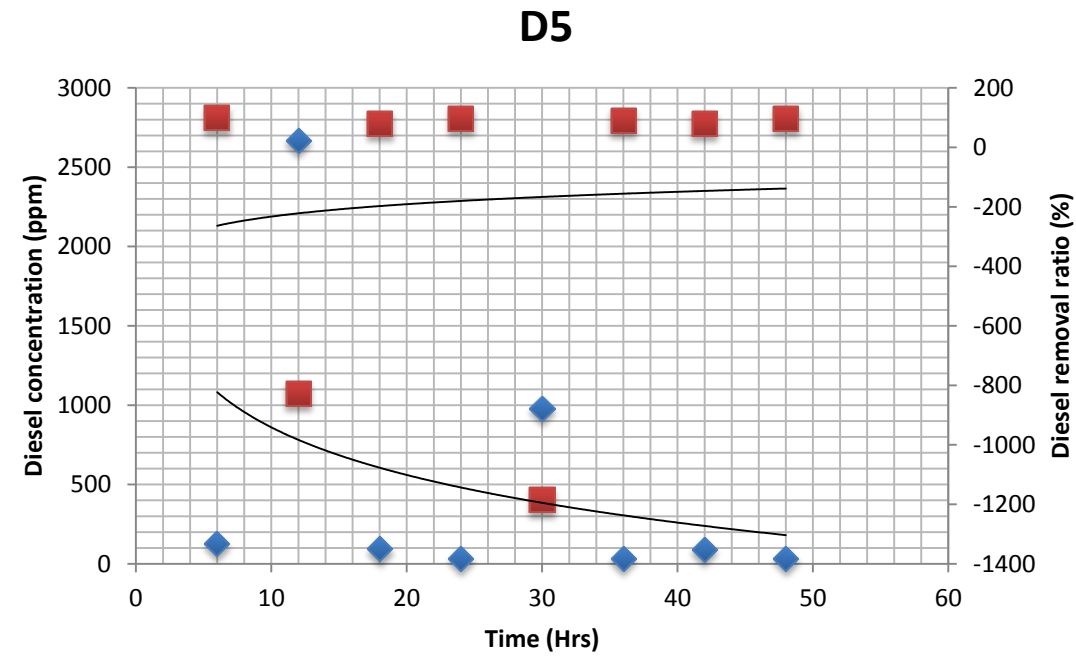


圖 5-13 D5 菌株對柴油之降解能力

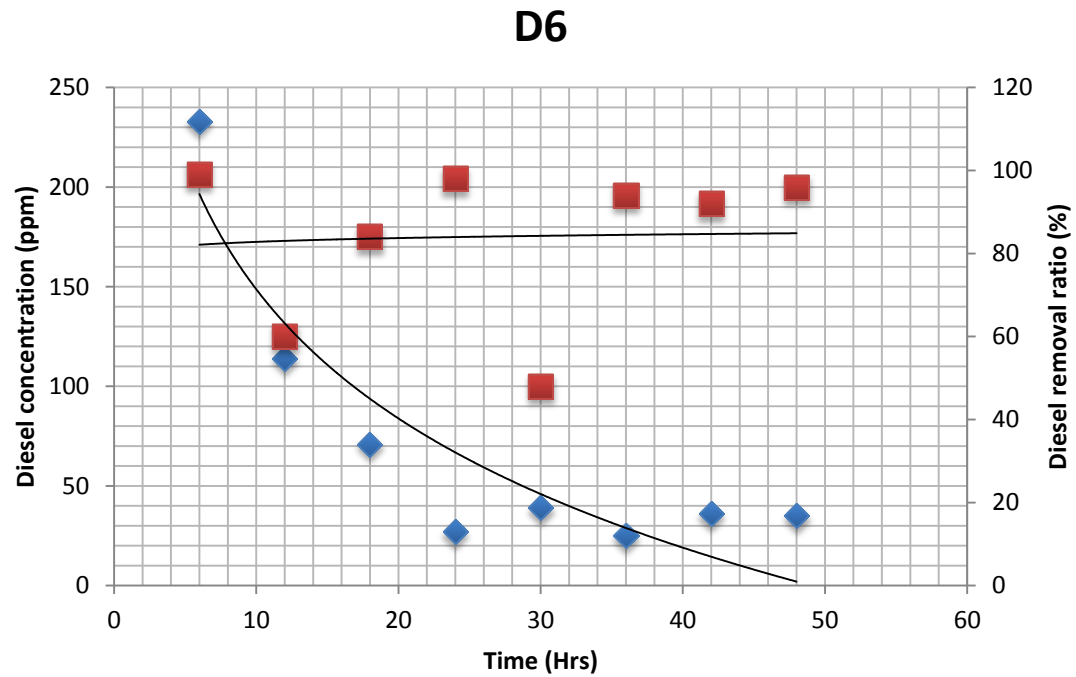


圖 5-14 D6 菌株對柴油之降解能力

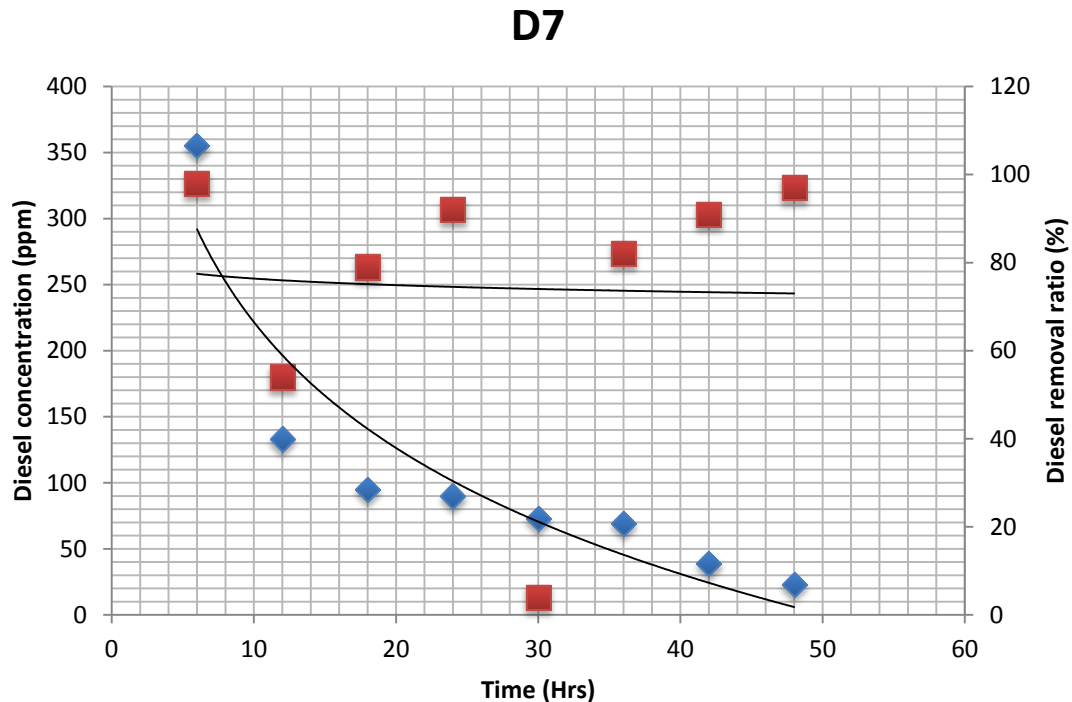


圖 5-15 D7 菌株對柴油之降解能力

(4) 柴油降解菌之乳化指數

環境中能分解油品污染的微生物,多數能利用碳氫化合物為能源及碳源來生產生物界面劑(Cooper and Goldenberg, 1987; Stronguilo et al., 1994; Marin et al., 1996)。生物界面活性劑為同時具有親水性基與疏水性基之分子,有助於乳化碳氫化合物促進溶解降低水的表面張力。本研究為瞭解篩選出之菌株對柴油之乳化效應,進行於柴油 BHB 液體培養基培養 2 天後的除菌液對柴油所產生的乳化指數,結果示如表 5-3,菌株 D5 具有最佳之乳化效果,顯示培養 48 小時的除菌液已有生物界面活性劑產生,其乳化指數可達 12%。其餘菌株之乳化指數僅為 3.57-3.7%,然菌株之乳化效應與菌株對甲苯降解能力間並無一致的相關性。

應用生物復育技術可能受限之因子為微生物對疏水性有機物(Hydrophobic organic compounds, HOCs)的生物可及性。解決此問題的其中一個方法為在土壤中添加界面活性劑,當其濃度大於臨界微包濃度(Critical micelle

concentration, CMC)時會降低油與水之間界面的張力，以提高 HOCs 在水中的溶解度，並從而增加其生物可及性。Syldatk and Wagner (1987)提出 *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 對於銨鹽的利用效果比硝酸鹽佳，為瞭解細菌對於不同氮源利用對於表面張力效應,以本研究篩選所得之柴油分解菌 *Bacillus megaterium* 及 *Bacillus cereus* 與 *Candida bombicola* 對於硝酸鈉及硫酸銨兩種不同氮源利用時因分解菌產生生物界面活性劑，為瞭解外加碳源與氮源對菌株是否具誘導產生生物界面活性劑之功效，將後續持續完成外加不同碳源(如：葡萄糖、蔗糖及甘露糖等)與氮源(硫酸銨、硝酸鈉等)至培養基，分析各菌株之除菌液對柴油的乳化指數，以尋求提升菌株對污染物的親和性。

表 5-3 試驗菌株之乳化指數(E₂₄)

Strain	乳化層高(cm)	總液層高(cm)	E ₂₄
D2	0.1	2.8	3.57
D5	0.3	2.5	12
D6	0.1	2.7	3.7
D7	0.1	2.7	3.7

(5) 菌種對重金屬之耐受性

本研究篩選之甲苯分解菌均能忍受 250 ppm Zn，柴油分解菌 D2, D5 與 D7 能忍受 250 ppm Zn，高 Zn 濃度則對多數菌種產生抑制作用，其中 T7 與 D5 可忍受高濃度(500 ppm)；菌種之生長較易受銅影響，篩選出之菌種中僅以 T7 與 D5 能耐受高濃度 Cu。後續利用化學連續萃取法分析探討耐受菌種之重金屬分布型態，以探討重金屬在細胞中之累積機制。

表 5-4 試驗菌株於含 Zn/甲苯 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試

Zn	100ppm	250ppm	500ppm
T5	+	+	-
T6	+	+	-
T7	+	+	+
T10	+	+	-
T11	+	+	-
T12	+	+	-

表 5-5 試驗菌株於含 Zn/柴油 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試

Zn	100ppm	250ppm	500ppm
D2	+	+	-
D5	+	+	+
D6	+	-	-
D7	+	+	-

表 5-6 試驗菌株於含 Cu/甲苯 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試

Cu	100ppm	250ppm	500ppm
T5	-	-	-
T6	-	-	-
T7	+	+	-
T10	-	-	-
T11	-	-	-
T12	-	-	-

表 5-7 試驗菌株於含 Cu/柴油 BHB 無機鹽培養基之耐受性測試

Cu	100ppm	250ppm	500ppm
D2	-	-	-
D5	+	-	-
D6	-	-	-
D7	-	-	-

(6) 菌種吸附重金屬型態分析

微生物細胞表面有許多重金屬鍵結位置，可吸附不同種類重金屬，對重金屬之吸附作用分為代謝相關型(胞內累積)和代謝無關型(細胞表面吸附)，各試驗菌種對 Cu/Zn 離子之吸附型態示如表 5-8 至表 5-10。微生物細胞壁因帶有負電殘基，如羧基、磷酸基和氨基等，故帶正電之金屬離子能與之鍵結，細胞壁所鍵結的金屬離子能以 EDTA 脫附，故將水溶性(water soluble)、可交換型(exchangeable)、吸附型(adsorbed)、有機物連結型(organically bound)與碳酸鹽型態(carbonate)累加，可視為細胞壁所結合之部分，殘留型則表示細胞內累積之重金屬。結果顯示，細胞外之吸附量(biosorption)為 59.7~70.8%，細胞內累積量(bioaccumulation)則約在 29.2~40.3%，微生物對重金屬之耐受主要是將重金屬排除於細胞外，或將重金屬結合於細胞壁與細胞外聚合物，文獻指出，假單胞菌(*Pseudomonas*)可利用蛋白質與 ATP 形成之 P-type ATPase 來調控細胞內銅離子之濃度，本研究所分離的菌株對重金屬之吸收則有良好效能。

表 5-8 試驗菌株於含 Zn/甲苯 BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附型態

菌種	水溶性 (%)	可交換型 (%)	吸附型 (%)	有機物連結 型(%)	碳酸鹽連結 型(%)	殘留型 (%)
T5	0.5	0.8	2.7	38.1	25.9	32.1
T6	0.4	1.2	1.9	33.4	32.0	31.1
T7	0.4	0.7	2.0	29.0	27.6	40.3
T10	0.3	0.6	1.8	33.5	32.8	31.0
T11	0.2	0.6	1.5	31.8	32.5	33.4
T12	0.4	0.9	2.3	29.4	31.3	35.7

表 5-9 試驗菌株於含 Zn/柴油 BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附型態

菌種	水溶性 (%)	可交換型 (%)	吸附型 (%)	有機物連結 型(%)	碳酸鹽連結 型(%)	殘留型 (%)
D2	0.3	0.7	1.3	32.7	32.4	32.6
D5	5.5	0.89	6.6	21.6	28.3	29.2
D6	0.4	0.9	1.8	31.6	32.4	33.0
D7	0.3	1.1	1.8	32.0	31.6	33.2

表 5-10 試驗菌株於含 Cu/ BHB 無機鹽培養基之重金屬吸附型態

菌種	水溶性 (%)	可交換型 (%)	吸附型 (%)	有機物連結 型(%)	碳酸鹽連結 型(%)	殘留型 (%)
T7	0.3	0.8	0.4	3.33	34.6	30.6
D5	0.4	0.5	0.3	33.5	34.4	30.9

(五) 模擬柴油污染土壤與有機質檢測

本研究利用市售 95 柴油，針對砂頁岩沖積土、紅壤、粘板岩沖積土等三種土壤製備柴油污染土壤。原始土壤與模擬柴油污染土壤均測定期有機碳含量(%Organic Matter)，以為後續處理效率計算之依據。原始土壤有機碳含量如表 5-4 所示，結果顯示原始土壤有機碳含量介於 0.05 - 0.15 之間。另外，利用市售 95 柴油製備柴油污染之土壤有機質含量如表 5-5 所示，結果顯示柴油製備柴油污染之土壤有機質含量介於 2.14 - 3.56 之間。一般而言，土壤有機質含量低於 0.5%，屬於極低(very low)之污染，若土壤有機質含量高於 2.61%，屬於高(high)與極高(very high)之污染(如表 5-6 所示)。以此為據，本研究利用市售柴油製備之柴油污染土壤的污染程度均介於高度與極高度之污染。

表 5-11 三種土壤有機碳含量

Sample	%Organic Carbon
Blank 1	0.00
Std. SI 1	0.15
Std. SI 2	0.15
Std. CC 1	0.05
Std. CC 2	0.05
Std. CF 1	0.15
Std. CF 2	0.14

表 5-12 三種模擬柴油污染土壤有機碳含量

Sample (before washing)	Sample Wight (g)	Organic Carbon (%)
SI1	0.98	2.86
SI2	0.71	3.56
CC1	0.99	2.48
CC2	0.87	2.47
CF1	0.85	3.25
CF2	0.91	2.14

(六) 界面活性劑洗提與微生物富集反應器系統

本研究先利用批式實驗方式，評估界面活性劑(Ethylene Glycol mono-Butyl Ether)對模擬柴油污染土壤之洗提效果，本階段先選擇 CF2-1 與 CF2-2 柴油污染土壤為實驗目標，因土壤經界面活性劑提洗後，土壤孔隙間仍含有多量的柴油-界面活性劑混合液，故參考相關文獻做法，利用離心機將提洗後

土壤予以離心，並比較離心與不離心操作之影響，CF2-1 與 CF2-2 經界面活性劑洗提後之有機物含量如圖 5-16 與表 5-7 所示，實驗結果顯示，在不離心部分，土壤中有機碳之洗提效果(%)隨界面活性劑濃度升高而降低，顯示土壤孔隙間仍含有多量的柴油-界面活性劑混合液，在離心部分，界面活性劑濃度 0.1% 與 0.5% 時，均無法有效移除土壤中之柴油，但當界面活性劑濃度提高至 5% 時，柴油的洗提效率達最高，土壤中有機碳之洗提效果可達 91%。

表 5-13 土壤有機碳含量與污染程度關係

OC (%)	Pollution level
< 0.29	Very low
0.29 - 0.58	Low
0.58 - 0.87	Relatively low
0.87 - 1.45	Moderate
1.45 - 2.03	Relatively high
2.03 - 2.61	High
> 2.61	Very high

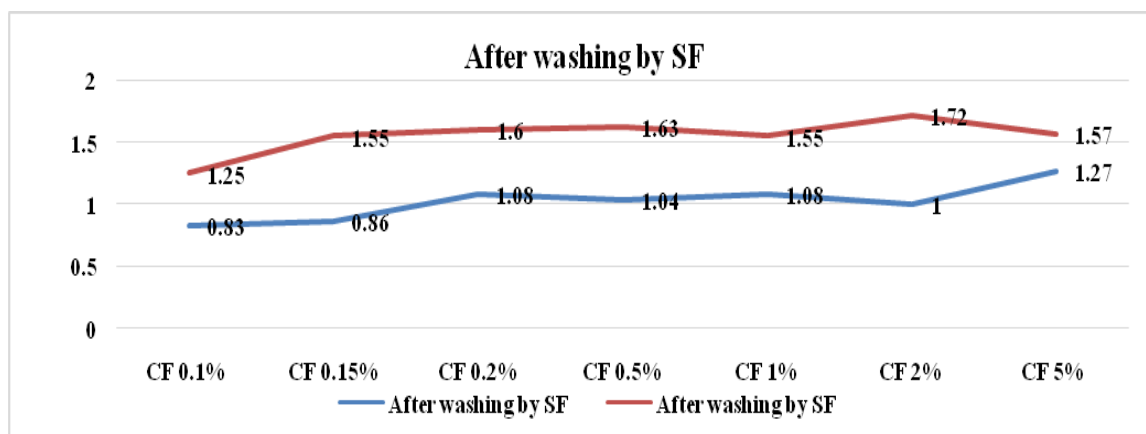


圖 5-16 不同濃度比例界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量 (註:縱座標為 OC(%))

表 5-14 離心操作對界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量之影響

土樣與不同 比例洗劑	洗提前 OC(%)含量	洗提後 OC(%)含量 (不離心)	洗提效果 (不離心)	洗提後 OC(%)含量 (離心)	洗提效果 (離心)
CF2-1	3.1725				
CF2-2	2.9957				
0.1% -1		2.6252	17%	1.8797	41%
0.1% -2		2.5735	14%	1.9536	35%
0.5% -1		2.9174	8%	2.6117	18%
0.5% -2		2.9317	2%	2.2598	25%
5% -1		2.9744	6%	0.2931	91%
5% -2		2.7633	8%	0.2588	91%

為探討不同體積洗劑的效果，本研究針對 0.1%濃度的界面活性劑，以 10、20、30、40、50mL 體積的界面活性劑進行實驗。實驗結果顯示，若要將土壤中有機碳降至 0.87% 以下 (Relatively low，見表 5-6)，不同性質土壤有不同的界面活性劑使用量，以 CC 土壤 (陳厝寮系，紅壤) 為例，30 mL 的界面活性劑使用量可將土壤中有機碳降至 0.87% 以下，SI 土壤 (秀水系，石灰性粘板岩沖積土) 需使用 40 mL，CF 土壤 (將軍系，砂頁岩沖積土) 需使用 50 mL。

表 5-9 為不同洗提時間洗提後 CF 與 CC 土壤中有機碳含量，結果顯示，在界面活性劑 30 mL / 0.15% 條件下，CC 土壤 (陳厝寮系，紅壤) 經提洗 30 分鐘後，土壤中有機碳可降至 0.87% 以下，但 CF 土壤 (將軍系，砂頁岩沖積土) 則需提洗 60 分鐘，土壤中有機碳才降至 0.87% 以下。

圖 5-17 與表 5-10 為界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CF 土壤 (將軍系，砂頁岩沖積土) OC(%) 含量之影響，CF 最初土壤 OC(%) 為 3.25，界面活性劑為 0.1% / 30 mL，實驗結果顯示，第一次提洗有 61.7% 的洗提效果，之後

逐次降低為 60.6、57.4、52.9 與 42.2%

圖 5-18 與表 5-11 為界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CC 土壤 (陳厝寮系, 紅壤) OC(%)含量之影響, CC 最初土壤 OC(%)為 2.48, 界面活性劑為 0.1% / 30 mL, 實驗結果顯示, 第一次提洗有 80.7% 的洗提效果, 但第二次之洗提效果即大幅下降至 59.7%, 前後相差約 20%。

表 5-15 不同體積界面活性劑洗提後土壤 OC(%)含量

0.1%不同體積洗劑	洗提後 OC(%)含量		
	CF	SI	CC
0.1% 10 mL	3.09	1.85	2.24
0.1% 20 mL	2.63	1.53	1.84
0.1% 30 mL	1.25	1.08	0.80
0.1% 40 mL	0.98	0.86	0.76
0.1% 50 mL	0.81	0.77	0.87

表 5-16 不同洗提時間洗提後土壤 OC(%)含量

洗提時間	30 mL/0.15% 界面活性劑洗提後 OC(%)含量	
	CF	CC
60 min	0.86	0.48
50 min	1.30	0.67
40 min	1.49	0.71
30 min	1.69	0.86
20 min	2.29	1.15
10 min	2.51	1.87

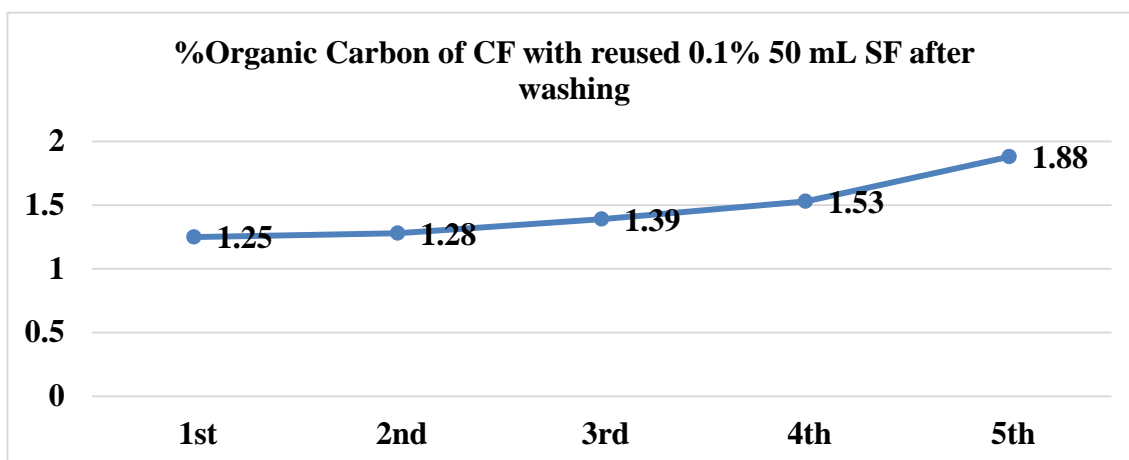


圖 5-17 界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CF 土壤 OC(%)含量之影響(註: 縱座標為 OC(%))

表 5-17 界面活性劑重複使用對柴油污染 CF 土壤之洗提效果

洗劑重複使用次數	洗劑洗提後 OC(%)含量	洗提效果 (%)
CF 1st	1.25	61.7
CF 2nd	1.28	60.6
CF 3rd	1.39	57.4
CF 4th	1.53	52.9
CF 5th	1.88	42.2

註: CF 最初土壤 OC(%)為 3.25，洗劑 0.1% /30 mL

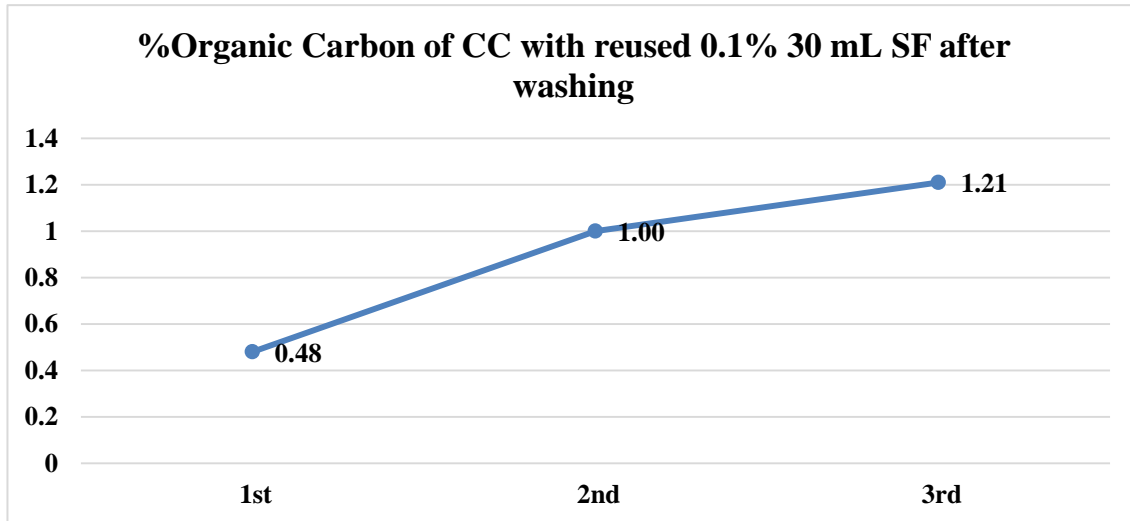


圖 5-18 界面活性劑重複使用次數對柴油污染 CC 土壤 OC(%)含量之影響
(註:縱座標為 OC(%))

表 5-18 界面活性劑重複使用對柴油污染 CC 土壤之洗提效果

洗劑重複使用次數	洗劑洗提後 OC(%)含量	洗提效果 (%)
CC 1st	0.48	80.7
CC 2nd	1.00	59.7
CC 3rd	1.21	51.2

註: CC 最初土壤 OC(%)為 2.48，洗劑 0.1% /30 mL

本研究除模擬柴油污染土壤外，另外針對模擬甲苯污染土壤進行界面活性劑的提洗效果。圖 5-19 與表 5-12 為界面活性劑在不同與體積與洗提時間下，對模擬甲苯污染 CF 土壤的提洗效果，實驗結果顯示，使用 30 mL 的界面活性劑在 60 分鐘內無法將土壤中有機碳降至 0.87% (Relatively low，見表 5-6) 以下，40 mL 需 50 分鐘，50 mL 需 40 分鐘，才可將土壤中有機碳降至 0.87% 以下。

圖 5-20 與表 5-13 為界面活性劑在不同與體積與洗提時間下，對模擬甲苯污染 CC 土壤的洗提效果，實驗結果顯示，30 mL 的界面活性劑在 20 分鐘後即無洗提效果，40 mL 與 50 mL 界面活性劑的洗提效果皆隨洗提時間的增加而增加。

本研究建構實驗室微生物富集反應器系統，用以處理模擬柴油污染土壤經界面活性劑洗提後之混合液。系統先以人工合成廢液 (COD 值 200 mg/L) 進流，並植入活性污泥進行馴養，俟系統去除效果與污泥濃度達穩定後，於第 60 天開始進流柴油-界面活性劑洗提液，最初以體積比 1% (柴油-界面活性劑洗提液 / 人工合成廢液) 進流，之後逐步提高柴油-界面活性劑洗提液比例，由圖 5-21 得知，當進流體積比提升至 20% 時，COD 處理效果急劇下降，污泥膠羽明顯有團聚而產生沉澱現象，實驗遂於第 87 天在反應槽中投入本研究分離純化的 3 種本土柴油降解菌株 (D2、D5、D6 各 35 mL)，菌株投入後，系統 COD 處理效果逐步上升，隨後進流體積比亦由 10%、20% 提升至 30%，系統對 COD 的處理效果穩定維持在 95-97% 之間，微生物富集反應器內 MLSS 濃度為 9000 mg/L，MLVSS 濃度為 8000 mg/L，研究結果顯示，本研究建構之實驗室微生物富集反應器系統能穩定有效處理柴油-界面活性劑洗提液。此微生物富集反應器可提高微生物濃度、增加微生物族群的歧異度並截留生長速率緩慢之菌群，除可處理界面活性劑沖排液外，亦是有效微生物之培養槽，未來可為深入研究與模廠整治之混生菌種來源，強化生物復育。

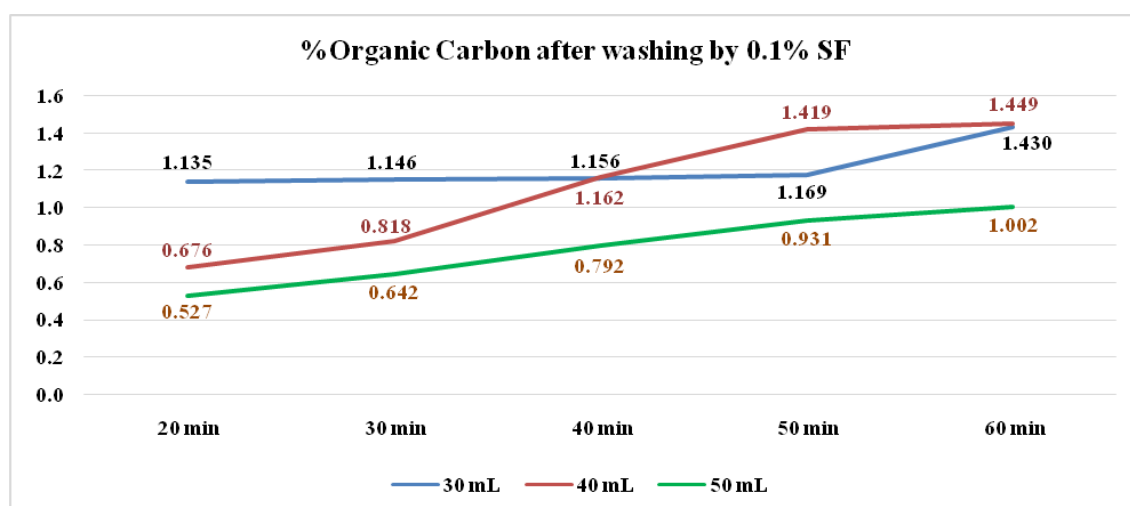


圖 5-19 模擬甲苯污染 CF 土壤洗提後土壤 OC(%)含量 (註:縱座標為 OC(%))

表 5-19 界面活性劑對模擬甲苯污染 CF 土壤的提洗效果

含甲苯土壤 CF	界面活性劑 0.1% /30 mL					
	30 mL		40 mL		50 mL	
	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)
CF 洗提 60 min	1.135	64.6	0.676	78.9	0.527	83.6
CF 洗提 50 min	1.146	64.3	0.818	74.5	0.642	80.0
CF 洗提 40 min	1.156	63.9	1.162	63.8	0.792	75.3
CF 洗提 30 min	1.169	63.6	1.419	55.8	0.931	70.9
CF 洗提 20 min	1.430	55.5	1.449	54.9	1.002	68.8
CF 土壤最初 OC(%)	3.21					

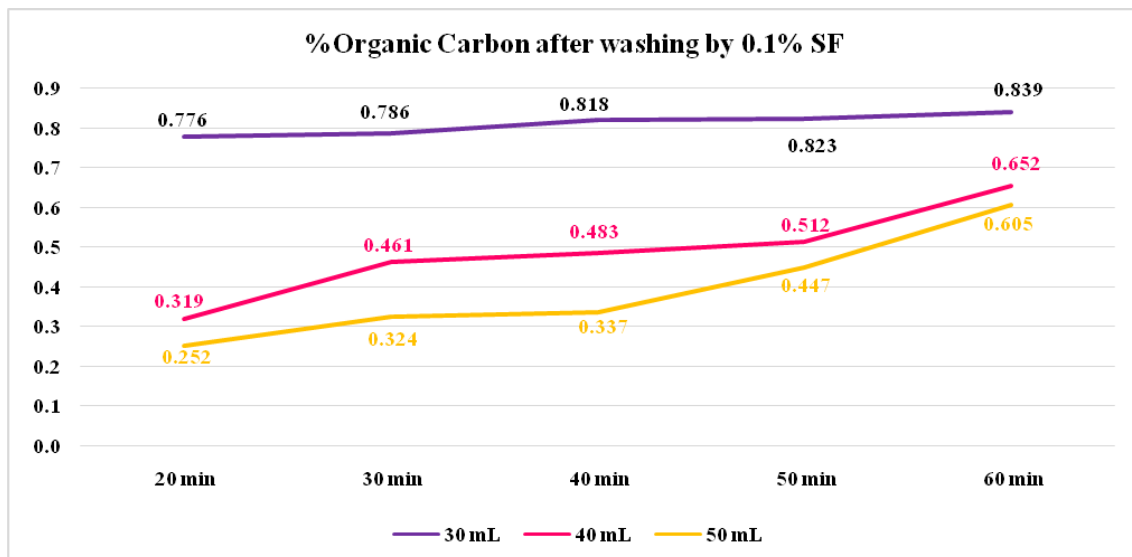


圖 5-20 模擬甲苯污染 CC 土壤洗提後土壤 OC(%)含量 (註:縱座標為 OC(%))

表 5-20 界面活性劑對模擬甲苯污染 CC 土壤的提洗效果

含甲苯土壤 CC	界面活性劑 0.1% /30 mL					
	30 mL		40 mL		50 mL	
	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)	洗提後 OC(%) 含量	洗提效果 (%)
CC 洗提 60 min	0.776	66.6	0.319	86.2	0.252	89.1
CC 洗提 50 min	0.786	66.1	0.461	80.1	0.324	86.1
CC 洗提 40 min	0.818	64.7	0.483	79.2	0.337	85.5
CC 洗提 30 min	0.823	64.5	0.512	77.9	0.447	80.8
CC 洗提 20 min	0.839	63.8	0.652	71.9	0.605	73.9
CC 土壤最初 OC(%)	2.32					

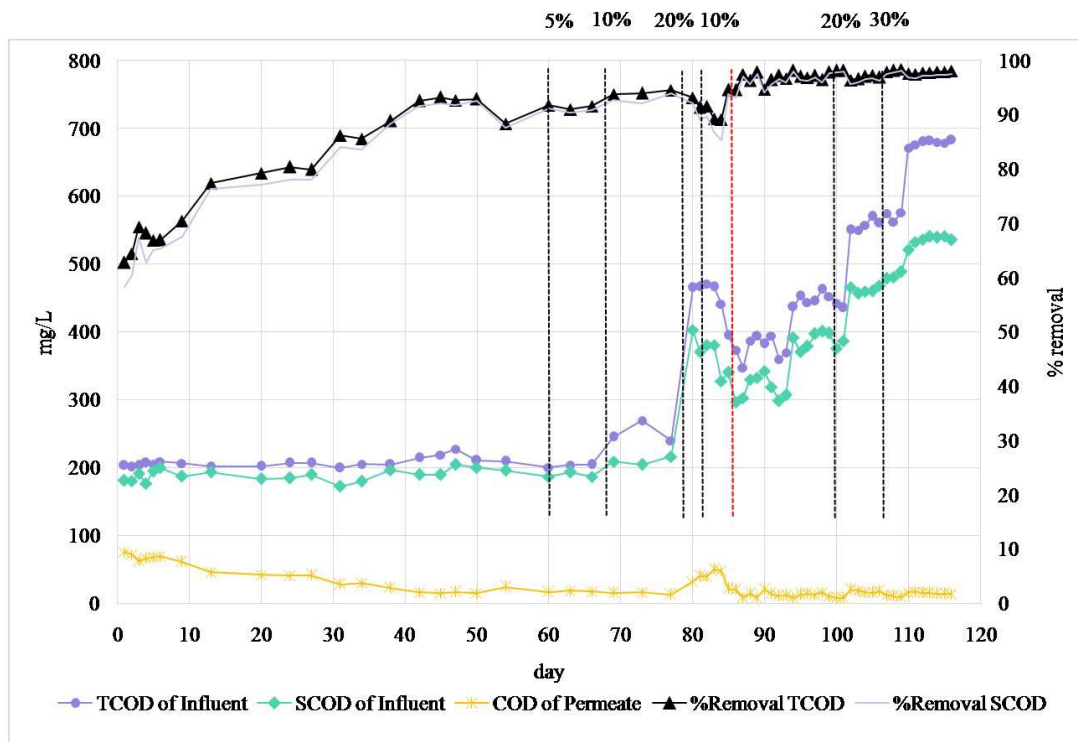


圖 5-21 微生物富集反應器系統對 COD 的處理效果

(七) 菌種之 16S rDNA 鑑定

本研究除分離純化出可降解甲苯或柴油之微生物外，並利用 16S rDNA 片段確認分離之菌株，或其相似菌種之親緣關係。在菌種之 16S rDNA 鑑定部分，鑑定結果發現主要的菌種是 *Achromobacter insolitus* (D2)，*Candida spp.* (D5)，*Xanthobacterpolyaromaticivorans* (D6 and T12)，*Ochrobactrum intermedium* (D7)，*Streptomyces caelestis* (T1 and T5)，*Gordonia amicalis* (T6)，*Brevibacillus brevis* (T10)，*Bacillus fumarioli* (T11)，另外，T7 經鑑定為真菌類。

表 5-21 菌種鑑定結果

Strain	Species					
	1	Identities	2	Identities	3	Identities
D2	<i>Achromobacter insolitus</i>	99%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99%	-	-
D5	<i>Candida viswanathii</i>	96%	<i>Candida aquae-texoris</i>	96%	<i>Candida tropicalis</i>	93%
D6	<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i>	99%	<i>Aquabacter spiritensis</i>	98%	<i>Xanthobacter tagetidis</i>	97%
D7	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	99%	<i>Brucella abortus</i>	99%	<i>Ochrobactrum ciceri</i>	99%
T1	<i>Streptomyces caelestis</i>	97%	<i>Streptomyces pallidus</i>	97%	<i>Streptomyces azureus</i>	97%
T5	<i>Streptomyces caelestis</i>	97%	<i>Streptomyces pallidus</i>	97%	<i>Streptomyces goshikiensis</i>	97%
T6	<i>Gordonia amicalis</i>	99%	<i>Gordonia rubripertinctus</i>	98%	<i>Gordonia namibiensis</i>	98%
T7*						
T10	<i>Brevibacillus brevis</i>	99%	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	99%	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	99%
T11	<i>Bacillus fumarioli</i>	99%	<i>Bacillus drementensis</i>	99%	<i>Bacillus niacini</i>	99%
T12	<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i>	99%	<i>Aquabacter spiritensis</i>	98%	<i>Xanthobacter tagetidis</i>	97%

* Strain T7 was identified as fungus by stain method but DNA extracted difficulty.

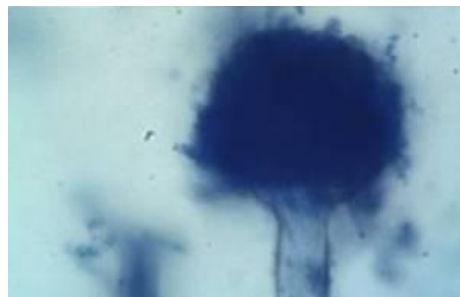


圖 5-22 T7 真菌顯微鏡下外觀

(八)結論與建議

根據本計畫之執行規劃，共計須完成下列 7 項主要工作與研究，各項工作執行比例如下說明：

- A. 完成篩選分離油品降解菌：本研究已經針對甲苯與柴油，完成篩選分離油品降解菌，達成率 100%。
- B. 完成菌種之 16S rDNA 鑑定：已完成菌種之 16S rDNA 鑑定，達成率 100%。
- C. 完成菌種之乳化與降解特性：已完成菌種之乳化與降解特性，達成率 100%。
- D. 完成菌種對重金屬之吸收效能評估：已完成菌種對重金屬之吸收效能評估，達成率 100%。
- E. 完成生物分解試驗：已完成生物分解試驗，達成率 100%。
- F. 完成混合菌相培養之效能評估：已完成混合菌相培養之效能評估，達成率 100%。
- G. 完成實驗室微生物富集反應器系統效能評估：已完成實驗室微生物富集反應器系統效能評估，達成率 100%。

本團隊為第一次執行本項專案計畫，前期工作在取樣點評估勘查與取樣等工作頗為耗時，另外在人員訓練、實驗設備建置方面亦著力頗深，全期在團隊成員之努力下，始能符合本計畫之執行規劃目標；

專案研究獲致具體結論如下：

- A. 本研究採集不同加油站油泥及化工廠周邊排水溝之污泥，並添加污染物-甲苯或柴油至基礎培養基，進而篩選各分離源污泥中之降解菌株，予以保存。陸續挑選出之甲苯降解菌 8 株，柴油降解菌 6 株，共有 14 株，甲苯降解菌分別為 T1、T5、T6、T7、T9、T10、T11 與 T12；柴油降解菌分別為 D2、D3、D4、D5、D6 及 D7，其中 T1、T9、D3 與 D4 因於污染物降解測試中並無明顯成效或生長速度緩慢等因素，故不採納。
- B. 菌株 T6、T7 與 T11 具有較佳之甲苯降解能力，於培養至 36 小時，甲苯降解率分別為 80、65 及 57%，培養至 48 小時，即可達 100%的甲苯去

- 除率；菌株 T10 與 T12 分別培養至 96 與 72 小時，亦可達 100% 的甲苯去除率；菌株 T5 培養至 108 小時，僅約有 20% 的甲苯去除率。研究結果顯示本研究所篩選出的部分菌株具有良好的甲苯生物降解效能，經由批次液體培養基之培養可篩選未來應用於受污染土壤進行生物復育時之參考。
- C. 菌株 D2、D5 與 D6 培養至 24 小時，即有 97-98% 的柴油去除率；菌株 D7 的降解效率略遜於其他菌株。研究結果顯示本研究所篩選出的菌株具有良好的柴油生物降解效能，經由批次液體培養基之培養特性可作為未來應用於受污染土壤進行生物復育時之參考。
 - D. 菌株 D5 具有最佳之乳化效果，培養 48 小時的除菌液已有生物界面活性劑產生，其乳化指數可達 12%。其餘菌株之乳化指數僅為 3.57-3.7%，然菌株之乳化效應與菌株對甲苯降解能力間並無一致的相關性。
 - E. 本研究篩選之甲苯分解菌均能忍受 250 ppm Zn，柴油分解菌 D2, D5 與 D7 能忍受 250 ppm Zn，高 Zn 濃度則對多數菌種產生抑制作用，其中 T7 與 D5 可忍受高濃度(500 ppm)；菌種之生長較易受銅影響，篩選出之菌種中僅以 T7 與 D5 能耐受高濃度 Cu。本研究所分離的菌株對重金屬之吸收有良好效能。
 - F. 菌種之 16S rDNA 鑑定結果發現，主要的菌種是 *Achromobacter insolitus* (D2)，*Candida spp.* (D5)，*Xanthobacterpolyaromaticivorans* (D6 and T12)，*Ochrobactrum intermedium* (D7)，*Streptomyces caelestis* (T1 and T5)，*Gordonia amicalis* (T6)，*Brevibacillus brevis* (T10)，*Bacillus fumarioli* (T11)，另外，T7 經鑑定為真菌類。
 - G. 本研究利用不同性質土壤，模擬甲苯或柴油污染，利用界面活性劑進行洗提，評估界面活性劑濃度、用量、洗提時間、界面活性劑重複使用對洗提效果之影響，結果顯示本研究選用之界面活性劑對不同性質土壤皆有洗提效果，惟其洗提效果高低與土壤性質有關。
 - H. 本研究建構實驗室微生物富集反應器系統，並於反應槽中投入本研究分離純化的 3 種本土柴油降解菌株 (D2、D5、D6)，用以處理模擬柴油污染土壤經界面活性劑洗提後之混合液。研究結果顯示，實驗室微生物富集反應器系統對 COD 的處理效果達 95-97% 之間，穩定且有效地處理柴

油-界面活性劑洗提液。

本案在研究團隊充分合作與努力之下，達成上述 8 項研究成果，除符合原計畫目標，亦為未來的研究開展了新的方向與目標。

後續執行工作項目

基於上述結論，建議未來方向與深入研究如下：

- A. 評估單一菌株添加條件下，針對利用柴油為土壤中之目標污染物，於實驗室進行批次實驗操作，探討單一菌株分解土壤中柴油之效率。
- B. 評估混合菌株添加條件下，針對利用柴油為土壤中之目標污染物，於實驗室進行批次實驗操作，探討混合菌株分解土壤中柴油之效率。
- C. 評估混合菌株的保存方法與貯存條件，於實驗室進行批次實驗操作，探討經保存後的混合菌株分解土壤中柴油之效率。

六、 參考文獻

1. 行政院環保署土壤及地下水污染整治基金管理會網頁
<http://sgw.epa.gov.tw/public/Default.aspx>
2. C.J. Camphuysen, M Heubeck , Marine oil pollution and beached bird surveys: the development of a sensitive monitoring instrument, *Environmental Pollution*, Volume 112, Issue 3, May 2001, Pages 443-461.
3. A.I. Zouboulis, P.A. Moussas , Groundwater and soil pollution: bioremediation Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, from *Encyclopedia of Environmental Health*, 2011, Pages 1037-1044.
4. Esperanza Mena, José Villaseñor, Pablo Cañizares, Manuel A. Rodrigo, Effect of a direct electric current on the activity of a hydrocarbon-degrading microorganism culture used as the flushing liquid in soil remediation processes, *Separation and Purification Technology*, Volume 124, 18 March 2014, Pages 217-223.
5. Reginald B. Kogbara, Abir Al-Tabbaa, Yaolin Yi, Julia A. Stegemann , Cement–fly ash solidification/stabilization of contaminated soil: Performance properties and initiation of operating envelopes, *Applied Geochemistry*, Volume 33, June 2013, Pages 64-75.
6. Jurate Virkutyte, Mika Sillanpää, Petri Latostenmaa, Electrokinetic soil remediation — critical overview, *Science of The Total Environment*, Volume 289, Issues 1–3, 22 April 2002, Pages 97-121.
7. Daniel E. Crean, Francis R. Livens, Mustafa Sajih, Martin C. Stennett, Daniel Grolimund, Camelia N. Borca, Neil C. Hyatt, Remediation of soils contaminated with particulate depleted uranium by multi stage chemical extraction, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 263, Part 2, 15 December 2013, Pages 382-390.
8. Jiangang Wang, Xinhua Zhan, Lixiang Zhou, Yusuo Lin, Biological indicators capable of assessing thermal treatment efficiency of hydrocarbon

- mixture-contaminated soil, *Chemosphere*, Volume 80, Issue 8, August 2010, Pages 837-844.
9. Javier García Frutos, Olga Escolano, Susana García, Mar Babín, M. Dolores Fernández, Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 183, Issues 1–3, 15 November 2010, Pages 806-813.
 10. C.M. Kao, C.Y. Chen, S.C. Chen, H.Y. Chien, Y.L. Chen, Application of in situ bioparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation, *Chemosphere*, Volume 70, Issue 8, February 2008, Pages 1492-1499.
 11. Gidarakos, M. Aivalioti, Large scale and long term application of bioslurping: The case of a Greek petroleum refinery site, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 149, Issue 3, 19 November 2007, Pages 574-581.
 12. Claudio Cameselle, Reshma A. Chirakkara, Krishna R. Reddy, Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: Status and opportunities, *Chemosphere*, Volume 93, Issue 4, October 2013, Pages 626-636.
 13. 莊世超, (2000) 泥漿法處理含油污泥及土壤之生物復育研究, 碩士論文, 國立成功大學環境工程學系研究所。
 14. <http://wzhz.cqvip.com/hzpinglaoshi/qk/98345X/200504/20050738.html>.
 15. István Máthé, Tibor Benedek, András Táncsics, Márton Palatinszky, Szabolcs Lányi, Károly Márialigeti, Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania), *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 73, September 2012, Pages 41–49.
 16. Kingsley Urum, Steve Grigson, Turgay Pekdemir, Sean McMenamy, A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils, *Chemosphere*, Volume 62, Issue 9, March 2006, Pages 1403-1410.

17. Lada Mathurasa, Chantra Tongcumpou, David A. Sabatini, Ekawan Luepromchai, Lada Mathurasa, Chantra Tongcumpou, David A. Sabatini, Ekawan Luepromchai, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 75, November 2012, Pages 7-14.
18. Kingsley Urum, Turgay Pekdemir, David Ross, Steve Grigson, Crude oil contaminated soil washing in air sparging assisted stirred tank reactor using biosurfactants, *Chemosphere*, Volume 60, Issue 3, July 2005, Pages 334-343.
19. Razika Khalladi, Ouassila Benhabiles, Fatiha Bentahar, Naji Moulai-Mostefa, Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 164, Issues 2–3, 30 May 2009, Pages 1179-1184.
20. Edelvio B. Gomes, Ricardo F. Silva, Alexandre S. Rosado, Nei Pereira Jr., Biotreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR), *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 64, Issue 5, August 2010, Pages 413-417.
21. Natalie McKenzie, Siqing Yue, Xudong Liu, Bruce A. Ramsay, Juliana A. Ramsay, Biodegradation of naphthenic acids in oils sands process waters in an immobilized soil/sediment bioreactor, *Chemosphere*, Volume 109, August 2014, Pages 164-172.
22. Manuela Taccari, Vesna Milanovic, Francesca Comitini, Cristiano Casucci, Maurizio Ciani, Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 66, Issue 1, January 2012, Pages 39-46.
23. Seockheon Lee, Ji Hyang Kweon, Han S. Kim, Selective biodegradation of sorbitan ethoxylated surfactants by soil microorganisms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 85, November 2013, Pages 652-660.
24. Barathi S., Vasudevan N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ Int.* 26(5-6):413-416.

25. Cooper D.G., Goldenberg B.G. 1987. Surface active agents of two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol., 53: 224-229.
26. Stronguilo, M.L., M.T. Vaquero, L. Comellas, and F. Broto-Puig. 1994. The fate of petroleum aliphatic hydrocarbons in sewage sludge amended soils. Chemosphere 29: 273-281.
27. Sylđatk, C., Wagner, F. 1987. Production of biosurfactants. In: Kosaric, N, Cairns, WL & Gray, WL (Eds) Surfactant Science Series. Biosurfactants and Biotechnology, Vol 25 (pp 21–45). Marcel Dekker, New York Basel