

行政院環境保護署

105 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

研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油汙染土壤之生物復育整治

期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署

專案執行單位：國立臺灣大學／農業化學系

專案主持人：施養信教授

專案執行期間：104 年 11 月 17 日起至
105 年 11 月 16 日止

中華民國 105 年 12 月 印製

「105 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」

■修正計畫書 □期中報告

□期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	■ 研究專案 □ 模場試驗	
計畫主持人	施養信	研究類別	■ 整治 □ 評估 □ 預防 □ 自訂	
計畫名稱	研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油汙染土壤之生物復育整治			
專案連絡人	楊千瑩	連絡專線	02-3366-9442	
政策性審查意見		計畫單位回覆		
<p>1. 請依專案計畫書標準格式撰寫，勿刪除表單及格式，各項次說明或表格勿跨頁。</p> <p>2. 專案主持人之「專案主持人、協同主持人學經歷與相關研究說明—延續性計畫」所填內容應屬「本署委辦計畫」，若無「延續性計畫」請空白。</p> <p>3. 「消耗性器材費」應將原說明欄位之敘述移至項目名稱欄位，並於說明欄內說明其用途。</p> <p>4. 「差旅費」請補充說明搭乘之交通工具（如：高鐵），填寫出差、採樣…等之起訖地點，並依實際票價編列。</p> <p>5. 住宿費請按規定填寫欄位。</p> <p>6. 雜項費用欄位（一）名稱請勿直接填寫「雜支」，應更正其說明；依規定編列經費。</p> <p>7. 本計畫執行期程未逾 12 月 1 日，不予編列年終獎金，保險費應以行政管理費用支用。</p> <p>8. 差旅費請依據行政院 103 年 7 月 7 日公告之「國內出差旅費報支要點」編列。</p> <p>9. 如編列參加成果發表會之相關費用，單據日期需於計畫執行期程內，始得核銷</p> <p>10. 本計畫經費編列如有浮編不實之虞，期末檢具核銷審查未通過，將扣除該編列款項，不予以補助（或追繳）。</p>		<p>1. 已依照標準格式撰寫，確認表單及格式並未被刪除，各項次說明或表格亦無跨頁。</p> <p>2. 已刪除「專案主持人、協同主持人學經歷與相關研究說明—延續性計畫」之內容。</p> <p>3. 「消耗性器材費」已依建議修改，將原說明欄位之敘述移至項目名稱欄位，並於說明欄內說明其用途。</p> <p>4. 「差旅費」已依建議修改，填寫出差採樣之起訖地點。</p> <p>5. 無申請住宿費。</p> <p>6. 原「雜支」已更改為詳細項目。</p> <p>7. 已刪除專任助理之年終獎金，專任助理人員僱主負擔部分之勞工保險、全民健康保險，已依規定(由研究計畫人事費項下列支)列入預算。</p> <p>8. 差旅費已依據行政院 103 年 7 月 7 日公告之「國內出差旅費報支要點」編列。</p> <p>9. 感謝提醒。</p> <p>10. 感謝提醒。</p>		
技術性審查意見				

委員 1

1. 應先比較本計畫擬開發之穩定型奈米金屬釋氧顆粒和傳統使用之無機釋氧物質（例如： CaO_2 ）之釋氧能力。

1. 感謝委員之建議。針對本計畫擬定開發之穩定型奈米金屬釋氧顆粒與傳統使用之無機釋氧物質釋氧能力之比較方面，已將此建議納入計畫書第四章研究方法及步驟中的第 4.1.4 子章節中(第 35 頁)，預計將設計一可同時監測溶液 pH 與溶氧濃度之密閉反應器，比較探討穩定型奈米金屬釋氧顆粒與傳統使用之無機釋氧物質釋氧能力之差異，以作為本計畫開發之穩定型奈米金屬釋氧顆粒其基本特性之探討。

委員 2

1. 本計畫在於統整柴油污染場址生物整治之必要因素，創新開發具有整合多種生物刺激功能之「穩定型奈米金屬釋氧顆粒」添加劑，探討此添加劑對於柴油污染土壤及地下水生物降解之成效。同時，本計畫亦搭配分子生物技術創新建立一套能有效監測土壤柴油降解微生物降解效能之評估準則，了解土壤環境中實際作用於柴油降解之微生物。

2. 主持人曾參與相關計畫，其經驗可勝任本計畫之執行。本計畫之執行可提供未來國內油品污染場址評估生物復育成效及提升整體整治效率之有效生物刺激添加劑。

3. 本計畫具創新性，惟屬研究性質，對未來污染場址之應用性需再評估。

1. 本計畫目的如同委員所述，為開發具有整合多種生物刺激功能之「穩定型奈米金屬釋氧顆粒」添加劑與搭配分子生物技術創新建立一套能有效監測土壤柴油降解微生物降解效能之評估準則，嘗試應用作為未來油品污染生物整治之現地整治工法。

2. 感謝委員，本研究團隊將運用過往經歷執行本計畫書中所預計開發之項目。

3. 本計畫現階段仍以上述兩方面的技術開發為優先，也將評估實場應用性。

委員 3

1. 創新性污染整治技術

2. 研究流程與內容簡略未能明確呈現研究的重點與預期成果，內容著重奈米釋氧顆粒被置測試，對油品污染之土壤特性與研究設計說明不足。

1. 感謝委員。

2. 已於計畫書中，增加針對計畫內容提及之試驗場址(基隆市油品污染地)之土壤，調查此受污場址之土壤基本特性作為未來此新興技術實地應用時的參考依據。土壤基本特性分析細項與分析方法增列於計畫書第四章研究方法及步驟中的第 4.1.4 子章節 (第 39 頁)，

	包含土壤粒徑分析、pH、有機質含量、陽離子交換容量、鐵錳含量、含水率等基本特性之探討了解，並針對穩定型奈米金屬釋氧顆粒於此性質之油品污染土壤中的效用探討。
委員 4	
1. 計畫書撰寫完整詳細，材料與步驟具體可行。 2. 主持人對此主題有多年多篇論文之研究成果，預期會有良好的成果。 3. 消耗性器材費編列過多。	1. 感謝委員意見與肯定。 2. 感謝委員給予肯定。 3. 已將消耗性器材費編列進行刪減調整。
委員 5	
1. 建議彙整國內土壤柴油污染生物整治的限制因子（氧氣確實是限制因子？），評估釋氧物質是否確能改善目前國內柴油污染的瓶頸（關鍵因子之一是傳輸，本計畫對此限制因子並無改善之效）。 2. 釋氧物質的添加與傳輸應用方式建議討論。 3. 國內有關柴油污染生物整治的研究極多，建議先彙整國內相關經驗（尤其是實場	1. 感謝委員的意見。已增加蒐集國內土壤油污染生物整治的限制因子資料，並彙整增列於本計畫書之計畫背景頁 17 內附加說明。另感謝委員所提出的「傳輸」建議，本計畫所提出穩定型奈米金屬釋氧顆粒之開發策略，即為利用生物界面活性劑作為包覆奈米釋氧顆粒的穩定劑，使釋氧顆粒能長時間保持奈米尺度增加顆粒傳輸距離與釋氧利用性。 2. 本計畫中所預計開發的穩定型奈米金屬釋氧顆粒兼具釋氧、提供營養鹽、與增加 TPH 溶解度等目標，因此可否有效穿透土壤孔隙並與污染物及土壤微生物接觸確實為重要的課題。我們已蒐集過去探討其他奈米材料於多孔材料的傳輸效益資料，補充增列於計畫書中計畫背景頁 27 第 4.8 子節內附加說明。然而，本計畫內所述之穩定型奈米金屬釋氧顆粒仍處於開發階段，在一年期有限時程中將著重針對其材料本身投入大量的基礎特性了解與應用最佳化，而穩定型奈米金屬釋氧顆粒的添加與傳輸應用方式將會以文獻收集討論。 3. 感謝委員提供此建議，已於回覆項目 1 中彙整國內相關研究資料。

<p>整治的限制因子)。</p> <p>4. 本計畫與已執行的科技部計畫之間的相關性建議說明。</p> <p>5. 本計畫宜評估實場應用性，並與已商業化的產品比對，已商業化的產品極多，本計畫的可能研究成果與已商業化的產品比較的優勢為何？</p> <p>6. 實場上柴油污染的整治，菌相與菌株間的關係是關鍵？實務上有純菌株的應用？建議應評估本計畫的實場應用性。</p> <p>7. 人事費與耗材費編列過高。</p> <p>8. 聘請專任助理較不具培育學生參與土水計畫的意義。</p>	<p>4. 科技部計畫主要針對含鹵素持久性有機污染物，研發還原性奈米金屬與研討脫鹵基因與酵素等。分子生物技術與本計畫部分領域相關，但本計畫的主軸 TPH 氧化生物降解與穩定型奈米釋氧顆粒開發則完全不同。</p> <p>5. 本穩定型奈米釋氧顆粒仍屬開發階段，將嘗試比較自行開發合成之奈米釋氧顆粒與商業化產品間對於土壤 TPH 降解提升成效之差異。</p> <p>6. 本研究計畫內所提及之降解純菌株，其主要的試驗目的為了解穩定型奈米金屬釋氧顆粒之微生物生長抑制性與降解效率的促進程度，同時也將利用此類降解純菌株，建立未來可使用於實場中調查原生土壤微生物降解功能表現量之分子生物分析工具，並非一般生物添加策略的運用。</p> <p>7. 已將人事費與耗材費進行調整。</p> <p>8. 本計畫工作內容繁多且須奈米合成與分生專業技能之人員參與，並將由專任助理培訓學生參與此計畫，達到培育學生參與土壤及地下水整治計畫之用意，以利完成計畫。</p>
綜合性審查意見	計畫單位回覆
<p>原則同意所送計畫，請依審查意見提送修正計畫書。</p>	<p>已依審查意見修正計畫書。</p>

「105 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」

☐修正計畫書 ☒期中報告

☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究專案 <input type="checkbox"/> 模場試驗
計畫主持人	施養信	研究類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 評估 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 自訂
計畫名稱	研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油污染土壤之生物復育整治		
專案連絡人	張文齊	連絡專線	02-3366-9442
政策性審查意見		計畫單位回覆	
委員 1			
1. 已完成預定之工作項目和目標。 2. 奈米過氧化鈣在不同性質之柴油污染土壤（不同之有機質和柴油含量）之釋氧率及所需之施用量，應依各個土壤之氧氣需要量（soil oxygen demand）能先加以測試和探討。		1. 感謝委員。 2. 本計劃主要目的在研發穩定型奈米釋氧顆粒，現在仍繼續努力研發奈米顆粒並加強其穩定性中，希望可藉由穩定型奈米釋氧顆粒持續供應土壤微生物進行好氧分解柴油所需之氧氣。未來將會針對實驗樣品量測其氧氣需求量，依委員意見進行測試與後續探討。	
委員 2			
1. 本計畫開發穩定型奈米金屬釋氧顆粒添加劑，探討此添加劑對於柴油污染土壤及地下水生物降解之成效。本計畫亦搭配分子生物技術建立監測土壤柴油降解微生物降解效能之評估準則，以期研發低成本高效益的生物復育方式。 2. 建議針對操作成本進行評估，並和目前使用方法比較。 3. 建議針對使用之限制、使用時機及使用條件進行說明。 4. 後續須評估此技術在實場應用之可行性。 5. 主要成果符合計畫書之內容，目前進度並無落後情形。		1. 感謝委員。 2. 將於期末報告中針對操作成本進行評估與計算，並和目前使用方法比較分析，期望可縮短處理時程與提高處理能力。 3. 將會於期末報告綜合實驗成果，如穩定奈米釋氧顆粒之微生物抑制分析、釋氧率與降解率等，討論使用之限制、時機及條件。 4. 感謝委員意見。後續將進行評估此技術應用於實場之可行性分析。 5. 感謝委員。	

委員 3	
1. 請具體完整說明研究設計與綜合初步成果。	1. 感謝委員建議。研究設計已於第四章研究方法與過程(p.33-p.40)，另獨立出結論說明綜合初步成果於 5-11。
2. 後續工作？	2. 感謝委員建議。已獨立出後續工作於 5-12。
委員 4	
1. 已依計畫進度及項目執行。	1. 感謝委員。
2. 已完成初步結論、成果自評及後續工作說明(目前寫在第59頁建議中)，預期可達成計畫目標。	2. 感謝委員肯定。
委員 5	
1. 執行現況、流程及方法已說明。	1. 感謝委員。
2. 計畫後續執行工作項目已說明。	2. 感謝委員。
3. 計畫執行進度與預定進度相符，本計畫至期中報告時執行進度並無落後。	3. 感謝委員。
4. 已有初步成果，初步成果與原計畫目標符合。	4. 感謝委員。
5. 至期中報告時，整體研究成果符合預期。	5. 感謝委員。
6. 已有初步研究成果，且已有初步討論。但對於成果的實務應用與潛在應用性仍待於期末報告時有更進一步的討論。	6. 感謝委員意見。對於成果的實務應用與潛在應用性，將於期末報告討論。
7. 研究內容與計畫目的相符，但研究成果的實務應用性仍待期末時具體討論。	7. 感謝委員意見。研究成果的實務應用性將於期末具體討論。
8. 除非證明”菌相”是柴油污染整治的限制因子，否則，將柴油生物整治的重點放在菌相的評估上並不切實際（國內的實場柴油污染生物整治成功的場址，幾乎不必評估是否有所謂的”柴油分解菌”）。	8. Adams <i>et al.</i> (2015)指出評估柴油分解菌也需考慮，因柴油污染整治也受限於微生物之菌種。雖然目前生物整治於受柴油污染之土壤，多需要以補充氧氣及養分為主，未來可望藉由分析柴油分解菌菌相，因時因地調整復育工法以加速整治。
9. 偵測特殊降解菌株的意義為何？有實務應用上的必要性？	9. 降解柴油之微生物之存在與否以及其活性將決定生物復育之成敗與時間，建立分析菌株方法與指標有實務上的重要性，更能有效解決受柴油污染土壤之復育。
10. 本計畫所使用的釋氧物質與商業產品是一樣的，宜說明本研究的意義。	10. 目前整治公司以翻攪混拌或灌入方式將商用釋氧物質添加於受污場址中，而這些商用釋氧物質皆為大顆粒，因無法於土壤中傳

	<p>輸，所以效果有限。本計劃主要合成穩定奈米級釋氧顆粒，一方面希望其細小顆粒可於土壤中傳輸，另一方面可穩定於水中，方便傳佈，再藉由其持續釋氧供應土壤微生物進行好氧分解柴油所需之氧氣，可望解決深層土壤或地下水中氧氣不足、降解效率低等問題。</p>
本署審查意見	
<p>1. 請更正專案基本資料表之經費並填寫日期。</p> <p>2. 請增加後續工作說明。</p>	<p>1. 感謝委員意見，已更正。</p> <p>2. 感謝委員意見。已獨立出後續工作於 5-12。</p>

「105 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」

☐修正計畫書 ☐期中報告

☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究專案 <input type="checkbox"/> 模場試驗
計畫主持人	施養信	研究類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 評估 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 自訂
計畫名稱	研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油污染土壤之生物復育整治		
專案連絡人	楊千瑩	連絡專線	02-3366-9442
政策性審查意見		計畫單位回覆	
委員 1			
1. 研究結果詳實，馴養後的微生物經實驗驗證已確定其柴油降解能力，而奈米釋氧顆粒過氧化鈣的添加也能夠確實提高柴油降解效率。然而實際應用之效果仍需進一步的實場實驗驗證，建議研究團隊對於往後柴油污染場址實場整治，能夠進一步提供驗證策略。		1. 感謝委員的建議，未來希望可有機會再獲補助執行實場驗證。土壤因地而異，實需進一步的透過現地實驗來進行了解顆粒的傳輸性、穩定性及釋氧能力，以利得知所合成的奈米過氧化鈣是否穩定於水中溶液提供微生物降解柴油所需要之氧氣，提升微生物生長並加速柴油的降解。	
委員 2			
1. 本計畫的目的在於統整柴油污染場址生物整治之因素，開發具有整合多種生物刺激功能之「穩定型奈米金屬釋氧顆粒」添加劑，探討此添加劑對於柴油污染土壤及地下水生物降解之成效。		1. 目的已達成，所合成之奈米金屬釋氧顆粒較小，也相對地穩定，添加後對於柴油降解菌在柴油降解上也有效果。	
2. 請進行成本分析，比較本技術和其他技術是否具成本上的優勢。		2. 已於5-12建議說明整治方式之成本及比較，生物復育技術常見的離場生物復育技術有土耕法(land farming)及生物堆法(biopiles)，整治時程約為六個月到兩年不等，整治費用分別為US\$ 30-60/ton (USEPA, 2004)與US\$ 30-90/ton (USEPA, 2004)；現地土壤氣體抽除法在理想情況下，成本處理約US\$ 10-50/ton；一般開挖處理法(excavation)的開挖與處置成本約US\$ 300-510/ton之間....。本試驗使	

<p>3. 請說明本技術在實場應用時，如何進行設計、規劃。.</p> <p>4. 請說明本技術用於實場整治可能在環境上受到的干擾問題。</p>	<p>用微奈米等級顆粒的過氧化鈣處理，以雲林汙染土為例，原始土壤含氧量約5.0 O₂ mg/L水溶液需較高的需氧量計算過氧化鈣所需濃度約 1%，整治費用約US 53/ton，但利用接種自受汙染土壤既存之微生物菌群可增加降解的生物量並縮短生物修復處理過程，提高生物修復效率的良好刺激條件。相較於其他整治方法是較低的且所需技術和設備較少，應具有成本上及操作上的優勢。</p> <p>3. 進行實場應用評估了解現地適合執行現地生物復育法後將可進行進一步的規劃。在使用上可將過氧化鈣顆粒利用監測井進行傳輸，透過溶氧度計的監測來了解地下水中的溶氧濃度，得以進一步的探討過氧化鈣的添加最適比例以及需要再次進行添加的天數。操作階段透過監測井了解地下水流向、水位、流速、水質(pH、導電度、溶氧、無機離子)，柴油降解濃度等進行監測，了解降解的效益。</p> <p>4. 土壤及地下水環境較為複雜，預期顆粒會因土壤顆粒、有機質、陰陽離子濃度、pH、溫度、還原物質、水流速、水流方向等因素干擾。</p>
<p>委員 3</p>	
<p>1. 建議對於本計畫成果之實務應用特性，應有專章節予以討論或說明，以確認本成果之未來應用性。</p>	<p>1. 已於 5-12 建議加入實務應用討論。現地生物復育法適用於土壤質地較粗的土壤、生物的背景大於 1000 CFU/g-soil、柴油濃度小於 50000 ppm、重金屬小於 2500 ppm、pH 介於 6 至 8 左右、地下水溫度介於 10 至 45 °C、好氧降解下溶解態鐵需小於 10 mg/L，在此條件下會有較佳的效益。操作階段可透過監測井了解地下水流向、水位、流速、水質(pH、導電度、溶氧、無機離子)，柴油降解濃度等</p>

<p>2. 計畫研發之奈米過氧化鈣顆粒物質之殘餘率為何?未來實場應用時,奈米物質對環境之影響性為何?</p>	<p>進行監測,了解其應用於降解的效益。</p> <p>2. 理論上,奈米過氧化鈣完全釋氧後,轉變成氫氧化鈣,應該無殘餘過氧化鈣的問題。然而透過排水集氣法結果計算,1克的過氧化鈣應可產生 170 毫升的氧氣,但試驗結果在兩天後,氧收集的氣體為 5 毫升便不再持續上升,但因氣體壓縮與溶解於水之不確定性,無法精確計算其殘餘率。然而奈米過氧化鈣顆粒在兩種土壤水溶液試驗結果發現,隨天數增加溶氧量一樣維持約 3.6 O₂ mg/L, Untreated soil solution 則從起始溶氧量就維持至 14 天,21 天後兩土壤水溶液溶氧量微下降但維持定值。結果顯示過氧化鈣持續的緩慢釋放氧氣提供微生物進行降解,所以排水集氣法的結果可能受到氣體可壓縮性的影響進而影響了精確性。奈米物質將可具有更佳分散性及穩定性,但在環境複雜影響因子的作用下會緩慢的聚集沉降成為大顆粒,轉變成 Ca(OH)₂ 可能會使得廠址之 pH 上升、鈣離子濃度提高。本次試驗也將其與微生物共同培養,對微生物具有生長促進的功能,不具毒性。</p>
<p>3. 添加奈米過氧化鈣之含量為何?當劑量不同其釋氧率是否會影響降解效率?如何決定最佳之添加比例?建議應予以討論說明。</p>	<p>3. 實驗加入的過氧化鈣分別為 0.1% 及 0.01%,即 100 毫升水溶液分別加入 0.1 克和 0.01 克。根據結果,於相同的柴油量下,過氧化鈣 0.1% 培養下會有較佳的最終菌數,柴油降解的效率也較高。因此,在較高的釋氧率下也會有較佳的降解效率。以本次實驗 Basic medium 為例,柴油降解菌群在添加 0.01% 和 0.1% 奈米過氧化鈣後,其降解速率分別為 0.016 /day 與 0.073 /day,反應速率在添</p>

	<p>加比例差異 10 倍下可提高 4 倍。最佳添加的比例部分，可先透過溶氧度計監測其中含氧量並考慮降解所需氧量，進一步地計算所需添加的過氧化鈣量來達到最佳的降解效率，如 5-12 建議處之雲林汙染土為例，原始土壤含氧量約 5.0 O₂mg/L 水溶液需較高的需氧量計算過氧化鈣所需濃度約 1% 的效率。</p>
委員 4	
<p>1. 研究內容與計畫目的相符，且整體研究成果符合預期，請補充說明發表論文之相關內容或進度。</p> <p>2. 請說明後續實場應用的可行性與經濟效益分析。</p>	<p>1. 謝謝委員。論文主要研討合成之奈米過氧化鈣，包含不同製備方法比較與對降解之效益等，已投稿於 Journal of hazardous materials 國際期刊。</p> <p>2. 5-12 建議以進行和其他整治方法經濟效益分析及實場應用可行性的評估，目前多樣的生物復育技術常見的離場生物復育技術有土耕法(land farming)及生物堆法(biopiles)，整治時程約為六個月到兩年不等，整治費用分別為 US\$ 30-60/ton (USEPA, 2004) 與 US\$ 30-90/ton (USEPA, 2004)；現地土壤氣體抽除法在理想情況下，成本處理約 US\$ 10-50/ton；一般開挖處理法（excavation）的開挖與處置成本約 US\$ 300-510/ton 之間....。本試驗使用微奈米等級顆粒的過氧化鈣處理，以雲林汙染土為例原始土壤含氧量約 5.0 O₂ mg/L 水溶液需較高的需氧量計算過氧化鈣所需濃度約 1%，整治費用約 US 53/ton。尤其若利用接種自受汙染土壤既存之微生物菌群更可增加降解的生物量並縮短生物修復處理過程，提高生物修復。</p>
委員 5	
<p>1. 執行現況、流程及方法說明具體</p> <p>2. 計畫後續執行工作項目及內容已說明</p> <p>3. 計畫執行進度與預定進度相符</p>	<p>1. 感謝委員。</p> <p>2. 感謝委員。</p> <p>3. 感謝委員。</p>

<p>4. 整體研究成果符合預期</p> <p>5. 根據研究內容所提出之討論與建議合理，但部分成果的解讀與應用條件建議進一步討論</p> <p>6. 研究內容與計畫目的相符</p> <p>7. 研究成果具體:主要是論文發表</p> <p>8. 研究成果的說明建議以實務操作參數加以探討，例如：報告中說明本技術可於現地操作，但現地操作的主要應用參數(氧氣供應條件(需多高的氧分壓?)、降解速率、中間產物、吸附與脫附...等等)仍建議具體說明討論</p> <p>9. 本技術的應用或是適用條件(例如：柴油濃度值的建議...等)? 建議說明討論</p>	<p>4. 感謝委員。</p> <p>5. 已於5-12建議處已增加進一步的討論。如同給前面委員之回覆，簡言之，本次合成之奈米過氧化鈣將可應用於具有微生物降解能力的污染場址，添加後得以進一步的促進微生物生長，縮短復育時間來降低成本，相對土耕法、生物堆肥法、土壤氣體抽除法以及一般開挖法，其所需要的成本相對較低，程序步驟也相對較簡單。</p> <p>6. 感謝委員。</p> <p>7. 本次研究之內容已投稿於國際論文。</p> <p>8. 成果及說明已加入 5-12 建議的部分進行討論，透過溶氧度計得以進一步的了解地下水的溶氧量，一般溫度下水之飽和氧氣溶解度約為8-9 mg/L。以建議的例子為例，在5 mg/L的土壤中需添加濃度 1%的過氧化鈣，進一步提升微生物的生長量。以本次實驗 Basic medium 為例，柴油降解菌群與添加 0.01%和 0.1%奈米過氧化鈣後，其降解速率分別為 0.016 /day 與 0.073 /day。柴油為碳數介於9 到 25 之間的碳氫混合物，於結果 5-7 小節中，微生物降解柴油的 GC 圖可以看到，碳數小於 12 的 peak 明顯減小，顯示低碳數碳氫化合物的明顯降解。吸附於土壤之柴油可能可透過微生物菌群產生的生物界面活性分子協助其脫附出來，使得降解柴油的效益提高，達到完成復育及降低成本。</p> <p>9. 由本次柴油降解實驗，柴油濃度在 2000 ppm 以下，所用之菌群皆可進行柴油降解，另外，根據文獻(盧至人, 2004)，此法適用於土壤質地較粗的土壤、生物的背景大於 1000 CFU/g-soil、柴油濃度小於 50000 ppm、重金屬小於 2500 ppm、pH 介於 6 至 8 左右、地下水溫度需介於 10-45 °C、溶解態鐵小於 10</p>
--	---

<p>10. 報告中說明可能的二階段生物分解是物理性(例如溶解)的限制?或是生物性的限制?</p> <p>11. 以國內的經驗而言，何種條件下的柴油分解需額外添加菌株?</p> <p>12. 以克服限制因子而言，生物堆攪拌或是添加過氧化鈣較適合實場? 其必要條件建議說明(例如: p. 69說明”...無差異性...”, 本研究的價值何在?)(為改善柴油分解而添加大量的添加物，如過氧化鈣或菌株，其意義為何? 與未添加菌株的原生菌比較，添加的效益顯著否?)</p> <p>13. 本計畫已有具體的研究成果，但是土污基金模場計畫應是以應用性為主，本研究的成果如何應用? 應用的條件為何? …等等，建議說明</p>	<p>mg/L，在此條件下會有較佳的效益。</p> <p>10.兩階段生物分解應屬於生物性的限制，在柴油降解過程於第二階段為進入遲滯期前添加入過氧化鈣以提升氧氣含量，促使遲滯期縮短來達到縮短時間，提升效益並降低成本。</p> <p>11.在菌株含量過低的情況下，如微生物的背景小於 1000 CFU/g-soil，適時的添加入柴油降解菌，可進一步的提升柴油降解的效益，然而一般而言，以改善現地環境因子先觀察能否促使現地原生菌生長為先行策略(盧至人, 2004)。</p> <p>12.對於可開挖之實場，透過生物堆攪拌將土壤挖出，再進行菌株添加、多次翻堆及曝氣，可較易均勻反應，但成本較高。然而奈米釋氧物質可以透過直接添加，若具有好的傳輸力而提升欲降解處的溶氧量，可能可以達到較低成本但可高效率的成果。在 p. 69 的 shaking 組與添加過氧化鈣沒有差異，說明透過搖晃也可使得空氣中的氧氣溶解到水中，然而實場無法以搖晃的方法來達到良好的氣體交換。在菌株含量過低的情況下，適時的添加入柴油降解菌，可進一步的提升柴油降解的效益。土壤中經過馴養也有可以降解柴油的原生菌，但需要長時間 241 天後可分別將添加柴油濃度 2000 ppm 的復育土降低至 23.9 ppm，高汙染土則是 112.4 ppm，然而透過菌株加入後，可以加快柴油降解的速率。添加入菌群和過氧化鈣後，則可於 21 天將柴油降解至 100 至 200 ppm 左右。</p> <p>13.已將研究成果及實際應用條件加入 5-12 建議，實場應用上，透過奈米釋氧物質添加，進而提升欲降解處的溶氧量來提升降解效益。本次研究成果對應於現地生物復育法，即在土壤質地較粗的土壤(砂土、壤土)、柴油濃度小於 50000 ppm、重金屬小於 2500 ppm、pH 介於 6 至 8 左右、地下水溫度介於 10-45 °C、溶解態</p>
---	---

	<p>鐵小於 10 mg/L。另外在菌株含量過低的情況下，適時的添加入柴油降解菌，可進一步的提升柴油降解的效益。由於所申請計畫類型為研究專案，非模場試驗，希望未來有機會於實場進行試驗。</p>
--	--

專案基本資料表

專案性質		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別(單選)		<input checked="" type="checkbox"/> 研究專案 <input type="checkbox"/> 模場試驗	
研究主題		<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 評估 <input type="checkbox"/> 自訂					
申請機構系所		國立臺灣大學農業化學系					
機構地址		台北市大安區羅斯福路四段 1 號					
計畫主持人		施 養 信		職等／職稱		教 授	
協同主持人				職等／職稱			
專案 名稱	中文	研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油污染土壤之生物復育整治					
	英文	Development of the stabilized oxygen-releasing nanoparticles to improve the bioremediation for the diesel oil-contaminated soil					
	關鍵字	穩定型奈米金屬釋氧顆粒、柴油、生物分解、界面活性劑、分子生物技術					
執行期程		<input checked="" type="checkbox"/> 1 年期 <input type="checkbox"/> 2 年期（第____年） <input type="checkbox"/> 3 年期（第____年） 自民國 104 年 11 月 17 日 起至民國 105 年 11 月 16 日 止					
計畫主持人		姓名：施 養 信 Email: yhs@ntu.edu.tw 專線：02-3366-9443 手機：0930-105-629					
專任助理		姓名：張文齊 Email: r99625058@ntu.edu.tw 專線：02-3366-9443 手機：0933-512-438					
經費 分析 總 表	專 案 預 估 經 費			金 額		編列說明	
	1.	人事費用		484,272		（1~5 項相加之 50% 為限）	
	2.	貴重儀器使用含維護費		0		（與計畫實驗相關）	
	3.	消耗性器材與主要費用		457,300		（與計畫主體相關）	
	4.	其它研究相關費用		4,500		（差旅與租賃費用）	
	5.	雜支費用		23,019		（1~6 項相加之 5% 為限）	
	6.	行政管理費		96,909		（1~5 項相加之 10% 為限）	
	專案計畫申請總金額			1,066,000		（多年期計畫請列全程經費）	

專案主持人（簽名及蓋章）：_____日期：_____

一、多年期計畫各年度經費分析表

第 1 年申請經費：

專 案 預 估 經 費		金 額	編列說明
1.	人事費用	484,272	(1~5 項相加之 50%為限)
2.	貴重儀器使用含維護費	0	(與計畫實驗相關)
3.	消耗性器材與主要費用	457,300	(與計畫主體相關)
4.	其它研究相關費用	4,500	(差旅與租賃費用)
5.	雜項費用	23,019	(1~6 項相加之 5%為限)
6.	行政管理費	96,909	(1~5 項相加之 10%為限)
申請總金額		1,066,000	

第 2 年申請經費：

專 案 預 估 經 費		金 額	編列說明
1.	人事費用		(1~5 項相加之 50%為限)
2.	貴重儀器使用含維護費		(與計畫實驗相關)
3.	消耗性器材與主要費用		(與計畫主體相關)
4.	其它研究相關費用		(差旅與租賃費用)
5.	雜項費用		(1~6 項相加之 5%為限)
6.	行政管理費		(1~5 項相加之 10%為限)
申請總金額			

第 3 年申請經費：

專 案 預 估 經 費		金 額	編列說明
1.	人事費用		(1~5 項相加之 50%為限)
2.	貴重儀器使用含維護費		(與計畫實驗相關)
3.	消耗性器材與主要費用		(與計畫主體相關)
4.	其它研究相關費用		(差旅與租賃費用)
5.	雜項費用		(1~6 項相加之 5%為限)
6.	行政管理費		(1~5 項相加之 10%為限)
申請總金額			

研究成果中文摘要

本計畫的主要目的在於統整柴油污染場址生物整治之必要因素，創新開發具有整合多種生物刺激功能之「穩定型奈米金屬釋氧顆粒」添加劑，探討此添加劑對於柴油污染土壤及地下水生物降解之成效，嘗試提出未來可廣泛應用於柴油污染場址之釋氧顆粒，並搭配分子生物技術能有效監測土壤柴油降解微生物降解效能，以期研發低成本高效益的生物復育方式。

目前已備製多種過氧化鈣(Calcium peroxide, CaO_2)，以動態光散射儀(dynamic light scattering, DLS)量測平均粒徑，其顆粒分布範圍主要在 10-1,000 nm 之間，PDI 值為 0.267，顯示透過研磨並添加分散劑後過氧化鈣顆粒可以有效的分散並不再聚集，其中以 Wet-grinded- CaO_2 平均粒徑為最小(123.2 nm)。在柴油降解微生物方面，已篩選出一些具柴油降解能力之混菌，以 Basic medium 添加柴油(1,000 ppm) 35°C 培養 14 天，與國內文獻報導之最佳柴油分解菌 *Gordonia alkanivorans* (CC-JG39)相比較，去除效率分別為 71.9% (effective microorganisms, EM)及 61.8%(CC-JG39)。土壤降解初步結果，以復育土所馴養微生物亦有柴油降解的情形，顯示原生菌群中已具有可分解柴油之微生物，經馴養後可經由降解實驗驗證其降解能力。在分子生物監測技術之建立上，利用聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)偵測使用的 EM 菌確實存在特定柴油降解基因，進一步配合變性梯度明膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)進行菌群結構分析，菌種豐富度隨復育天數上升之而後因主要碳源之柴油濃度下降後而菌種隨之下降。藉本土菌篩選出具有柴油降解之特殊菌群，並配合穩性奈米過氧化鈣的處理，以及整合分子生物資訊的對應關係，希冀未來可提供學界、產業界與土壤及地下水整治的新策略。

研究成果英文摘要

There were some problems in bioremediating the petroleum hydrocarbon contaminated soils, such as low contaminant degradation rate and limited degradation amounts. The objective of this project is to establish a cost-effectiveness technique for enhancing the efficiency of bioremediation by developing novel stabilized oxygen-releasing nanoparticles (SORNPs), which would mitigate the deficiency of microbial demands. On the other hand, genetic tool would also be developed to evaluate potentials of microorganisms in the biodegradation processes.

We have synthesized several oxygen-releasing calcium peroxide (CaO_2) particles by wet synthesis methods and grinding method (both wet or dry). Their particle sizes were ranged from 10-1,000 nm according to the measurement by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The Wet-grinded CaO_2 particle has the smallest in size (123.2 nm) and was most stable. The diesel degradation percentage of our mix culture (Effective Microorganisms, EM) was 71.9% compared to the 61.8% of the pure culture (CC-JG39) which the sampling point was at day 14 and the degradation experiments were performed at 35°C using basic medium with 1,000 ppm of diesel as the main carbon source. The microorganisms in the mix culture also presented diesel degrading abilities in the treated soil. All these results indicated the possible presence of diesel degrading microorganisms in the mix culture. We further prove the existence of diesel degrading related genes and microorganisms in our mix culture using gene specific primers and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE data suggested the species in the consortium increased with the increase of carbon source during remediation and decreased with the depletion of carbon source. Our results demonstrated that the screened microbial consortium showing diesel degradation property could have great interest to academic and industry when combining its usage with our stable CaO_2 nanoparticles in terms of diesel degradation in soil and under water remediation.

行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會
土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

105 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：105 年 10 月 03 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input checked="" type="checkbox"/> 研究專案 <input type="checkbox"/> 模場試驗
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 評估 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 自訂		
申請機構系所	國立臺灣大學農業化學系	計畫主持人	施養信
專案名稱	研發穩定型奈米釋氧顆粒以應用於受柴油污染土壤之生物復育整治		
專案執行期程	<input checked="" type="checkbox"/> 1 年期 <input type="checkbox"/> 2 年期 <input type="checkbox"/> 3 年期	查核點	<input type="checkbox"/> 申請 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 期末

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於「結案達成數」欄位中。

(一) 學術面

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術產出發表日期、發表處、發表名稱、影響指數等)
A 學術產出及活動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	2		2		
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1		1		
		(2)研討會論文	1		1		
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告	1	1	1		
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術						
	(2)技術平台						
B 人才培育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	1	1	1		
		(2)博士					
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
		(4)形成實驗室	1	1	1		
	9. 其他指標						

(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專 利、技術轉移相關詳細資 料)
A 智慧財產權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申 請 中	發明					
			新型/設計					
			合計					
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍 生 利 益 金 (仟 元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金 (仟元)						
	4.技術移轉 (應用技 術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍 生 利 益 金 (仟 元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
		(2)品種/系(件數)						
C 產學研合作	6.促成合作 研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額 (仟元)						
	8.促成取得 業界科專	件數						
		業界投資金額 (仟元)						
9.其他指標								

(三) 政策面

項目 \ 目標達成程度		申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數				
		收入(仟元)				
	2.諮詢服務	次數				
		收入(仟元)				
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策				
		(2)法規				
		(3)規範				
		(4)標準				
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)					
	5.獲得獎項(件數)					
	6.提升能源效率(%)					
	7.節能減碳效率(%)					
8.其他指標						

三、請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果對現況或本署之學術或應用價值。

學術研究方面，在國內外環境科學領域中，將可提昇穩定型奈米金屬釋氧顆粒之研發，及應用於微生物處理土壤環境中柴油污染之分子生物技術。完成穩定型奈米金屬釋氧顆粒在環境應用之最新相關文獻收集與彙整，探尋穩定型奈米金屬釋氧物質最佳合成條件並提供在去除柴油之反應機制之最新學理探討。完成柴油分析技術之建立，探討環境之菌種與降解基因，評估添加微生物、穩定型奈米金屬釋氧物質對現有微生物降解柴油之影響。提昇生物科技應用於環境中之效益，與了解環境微生物與穩定型奈米金屬釋氧物質加成後降解柴油之能力，及其對土壤污染復育工程之貢獻與影響。

國家發展及其他應用方面，釐清穩定型奈米金屬釋氧物質對於處理柴油之影響，以及與土壤中微生物之反應機制，有助應用在柴油污染或其他有機污染物污染的土壤環境復育上，使國內環保之範疇進入生物科技與奈米科技等級。增加國內相關科技研發之動能，擴大環境微生物基因研究方向之廣度。培養學生參與基礎研究之技能與應用科學之興趣，為國家高等人力之發展提供寶貴資源。

目錄

第一章 前言	1
第二章 研究目的	3
第三章 文獻探討	5
3-1 石油與柴油基本性質	5
3-2 全球與台灣受 TPH 污染之情形	7
3-3 TPH 各種處理方法、限制與成效	10
3-4 界面活性劑處理土壤污染場址	14
3-5 高含氮廢棄物回收再利用	22
3-6 無機釋氧物質種類、機制與應用	24
3-7 TPH 降解微生物與降解機制	26
3-8 奈米顆粒之傳輸效率	29
3-9 利用生化與分子生物學探討微生物降解石油之機制	29
第四章 研究方法與過程（含工作進度甘特圖）	32
4-1 試劑與材料	32
4-2 穩定型奈米過氧化鈣釋氧顆粒製備	32
4-3 奈米過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分佈檢測	32
4-4 奈米過氧化鈣釋氧顆粒之基本物化特性分析	34
4-4-1 穿透式電子顯微鏡 (TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE, TEM) ...	34
4-4-2 X 光粉末繞射儀 (X-RAY POWDER DIFFRACTOMETER, XRD)	34
4-5 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之聚集特性	35
4-6 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之沉降特性	35
4-7 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之釋氧率量測	35
4-8 柴油分析	35
4-8-1 液相液相萃取 (LIQUID-LIQUID EXTRACTION)	35
4-8-2 柴油分析條件	35
4-9 水介質中奈米過氧化鈣對柴油溶解量之影響	36

4-10 添加溶液特性	36
4-11 土壤樣本	36
4-12 生物抑制毒性之評估	37
4-13 可降解柴油微生物之篩選試驗	37
4-13-1 可降解柴油微生物之土壤水溶液試驗	37
4-13-2 柴油降解微生物在土壤之馴養試驗.....	37
4-14 添加溶液對微生物降解柴油效能分析	37
4-15 分子生物學方法分析菌相	38
4-15-1 微生物 DNA 之萃取	38
4-15-2 聚合酶連鎖反應 (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR).....	38
4-16 研究進度及預期完成之工作項目 (甘特圖)	40
第五章 結果與討論 (含結論與建議)	42
5-1 過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分析與製備	42
5-2 顆粒之基本物化特性分析.....	45
5-2-1 光學顯微鏡與電子顯微鏡影像	45
5-2-2 X 光粉末繞射儀圖譜.....	47
5-3 過氧化鈣顆粒於溶液中的聚集沉降特性	51
5-4 過氧化鈣顆粒之釋氧速率.....	52
5-5 過氧化鈣顆粒對柴油水中含量之影響	54
5-6 氧化鈣釋氧顆粒對生物毒性之評估	55
5-7 微生物降解柴油試驗.....	56
5-7-1 可降解柴油微生物之柴油降解試驗	56
5-7-2 過氧化鈣添加對可降解柴油微生物生長影響試驗	58
5-8 添加過氧化鈣之微生物土壤水溶液試驗.....	59
5-8-1 汙染土壤基本性質分析結果	59
5-8-2 pH 與溶氧之監測.....	59
5-8-3 不同培養基溶液與添加過氧化鈣之微生物降解柴油結果	62
5-9 微生物降解柴油之土壤試驗	63

5-9-1 馴養之土壤微生物降解柴油	63
5-9-2 添加溶液特性分析與其對土壤微生物降解效應之影響	65
5-10-1 分子生物監測系統建立	66
5-10-2 PCR 增幅作用後進行序列分析	67
5-10-3 應用分子生物監測微生物多樣性及菌群消長	68
5-11 結論	69
5-12 建議	70

參考文獻

圖目錄

圖 3-1 Rhamnolipid、trehalolipid 和 sophorolipid 之化學結構圖	18
圖 3-2 Surfactin 之化學結構圖	19
圖 3-3 Emulsan 之化學結構圖	19
圖 3-4 降解烷烴類石油碳氫化合物之微生物酵素作用途徑	26
圖 3-5 降解芳香族類石油碳氫化合物之微生物酵素作用途徑	28
圖 5-1 Commercial B-CaO ₂ (B)粒徑分佈圖	43
圖 5-2 Aldrich-CaO ₂ (C)粒徑分佈圖	44
圖 5-3 CTAB-CaO ₂ (D)粒徑分佈圖	44
圖 5-4 PEG 200-CaO ₂ (E)粒徑分佈圖	44
圖 5-5 Dry-grinded 30 min CaO ₂ (I)粒徑分佈圖	45
圖 5-6 Wet-grinded CaO ₂ (J)粒徑分佈圖	45
圖 5-7 Commercial A-CaO ₂ (A)光學影像圖	46
圖 5-8 Commercial B-CaO ₂ (B)光學影像圖	46
圖 5-9 CTAB-CaO ₂ (D)光學影像圖	46
圖 5-10 PEG-CaO ₂ (E)光學影像圖	47
圖 5-11 Wet-grinded CaO ₂ (J)電子顯微鏡影像圖	47
圖 5-12 Commercial A-CaO ₂ (A)之 XRD 圖譜	48
圖 5-13 CTAB-CaO ₂ (D)之 XRD 圖譜	48
圖 5-14 PEG-CaO ₂ (E)之 XRD 圖譜	48
圖 5-15 TX-100-CaO ₂ (F)之 XRD 圖譜	49
圖 5-16 Wet-grinded CaO ₂ (J)之 XRD 圖譜	49
圖 5-17 Commercial A-CaO ₂ (A)之 FTIR 圖譜	50
圖 5-18 Commercial B-CaO ₂ (B)之 FTIR 圖譜	50
圖 5-19 PEG-CaO ₂ (E)之 FTIR 圖譜	50
圖 5-20 Wet-grinded-CaO ₂ (J)之 FTIR 圖譜	51
圖 5-21 Commercial A (A)與 Commercial B-CaO ₂ (B)隨時間沉降之結果	51
圖 5-22 Wet-grinded CaO ₂ (J)粒徑隨時間之變化情形	52
圖 5-23 Wet-grinded CaO ₂ (J)隨時間之沉降變化	52
圖 5-24 Commercial B-CaO ₂ (B) 釋氧量與時間關係	53
圖 5-25 Aldrich-CaO ₂ (C)顆粒釋氧量與時間關係	53

圖 5-26 合成之 PEG-CaO ₂ (E)合成後以不同方法清洗釋氧量與時間關係	53
圖 5-27 Wet-grinded CaO ₂ (J)釋氧量與時間關係	54
圖 5-28 不同過氧化鈣釋氧顆粒對柴油於水中溶解量之影響.....	54
圖 5-29 三種氧化鈣釋氧顆粒對於柴油分解菌株生長之影響.....	55
圖 5-30 Commercial B-CaO ₂ 及 Wet-grinded CaO ₂ 對於 EM 菌株生長之影響	56
圖 5-31 微生物降解 1,000 ppm 柴油之 Basic medium 試驗	57
圖 5-32 Commercial B-CaO ₂ 濃度對於不同柴油分解菌降解柴油能力之影響	58
圖 5-33 兩種不同濃度 Commercial B-CaO ₂ 對不同柴油分解菌生長之影響	59
圖 5-34 不同培養基溶液與添加過氧化鈣處理之 pH 值與溶氧分析.....	61
圖 5-35 不同培養基溶液與添加過氧化鈣對微生物降解柴油試驗結果.....	63
圖 5-36 馴養 241 天後土壤微生物降解 2,000 ppm 柴油之結果	64
圖 5-37 土壤微生物降解 2,000 ppm 柴油之 GC 圖譜.....	65
圖 5-38 添加溶液對土壤微生物降解效應之影響.....	66
圖 5-39 16s rRNA 之 DNA 序列進行 PCR 增幅所得到的產物結果	67
圖 5-40 Basic medium 中柴油降解測試在不同處理天數的菌相變化.....	69

表目錄

表 3-1 石油中的成份分類表.....	5
表 3-2 各油品的沸點及碳數分佈.....	6
表 3-3 環保署於 2010 年公告的國內土壤及地下水受 TPH 污染之整治場址.....	9
表 3-4 環保署於 2010 年公告的國內土壤及地下水受 TPH 污染之整治場址(續).....	10
表 3-5 常見的石油碳氫化合物降解酵素。.....	28
表 4-1 GC/ FID 之操作參數	36
表 4-2 PCR 反應試劑配方	38
表 4-3 PCR 反應溫度程序	39
表 5-1 不同奈米過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分析.....	43
表 5-2 選用於增幅特定降解酵素基因之引子.....	66

第一章 前言

總石油碳氫化合物 (total petroleum hydrocarbon, TPH) 的涵蓋範圍很廣，舉凡日常生活上所使用之汽油、柴油、燃料油、潤滑油、機油等皆是。由於石化工業的盛行與交通運輸方面的需求日增，全球對石油的使用仍有增無減。國內近年來開放油品進口及加油站民營化，汽機車的普及也快速成長，因此國內對汽油、機油、潤滑油的需求也大幅增加。然而在開採、運送、儲存、產製石化相關原料的過程中，因人為、設備失誤或交通意外而引起工業事故，常導致大量之油品或石化相關物質洩漏至環境中。近年來全球油污事件頻傳，人類賴以生存的土壤、水體及空氣接受到不一的污染。這些事件不僅造成當地環境生態一時的嚴重污染，多年後受污染的區域仍無法恢復往日生機，而且有毒物質透過土壤種植、水體流佈、食物鏈累積，最終將直接危害人類。

油污難溶於水，因此不易從受污的土壤環境中分離出來。以國內土壤及地下水受油污污染的案例來說，大致分為汽油及柴油兩大宗，其中由於柴油碳氫化合物較不易揮發，因此整治較為困難。目前已有多種清理及去除油污污染之方法，主要都是利用物理或化學的方式，這些方式主要都是將污染物從環境中移除或是將其固定於現地使其無法移動，此兩類處理方式並未能有效地解決油品污染。然而，利用微生物生物復育的處理方式不僅可以節省成本，也較不易製造二次污染物，對環境傷害較小，且生物復育適用於大範圍的污染場址，因此逐漸成為土壤油污污染復育技術之趨勢。然而生物整治之分解效率受限於諸多因子，因此時程較長，且成效較難評估。因此如何有效地指引出具有降解能力之現地微生物、增加油品污染物與微生物的接觸機率、並尋找可促進微生物降解油品污染物能力之添加物及生長必須資源，將成為提升油品污染場址生物復育整治技術之關鍵。

生物復育整治可從生物刺激與生物強化兩方面來進行，前者主要為添加營養鹽類、氧氣、及界面活性劑等方法，以促進原生油品降解微生物之生長、代謝、及降解物質之接觸機率，以達到增加降解效率之目標；後者則為以添加已知降解能力之微生物，增加污染場址中降解微生物之多樣性及族群密度加速降解反應。然而，無論以何種方式促進油品污染物降解，皆須先行確認降解微生物之降解功能確實被誘發與強化，從過去的研究經驗指出，判定微生物族群之降解功能最直接的方法即為測定其特定降解酵素之表現與產量，而此測定方式則需透過分子生物技術及巨大的生物資訊資料庫，建立一套適用於油品污染物降解酵素之監測系統，以確認各類的生物刺激或生物強化方式，是否能有效誘發或增加油品污染物降解酵素之產生；另外亦可透過聚合酶連鎖反應及變性梯度電泳技術，探討經生

物刺激後油品降解微生物種類與數量之變化，於此可評估後續以生物刺激方式進行之策略。因此本計畫冀評估各類生物刺激與生物強化之方式，應用於遭油品污染物污染之土壤及地下水場址，並同時建立一套土壤微生物降油品污染物效果之分子生物評估系統，以有效地作為未來油品污染場址生物處理之整治工法。

於油品污染案例中，過去許多案例常以添加界面活性劑增加柴油在水中的溶解度並促進微生物之吸收，然而部分人造的化學界面活性劑對微生物具有些微毒害且殘留於環境中難以被分解，而且同時具有高臨界微胞濃度、低熱穩定性、及對 pH 敏感等缺點。上述因素使得化學界面活性劑較不利於應用在現地的整治工作上。根據國內外近年的研究，多數環境微生物或植物體可以分泌具有界面活性劑性質的物質，又被稱為生物界面活性劑。這些生物界面活性劑同樣可以促進碳氫化合物及柴油的溶解度，增加微生物接觸到油品污染物的機會促進油品污染物的降解速度，且生物界面活性劑對環境衝擊小，因此被視為未來可用來取代人工化學界面活性劑之替代品。除了生物界面活性劑外，過去研究指出，大部分遭受油品污染之場址土壤及地下水中，普遍缺乏微生物代謝碳氫化合物過程中所需之充足氮源，導致碳氫化合物降解速率降低及生物整治成效不彰等，因此經研究指出，額外提供氮源進入油品污染場址也具有提升碳氫化合物降解的效果。另外，近年來多方面的研究也發現，許多金屬過氧化物具有挾帶氧氣之能力，可與水分子反應過程中緩慢釋放氧氣，又被稱為釋氧物質。而在氧氣較缺乏的土壤及地下水微環境中，氧氣為油品污染物氧化降解時參與的重要反應物。由此可知，透過生物界面活性劑與有機酸的添加以增加土壤微生物接觸到油品污染物之機率，以及額外提供有效緩慢釋放氧氣之釋氧物質及充足氮源，應能作為油品污染場址中生物復育之有效生物刺激策略。

因此，本計畫冀建立油品污染之創新性生物整治方式，將透過本研究團隊過往之研究經驗，一方面嘗試整合上述生物刺激策略，開發穩定型奈米金屬釋氧顆粒，利用緩慢釋放氧氣之效果，進一步了解應用此穩定型奈米金屬釋氧顆粒，評估受柴油污染之土壤或地下水生物整治之成效。另一方面，透過有效之油品污染整治策略，將搭配分子生物技術同時建立一套監測土壤微生物降解油品污染物的之評估準則，同時探討經由穩定型奈米金屬釋氧顆粒的添加，對於土壤柴油降解微生物降解效應之影響。配合土壤微生物生長、降解基因表達之種類數量與變化、以及降解菌種之族群變化，了解穩定型奈米金屬釋氧顆粒生物刺激策略對促進微生物降解油品污染物之機制，並連結微生物功能基因與油品污染生物復育操作策略之關係，研發低成本、高效益的油品污染生物復育模式以縮短復育的時間與成本。

第二章 研究目的

本計畫的主要目的在於針對柴油污染場址生物整治特性，整合多種生物刺激關鍵因素，進一步開發包含多種生物刺激因素之添加劑「穩定型奈米金屬釋氧顆粒」，並探討此添加劑對於柴油生物降解之影響，嘗試開發往後可普遍應用於油品污染場址之生物刺激有效添加劑。本計畫亦希望搭配分子生物學技術創新建立一套能監測土壤微生物降解柴油效能之評估準則，於本計畫中土壤微生物降解柴油之過程，監測多種已知的微生物柴油降解酵素之存在與基因表現量，並搭配分析降解微生物之族群變化，了解土壤環境中實際作用於柴油降解之微生物，在不同生物刺激策略條件下降解柴油之效能變化與其功能性基因表現量之呼應關係，以期研發低成本高效益的生物復育方式。

穩定型奈米金屬釋氧顆粒之開發，將透過奈米顆粒表面處理及混合具有分散奈米顆粒之添加溶液等雙重策略進行開發。以界面活性劑修飾奈米顆粒表面使其長期穩定分散及延長奈米顆粒於土壤孔隙中的傳輸距離，另外，修飾於奈米顆粒表面上的界面活性劑進入含油品污染之土壤時，希望同時借重其界面活性劑之特性增加油品污染物之溶解度，增加土壤微生物與油品污染物之機觸機率，提升整體油品污染物之生物降解成效。有助於奈米顆粒分散之適用溶液，除了作為奈米釋氧顆粒的分散介質外，也可倚重其中有利於土壤微生物降解之營養源，促進油品污染物生物降解之效率。而分子生物監測技術之建立，乃針對微生物降解柴油各成份之降解路徑中，各降解酵素基因序列設計多套引子對，利用聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)初步篩選土壤樣品中是否存在特定降解基因，並針對偵測到之降解基因序列設計高專一性之引子對，再以即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)監測特定酵素基因之表現量，如此以了解微生物表現降解酵素之種類與數量。並且利用變性梯度明膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)可以偵測菌群中特殊降解菌株之種類與變化，並配合油品污染物的實際降解效率，整合分子生物資訊在不同生物刺激策略條件下的對應關係。

在整體研究執行計畫上將以四階段漸進方式進行：(一)開發穩定型奈米金屬釋氧顆粒並針對其基本表面物化特性進行初步了解、(二)探討奈米釋氧顆粒於多種添加溶液中的聚集沉降特性、(三)探討穩定型奈米金屬釋氧顆粒對柴油等碳氫化合物水中溶解度之影響/利用烷類或苯類降解菌探討不同種類與劑量之奈米金屬釋氧顆粒其降解碳氫化合物之效應/建立分子生物監測系統以初步評估菌株降解效力與分子生物資訊評估系統之間的相關性、(四)利用土壤培養液與實際土壤兩類樣本探討不同生物刺激策略對於土壤微生物降解柴油之效應/驗證分子生物資訊系統用於評估監測降解表現之適用性。希望藉由本計畫之研究成果，提供未

來國內油品污染場址評估生物復育成效及提升整體整治效率之有效生物刺激添加劑。

由於石化工業的盛行與交通運輸方面的需求日增，全球對石油的使用仍有增無減。然而在開採、運送、儲存、產製的過程中，常導致大量之油品或石化相關物質洩漏至環境中。近年來全球常見的土壤污染案件中，以 TPH 之污染最為嚴重，土壤、水體及空氣一旦受到污染，當地的環境生態首當其衝，加上受污區域之整治須時耗日，難恢復往日生機，有毒物質更會透過植栽、水體流佈、食物鏈累積而直接危害人類。

以生物復育處理油污土壤，費用低廉，對環境生態的衝擊極小，因而為國外普遍風行且使用的整治手段。由於生物整治之分解效率受限於諸多因子，例如：缺乏營養鹽或共代謝基質、可降解之微生物種類少或密度低、微生物無法接觸到目標油品污染物、氧氣缺乏、微生物受有毒碳氫化合物抑制等等，因此往往需要較長的整治時間。若以其他物化處理方法並行使用，不僅提高整體整治成本，更不易準確評估生物復育方法之成效。因此，若能開發對環境友善且多重功效之生物刺激添加劑，著重目前油品污染生物整治中已知的缺失加以補強，達到有效提升油品污染物生物降解之效率且整治過程不易對環境造成二次傷害。此外，搭配一套有效監測與評估微生物降解功能的分子生物系統，有助於未來了解各種生物刺激或生物強化的復育方法，對於土壤環境中降解微生物之誘發與降解酵素之產生的影響。以往國內外相關研究多以土壤微生物菌相作為降解功能指標，以特定降解菌種之族群變化，來代表土壤中石油碳氫化合物之降解潛力。唯特定降解菌種之存在僅能說明降解反應發生之可能性，卻無法進一步說明降解反應是否進行，也無法反應降解之速率大小。有鑒於此，以特定降解酵素之產生與數量上的變化做為監測之目標物，可以補足舊有監測系統之不足，而且配合降解微生物之種類、數量與生長的資料，可以確認不同的復育方法，對於降解微生物之誘發、降解酵素之表現的影響，於此可評估復育方法之優劣，並調整後續之整治策略。另外本計畫預計以常用的 PCR 技術與近來逐漸普及的 Real-time PCR 生物技術，針對多種降解酵素之基因表現進行評估與偵測，在儀器與藥品的可及性上皆非難事。一旦開發出具有此效用之生物刺激添加物並且建立分子生物監測系統後，未來可供各研究、調查單位、與整治現場使用，對於學術研究與現地處理皆有助益。

第三章 文獻探討

3-1 石油與柴油基本性質

自工業革命以來，石油可以做為燃料以及石化工業的原料，是最重要的能量及物質來源。未經提煉的液態石油泛稱為原油（crude oil），其中組成並不固定，一般帶有異臭、比重約 0.8~1.1 的黑褐色流體，由碳（85%）和氫（13%）元素組成的混合體，另含少量的氮（1%）、氧（1%）、硫（3%）及金屬成份。因碳氫為主要成份，所以稱為總石油碳氫化合物。

TPH 中含有的物質有：脂肪族（Aliphatics）之飽和烴類（Alkane；Paraffin）與不飽和烴類（Alkene；Olefin）、單環芳香族碳氫化合物（monocyclic aromatic hydrocarbons），如 BTEX（benzene、toluene、ethylbenzene 與 xylenes）、多環芳香族碳氫化合物（polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH）、環烷烴（Naphthenes）、瀝青、樹脂等柏油類（Asphalts）、及含氮氧硫的極性物質。在脂肪族中不飽和烴類占之比例較低，大多為飽和烷類。柏油類為高有機質的複雜混合物，一般為自然衰減產生，即由脂肪族或芳香族等碳氫化合物裂解或生物分解而之中間產物，另與氮、氧、硫等富電子之元素結合而成。結構上含有脂肪族、芳香族、瀝青結構及前述極性元素。詳見表一。

表 3-1 石油中的成份分類表

	組成分類		主要分類
總石油碳氫化合物	脂肪族	飽和烴類	正烷類 支鏈烷類 環烷類
		不飽和烴類	烯、炔（原油中極少見）
	芳香族		單環 多環
	極性物質及柏油類	極性物質	含氮（N-heterocyclic） 含氧（O-heterocyclic） 含硫（S-heterocyclic）
		柏油類	Phenols、fatty acids、ketones、esters、alcohols and monoaromatic steroids

原油能製成 2500 種性能相異之不同石油產品，以及 3000 種以上的石油化學品，大致可分為七大類：氣體、燃料類、潤滑油脂、溶劑類、石油化學品、其他

產品。依據各種碳氫化合物沸點不同，以蒸餾方式將之分離，沸點較低的油品會先被分離出來，得到各種初級產品，如酸性燃料氣、粗液化石油氣、戊烷、輕重石油腦、煤油、柴油、重油（燃料油）等，再分別經由不同的製程加以精煉。其中石油氣為乙烷、丙烷、或兩者混合物，在常溫下雖為氣體，但稍加壓力即易液化為液體，一般稱為液化石油氣。而一般做為燃料與工業原料之天然氣為由地下開採之可燃性氣體，其主要成份有甲烷，以及微量的乙烷、丙烷、丁烷與戊烷等。燃料類依煉製方法分為及用途分為汽油、煤油、柴油及燃料油等。各油品提煉公司也會對自己的產品又各自命名及分類的方式，通常碳數較高的石油碳氫化合物沸點較高，也較不易被生物降解。這些產品的沸點及碳數分佈列於表二。

表 3-2 各油品的沸點及碳數分佈

油 品 名	碳 數	沸 點 (°C)
天然氣	C ₁ ~ C ₄	<-20
輕石油	C ₇	20 ~135
汽油	C ₄ ~ C ₁₂	35 ~200
煤油	C ₈ ~ C ₁₆	160 ~272
柴油	C ₁₀ ~ C ₂₈	200 ~370
潤滑油	C ₁₅ ~ C ₅₀	300 ~370
燃料油	C ₈ ~ C ₅₀	>350
柏油	C ₃₀ ~	>300

柴油為淡黃色液體，在 30℃ 下，密度約為 0.84 g/mL，難溶於水。熔點為 -29.6℃，沸點 160℃ ~ 360℃，閃火點 58℃，遇火花易燃，輕質柴油之淨發熱量為 11030 kcal/kg。主要碳數分佈為 C₁₀~C₂₈，屬於中低碳數的油品。其中成份依結構來說分為五類：(1)正烷類，所佔重量百分比為 38%，最易被微生物分解；(2)含支鏈的烷類與環烷類，約佔 38%；(3)異烷類，約佔 3%，不易被微生物分解；(4)芳香族類，單環的如苯、甲苯、以苯，多環的如萘（naphthalene）、蒽（anthracene）、菲（phenanthrene），所佔重量百分比為 20%；(5)含有硫、氧、氮之極性物質，約佔 1% (Calabrese and Kostecki, 1988)。因組成之碳數分佈不同及含硫量不同，其特性用途亦不同，以中國石油提煉的柴油來說，分為超級柴油、海運輕柴油及海運重柴油，分別適用於柴油引擎、工業與發電用、以及國際海運船舶使用。針對柴油中各物質對人體的危害，由於苯、甲苯、萘、芴（fluorene）等芳香族類碳氫化合物持續吸入人體會造成吸入性肺炎，長期接觸會造成接觸性皮膚炎，以及腎功能衰竭，因此美國毒性物質及疾病管制局已針對這些成分進行管制。

3-2 全球與台灣受 TPH 污染之情形

在開採、運送、產製石化相關原料的過程中，因人為、設備失誤或交通意外而引起工業事故，常導致大量之油品或石化相關物質洩漏至環境中。這些不屬於生物體且不存在於自然環境中之外來物質分解甚為緩慢。大規模的原油洩漏對海生及陸生生物具有長期性危害，其中危害可以分為兩大類：(1)物理性危害主要是原油黏度高，遮蓋海面造成透光性及通氣性下降威脅到海底生物；(2)化學性危害則是石油對生物具有直接毒性。

海洋石油污染絕大部分來自人類活動，其中以船舶運輸、海上油氣開採，以及沿岸工業排污為主，由於石油產地與消費地分佈不均，因此，世界年產石油的一半以上是通過油船在海上運輸的，這就給佔地球表面 71% 的海洋帶來了油污染的威脅，特別是油輪相撞、海洋油田洩漏等突發性石油污染，更是給人類造成難以估量的損失。1991 年海灣戰爭期間，伊拉克軍隊撤出科威特前點燃科威特境內油井，多達 100 萬噸石油洩漏，污染沙特阿拉伯西北部沿海 500 公里區域，200 多萬隻海鷗喪生，許多魚類和其它動植物也在劫難逃，一些珍貴的魚種已經滅絕，美麗豐饒的波斯灣變成了一片死海。1996 年，利比里亞油輪“海上女王”號在英國西部威爾士聖安角附近觸礁，14.7 萬噸原油洩漏，致死超過 2.5 萬隻水鳥。2007 年，裝載 4700 噸重油的俄羅斯油輪“伏爾加石油 139 號在刻赤海峽遭遇狂風，解體沉沒，3000 多噸重油洩漏，致出事海域遭嚴重污染。2010 年，位於美國南部墨西哥灣的石油井平台發生爆炸，事故造成的原油洩漏形成了一條長達 100 多公里的污染帶，造成嚴重污染。1977 年布拉格號在基隆海域觸礁，1 萬 5 千餘公噸燃料油洩漏，造成 70 多公里海岸不同程度的污染，是台灣自光復以來，國內首宗最嚴重的油輪漏油污染事件。2001 年，阿瑪斯號在屏東鵝鑾鼻海域擱淺，油料外洩約 1100 噸，造成海洋、海岸嚴重污染。成千上萬噸的溢油，一旦進入海洋將形成大片油膜，這層油膜將大氣與海水隔開，減弱了海面的風浪，妨礙空氣中的氧氣溶解到海水中，使水中的溶氧減少，同時有相當部分的原油，將被海洋微生物消化分解成無機物，或者由海水中的氧進行氧化分解，這樣，海水中的氧被大量消耗，使魚類和其它生物難以生存。油污附著於海鳥與魚類身上，將妨礙牠們的覓食與運動，在海洋石油污染事件後，往往發現數以萬隻的海鳥與魚類喪生。油污順著海流到了岸邊，附著於海岸的岩石與植物上，又會造成生存於期間的蝦蟹貝類、魚類及其它動植物的死亡，甚至造成滅絕的結果，美麗豐饒的海洋變成了一片死海，海洋石油污染對海洋生態系統的破壞是難以挽回的。另外海上溢油不僅破壞海洋環境，而且還存在發生火災的危險。

地下儲油槽和輸油管線腐蝕或破裂、地面油品意外滲漏，都會造成陸地上土

壤和地下水源的污染，不僅造成土壤鹽鹼化、毒化，導致土壤破壞和廢毀，而且其有毒物能通過農作物尤其是地下水進入食物鏈系統，最終直接危害人類。土壤之縱剖面由地表至地心可分為三部分：不飽和層、毛細層與飽和層。當石油碳氫化合物於地表滲漏之後，會因重力作用向下滲漏於不飽和層中，加上毛細現象會使其水平移動。兩者作用之強度受土壤孔隙性質而不同。另外受到土壤顆粒吸附機制影響，石油碳氫化合物會以五種方式存在於不飽和層中：(1) 吸附在土壤礦質粒子上，(2) 吸附在土壤有機碳上，(3)經由脫附溶解在土壤表面的吸附水珠上，(4) 吸附在土壤空隙之氣液界面，(5)停留在土壤孔隙中(Pennell et al. 1993)。另外也會石油碳氫化合物直接蒸發至大氣中，土壤之含水量、密度、表面積及污染物之揮發性皆會影響此揮發作用。石油碳氫化合物也會溶解於土壤水中，長鏈的脂肪族溶解度遠低於短鏈脂肪族及芳香族。石油碳氫化合物會受到光及化學物質影響而分解，也會受到微生物的好氧降解，另外植物的攝入也會使其分解。在毛細層中石油碳氫化合物以水平移動為主，比重較小的會浮在地下水層上，土壤的滲透度越高，污染物移動越快，且含水量越高，污染物的揮發降低，溶解增加，會隨地下水流動。在飽和層中則受到水文梯度影響而水平移動，同時亦受重力影響向下滲漏，最終至匯集在不透水層之交界處。

根據美國資源部的研究，埋設超過 10 年以上的儲油槽有 46% 會發生洩漏，15 年以上者，發生洩漏機率高達 71%。美國境內約有 300 萬個以上的儲油槽，估計 35% 的儲油槽可能正在漏油，因此儲油槽的洩漏問題必須被重視。2002 年中油高雄煉油廠 P-37 油槽漏出 27,850 公秉原油，相當於 140 座加油站的油滲入地下。雖然挖除地表 2 至 30 公分表土，地底下仍都是黑色的油污，污染場址中 TPH 為管制標準的 44.2 倍，2004 年該地被公告為土壤及地下水污染整治場址，經多年整治後，2010 年終於完成整治並解除列管。環保署於 2010 年公告的國內土壤及地下水污染整治場址，依污染物可概分為三類：TPH、重金屬、有機廢液和廢棄物污染。以 56 處列管整治場址中，光 TPH 及相關污染物就占了 29 處，是當前佔地面積最大且對人體及環境有立即性危害之污染。表三即為 29 處受 TPH 及相關污染物污染之整治場址。其中場址包括有加油站、儲油槽及工廠。以中國石油公司在高雄楠梓、苓雅、新營等地的污染面積，就高達 136,200 立方公尺，而其他整治場址的污染面積加總，也高達 100,450 立方公尺。全台 2,700 多家加油站，自民國 90 年開始調查至今，目前完成 5 期、共 1,791 站，其中污染情節較嚴重、超標至少 20 倍以上的整治場址有 16 站，而公告為污染列管場址的有 117 站，顯示國內多處加油站或工廠之儲油槽與輸油管線，都是潛在的污染源，需要做大規模且地毯式的調查。因此國內土壤及地下水受 TPH 污染的問題必須謹慎面對。TPH 一經洩漏進入土壤及地下水中，發生脫附、蒸發、擴散等作用後，將對人體

發生危害。台灣地小人稠，土地利用與規劃又常面臨住工混雜的情形，因此這類受污的土地是迫切需要整治改善的。

表 3-3 環保署於 2010 年公告的國內土壤及地下水受 TPH 污染之整治場址

	場址名稱	種類	場 址 面 積 (平方公尺)	公告日期	土壤/地下水污染物
1	台灣中油高雄煉油桶梓廠	工廠	109923.51	2012/1/20	苯;二甲苯;乙苯;TPH
2	台灣中油苓雅寮儲運所	工廠	15897	2006/12/14	TPH
3	台灣中油新營長榮加油站	加油站	2257	2008/10/28	苯
4	東林加油站	加油站	925	2008/10/16	苯;甲苯;總酚
5	高雄市桶梓區後勁月眉段	工廠	7197	2009/4/9	苯;TPH;二甲苯
6	川流有限公司川流加油站	加油站	719.64	2009/2/27	苯;TPH;甲苯;奈
7	台亞石油新莊加油站	加油站	1311.29	2008/5/13	苯;甲苯;奈
8	台灣氯乙烯頭份廠	工廠	50000	2006/3/27	1,2-二氯乙烷;三氯乙烯;氯乙烯;苯
9	永信加油-永信加油站	加油站	1960	2009/4/10	苯;TPH
10	全國加油-仁武加油站	加油站	2318	2008/3/6	苯;TPH;乙苯;甲苯;二甲苯
11	林園鄉中汕段及汕尾段	其他	4792	2009/5/22	TPH
12	高雄市大順加油站	加油站	1420	2008/3/21	TPH;苯;甲苯;總酚
13	全部實業	工廠	2188.49	2011/2/16	鉛;TPH
14	南昇加油站	加油站	1632	2008/5/26	苯;二甲苯;TPH;總酚
15	秀和興業	工廠	5305	2011/9/15	TPH;順-1,2-二氯乙烯; 四氯乙烯;三氯乙烯; 氯乙烯
16	統一精工左營加油站	加油站	1949	2006/11/28	苯;TPH
17	統一精工鳳山二站加油站	加油站	3365	2009/4/20	TPH;苯;甲苯;奈
18	佳滿企業永興加油站	加油站	1004	2006/8/30	苯;甲苯;奈;總酚
19	屏東縣九如鄉九清段	其他	1800	2011/1/11	TPH;重金屬
20	台南縣嘉仁加油站	加油站	1515.02	2008/2/14	苯;TPH;乙苯;甲苯;二甲苯;奈;總酚
21	台南縣嘉南加油站	加油站	1239	2004/10/19	苯;甲苯;奈
22	高雄縣大旗桶加油站	加油站	1365.19	2010/12/7	苯;TPH;甲苯
23	統一精工虎尾加油站	加油站	893.66	2007/3/13	苯;

表 3-4 環保署於 2010 年公告的國內土壤及地下水受 TPH 污染之整治場址(續)

24	興農股份王田廠	工廠	9839	2012/3/13	甲苯;砷;氯苯;1,2-二氯乙烷;總酚;二氯甲烷
25	彌陀加油站	加油站	1136.55	2010/12/7	苯;TPH;二甲苯;甲苯;奈;總酚
26	統一精工南科二站	加油站	777	2011/12/2	TPH; 苯
27	嘉義縣水上鄉北回段	其他	2885.42	2010/5/24	TPH
28	水上鄉回歸村北回段	其他	1204.51	2007/5/15	TPH;柴油
29	統一精工小北加油站	加油站	546	2007/11/19	苯;TPH;乙苯;甲苯;二甲苯;三氯乙烯

3-3 TPH 各種處理方法、限制與成效

民國 89 年 2 月 2 日土污法因應國家社經趨勢而公布施行，接著專責機關土污基管會也成立，土壤及地下水的調查與整治業務開展了起來，各項調查如火如荼的展開，台灣農地及地下水的監測資料也因調查工作的進行逐一完備，污染場址陸續被發現，相關整治技術也須一併從國外引進與學習，於是，整治技術在民間整治公司的努力與政府的積極推動之下逐漸累積。針對土壤污染復育，現已發展出各類物理、化學及生物的方法來去除土壤中有害因子或降低其毒性。就實施方法之原理又可分為物理/化學、生物及整治技術聯用序列 (Treatment Train)；就污染物處理實施場所可劃分為現地 (in-situ)、現場 (on-site) 與離場 (off-site) 三種。

物理/化學方法的原理，是利用污染物或被污染介質的物化特性，達到破壞、分離或穩定污染物的目的。此法的經費與效果比較佳，且時程較短。常見的物理方法有吸附處理、氣提法、阻絕法、破碎法、焚化法、現地熱處理、抽取處理法、土壤開挖、土壤氣體抽除法、熱脫附等；化學方法則有化學去鹵素法、化學氧化法、透水性反應牆法、固化與穩定化、玻璃化法、現地淋洗法、土壤清洗（酸洗）等。其中，熱處理是利用加熱處理達到分離或加速分離污染物的目的，惟此法的費用偏高，且需動用較大機具，耗費的能量較高，但時程較短。另外，整治技術聯用序列則是採用多種整治方法，同時或分階段進行整治工作，此法結合多種整治方式的優點，可有效降低經費，或縮短整治期程。

生物整治原理是利用自然作用去除污染物，通常是以環境中之植物吸附或微生物來分解油污，由於石油的成分多半是碳氫化合物，可以被微生物當作碳源或能量的來源，經生化代謝後將複雜的大分子有機物轉化為毒性低(無毒)的小分

子。藉由翻堆、通氣、添加營養鹽、有機肥、及降解菌株的手法，以促進降解微生物的生長與密度。一般而言，利用微生物進行生物分解不會造成二次污染，費用較便宜，且適用於大範圍的污染場址，因此逐漸成為土壤復育技術之趨勢。美國環保署 2007 年的統計，近年應用新技術的案例中，生物復育就占了 47%，顯示未來有長足的發展趨勢。不過由於生物分解效率受限於諸多因子，因此時程較長，且成效較難評估，因此仍有技術改善之空間。

目前常用的生物復育策略有：(1)自然衰減 (natural attenuation)，是在沒有人為的干擾情形下，降低污染場址中污染物的濃度與毒性。例如由自然發生的真菌、細菌等微生物將有機物作為食物進行降解，屬於破壞性方法；而利用吸附、擴散、稀釋與揮發等作用則屬於非破壞性方法。優點為較不會破壞環境，缺點為降解程度依場址而異。(2)生物刺激 (biostimulation)，在受污染之場址中通常可以馴養出具分解能力之微生物，然而污染物型態與濃度、土壤性質、營養鹽、氧氣、水份、溫度及 pH 值等環境因子，會影響微生物之利用。其中營養鹽中氮源及磷源的缺乏是最常見的降解限制因子(Rosenberg et al., 1992)，此外石油碳氫化合物的低水溶性也會限制其被微生物接觸利用，在一些實驗室或現場整治經驗中，藉由添加無機氮磷肥、有機肥及生物界面活性劑、氧氣或其他生長限制因子，可以促進降解菌之生長與代謝功能(Seklemova et al., 2001)；(3)生物強化 (bioaugmentation)，受污染的環境中可能只存在少數種類或低密度的降解菌株，或者污染物濃度過高或是污染物種類多元對微生物造成抑制時，利用添加外來降解微生物的方法增加降解菌株的種類與數量，可以加速復育的速度；(4)植物復育等。

生物復育需考慮到微生物的代謝，而土壤環境的條件與變動則會影響生物可利用性、物質傳輸、以及微生物的代謝速率，例如溫度、鹽度、含氧量、酸鹼值、水份、氮磷等營養源、土壤質地、污染物特性等。以氧氣來說，大部分的碳氫化合物可透過氧化反應降解，因此生物復育以好氧降解微生物為主(Geerdink et al., 1996)。微生物在降解碳氫化合物化合物過程所分泌之氧化酵素，需要以氧氣為電子接受者進行降解反應，因此氧氣濃度為氧化降解酵素代謝作用之關鍵因子。土壤若通氣不佳，氧氣含量為空氣中之一半，二氧化碳卻因生物作用而多了好幾倍，易使土壤形成厭氧環境而降低碳氫化合物之降解速率。因此在油品污染生物復育時須不斷補充氧氣，例如埋設通氣管、翻堆、或添加釋氧劑等等。

營養鹽是生物組成的重要元素，會影響微生物的代謝速率，由於一公克碳氫化合物變成一公克生物質需要 150 毫克的氮與 30 毫克的磷，因此氮磷往往是柴油降解過程中之限制因子(Rosenberg and Ron, 1996)。Chaillan 等人(2006) 以尿素

作為氮源，發現尿素濃度超過 500 mg/kg soil 時會造成過量氨氣，提升土壤 pH 值，而抑制微生物降解碳氮化合物。Chaîneau 等學者(2005)更發現過量的 resins 累積與添加過量的營養鹽以刺激生物分解有關，這些代謝副產物的累積會回頭抑制 aliphatics 與 aromatic 類的降解。前人亦曾報導不同氮鹽對柴油受污海水復育之促進效果，結果顯示硝酸鹽較氨氮為適合，原因是氨氮代謝後之酸性副產物會抑制微生物降解柴油。以水份來說，太少的水會限制生物降解的進行(Margesin and Schinner, 2001)，但是土壤中含水太高卻會影響氧氣的傳送，因此除非氧氣的供應有特定的補足方式（如通氣管或曝氣等），否則進行生物復育時土壤中含水率皆須介於 15% 至 30% 間。另外也需考慮天氣、土壤的保水力對場址含水率之影響，適度建構排水系統以調整土壤含水。

以 pH 值而言，微生物最佳的活性範圍為 pH6 至 8 之間，過高或過低皆不適合生物降解之進行(US EPA 510-B94.003, 1994)。幸好土壤中具有緩衝的碳酸根或磷酸根，因此土壤中的 pH 值相對來說較穩定，倘若有些微的變動則肇因於環境中劇烈的變動。考慮碳酸根系統，在 pH 於 6.3 時，系統的緩衝能力最強，在 pH 於 8.3 時，系統的緩衝能力最弱，此時呼吸作用較易降低 pH 值。若考慮磷酸根系統，在 pH 於 10.3 時，系統的緩衝能力佳，在 pH 於 7.2 時，系統的緩衝能力最強，在 pH 於 9.3 時，系統的緩衝能力最弱，一般土壤皆約為中性，此時磷酸根系統可以提供好的緩衝能力。由於氨水解會產生氫氧根離子而破壞酸鹼平衡，並影響兩大系統的緩衝能力，導致 pH 值增加。

以有機碳作為電子提供者也是好氧微生物必須之物質，但在受污之土壤中，易於被利用的有機碳常常不足，這也是造成微生物活性不佳之原因，因此近年常有額外添加碳源之整治策略。另外污染物的構造與濃度也會決定其生物降解之可能性，aliphatics 的生物降解性最佳，Resins 與 asphaltenes 最差。Lee 等人(2007)監測不同營養鹽條件影響污染土壤中碳氮化合物之降解，顯示主要的降解為飽和族(saturated hydrocarbon)，aromatic 類降解較慢，而 resins 與 asphaltenes 甚至在後期有累積的情形發生。Chaîneau 等人(2006)認為 aliphatics 與 aromatic 類的碳氮化合物經生物降解之後，產生的副產物會與土壤中的氮、氧、硫等元素結合，形成類似 resins 與 asphaltenes 等不易降解之物質。當污染物濃度過高時，毒物也會傷害微生物而降低降解速率(Venosa and Zhu, 2003)。當土壤中碳氮化合物濃度超過 15%，將造成微生物活性降低；而污染物濃度減少時，被微生物接觸之機率也較低，因此效率將變差。而溫度也會影響微生物活性、物質傳輸與生物可利用性，進而影響降解速率，通常溫度高降解速率較佳。一般而言土壤中微生物的最佳降解溫度為 20℃~40℃，在淡水中為 20℃ ~30℃，海中則為 15℃ ~20℃ (US EPA

510-B94.003, 1994)，不過在實際場址中不易控制溫度，多隨氣候變動。

綜合上述論點可知，利用生物整治復育遭受油品污染之土壤地下水需考量多種土壤微生物必要之生長所需因子，根據國內針對油品污染土壤與地下水之生物復育研究成果可進一步了解國內 TPH 污染案例中的關鍵因素。由國立成功大學鄭幸雄教授研究團隊研究指出，添加生物性界面活性劑 surfactin 與 rhamnolipid 可提升降解菌株利用 TPH 之速率約四至七倍，且降解系統中若缺乏銨氮(<50 mg/L)時降解菌株之生長速率會大幅降低(馬志強, 2005)。將遭受 TPH 污染之土壤以離場方式處理時，額外添加生物界面活性劑、生長營養鹽、或添加具有降解柴油功能之菌株皆可使 TPH 降解率超過 90%，說明台灣土壤中的原生菌種具有高度的環境適應能力，因此於離場處理時並不易受到上述添加物的促進，另外，此離場試驗結果也可推論，氧氣可能為實際土層中影響原生菌種降解 TPH 之主要因子(廖翊廷, 2007)。此外，於模場試驗中，添加具有降解柴油功能之菌株與透過廚餘堆肥增生之原生降解菌株皆可以提升 TPH 降解率達 65%(楊宇祥, 2010)。由國立中山大學高志明教授研究團隊研究指出，以硫還原菌作為降解苯、甲苯、及甲基第三丁基醚(MTBE)三類石油污染物時，主動灌注硫還原菌生長必須之硫酸鹽可使此三類污染物的降解率分別達到 90%、63%與 8%，由此研究成果可知，添加降解微生物必要之生長因素確實可提升碳氫化合物污染物之降解效果(黃威翔, 2015)。另外，其分析某加油站整治場址之試驗結果指出，場區土壤內包含足夠數量且具有降解 TPH 能力之微生物，但土壤中的含水率與氮磷濃度偏低，因此，透過土耕法調整適當生長環境可提升 TPH 的生物降解率(楊竣智, 2014)。若以自然衰減法監測遭受 TPH 污染之土壤及地下水場址，其持續兩年之監測結果顯示，污染場址中生物降解的情形持續發生，隨監測期程同時觀察到電子接受者的減少與代謝副產物的增加，且伴隨著監測範圍內的 TPH 濃度逐漸減少的趨勢，另外，此自然衰減法的監測結果亦發現，多種電子接受者包含硝酸鹽與溶氧皆同時減少，由此結果可推測，該場址土壤與地下水中的溶氧含量應不足供給降解微生物進行 TPH 的完全降解，因此取而代之利用其他化合物作為電子接受者進行代謝(邱漢瑜, 2013)。其團隊過往也利用釋氧物質處理 TPH 污染之地下水，其研究成果證實利用過硫酸鉀與過硫酸鈉作為釋氧物質時，可使 MTBE 與苯污染物去除率達到 98%與 99%(郭育嘉, 2009)；而評估試驗土壤管柱中好氧微生物含量可發現，添加釋氧物質後其總菌數含量高於原始土壤中的總菌數，此結果顯示添加釋氧物質可有效提升 TPH 好氧降解微生物的含量並且提升整體 TPH 的降解效率(陳廷育, 2007)。再者，國立成功大學黃良銘教授研究團隊於 TPH 生物整治研究中，其利用生物滲透性反應牆將具有 TPH 降解能力之菌株包埋至通透管柱內內，作為未來現地整治之策略工法。其研究成果指出，氮源與碳氫化合物比例為影響生

物滲透性反應牆降解 TPH 效率之主要因素，當碳氮比率由 100:2 降低至 100:0.5 時則降解效率會由 80% 下降至 45%(潘祈良, 2009)。另外，其於土耕法配合多種生物刺激策略等試驗中也發現，添加營養鹽的組別可達到較高的 TPH 降解率(張儷馨, 2008)。除了上述團隊之研究成果，國內許多學者也投入大量心力針對 TPH 生物整治之最佳化，而綜觀國內研究成果可知，上述所提及之生長所需因子中以油品污染物之生物可及性、土壤地下水中氧氣含量、與土壤微生物生長所需的營養鹽(氮磷源)含量為主要影響因子。

3-4 界面活性劑處理土壤污染場址

過去多種不同類型的土壤污染場址中，經許多不同處理程序所處理過的土壤顆粒，其於顆粒表面所殘留之化學污染物多半具有低親水性的特性，此類殘留於土壤顆粒表面之化學污染物，長時間停留於污染場址中會提高動植物接觸到污染物的風險，也會阻礙污染場址土地的利用性。界面活性劑(短鍊有機酸或螯合劑)的添加，因為其同時包含親水與親脂之官能基，可提升疏水污染物之水溶解度，因此，過去已經廣泛被利用於多種土壤污染的整治案例中(Fountain et al., 1996)。過去研究探討指出，當界面活性劑分子存在於含水土壤時，可親近土壤顆粒表面將其自身的親水官能基散布於水相之間，而疏水官能基則吸附於土壤顆粒或其中的有機污染物上，當界面活性劑濃度較低時，會以分子單體的形態存在於固/液或液/液兩相之間，隨著其濃度的提升，其會逐漸降低疏水物質的表面張力，因此可以增加疏水化合物的水溶性。而為了有效地利用界面活性劑促進受污染土壤之整治成效，整治過程中有諸多因子需要被謹慎評估，例如：污染物與土壤顆粒的吸附行為種類、界面活性劑種類對污染物脫附效率、或是添加的界面活性劑種類對現地生物或微生物族群的影響等因子，例如過去研究指出，當施加界面活性劑到受污染土壤進行整治處理時，部分施加的界面活性劑會同樣被吸附於土壤顆粒表面，因此實際上用於污染物吸附之界面活性劑含量並不達施加劑量；此外，界面活性劑於土壤顆粒表面的累積容易變相增加土壤顆粒的疏水性，使得原本已被界面活性劑包覆的疏水性有機污染物重新再吸附回土壤顆粒表面(Paria, 2008)。由此可說明，界面活性劑與土壤顆粒間的吸附特質之因素，對於實際將界面活性劑應用於土壤污染整治有重大的影響，因此在挑選界面活性劑的施用種類時，需格外注意土壤污染之污染情勢與類型，挑選合適之界面活性劑種類以達到良好的整治效果。舉例而言：針對吸附於活性污泥的能力上，全氟磺酸類的界面活性劑對於全氟羧酸類要來的強，且當全氟磺酸的碳鍊由 C5 增加到 C15 時，其吸附於活性污泥的能力也隨之加強(Zhang et al., 2013)。另外，土質的基本物化特性也同樣會影響界面活性劑的處理效率，例如：界面活性劑氯化十二烷基 (DCP) 對於土壤

顆粒的吸附能力，會隨著其陽離子交換能力的增加呈現線性的提升，此現象表示界面活性劑 DCP 的吸附能力會受到土壤顆粒表面所攜帶的負電荷所改變。而針對界面活性劑 TX-100 之相關研究中也證實，TX-100 的最大吸附量會受到土壤顆粒中的有機物含量多寡所影響，土壤顆粒中的有機物質會改變土壤孔隙水的界面特性，導致 TX-100 的吸附情形連帶受到改變(Yeh and Young, 2003)。過去研究也指出在各種界面活性劑種類中，其分子結構(Chakraborty et al., 2009; Zhu et al., 2012; Lee et al., 2013)、羥基官能基數目的多寡(Oliveira et al., 2009)，以及分子結構中所包含的其他類別官能基(Gao et al., 2013)等因素，皆會直接影響到界面活性劑溶出土壤有機污染物的莫爾溶增率。

一般而言，界面活性劑可依照其親水特性分為四類，分別為陽離子型、陰離子型、雙性離子型、與非離子型四類界面活性劑(Paria, 2008)。而此四類中的界面活性劑依照其不同的分子結構可將其應用於不同的污染物種類，其過去於土壤污染處置之應用層面將依序介紹。由於土壤膠體與顆粒表面主要攜帶負電荷，此特性讓土壤顆粒可以十分容易與離子性界面活性劑相互吸引，透過離子交換或異性離子相互吸引之反應途徑，降低土壤顆粒的表面張力使其中包含的有機污染物可更容易隨著地下水流或土壤孔隙水而移動(Margesin and Schinner, 1999)。界面活性劑十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulphate, 簡稱 SDS)為陰離子性界面活性劑之一，因其具有生物可分解性故被廣泛利用於處理土壤之有機污染物。Davessa 等學者過去曾利用 SDS 處理砂質土壤中 4-甲基苯酚、4-乙基苯酚、與 4-叔丁基酚等有機污染物，並且分別達到 89.1%、65.3%、與 55.1% 的污染物去除率(Davessa et al., 2011)，Lee 等學者混合乾重比 4% 的 SDS 與 10% 的氯化鈉於砂質土壤時，其實驗結果顯示可將其砂質土壤中的 1,2,4-trichlorobenzene 脫附，並且達到 97% 的處理效果(Lee et al., 2008)，同樣地，Khalladia 等學者混合濃度 8 mM 的 SDS 含鹽溶液，並將此溶液緩慢通過遭受油品污染的土壤管柱中，其發現可脫附土壤中約 97% 的污染油品(Khalladi et al., 2009)。除了陰離子型界面活性劑以外，溴化十六烷基三甲胺(cetyl trimethylammonium bromide, CTAB)、十二烷基苯磺酸鈉(sodium dodecylbenzenesulfonate, SDBS)、與烷基醯胺甜菜鹼(cocamidopropyl betaine, CAPB)為另一類的陽離子型界面活性劑，Ranjan 等學者過去將 CTAB 以濃度 1.5% 的施加量用於處理遭受苯類、萘類、跟菲類有機物之黏土顆粒，並且獲得 58.8% 至 98.9% 的移除率(Ranjan et al., 2006)。但相較於陰離子性界面活性劑而言，此類陽離子性界面活性劑因電荷特性，其主要透過電荷相吸之機制吸附於土壤顆粒表面，因此對於直接清洗土壤內有機污染物的作用不大，因此並未廣泛應用於有機污染的土壤整治中。

除了離子型界面活性劑外，非離子型界面活性劑之特性為其溶解於水中時並非產子包含電荷的親疏水端官能基，相對地，其所產生的親水端主要透過含氧官能基（例如：羥基或聚氧乙烯官能基），當此類含氧官能基暴露於水中時，其可以與水分子產生氫鍵作用力，由於其分子可產生氫鍵的能力，使得非離子型界面活性劑的疏水端官能基容易相聚，讓其於水中十分容易產生微胞，因此非離子型界面活性劑可於低劑量下仍保持微胞型態，相當適用於受有機物污染之土壤整治中(Zheng et al., 2012)。Mulligan 與 Eftekhari 等學者過去研究成果指出，添加濃度 1% 的 TX-100 界面活性劑可協助五氯酚等物質的溶出，其處置受污染的細沙土壤可達到 84% 的溶出率(Mulligan and Eftekhari, 2003)。另外，Torres 等學者的研究指出遭受甲基對硫磷所污染的土壤顆粒也可利用濃度 1% 的 TX-100 界面活性劑所脫附，其脫附率達 88%。另外，Rios 等學者也試驗其他兩種非離子型界面活性劑對於農藥 DDT 的脫附效率，其研究成果指出，濃度 2% 的 Brij-35 界面活性劑溶液於連續清洗約 86 分鐘後可溶出 76.7% 的農藥 DDT，而使用相同濃度的 Tween 80 界面活性劑則可於清洗時間 118 分鐘後溶出 56.3% 的農藥 DDT(Rios et al., 2013)。除此之外，非離子型界面活性劑也被試驗於處理多種不同的有機污染物，例如：使用濃度 2.5 mg/L 的 Tween 80 溶液與粒徑 2 mm 的試驗土壤顆粒混合，可將其中吸附的對甲酚脫附約 70% (Rosas et al., 2011)；將濃度 0.05M 的 Brij-35 界面活性劑溶液與受污染土壤混合後可將其中吸附的疏水性碳氫化合物脫附約 43% 至 69% (Fabbri et al., 2008)；而使用濃度 2% 的 POE 20 界面活性劑於現地土壤污染場址中，可使土壤中的柴油、煤油與潤滑油等類的污染物達到整體 88% 的脫附率(Lee et al., 2005)；另外，將土壤顆粒混合濃度 0.5% 的 Canarcel TW80 界面活性劑時，也發現可將其中的總石油碳氫化合物(濃度 4,600 mg/kg)達到 87.1% 的移除率(Vreysen and Maes, 2005)。

然而，於現地土壤整治過程中，若隨意添加特性尚未十分明確的化學性界面活性劑於土壤中，劑量過高時可能會改變土壤質地的特性或影響土壤中的生物種類(Jia et al., 2005)，舉例而言，吸附於土壤顆粒表面的界面活性劑會改變土壤表面的導水度(Renshaw et al., 1997)，而某些類別的界面活性劑也經研究指出對於土壤生態圈會造成負面的影響，例如：全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)是一種廣泛被使用於工業製程中的界面活性劑，而研究證實其對於土壤生態圈會造成持久性的影響，且動物暴露於其中時會增加罹癌的風險(Paustenbach et al., 2007)。於整治過程後殘留於土壤孔隙中的界面活性劑，有些並非可立即被土壤微生物分解，因此過量的界面活性劑會逐漸改變土壤中的微生物種類，過去研究顯示，土壤微生物暴露於離子型界面活性劑之中時，其合成的巨分子物質如：胺基酸鏈、酵素、甚至其遺傳物質，進而改變其微生物的生理特性(Cserhati et al., 2002)，陽

離子型界面活性劑則相當容易影響土壤微生物的細胞膜(Ivankovic and Hrenovic, 2010)。而非離子型界面活性劑同樣也具有一些抗菌效果，其可以與土壤微生物所分泌的蛋白質或磷脂質膜結合，造成土壤微生物於生理代謝的負面影響(Santonicola et al., 2008)。Bailey 等學者過去測試多種界面活性劑對於菌株 *Shewanella oneidensis* MR-1 的影響，其結果顯示界面活性劑 NINOL 40-CO 於各個測試濃度下皆對於菌株 *S. oneidensis* MR-1 之生長產生抑制，而界面活性劑 CAPB(cocamidopropyl betaine)與 SLES(sodium laureth sulfate)則於 20 mM 至 100 mM 之濃度範圍下會產生抑制現象(Bailey et al., 2012)。而另一類界面活性劑 LAS(linear alkylbenzene sulfonate)則顯示出其對於細菌細胞膜會造成影響並擾亂其正常的生理代謝(Brandt et al., 2001; Elsgaard et al., 2001)。Chang 等學者也針對 TX-100 和 Brij-35 等兩類界面活性劑進行測試，探討其存在下對於現地多環芳香烴降解微生物之影響，其結果顯示添加此類界面活性劑會改變微生物族群及其外泌酵素種類(Chang et al., 2010)。除此之外，土壤中存在過量的界面活性劑也會對於當地植物產生影響，Ostroumov 等學者試驗 LCC(Liquid Crystal Concentrate)界面活性劑對水生植物伊樂藻的影響，其研究成果發現於 50 至 150 $\mu\text{L/mL}$ 的濃度範圍中可觀察到伊樂藻的毒害現象(Ostroumov and Solomonova, 2013)。Oros 等學者之研究成果指出，磺基琥珀酸酯(sulfosuccinic acid esters)界面活性劑對錦竹草造成生物毒害，其試驗結果指出界面活性劑的非極性烷鏈有機會插入錦竹草細胞膜中的磷脂質雙層膜間，並且造成細胞膜功能受損與機能失調等症狀(Oros et al., 1999)。由此可知，雖然化學性界面活性劑應用於整治土壤中有機污染物吸附方面已經有深入的研究與多個成功案例，但其過量施加對於環境所造成的衝擊目前仍未被詳細地探討，因此，若需要因應未來土壤有機污染的處置與整治，試驗其他不同類型的界面活性劑必然成為主要的發展方向。生物界面活性劑(biosurfactant)為微生物或植物所產生之低分子量異質界面活性化分子，其分子構造包括親水性之原子團（諸如：氨基酸、胍類、陽離子、陰離子、單糖、雙糖或多糖等）與親脂（疏水）性之原子團（諸如：飽和、不飽和或羥基脂肪酸，或疏水性脂胍類等）。它們可以使溶液藉由微乳化作用，使碳氫化合物溶於水中，或使水溶於碳氫化合物中，因此降低液體溶液與碳氫化合物混合之表面張力、微膠粒臨界濃度、界面張力。化學合成界面活性劑在各種產品製程、工業應用及環境復育上，可以促進由水相互溶，以協助後續反應，然而這些人造的界面活性劑對環境微生物常有毒害，致無法生物降解，容易形成環境蓄積，衝擊環境生態。Vasileva-Tonkova 等（2001）以酵母菌測試多種生物界面活性劑，證實生物界面活性劑對生態環境安全無虞。Shreve 等人(1995)研究 rhamnolipid 此種生物界面活性劑在溶液內溶解碳氫化合物之效能約為化學合成陰離子界面活性劑(alkyl benzene sulfonate, ABS)之 9 倍。Bai 等人(1997)也發現 rhamnolipid 可以將水與十六烷的界面張力從 49.5

dyne/cm 降到 1 dyne/cm，而同樣濃度(500 mg/L)Tween 80 和 SDS 卻只能分別降至 9.6 dyne/cm 和 25.2 dyne/cm。Desai 和 Banat (1997) 也證實生物界面活性劑比化學界面活性劑效能更佳、具選擇性、可被微生物分解，對環境友善。另外生物界面活性劑對 pH、溫度、鹽度的容忍度也較化學合成界面活性劑好(Foght and Westlak 1987)。因此生物界面活性劑具有以下優點：低（或無）毒、可以經生物降解，不會在環境中殘留、結構與種類多樣、可利用農餘材料做為培養基質，是對環境生態友善的材料之一。

生物界面活性劑依其化學結構特性，一般可分成六大類，包括醣脂(glycolipids)、脂肪酸(fatty acids)、聚醣脂等聚合物(lipopolysaccharides/polymeric biosurfactants)、磷脂(phospholipids)、脂胜肽/脂蛋白(lipopeptides/lipoproteins)以及細胞膜形成的微胞。分子量較大且與生物界面活性劑具有相似特性之分子則稱為生物乳化素(bioemulsifier) (Saharan et al. 2012, Gautam and Tyagi 2006)，較適於用在穩定油水形成的乳滴，如胞外多醣(exopolysaccharide)。目前可以生產生物界面活性劑之微生物約有 24 個屬 40 餘種，產生的生物界面活性劑有 24 種之多(Saharan et al. 2012)。最常見且最常被應用的有三類：

醣脂，其結構一端為碳水化合物，一端接長鏈脂肪酸，例如 rhamnolipid、trehalolipid 和 sophorolipid，見圖 3-1 (Desai and Banat, 1997)。rhamnolipid 亦為醣脂質，為 *Pseudomonas aeruginosa* 發酵產物，其分子結構包括鼠李醣(rhamnose, 6-deoxymannose) 及 β -hydroxydecanoic acid。

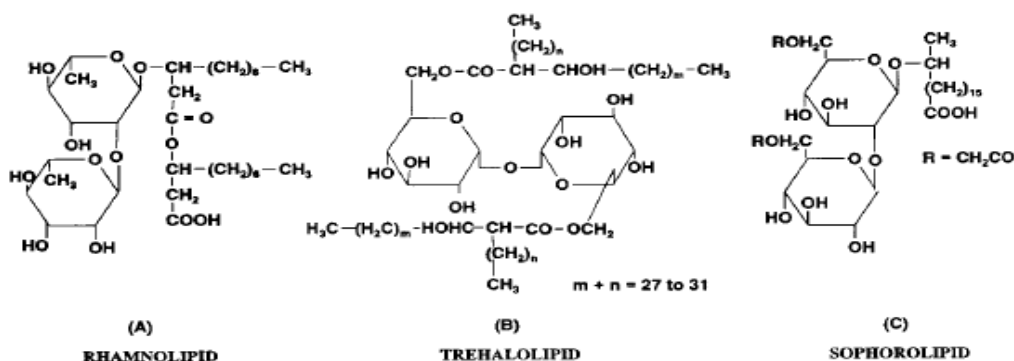


圖 3-1 Rhamnolipid、trehalolipid 和 sophorolipid 之化學結構圖

脂胜肽，大多具有抗生素特性，如 gramicidins、polymyxins、cerilipin。surfactin 為枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)產生，為脂肪酸與氨基酸結合的環狀結構脂胜肽。為一種目前已知最強而有力的生物界面活性劑，可在極低濃度下(8-80 mg/L)將水的表面張力由 72 dyne/cm 降至 27 dyne/cm 以下。其結構圖如圖 3-2 (Desai and Banat,

1997)。

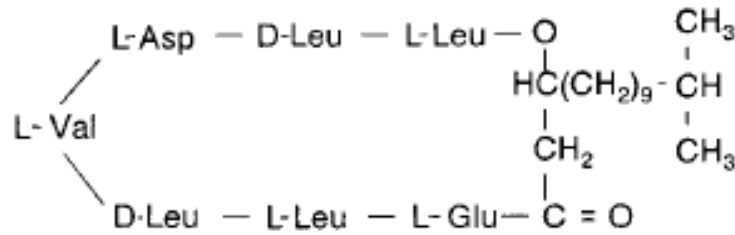


圖 3-2 Surfactin 之化學結構圖

(3) 脂肪酸，最具代表的是 emulsan，應用於儲油桶殘油回收，其結構圖如圖 3-3 (Desai and Banat, 1997)。

目前以 rhamnolipid 與 surfactin 被研究及應用得最多 (Satpute et al., 2010)。

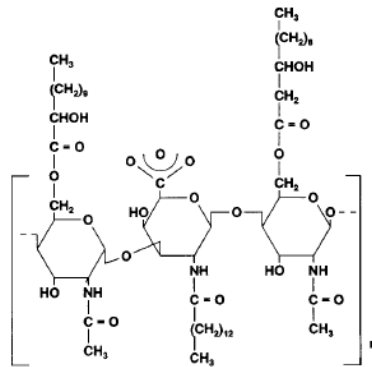


圖 3-3 Emulsan 之化學結構圖

當界面活性劑在水中濃度低時，會以分子或離子型態存在，一旦濃度持續增加，單體 (monomer) 將聚合成一個巨大的結構物，此時親油基會集合在內部，親水基則朝外排列，成為微胞 (micelle) 結構，而形成微胞所需之最小界面活性劑濃度即為臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC)，超過此濃度以上，水溶液中的單體分子濃度將維持固定，因為繼續增加的界面活性劑將形成微胞而不以單體型態存在。影響微胞形狀及大小的因素有很多，包括界面活性劑之化性、構造、水溫及水中之鹽類，會使微胞呈現球形、橢圓形或圓柱形。界面活性劑對非水溶性有機物在水中溶解度的影響可以用莫耳溶增率 (MSR) 來表示：

$$\text{MSR} = (\text{Sw} - \text{Scmc}) / (\text{Cmc} - \text{CMC})$$

其中 S_w 為某界面活性劑濃度下某非水溶性有機物在水中溶解度, S_w 為到達 CMC 時該非水溶性有機物在水中溶解度, C_{mc} 為高於 CMC 值時該界面活性劑之濃度。如以溶解度對界面活性劑濃度做圖, 則 MSR 為界面活性劑濃度大於 CMC 時之斜率。MSR 越大代表界面活性劑對疏水性有機物之增溶效應越大。

利用生物界面活性劑來清除或回收重金屬及其他有機物已有多項研究成果與先例。石油貯槽底蓄積的重金屬與污泥, 必須定期清除, 以生物界面活性劑清除, 不論水中油或是油中水, 皆可藉由生物界面活性劑大乳化及微乳化作用, 降低污泥之黏稠度, 可以很方便的利用幫浦抽取以清除槽底的污泥, 而且油水經乳化作用後, 容易隔離分離, 並混於原油內再次提煉。Joseph 夫婦(2009)將培養 *Bacillus* sp. 之菌液或去除菌體之培養亦直接添加於槽底污泥, 細菌分泌的生物界面活性劑可以從污泥內回收 90 % 之碳氫化合物。阿拉斯加海岸岩壁沉積多年的油污, 由於蒸發、風乾之影響, 以致太黏, 牢不可去。Exxon Valdez 公司即以 1 % rhamnolipid 溶液, 加溫 30-50°C 後淋洗以清除油污, 此法對於石油及其他有機污染場址之復育助益甚大。*Bacillus licheniformis* (ATCC 14580) 分泌的 lichenysin 為一種脂胜肽, 對石油之清除與回收效果很好(Thomas et al., 1993)。Kaczorek 與 Olszanowski (2011)研究發現 150 mg/L 的 rhamnolipid 與 saponin 可促進 *P. fluorescens* P1 與 *P. putida* K1 對正十二烷(dodecane)與正十六烷(hexadecane)混合液與柴油之降解, rhamnolipid 對 *P. fluorescens* P1 的效果較佳, 而 saponin 對 *P. putida* K1 的效果較佳。Kang 等人(2010)將 10 g/L 的 sophorolipid 添加於含有 2-甲基奈(2-methylnaphthalene)的土壤中, 30% 的 2-甲基奈可被脫附出來, 同時可促進土壤培養液中微生物對 2-甲基奈的降解(2 天內降解 95%)、正十六烷的降解(6 天降解 97%)、四甲基十五烷 (pristane) 的降解(6 天內降解 85%)。同樣濃度的 sophorolipid 添加亦可使原油中的飽和碳氫化合物在 8 天內降解 80 %, 芳香族碳氫化合物降解 72 %。Das 與 Mukherjee (2007)從受石油污染的土壤中篩選出三株菌—*Bacillus subtilis* DM-04、*Pseudomonas aeruginosa* M 與 NM。這三株菌可以將原油中的碳氫有機物當作碳源, 其製造的生物界面活性劑可以促進 PAH 的水中溶解度, 將生物界面活性劑與菌液定期添加於受原油污染的土壤中, 4 個月後土壤中的碳氫化合物由 84 g/kg 土壤降至 21-39 g/kg 土壤, 而控制組只減少了 1g/kg。Whang 等人(2008)蒐集 *P. aeruginosa* J4 分泌的 rhamnolipid 及 *B. subtilis* 分泌的 surfactin, 添加於以柴油(1 %)培養之土壤培養液中, 80 mg/L 的 rhamnolipid 可以在 7 天後將柴油全部分解, 也不會造成微生物毒性, 160 mg/L 的 rhamnolipid 添加有相同的降解效果, 但微生物生長並未隨之增加; 較恰當的 surfactin 濃度為 40 mg/L, 可以將柴油全部分解, 也不會造成微生物毒性, 80 mg/L 以上的 surfactin 會使微生物菌數減少, 柴油降解的效率也因此降低。Whang 等人(Whang et al.,

2009)探討 pH 值與添加氮對 rhamnolipid (50 mg/L)及 surfactin (40 mg/L)促進土壤培養液對柴油降解之影響，發現最適 pH 值為 7.0，以上(8.0)或以下(5.2)皆會抑制微生物之降解作用；氮的濃度以 200-300 mg-N/L 為限，此值時柴油降解的效能最大，也不會造成微生物毒性，450 mg-N/L 時會使微生物菌數減少，柴油降解的效率也因此降低。

大分子的生物乳化素也對有機物的清除有很好的效果。Ilori 和 Amund(2001)從 *Pseudomonas aeruginosa* 培養液中另分離出的生物乳化素 peptidoglycolipid，對原油、煤油有很好的乳化效果。Nievas 等人(Nievas et al., 2008)將可分泌生物乳化素的混菌培養液添加於船艙燃料油廢料中，可以降解 85 % 的正烷類、75 % 的易溶性碳氫有機物及 58 % 難溶性碳氫有機物。Barkay 等人 (1999)發現由 *Acinetobacter radioresistens* KA53 分泌的生物乳化素 Alasan，500 ug/mL 可以促進 phenanthrene、fluoranthene 與 pyrene 等 PAH 的水中溶解度 7-26 倍，同時促進 *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 對 phenanthrene 的礦化作用。Martínez-Checa 等人(2007) 探討不同碳源對 *Halomonas eurihalina* F2-7 分泌生物乳化素 V2-7 之效果，V2-7 較三種化學界面活性劑 Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 對原油有較佳之乳化效果，該菌在 96 小時的生長過程中可分解 57% fluoranthene、45 % pyrene、14 % naphthalene 與 16 % phenanthrene。

生物界面活性劑亦有抑菌之效果。Sandrin(1990)指出 surfactin 具有殺真菌之功能。此外，sophorolipid 對革蘭氏陽性細菌及某些腸內微生物，具有殺菌作用；Sandrin(1990)之報告，*Bacillus subtilis* 產生之脂肽類 iturin 即具有殺真菌之功能；其作用機制主要是取代細胞膜上的磷脂，使得細胞膜之構造與滲透率改變，導致細胞破裂死亡。不適當的生物界面活性劑種類與濃度，也會傷害降解毒化物微生物，因而使得微生物降解的能力變差(Volkerling et al., 1997; Whang et al., 2008) 因此在土壤復育時，須慎選添加的生物界面活性劑種類與濃度。

另外除了微生物的分泌之外，許多植物身上也可以萃取出具有界面活性劑之物質。從無患子(*Sapindus mukorossi*)類喬木種子中萃取的無患子果皂苷(Saponin)，也是人類再石化工業興起前常用的天然清潔劑。

與化學界面活性劑一樣，生物界面活性劑能提升碳氫化合物在土壤中的去除率，主要有兩個機制：(1)mobilization，可分成置換(displacement)和分散(dispersion)。分散表是在非常弱的乳化程度下將污染物分散至溶液相中，和界面張力與界面活性劑的濃度有關；置換是指將污染物藉由降低界面張力從土壤顆粒中釋放出來，只和界面張力有關而沒有乳化型態。(2)solubilization，藉著降低表面張力與界面

張力，以及形成微胞之方式而提升溶解度，可大幅提升微生物對碳氫化合物之利用率(McCray and Brusseau, 1998)。許多學者研究提出生物界面活性劑可以提升生物復育的效育，是基於(1)提升基質的溶解度，使其更容易被水中微生物利用；(2)使細胞表面改為疏水性，使疏水性的基質更容易與細胞接觸。然而若生物界面活性劑的濃度高於 CMC 時，形成的微胞將碳氫化合物包覆在內時，可以增加污染物在液相中的傳輸，但卻會降低生物利用性，使降解效率變差(Pacwa-Plociniczak et al., 2011)。

數種生物界面活性劑已有產品問市，然生物復育往往需要清除大體積土壤中之污染物，若以購得之產品添加，恐增加許多處理成本。有些研究以有機溶劑萃取菌液，待有機溶劑揮發後可獲得較高濃度的生物界面活性劑(Das and Mukherjee, 2007; Kang et al., 2010)，然使用大量有機溶劑亦非對環境友善的做法。藉由培養分泌生物界面活性劑之微生物，去除菌體之培養液中即含有可用的生物界面活性劑，它們在培養液中相當穩定，可直接添加做為材料(Pacwa-Plociniczak et al., 2011)。本研究計劃以菌液測試生物界面活性劑對柴油及相關有機物降解之影響，期尋找有效且適當的添加方法。

3-5 高含氮廢棄物回收再利用

如同先前所述，土壤污染生物整治中營養源為其整治成效之關鍵影響因子之一，提供適當且足夠的氮源可促進土壤微生物的生長及代謝速率，進而提升整體生物整治成效。特別在遭受油品污染之土壤環境中氮磷營養源更顯得格外重要，由於石油碳氫化合物屬於大量碳與氮原子所鍵結之化合物，即便土壤中本身存在些許的氮磷營養源，但大量的石油碳氫化合物使得受污染之土壤中碳氮磷比例嚴重失衡，氮磷營養源的限制則間接造成土壤微生物的生長限制。過去許多針對油品污染生物整治的研究中指出，額外添加微生物可利用的氮源可有效地提升油品污染物的降解效率。學者利用離場堆肥方式處理受到碳氫化合物污染之土壤，當額外添加氮源輔助生物堆肥時其碳氫化合物降解速度皆比未添加氮源輔助組別要快，針對潤滑油污染種類之土壤堆肥可達到 70% 的去除率；另外針對較難分解的柴油污染土壤堆肥亦可達到 71% 的去除率(Jorgensen et al., 2000)。而添加不同種類的氮源同樣對油品污染生物整治之效率有所影響，於土壤中添加硫酸銨之組別明顯較添加尿素之組別有較快的碳氫化合物降解速率；但適當的碳氮比例則皆有助於提升碳氫化合物之降解速率，研究發現無論是添加硫酸銨或尿素作為添加氮源，碳氮比 20:1 的比例皆比 40:1 的組別有較佳的降解速率(Brook et al., 2001)。而同樣的影響效果也在其他學者之研究報告中被驗證，隨著氮源添加量由 50 mg/kg 提升至 200 mg/kg 時，土壤微生物的活性也隨之上升，並且增加了石油碳

氮化合物的降解效率(Walworth et al., 2001)。更詳細之研究成果指出，於碳氮化合物污染土壤中添加氮源後，土壤微生物消耗氧氣速率及呼吸速率皆提升，同時也可以分析到更多的二氧化碳釋出(Aspray et al., 2008)。由此可知，當土壤遭受高含量的碳氮化合物污染時，土壤微生物需要攝取合適與足夠的氮源以保持細胞活性，並可於細胞代謝的同時代謝周遭的碳氮化合物，達到污染場址生物整治的成效。

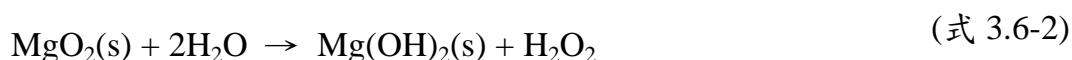
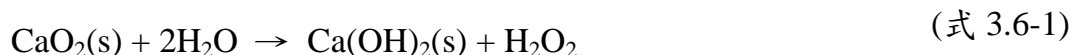
除了從肥料或化學藥劑作為額外添加氮源以外，許多製程廢棄物中也同樣含有可被生物轉化利用的氮源。皮革製作工廠中的製程過程所產生的固體廢棄物中，富含高含量的蛋白質殘留物，過去許多研究已將皮革製程之固體廢棄物作為各式氮源的來源；曾有學者將此類固體廢棄物與豆類植物一同栽種，從研究結果顯示，與皮革固體廢棄物一同栽種之豆類植物體內可固定較高含量的氮進而累積更多的蛋白質含量(Lima et al., 2010)；一些學者也將皮革固體廢棄物經過簡單前處理後，提取其中的氮源進一步用於水稻的栽種(Nogueira et al., 2011)。另外，金槍魚罐頭生產的製程，其所產生的食品廢水中也含有多種水解胺基酸成分。過去許多學者也藉用此食品廢水的特性，將殘留於廢水中的水解胺基酸作為氮源培養乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* 及其他細菌(Ovissipour et al., 2009; Ovissipour et al., 2012; Safari et al., 2012)，而魚類製品之食品廢水中的水解胺基酸也被用來培養菌株 *Zymomonas mobilis*，取代原始培養所需的氮源酵母抽出物，進一步使菌株發酵農業廢棄物產生具有經濟價值之生質酒精(Ruanglek et al., 2006)，而魚類軟骨之固體廢棄物同樣也可以作為微生物生長的氮源來源(Vasileva-Tonkova et al., 2007)。除此之外，大豆渣廢棄物中所富含的蛋白質物質也被廣泛使用於各種微生物的培養上，其中有學者將大豆渣廢棄物同時作為碳源與氮源，以連續批次式反應槽培養活性污泥並且製造生物可分解塑膠戊酸酯共聚物(Wang et al., 2007)，而在其他畜牧廢棄物中也發現含有 22% 至 25% 左右的粗萃蛋白質含量(Kanyinji and Moonga, 2014)。結合上述研究成果可推論，許多工業製程中的中間廢棄物甚至最終廢棄物中，富含許多不同種類可提供微生物生長之氮源來源，而氮源缺乏為石油碳氮化合物污染之土壤微生物的主要限制因子，若結合兩者之特性，可同時回收多種工業製程中的廢棄物作為石油碳氮化合物降解微生物生長所需的氮源，達到整合並同時處理多種環境廢棄物之優質生物整治程序。

上述之廢棄物除了回收應用之整合優點外，許多研究亦發現許多生物巨分子物質具有穩定奈米金屬顆粒之能力。於表面吸附聚丙烯酸之奈米二氧化鈾與氧化鐵顆粒，其研究發現此類型奈米顆粒可在細胞組織培養液中穩定懸浮超過數周(Chanteau et al., 2009)。而被牛血清白蛋白包覆之奈米銀顆粒可在高離子強度之水

溶液中保持顆粒穩定，被澱粉包覆之奈米銀顆粒則可抵消外在環境酸鹼度對於顆粒大小之影響(MacCuspie, 2011)。另外，研究指出部分微生物於生長代謝過程所分泌的溶解性聚醣類分子，於添加濃度 10 至 250 mg/L 時可增加銀奈米顆粒表面上的負電荷，提升銀奈米顆粒於水溶液中的穩定性(Khan et al., 2011)。而近期研究指出，微生物所分泌的巨分子中存在可避免奈米顆粒溶解之官能基，學者研究成果指出，於金奈米顆粒表面附加一層抗體蛋白質，若將抗體蛋白質結構內的半胱氨酸含量提升時，半胱氨酸中的硫醇官能基可與金奈米顆粒表面形成共價鍵結，減少外界環境溶解金顆粒之機會，進而促使金奈米顆粒的表面穩定程度(Siriwardana et al., 2013)。由上述研究成果可推測，富含生物代謝巨分子之廢水或廢棄物，其本身應同時具有穩定金屬奈米顆粒之能力，故若伴隨此類廢水或廢棄物，同時添加可促進石油碳氫化合物降解之奈米金屬顆粒，其廢棄物不僅可整合作為生物復育所需之氮源營養源，也可以同時製造提升奈米金屬顆粒穩定性之微環境，由此可知，利用適性廢棄物應用於石油碳氫化合物之生物整治程序，應為一種具有高潛力且多重功效之生物刺激策略。

3-6 無機釋氧物質種類、機制與應用

固體無機釋氧物質之種類主要有過氧化鈣、過氧化鎂、及過碳酸鈉為主，其被研究最為廣泛之特性主要為此類物質接觸到含水的環境時可釋放出些微氧氣。其主要化學反應式如下所示：



如同上述之化學反應式所表示，此類無機釋氧物質接觸到水分子後第一步會先行釋出過氧化氫，而此過氧化氫會再自發性分解成氧氣跟水分子。在這幾類無機釋氧物質當中，由於過氧化鎂具有較低的水溶解度，因此又被歸類於釋放氧氣速率最慢之釋氧物質。根據過去研究指出，過氧化鎂與過氧化鈣之平衡係數分別為 9.8×10^{-9} 與 1.8×10^{-11} ，說明過氧化鎂之溶解度較過氧化鈣為低，導致過氧化鎂的反應速率及釋氧速率皆較慢(Borden et al., 1997)。除此之外，這幾種釋氧物質在製備程序中，過氧化鈣可以得到較高純度的固體粉末，其一般的製程約可獲得純度介於 60% 至 80% 的固體粉末，相較於過氧化鎂僅有 15% 至 25% 之純度而言，過

氧化鈣可以更有效率地應用於氧氣釋放的所需程序上(White et al., 1998; Cassidy and Irvine, 1999)。

過去文獻中提及之釋氧物質應用層面相當廣泛，且亦有許多研究將釋氧物質應用於環境污染物生物復育上。起於 1994 年時，即有加拿大學者將釋氧物質添加於遭受苯與甲苯污染之地下含水層中，而研究成果指出有添加釋氧物質的試驗組別中，含水層內的釋氧物質可持續釋放氧氣長達 10 周以上，且提供的溶氧(濃度約 4 mg/L)可促進微生物降解溶解於含水層中的苯與甲苯，說明與碳氫化合物污染之場址中添加釋氧物質可有效提升現地生物整治復育之成效(Bianchimosquera et al., 1994)。於新墨西哥之研究學者也透過設立多口灌有過氧化鎂之通透井，並於灌注後持續觀察遭受 BTEX 污染之場址中，其碳氫化合物濃度於 93 天期間內的變化情形，而研究結果指出，通透井中的過氧化鎂可有效提升地下水位下 20 英尺範圍內的溶氧濃度，而所提供的溶氧作為土壤微生物代謝所需的電子接受者，進一步降解地下水中溶解的 BTEX(Odenrantz et al., 1996)。類似地，其他學者也將過氧化鈣填充至受 BTEX 污染地下水之流經通透井中，根據監測結果顯示，通透井中的地下水溶氧從 0.4 上升至 1.8 mg/L，且地下水中的 BTEX 濃度可從 17 降到 3.4 mg/L，且隨著填充的釋氧物質效果減少後，地下水中 BTEX 的降解速率也隨之下降，表示 BTEX 降解與地下水中溶氧含量之間的關係密不可分(Borden et al., 1997)。與 BTEX 污染物呈現相同之現象也發生在鄰苯二甲酸二辛酯(bis(2-ethylhexyl)phthalate, BEHP)的生物降解中，透過將過氧化鈣填充至孔隙水飽和的污染土壤中，可於 20 天的生物整治程序中將濃度 20 g/kg 的 BEHP 降解至 5 g/kg，相較於未添加過氧化鈣的組別，相同的整治試程其僅能將 BEHP 降解至 15 g/kg，可以見得釋氧物質對於此類碳氫化合物之降解有很大的幫助(Arienzo, 2000)。而釋氧物質不僅被用於降解碳氫化合物，近年來許多研究也將釋氧物質用於其他土壤整治用途，學者將釋氧物質/沸石/多孔海綿/零價鐵填充於通透牆中以去除氨氮濃度過高的地下水，其試驗結果顯示，此複合性通透牆可產生硝化作用移除地下水中 90% 以上的氨氮(Huang et al., 2015)。除此之外，也有學者藉用過氧化鈣反應時所產生的過氧化氫，直接針對含高濃度的三價砷廢水進行處理，其結果顯示於中性酸鹼度範圍內，過氧化鈣釋放的過氧化氫可有效氧化廢水中的三價砷並達到 88% 的移除率(Olyaie et al., 2012)。而其他方面，過氧化鈣也被應用於添加至一些受污染的河川及底泥中以增加水中溶氧，避免遭受污染的河川因水中細菌大量繁殖而造成缺氧，使得河川生物受到迫害的困擾(Nykanen et al., 2012)。綜合上述各項研究顯示，無機釋氧物質可有效且長時間釋放氧氣至所需的環境中，促進多種微生物生理代謝時所需要的氧氣需求，無論是在遭受油品污染的土壤及地下水體中或是各種需要提供氧氣之環境水體內，無機釋氧物質皆可扮

演重要的角色，加速整體微生物的代謝或降解速度，達到環境生物復育的顯著成效。

3-7 TPH 降解微生物與降解機制

在自然土壤中，每公頃土壤中就有 7.7 公噸的微生物，而每克土壤中則含有 1.7×10^7 個細菌、 1.3×10^6 個放線菌、 2.1×10^5 個真菌以及 5×10^2 個藻類(Burges A., 1958)。Winogradsky (1925)以生態學觀點將土壤中微生物區分為固有微生物與誘發微生物。前者的營養源來自土壤中之有機質，因此不需要添加額外的營養與能量，它們在土中的數目是穩定的；後者的數量則受到外加有機養份而增生，一旦養份消耗後即銳減。土壤深度在 3-8 cm 時，每克土壤中的微生物量約有 1.2×10^7 個，超過 40 cm 時，則降至 5%，因此固定翻動與曝氣對好氧與兼性微生物之活性相當重要。另外在通氣性良好的土壤中，細菌與真菌充斥，然在缺氧或無氧的環境下，幾乎全由細菌進行分解工作。土壤在長期受碳氫化合物污染下，可以優化出具有降解碳氫化合物之微生物，包括細菌(Bossert and Bartha, 1984)、真菌(Bento and Gaylarde, 2001)、藻類(Semple et al., 1999)及藍綠菌(Chaillan et al., 2006)等。其中 AH 為 alkane hydroxylase；AD 為 alcohol dehydrogenase；ALD 為 aldehyde dehydrogenase；ACS 為 acyl-CoA synthetase； ω -H 為 ω -hydroxylase；BVM 為 Baeyer-Villiger monooxygenase；E 為 esterase。

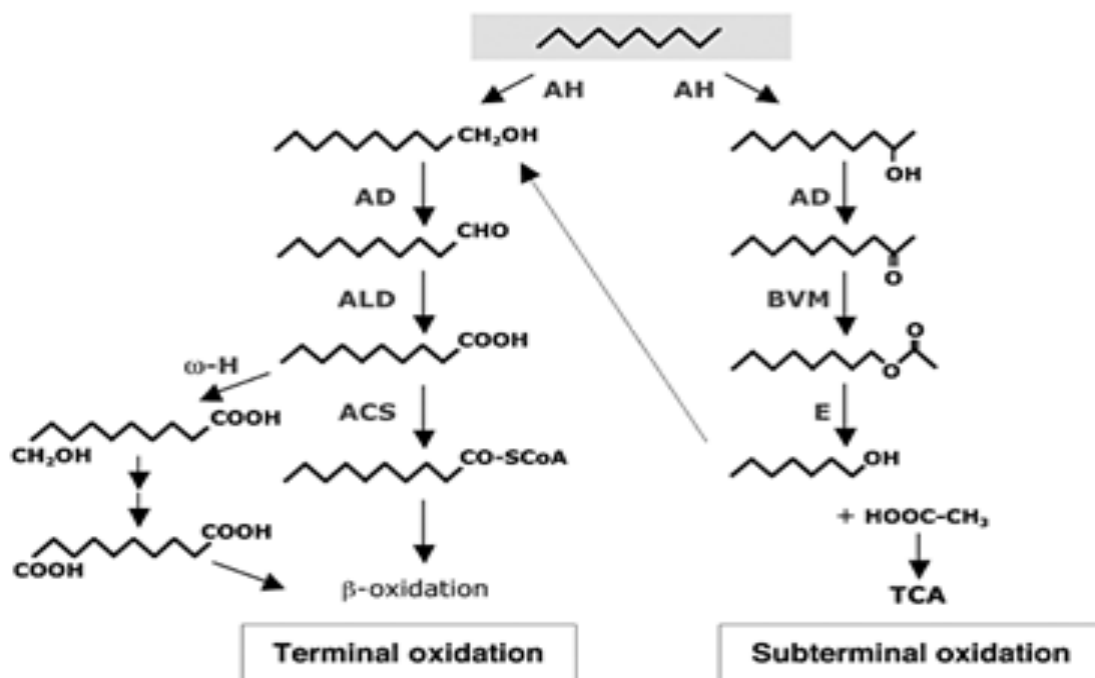


圖 3-4 降解烷烴類石油碳氫化合物之微生物酵素作用途徑

碳氫化合物降解細菌對直鏈與支鏈烷類、環烷類、與芳香族碳氫化合物之礦化代謝作用，都是建立在碳氫化合物之氧化降解反應。第一階段是藉由細菌之酵素將外界的氧氣導入碳氫化合物中。以烷烴類碳氫化合物之降解為例，最常見的代謝途徑為單末端氧化 (terminal oxidation)，即由單氧化酶(monooxygenases)將烷烴末端的一個甲基氧化形成醇，然後再氧化為醛和脂肪酸，之後直接歷經 β 氧化序列，即形成縮基並脫落兩個的碳單元；或歷經 ω -羥基化形成 ω -羥基脂肪酸，然後在非專一羥基酶的參與下被氧化為二羥基酸，最後亦經過 β 氧化序列而降解，此過程稱為雙末端氧化 (subterminal oxidation)。典型的單氧加氧酵素如烷烴氧化酵素(alkane hydroxylase, AlkB)，如圖 3-4 (Rojo, 2009)。以烷烴類為主要碳源的細菌中，單末端氧化為較重要的降解途徑，然而對於某些降解細菌，如：*Bacillus* sp.、*Streptomyces* sp.、*Arthrobacter* sp.，或一些真菌類（黴菌及酵母菌）來說，雙末端氧化則為較重要的降解途徑。支鏈烷烴類碳氫化合物之降解也是先透過單氧化酶的催化將末端的甲基羥基化，然後在一系列脫氫酶的作用下形成支鏈脂肪酸，經過 β 氧化及 ω 氧化而降解。

芳香烴為重要的原油成分，所以是復育土壤污染優先控制之污染物。以細菌好氧降解芳香族類化合物(如 benzene, toluene, xylene and naphthalene) 的過程為例，須先藉由加氧酵素(dioxygenases)將兩個氧原子導入苯環結構中(雙水解反應，dihydroxylation)，形成活性較高之中間產物雙醇基(dihydrodiol)，再經下游去氫酵素(dihydrodiol dehydrogenase)作用而將其轉換成具之關鍵性之兒茶酚類(catechol)之中間產物。後經由不同的雙加氧酵素以 ortho-或 meta-位切而裂解其環狀結構，例如鄰苯二酚加氧酵素(catechol 2,3-dioxygenase, C23DO)、甲苯加氧酵素(toluene dioxygenase, TodC1)、萘加氧酵素(naphthalene dioxygenase, NdoB)及雙酚加氧酵素(biphenyl dioxygenase, BphA1)等(Panicker et al., 2010)。最後被分解成二至四個碳的小分子而進入 tricarboxylic acid (TCA) cycle 以供菌體利用。初期氧化酵素大多位於細菌細胞膜上，因此可以直接接觸到污染物而進行反應，如圖 3-5 所示(Das and Chandran, 2011)。和細菌不一樣，真核生物的解酵素主要是細胞色素 cytochrome P450 單氧化酵素系統(monooxygenase system)，會將芳香族碳氫化合物轉化為 arene。因此碳氫化合物降解菌因具有特殊氧化酵素方能將碳氫化合物轉化為對自己無害之物質，甚至做為生長的基質來源。一般常見的石油碳氫化合物降解酵素列於表 3-4。

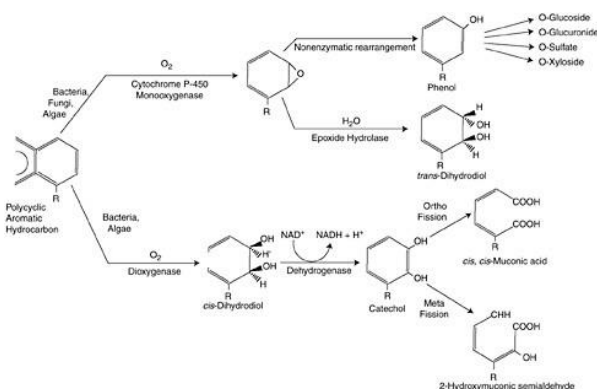


圖 3-5 降解芳香族類石油碳氫化合物之微生物酵素作用途徑

表 3-5 常見的石油碳氫化合物降解酵素。

降解酵素	目標降解物	降解微生物
Soluble Methane Monooxygenases	C1–C8 alkanes alkenes and cycloalkanes	<i>Methylococcus</i> <i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylocella</i>
Particulate Methane Monooxygenases	C1–C5 (halogenated) alkanes and cycloalkanes	<i>Methylobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylocystis</i>
AlkB related Alkane Hydroxylases	C5–C16 alkanes, fatty acids, alkyl benzenes, cycloalkanes and so forth	<i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i>
Eukaryotic P450	C10–C16 alkanes, fatty acids	<i>Candida maltose</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
Bacterial P450 oxygenase system	C5–C16 alkanes, cycloalkanes	<i>Acinetobacter</i> <i>Caulobacter</i> <i>Mycobacterium</i>
Dioxygenases	C10–C30 alkanes	<i>Acinetobacter sp.</i>

不同微生物可以降解之污染物不同，多取決於質體 (plasmid) 上攜帶的降解基因，另外細胞膜上載體蛋白之專一性，亦會限制菌種對其他物質之降解能力。將甲苯或二甲苯導入只能降解苯之細菌中，這兩種物質皆可被該細菌降解，顯示帶有某專一降解酵素質體之降解可以降解多種物質，細胞膜上載體蛋白之專一性會篩選特定降解物質之進入(Cookson, 1995)。

3-8 奈米顆粒之傳輸效率

應用於土壤與地下水時所關切的因素除了材料本身所附加的功能外，其於土壤孔隙間的傳輸情形也是影響其應用效益的關鍵。過往許多研究針對材料於不同尺寸規格下，探討其在多孔材料間的傳輸情形，而研究至今對於各種應用材料的傳輸情形仍未有全面性的了解。而多數的研究成果指出，應用材料的尺度越小有助於顆粒於多孔材料間的傳輸效率。Lecoanet 等學者研究不同尺寸的富勒烯(C60)、單層奈米碳管、奈米矽膠顆粒等多種材料之傳輸效率，發現尺寸越小其在多孔材料間的單位傳輸衰減距離越長(Lecoanet et al. 2004)；而 Guzman 等學者以不同聚集尺寸之二氧化鈦顆粒於管柱中觀察其各別的傳輸效率，也發現較小尺寸的顆粒能夠具有較高的移動性(Guzman et al. 2006)；相同地，Darlington 等學者以 50、80、及 120 奈米尺寸的奈米鋁顆粒進行土壤介質間的傳輸效率，其結果指出尺寸較小的奈米鋁顆粒較容易穿透土壤介質(Darlington et al. 2009)。然而，雖然奈米顆粒傳輸與其顆粒尺寸有密切的關係，但土壤及地下水中許多因素會使得奈米顆粒產生聚集效應，使得奈米顆粒尺寸隨著環境因素而有所改變。因此，應用於環境中的奈米材料，其實劑傳輸狀況與適用性仍需要更進一步地討論。

3-9 利用生化與分子生物學探討微生物降解石油之機制

由於生物降解常需多種微生物協同作用，形成上下游的串連方式，而微生物之間對於食物與空間等資源之競爭，也影響彼此的消長。然而目前只有極少數的環境微生物被成功分離，因為大部分微生物生存的微環境與彼此的交互作用關係尚未被釐清，因此無法在人為環境下被分離培養。然而受惠於分子生物技術之發展，可以不需長時間培養及分離的程序，即可快速鑑定微生物族群中優勢菌種，並建構微生物的族群結構。將土壤樣品中的總 DNA 萃取之後，利用 PCR 增幅特定基因之片段（例如 16S rRNA 基因），可利用 DGGE、溫度梯度凝膠電泳（temperature gradient gel electrophoresis、TGGE）或端點限制片段長度多型性分析（T-RFLP）來了解微生物的族群內之多樣性；將 16S rRNA 基因以電泳分離純化或以分子選殖的方式，分別定序，經由與資料庫之比對，可以鑑定微生物的菌種，推測期可能的生理功能，並利用序列建構族群內的親源演化樹，並修正適當

的分離策略以分離菌群。另外亦可針對特定微生物設計專屬探針，利用點墨法或螢光原位雜交法，監測特定菌群之數量、分佈情形、與動態變化。另外結合多個 16S rRNA 基因探針亦可以微陣列技術提供方便快速的檢測分析。

16S rDNA 是細胞內普遍存在之基因，有高度保守性，演化過程變異小速度慢；長度大約具有 1500 個核酸序列，有足夠資訊作為鑑定分類依據；不會再不同個體間進行轉移，序列差異可表現出微生物間的演化關係。經由許多學者廣泛研究，現今 16S rDNA 資料庫相當完善，可方便經由網路進行比對。由於核酸定序技術的進步，可快速獲得 16S rDNA 序列，經由基因資料庫進行序列比對，便可以將此物種加以進行菌種鑑定與分類，目前研究仍以 16S rDNA 作為分類依據。

DGGE 應用在分析環境微生物的族群結構，尤其研究複雜的環境微生物族群結構時，結合 PCR 可針對定的基因做大量的複製，藉由分析混合菌群中不同為生物間的差異來探討混合菌群的結構。DGGE 此技術透過尿素 (urea) 及甲醛 (formamide) 兩種變性劑形成一由低至高濃度具梯度的丙烯醯胺 (polyacrylamide) 膠體，由於在變性劑作用下，膠體上進行電泳的雙股 DNA (double strand DNA, dsDNA) 會產生部分變性 (denature)，但由於進行 PCR 反應時在 forward 引子的 5' 端加了 40bp 的 GC clamp，固可避免雙股 DNA 變成單股 DNA。雙股 DNA 間的鍵結力量是由鹼基配對所形成的氫鍵力量，其中腺嘌呤 (A) 與胸腺嘧啶 (T) 配對形成兩個氫鍵，鳥嘌呤 (G) 與胞嘧啶 (C) 配對形成三個氫鍵。因此當 DNA 序列中的 G≡C 含量愈高，打開雙股所需的力量也就愈大，變性時所需的變性劑濃度也就愈高。不同序列的 DNA 樣品核酸序列的不同，部分變性解離的程度也不相同，會在不同的變性劑濃度下打開雙股並改變其分子形狀，並藉由分子形狀的變異，在電泳膠的中的移動速度不同而分離，目的為分離不同長度相同序列不同的 DNA。在凝膠中添加線性梯度的變性劑，使 DNA 在電泳過程中通過漸增濃度的變性劑，可使序列間的差異性增大，將 DNA 片段長度相同但鹼基不同的序列分離，使得部份變性的 DNA 會在相同時間內，在膠體上跑出不同的距離。DGGE 上每一個亮帶可代表一個微生物族群，不同水平位置的亮帶即表示不同的微生物族群，準確度可達到 98% 以上。但其限制在於適合分析 500bp 大小之 DNA 片段，若 DNA 片段大於 500bp，不同序列不易分開，易造成誤判 (Muyzer, 1999; Wilderer et al., 2002)。

在降解柴油及其他碳氫化合物之際，以及在不同物化因子的環境中，各物種之消長可以提供我們了解微生物菌群的功能、主動與被動的影響。若能同時監測微生物在不同降解環境下，降解酵素之基因表現情形，可更了解微生物受到不同

促進因子影響之生物反應與機制。技術上乃針對多種已知的微生物降解酵素基因保守性序列，設計專一性引子，經由 PCR 偵測土壤樣本中特定降解酵素基因之有無，再針對篩選成功的基因，利用 Real-time PCR 監測該基因之表現(Panicker et al. 2010)。另外在後基因體時代，則可混合多種樣品，利用焦磷酸測序(pyrosequencing)技術快速分析與偵測大量樣本(Shah et al. 2011)；另外也可藉由微陣列(microarray)，針對已知環境微生物體內的代謝路徑，包含 57000 個基因，可以將具有降解能力的樣本，利用其 DNA 與 chip 雜合，以分析污泥或土壤菌群中具有哪些基因，在不同降解過程，或在不同環境物化因子存在時，微生物菌群之組成與消長情形(Claesson et al. 2010, Xie et al. 2011)。目前已知微生物還原有機化合物之反應乃藉由特定酵素之作用，然而微生物在降解過程中，內部有哪些其他生理及生化特性被改變，目前仍沒有這方面的研究。

綜合上述結果，應用釋氧物質以進行生物刺激方法，以及另用添加降解菌至混菌或土壤等生物強化手段，為處理土壤中柴油或其它碳氫有機污染物之可行策略，然而相關研究仍逐漸累積中，關於穩定性奈米釋氧物質開發以及降解菌株的選擇與用量、添加形式等都待持續研究，這些促進因子在此系統中的作用也待進一步釐清。尤其針對土壤中微生物之生長、菌相之間的消長、以及降解酵素基因之表現都極需研究，相信本計劃建立之分子生物監測系統，有助於連結微生物功能基因體與生物復育操作手法，並發展有效的生物復育模式。

第四章研究方法與過程（含工作進度甘特圖）

4-1 試劑與材料

1. 商用過氧化鈣粉末 (Calcium peroxide, CaO_2)，購買於合成工業化學原料股份有限公司，以 Commercial A 稱呼之。
2. 商用過氧化鈣/氫氧化鈣粉末 EOX^{TM} (CaO_2 : Calcium hydroxide = 3:1)，購買於 EOS remediation，以 Commercial B 稱呼之。
3. 過氧化鈣粉末(75%)，購買於 Aldrich。
4. PEG 200 (Poly(ethylene glycol), $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, average M.W. 200)，購買於 Acros。
5. CTAB (Pexadecyl trimethyl ammonium bromide, $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$)，購買於 Acros。
6. TX-100 (Polyoxyethylene octyl phenyl ether, $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$)，購買於 Acros。
7. 聚醣脂(Saponin)，購買於醇醣酐生物科技有限公司。
8. 甲醇 (Methanol, CH_3OH)，購買於 J. T. Baker。
9. 氯化鈣 (Calcium Chloride, CaCl_2)，購買於島久藥品。
10. 氫氧化鈉 (Sodium hydroxide, NaOH , 99.8%)，購買於 J. T. Baker。

本次計畫所使用的化學品均未經特別處理，而所有的溶液均用高純度的二次去離子水 (bi-distilled deionized water) 配製 (Millipore, 18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$)。

4-2 穩定型奈米過氧化鈣釋氧顆粒製備

奈米金屬釋氧顆粒之製備乃將含鈣之氯化鹽與過氧化氫反應而成，詳細步驟如下：適量氯化鈣溶解後加入一半體積、濃度 1M 之氫氮溶液，再與過量之有機穩定劑溶液(如 PEG 200、CTAB、TX-100 或聚醣脂)一同攪拌，混合均勻後，於該生成溶液上架設滴定管，以每分鐘三滴的速率加入濃度 30% 之過氧化氫溶液，經由兩小時攪拌混合後將形成淡黃色之過氧金屬溶液。將上述溶液以氫氧化鈉調整酸鹼度至 pH 11.5，其黃色溶液逐漸轉變為白色懸浮物，此時利用離心收集懸浮固體物，以去離子水沖洗收集之懸浮固體物數次，使溶液最終酸鹼度降至 pH 8.4，固體物後以烘箱烘乾(80°C)成粉末備用。

4-3 奈米過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分佈檢測

水中奈米粒徑之量測方法國內外皆採用動態光散射儀，一般檢測器之位置皆在入射光 90 度角，或有不同角度由 30 度至 180 度收光，如 Beckman coulter (UK) 之 PCS N5，此種儀器有一限制在於無法對於高濃度與高濁度之樣品進行分析。

所以本計畫採用具有背向光散射技術 (back scattering) 之儀器進行建立檢測水中奈米粒徑之方法，本計畫採用德芮克所生產之動態光散射儀 (dynamic light scattering, DLS) Zetasizer Nano 進行測定。Zetasizer Nano 可測量之粒徑計算範圍設定在 0.6~6000 nm，可測量粒徑之顆粒濃度範圍為 0.1 ppm~400000 ppm。Zetasizer Nano 主要是利用粒子與入射雷射光之間交互作用所發出之雷射散射光，藉著自相關函數 (autocorrelation function) 的推演，即可得到粒子的水合半徑，實驗方式主要為濕式量測，奈米微粒溶液放置於透明試管中，藉由 633 nm 之雷射光束打至樣品槽中，利用背向偵測樣品槽中粒子經由動態光散射所產生之波長，測量其光強度強弱變化速率來計算粒子的大小。顆粒大小分布之轉換公式如下：

$$G(\tau) = A[1 + B \exp(-2\Gamma\tau)] \quad (\text{式 4.3-1})$$

其中 A 為相關函數基線、B 為相關函數截距、 Γ 為 Dq^2 衰變常數、D 為擴散係數。

$$q = (4\pi n / \lambda_0) \sin(\theta/2) \quad (\text{式 4.3-2})$$

其中 n 為介質折光係數、 λ_0 為真空中光波長、 θ 為散射角。

依 Stokes-Einstein 方程式：

$$d(H) = kT / 3\pi\eta D \quad (\text{式 4.3-3})$$

其中， $d(H)$ 為水合半徑、k 為 Boltzmann's 常數、T 為絕對溫度、 η 為黏滯係數。此外，藉由雷射都卜勒電泳技術偵測待測材料之表面電位，其換算公式如下：

$$UE = [2\varepsilon Zf(K_a)] / (3\eta) \text{ 或 } Z = 1.5\eta UE / \varepsilon f(K_a) \quad (\text{式 4.3-4})$$

其中 UE 為電泳移動率、 ε 為絕緣常數、Z 為界達電位、 η 為黏滯係數、 $f(K_a)$ 為亨利方程式。

根據 ISO 13321 的內容，可以利用多分散性指數 (polydispersity index, PdI) 得知顆粒大小的分布，以下為其方程式：

$$\ln g_1(\tau) = \ln A - \Gamma\tau + (\mu_2 / 2) \tau^2 - (\mu_3 / 3) \tau^3 \quad (\text{式 4.3-5})$$

其中 $g_1(\tau)$ 為強度相關函數、 τ 為衰退時間、A 為常數、 Γ 為平均顆粒擴散係數、 μ_2 為第二累積量、 μ_3 為第三累積量。PdI 為 μ_2 / Γ^2 。PdI 值為用以描述量測顆粒大小分佈寬廣度之無因次單位。

由於過氧化鈣和水反應會進一步的生成氧氣，於水中生成氣泡干擾粒徑分析，

因此本計畫將過氧化鈣顆粒溶於甲醇後再進行粒徑分析，樣品槽選用 DLS 專用之方型聚苯乙烯透明容器(DTS0012)，界達電位(zeta potencial)則以 Y 型聚碳酸酯透明容器(DTS1060C)進行量測，測試溫度控制在 25°C。過氧化鈣顆粒材料參數如下：折射率(refractive index, RI)為 1.895，吸收值(absorption)為 0.01。甲醇溶劑參數如下：黏度(viscosity) 為 0.5476 cP，介電常數 (dielectric constant)為。顆粒大小選用背散光散射(173°)進行量測，一點跑 12 次，一次 10 秒。而界達電位則選用自動偵測，連續測三個點（一個點最少跑 10 次，最多跑 100 次）。DLS 是依照第一物理原則，亦即遵照 Stokes-Einstein 方程式，為絕對方法，不需要標準品做檢量線，標準品的用意在於驗證儀器的電子電路光學等系統是否正常。

4-4 奈米過氧化鈣釋氧顆粒之基本物化特性分析

4-4-1 穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscope, TEM)

奈米過氧化鈣釋氧顆粒之形態及大小另以 TEM 進行鑑定，機器為 HRTEM, JEOL, JEM-3000F，以 200 千伏特 (kV) 的加速電壓打至分散於樣品的銅網上，以瞭解奈米材料的顆粒大小與形態。

4-4-2 X 光粉末繞射儀 (X-ray powder diffractometer, XRD)

利用 X 光粉末繞射儀分析奈米過氧化鈣釋氧顆粒之晶形結構。利用布拉格方程式(Bragg's law)，計算其晶格間的距離，同時也可以由繞射峰的半高寬計算出結晶區塊的大小。本計畫所使用的儀器機型為 MAC Science, MXP18，操作條件為加速電壓為 30 kV 及電流為 20 mA。掃描範圍為 5~90 度且每分鐘掃描 4 度。其中二氧化鈦的晶粒大小可使用布拉格方程式(Bragg's law)加以推估：

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (\text{式 4-4.1})$$

其中 n 為整數值、 θ 為繞射波峰的布拉格角(Bragg Angle)、 λ 為 X 光的波長 (1.5405 Å)、 d 為結晶面間的距離。

4-4-3 傅立葉轉換紅外光譜儀 (Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)

傅立葉轉換式紅外線光譜儀可利用奈米過氧化鈣釋氧顆粒表面鍵結之官能基種類，來鑑定表面修飾物之有無與種類。本計畫所使用的型號為 Horiba FT-720，掃描波數範圍為 400~4000 cm^{-1} ，掃描模式為吸收式掃描。製樣方式為溴化鉀鹽片法：將溴化鉀固體放至 100°C 的烘箱中過夜乾燥，取約 300 mg 的溴化鉀固體，用瑪瑙研鉢均勻研磨成細緻的粉末後，用壓片器 (Pellet die) 壓成鹽片，進行空白

測試。再取約 10 mg 之奈米過氧化鈣釋氧顆粒粉末，與溴化鉀粉末均勻混合研磨後，使用壓片器壓片後測量。由於溴化鉀在此波數間沒有吸收，故可得完整吸收光譜，又此法所需的樣品量極少 (1~2 g)，故採此方式測量。

4-5 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之聚集特性

奈米過氧化鈣釋氧顆粒於甲醇中之聚集特性亦採用 DLS 量測顆粒粒徑隨時間之變化，由粒徑對時間做圖可了解奈米釋氧顆粒隨著時間其顆粒粒徑的變化。

4-6 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之沉降特性

奈米微粒在水介質中的轉變為聚集後發生沉降，一般沉降類型可由自由沉降到絮凝沉降與層沉降以及壓密沉降。由於過氧化鈣和水反應會進一步的生成氧氣，於水中生成氣泡干擾分析，因此本計畫將過氧化鈣顆粒溶於甲醇後再進行懸浮及穩定性分析。利用可見光分光光譜儀 (Ultraviolet-visible, UV-Vis, Unico Spectro UV-2802)，其原理為利用可見光與紫外光之燈管做為光源，光源經過濾光鏡調色後，經聚焦通過單色光分光稜鏡，在經過狹縫產生特定波長的光源，光線打入樣品槽待測物後再由偵測器將光能轉化為電子訊號，再藉由待測樣品與空白樣品之吸收光能差，與所配製之標準液之吸收值進行比較即可量測出樣品內待測物之濃度。將溶解奈米過氧化鈣釋氧顆粒之甲醇溶液放入分光比色液槽，立刻放入分光光度計中，以波長 209 nm 進行量測，隨時間記錄其吸光值之變化，由此實驗 C/C_0 對時間做圖可得沉降曲線。

4-7 水介質中奈米過氧化鈣釋氧顆粒之釋氧率量測

釋氧率以排水集氣法來進行測試，將 250 ml 去離子水裝入錐形瓶中，並加入 0.3 克的不同釋氧顆粒，迅速的將抽氣過濾瓶瓶口封住並將連接的矽膠管通入裝滿水倒至於燒杯的量筒內，紀錄量筒內空氣隨時間下降的刻度進一步得到釋氧量和時間的關係。

4-8 柴油分析

4-8-1 液相液相萃取 (Liquid-liquid extraction)

取 2 ml 培養液以 2 ml 丙烯酸乙酯 (Ethyl acrylate) 萃取，萃取時以超音波震盪器振 20 分鐘，收集有機相，重複三次後混合，利用 GC 進行分析。

4-8-2 柴油分析條件

利用氣相層析儀/火焰離子化偵檢器 (Gas Chromatograph/ flame ionization

detector, GC/FID)進行總 TPH 偵測。

表 4-1 GC/ FID 之操作參數

Operating parameter	Analysis conditions
Total flow	23.3 ml/min
Inlet temp	250 °C
Detector temp	300 °C
Oven temp	45 °C, hold 3min, 10 °C /min to 300°C, 300 °C hold 10 min

4-9 水介質中奈米過氧化鈣對柴油溶解量之影響

於樣品瓶內加入 20 ml 的去離子水，並添加入柴油配置成濃度為 10000 ppm，於 35 °C 培養箱進行 24 小時震盪後，取出水相 2 ml，以丙烯酸乙酯(Ethyl acrylate) 體積 1:1 進行萃取，重複三次，每一個樣品三重複，萃取液以 GC 進行分析。

4-10 添加溶液特性

針對食品廢水之基本水質特性進行分析，分析項目包括：酸鹼值、氧化還原電位、導電度、總有機碳、總氮與總磷。酸鹼值、氧化還原電位、導電度以相關電極偵測；總有機碳以 Aurora Model 1030W 濕式氧化法 TOC 分析儀進行；總氮分析方法將參考環檢所公告之 NIEA W423.52C 分析方法；總磷則採用環檢所公告之 NIEA W427.53B 分析方法。

4-11 土壤樣本

土壤樣本取自雲林某加油站因油管洩漏而污染之土壤，分別為高污染未整治土(簡稱高污染土, Untreated soil)與以曝氣工法整治過之土壤(簡稱復育土, Treated soil)。針對土壤之基本物化特性進行分析，分析項目包括：酸鹼值、含水率、氧化還原電位、總有機碳、總氮與總磷。含水率採用環保署公告之檢測方法 NIEA S280.61C，以坩鍋烘乾量取淨重及濕土重，再以 105°C 經 48 hour 之乾燥，秤取乾土重，而含水率就以「水份/乾土重」代表。酸鹼值 (pH) 測定根據環保署所研訂之電極法 (R208.04C) 進行測定。秤取土壤樣品 5.0 ± 0.5 g 於燒杯中，加入 25 ml 之去離子水 (1:5)，攪拌均勻後靜置 30 分鐘，過濾所得之濾液進行測定。碳氮比採用環保署公告之檢測方法 NIEAR409.21C，土壤中各元素含量檢測方法—元素分析儀法。

4-12 生物抑制毒性之評估

為了解奈米過氧化鈣釋氧顆粒是否抑制分解菌株生長，以國立中興大學環境工程學系楊秋忠教授所提供之柴油分解菌株 *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 進行試驗，該菌株篩選於台中市重光加油站儲油桶污泥。因 CC-JG39 培養時主要漂浮於培養基液面，因此採用乾重法量測菌隻生長情形(曾依蕾, 2005)。取 5 mL LB 培養 CC-JG39 三天後，添加試驗之三種奈米過氧化鈣釋氧顆粒：Commercial A、Commercial B 及 Wet-grinded- CaO_2 ，於 35 °C 下培養 48 小時後，以 6000 rpm 離心除去上清液，收集菌體，於 50 °C 烘箱中乾燥，24 小時後測量乾重以做比較。

4-13 可降解柴油微生物之篩選試驗

本研究針對柴油降解的最佳化菌株試驗，設計概念為兩種分別篩出的純菌與原生混菌及其組合的試驗來找出最佳組合，分別為具有柴油分解菌 *Gordonia alkanivorans* (CC-JG39)與EM混菌與其組合菌，每個處理之微生物生物量約1.0 mg/L，以基礎鹽類培養液(Basic medium)，配方:0.5 g/L NH_4Cl 、1.3 g/L Na_2HPO_4 、0.8 g/L KH_2PO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 g/L CaCl_2 、0.05% Triton X-100)與LB medium(10g/L NaCl、5g/L Yeast extract、10g/L Tryptone)，並添加1,000 ppm柴油做為碳源後滅菌使用，配合加入兩種濃度(0.01%及0.1%) Commercial B- CaO_2 ，從較單純的水體試驗來測試，觀察否有明顯提升與主導柴油的降解情形與微生物生長量關係。無添加 CaO_2 並含1,000 ppm柴油之相同配置為空白對照組。

4-13-1 可降解柴油微生物之土壤水溶液試驗

以Basic medium或以高污染土或復育土之土壤樣本/去離子水比例為1:5，120 rpm shaker反應overnight，經 Whatman No. 1 濾紙(孔徑11 μm)於布氏漏斗抽氣過濾，且添加1,000 ppm柴油做為碳源後滅菌使用，並比較兩種濃度(0.01%及0.1%)之Commercial B- CaO_2 與Wet-grinded CaO_2 ，探討不同種類之培養基與過氧化鈣對柴油降解率、pH值與含氧量之影響。

4-13-2 柴油降解微生物在土壤之馴養試驗

Basic medium 添加 2,000 ppm 柴油後滅菌使用。取 5g 土壤樣本，以含柴油之基礎鹽類培養液進行馴養，培養於 30 °C 恆溫培養箱，以 80 rpm 水平震盪維持系統內部氣體供應。無添加土壤、含 2,000 ppm 柴油之相同配置為空白對照組，而滅過菌並添加 0.01M 疊氮化鈉之相同配置為控制組。

4-14 添加溶液對微生物降解柴油效能分析

選擇降解效能較佳之微生物，以等比例添加於土壤中，並測試不同比例之氮磷溶液，對於土壤微生物降解柴油之效應。測試條件有氮:磷=7:1、10:1、15:1。添加溶液若為氮:磷=10:1成分為sucrose (2.5 kg/m^2)、 NH_2CONH_2 (1.25 kg/m^2)、 KH_2PO_4 (0.315 kg/m^2)。

4-15 分子生物學方法分析菌相

4-15-1 微生物 DNA 之萃取

土壤中微生物DNA之萃取採用UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Laboratories, Inc., Solana Beach, Cal., USA)，操作步驟如下：取0.5 g - 1.0 g 土壤到 2 ml 的glass bead solution tube 中，置於vortex 上震盪5 s，加入60 μl 的S1 solution 和200 μl 的IRS solution 並置於vortex 上全速震盪10 min，10,000 rpm 離心30 s，取上清液450 μl 至新的離心管並加入250 μl 的S2 solution 置於vortex 上震盪5 s，置於冰上5 min，10,000 rpm 離心1 min 後，取500 μl 的上清液至新的離心管，加入900 μl 的S3 solution，置於vortex上震盪5 s，取700 μl 加至spin filter，10,000 rpm 離心1min，倒掉離下的液體，再取剩下的650 μl 至spin filter 中，10,000 rpm 離心1 min，倒掉離下的液體，加入300 μl 的S4 solution 至spin filter，10,000 rpm 離心30 s，倒掉離下的液體，再10,000 rpm 離心1 min，取出spin filter 至新的離心管，加入50 μl 的S5 solution 至spin filter 中，10,000 rpm 離心30 s，丟棄spin filter，即得到DNA。之後以分光光度計量測260 nm、280 nm吸光值並換算DNA濃度。

4-15-2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

將萃取之土壤微生物DNA進行聚合酶連鎖反應，本計畫針對一般細菌16S rRNA 基因序列核酸設計引子 (primer)，分別為 Eub968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') 3' 端加上 GC clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTAC-3')與Univ1392R (5'-ACGGGCGGTG-TGTAC-3')。PCR反應試劑配方列於表4-4.2，聚合酶採用GenTaq PlusTM DNA polymerase (GMBiolab Co, Ltd., Taiwan)。所使用的設備為Minicycler PTC-150 (Bio-Rad, Hercules, California, USA)，反應溫度程序條列於表4-4.3，反應後可將DNA擴增放大，先利用瓊脂膠體電泳 (Agarose Electrophoresis) 確認反應後片段大小、產物純度及濃度，再後續進行變性梯度凝膠電泳實驗。

表 4-2 PCR 反應試劑配方

Reagent	Volume (μl)
10X buffer	2.5
2.5 mM dNTP	2
EUB968F (10 μm)	0.5
UNIV1392R (10 μm)	0.5
DNA (30 - 500 ng)	1
GenTaq Plus TM	0.1
ddH ₂ O	19.4

表 4-3 PCR 反應溫度程序

Step	Temperature(°C)	Time	Cycle number
1	94	1 min	1
2	94	30 sec	30 (step 2+3+4)
3	55	30 sec	
4	72	30 sec	
5	72	7 min	1

4-16 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備 註
文獻資料蒐集	■	■		■	■		■	■		■	■		
穩定型奈米金屬釋氧 顆粒製備與特性分析	■	■	■										
添加溶液特性分析	■	■	■										
奈米釋氧顆粒聚集沉 降特性試驗		■	■	※									
穩定型奈米金屬釋氧 顆粒對柴油溶解度				■	■	■							
生物降解效應與抑制 毒性評估				■	■	■	■						
分子生物系統建立				■	■	■	■	※					
土壤培養液降解柴油 反應動力實驗							■	■	■	■	■		
土壤培養液菌群變化							■	■	■	■	■		
分解菌酵素表現評估							■	■	■	■	■	※	
成果報告發表			■	■			■	■			■	■	
工作進度估計百分比 (累 積 數)	5%	15%	20%	30%	40%	40%	50%	60%	60%	60%	90%	100%	
預定查核點	期 中		1. 獲得穩定型奈米金屬釋氧顆粒及其特性了解 2. 奈米金屬釋氧顆粒之柴油溶解性、生物降解、抑制毒性與分子生物監測系統的建立										
	期 末		1. 穩定型奈米金屬釋氧顆粒對土壤中柴油生物降解之促進成效與分子生物監測系統之可行性評估										

說明：

- 1、工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。
- 2、「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1) 工作天數，(2) 經費之分配，(3) 工作量之比重，(4) 擬達成目標之具體數字。
- 3、「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。
- 4、多年期計畫應分年說明各年度工作項目及期程規劃。

第五章 結果與討論（含結論與建議）

5-1 過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分析與製備

利用 DLS 分析，表 5-1 為不同條件處理下所測量得之過氧化鈣顆粒大小及其 PDI 值，經過 200 mesh 過篩後的 Commercial A-CaO₂ (Sample A) 顆粒其平均顆粒大小大於 6 μm (7288 nm)。Commercial B-CaO₂ (Sample B) 為一環境顧問公司在現地整治已在使用之過氧化鈣顆粒，經過超音波震盪後平均粒徑為 950 nm 左右(圖 5-1)，然而 PDI 值為 0.7，在表 5-1 中相對的較高；Aldrich-CaO₂ (Sample C) 平均粒徑為 750 nm 左右，PDI 值 0.4(圖 5-2)。

由下而上製備法(Bottom up)為以離子態進行沉澱生成反應，而合成出所需的大小顆粒。將適量氯化鈣溶解後加入一半體積、濃度 1M 的氫氮溶液，再與過量之有機穩定劑溶液(如 PEG 200、CTAB、TX-100 或聚醣脂)一同攪拌混合均勻成為生成溶液。於生成溶液上架設滴定管以每分鐘三滴的速率加入濃度 30% 的過氧化氫溶液，經由兩小時攪拌混合反應後形成淡黃色溶液，即完成過氧金屬之溶液製備(Khodaveisi et al., 2011)合成之方法。將上述溶液以氫氧化鈉調整酸鹼度至 pH 11.5，其黃色溶液逐漸轉變為白色懸浮物，此時透過適當的離心速度收集懸浮固體物，將收集的懸浮固體物以去離子水沖洗數次使溶液最終酸鹼度降至 pH 8.4，形成固體物後，以烘箱烘乾(80°C)成粉末備用。自行合成之過氧化鈣顆粒部分，共得到三種顆粒，分別為 CTAB-CaO₂ (Sample D)、PEG 200-CaO₂ (Sample E) 以及 TX-100-CaO₂ (Sample F)。然而，以聚醣脂合成之固體物太少不易收集，不適合此研究，所以沒有進行後續實驗分析。三種自行合成之過氧化鈣顆粒粒徑分別為 2369 μm 、800 μm 以及大於 6 μm (11934 nm)，圖 5-3 與圖 5-4 分別為 CTAB-CaO₂ (Sample D) 與 PEG 200-CaO₂ (Sample E) 之粒徑分佈圖。

也嘗試由上而下製備法(Top down)為將大顆粒以研磨、剝蝕的方法變成小顆粒的方法。本計畫參考 Li 等人(2009)及 Qian 等人(2013)文獻，將過氧化鈣顆粒(Commercial A-CaO₂)利用研磨機自行研磨，研磨機為 Retsch PM100 (尚上公司)。自行利用乾式研磨可以減少顆粒大小到 500~750 nm 左右，但是顆粒的平均粒徑並不會因為研磨時間的增加(10 到 30 分鐘)而改變，但是顆粒的 PDI 值由 0.4 下降至 0.2 (Sample G-I)，顯示顆粒大小會隨著研磨時間的增加而趨向同質化，圖 5-5 為 dry-grinded 30 min CaO₂ (Sample I) 之粒徑分佈圖。

另亦將過氧化鈣顆粒粉末分散於溶液中，以直徑 250 μm 的研磨珠以轉速 2000-2500 rpm 進行研磨，反應溫度控制在 35°C 以下，並於研磨過程中添加分散劑使得研磨過後的顆粒得以均勻的分散於溶液中，進一步於甲醇中研磨後可

以得到接近奈米等級之過氧化鈣顆粒，平均大小 110 nm 左右(Wet-grinded CaO_2 , Sample J)，圖 5-6 為利用 DLS 偵測之粒徑分佈，分別以訊號強弱(intensity)、數量(number)及體積(volume)表示，其顆粒分布範圍主要在 10-1000 nm 之間，PDI 值為 0.267，顯示透過研磨並添加分散劑後過氧化鈣顆粒可以有效的分散並不再聚集。

表 5-1 不同奈米過氧化鈣釋氧顆粒之粒徑分析

Sample	Treatment	z-average size (nm)	PDI value
A	Commercial A	>6000	
B	Commercial B	953.8	0.7
C	Aldrich- CaO_2	750	0.4
D	CTAB- CaO_2	2368.7	0.4
E	PEG 200- CaO_2	800	0.2
F	TX-100- CaO_2	>6000	1.0
G	dry-grinded 10 min	501.4	0.4
H	dry-grinded 20 min	749.3	0.5
I	dry-grinded 30 min	568.0	0.2
J	Wet-grinded CaO_2	123.2	0.3

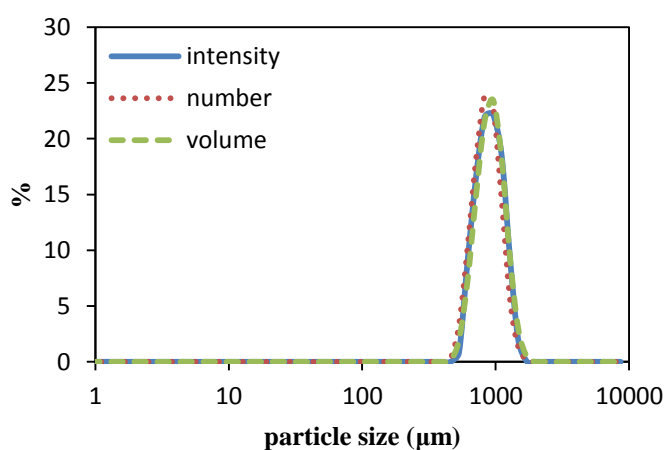


圖 5-1 Commercial B- CaO_2 (B)粒徑分佈圖

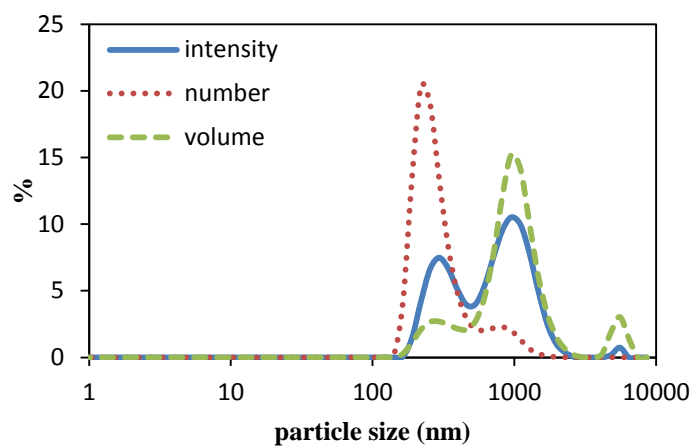


圖 5-2 Aldrich-CaO₂ (C)粒徑分佈圖

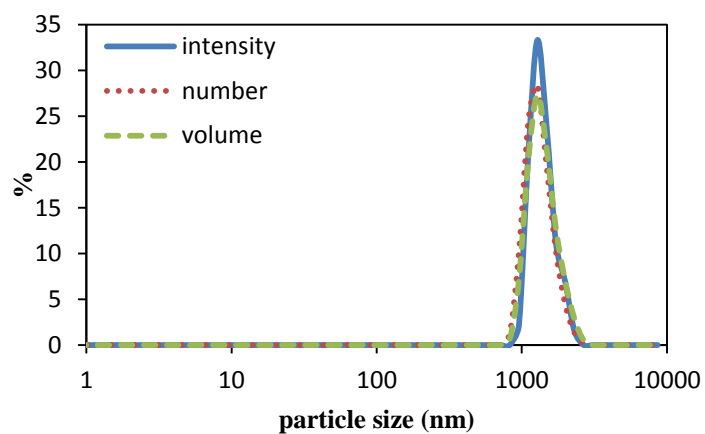


圖 5-3 CTAB-CaO₂ (D)粒徑分佈圖

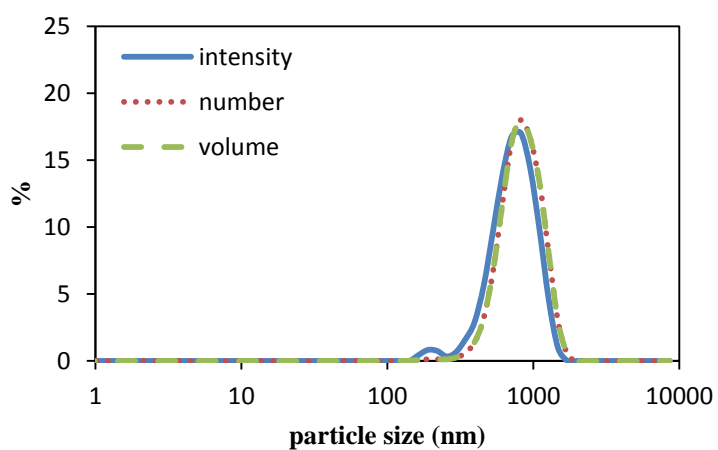


圖 5-4 PEG 200-CaO₂ (E)粒徑分佈圖

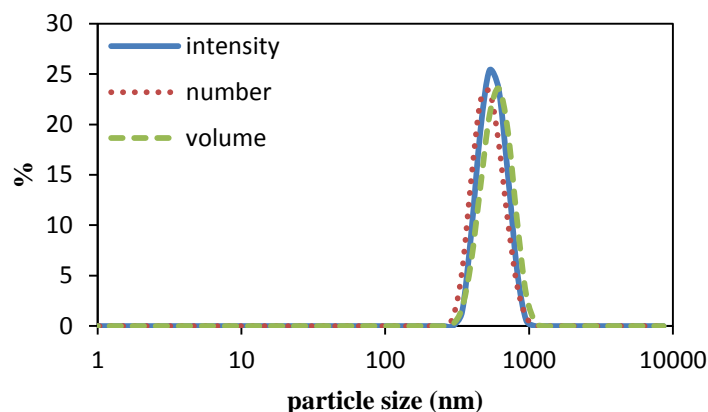


圖 5-5 Dry-grinded 30 min CaO_2 (I) 粒徑分佈圖

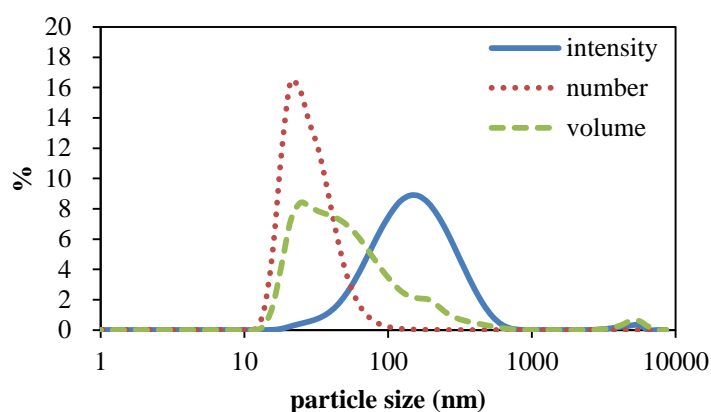


圖 5-6 Wet-grinded CaO_2 (J) 粒徑分佈圖

5-2 顆粒之基本物化特性分析

5-2-1 光學顯微鏡與電子顯微鏡影像

未經研磨的顆粒以光學顯微鏡觀察，Commercial A- CaO_2 (圖 5-7) 和 Commercial B- CaO_2 (圖 5-8) 過氧化鈣顆粒的大小分布主要為 7-10 μm 左右。合成之 CTAB- CaO_2 (D) 顆粒則是顆粒較大，大部分都在 10 μm 左右(圖 5-9)，PEG- CaO_2 (E) 顆粒分布在 5 μm ，在影像上可以看到有些許較小的顆粒小於 1 μm ，不過影像中可以發現顆粒有明顯的聚集(圖 5-10)。經過研磨過後的過氧化鈣顆粒以電顯觀察，大的顆粒可以看到約為 100 nm，其中也可以看到 Wet-grinded CaO_2 具有相當多因研磨而得的小顆粒分散於其中(圖 5-11)，結果顯示和以 DLS 所測得的顆粒大小相符合。

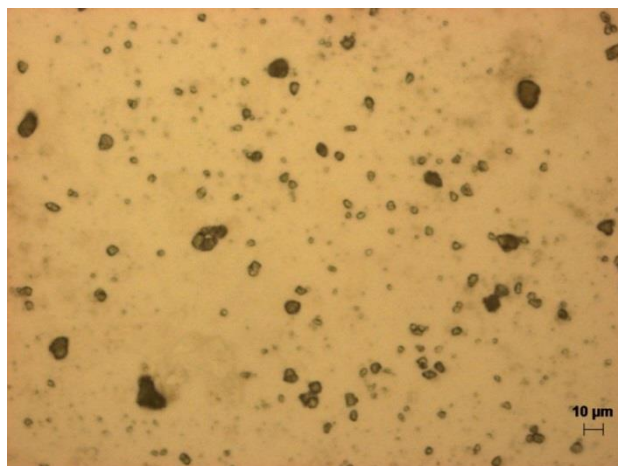


圖 5-7 Commercial A-CaO₂ (A)光學影像圖

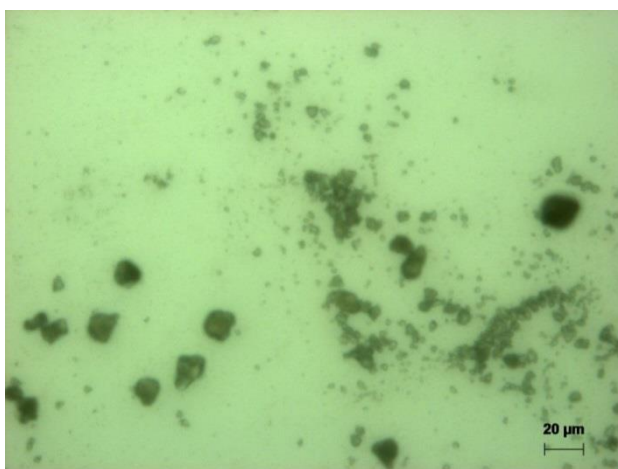


圖 5-8 Commercial B-CaO₂ (B)光學影像圖

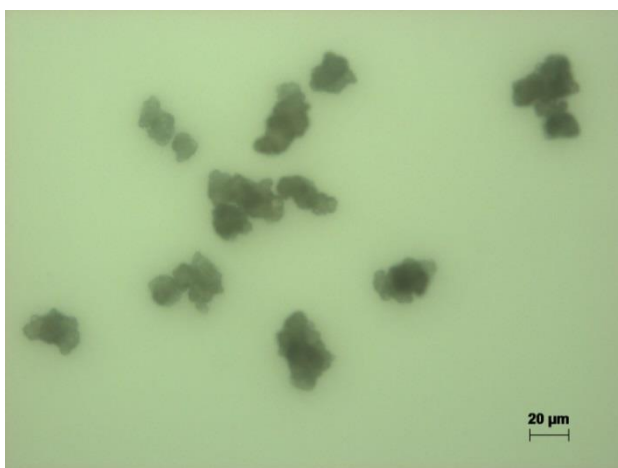


圖 5-9 CTAB-CaO₂ (D)光學影像圖

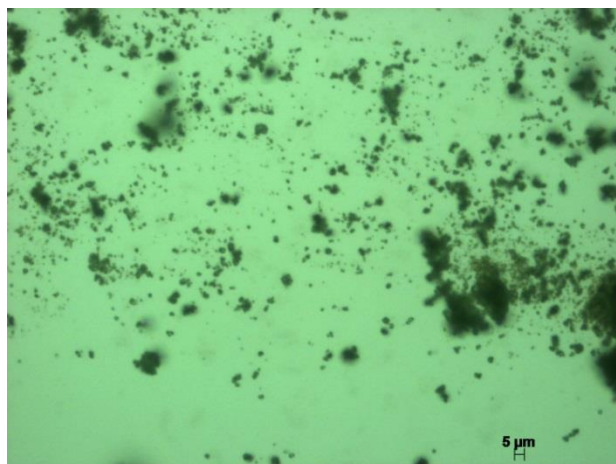


圖 5-10 PEG-CaO₂ (E)光學影像圖

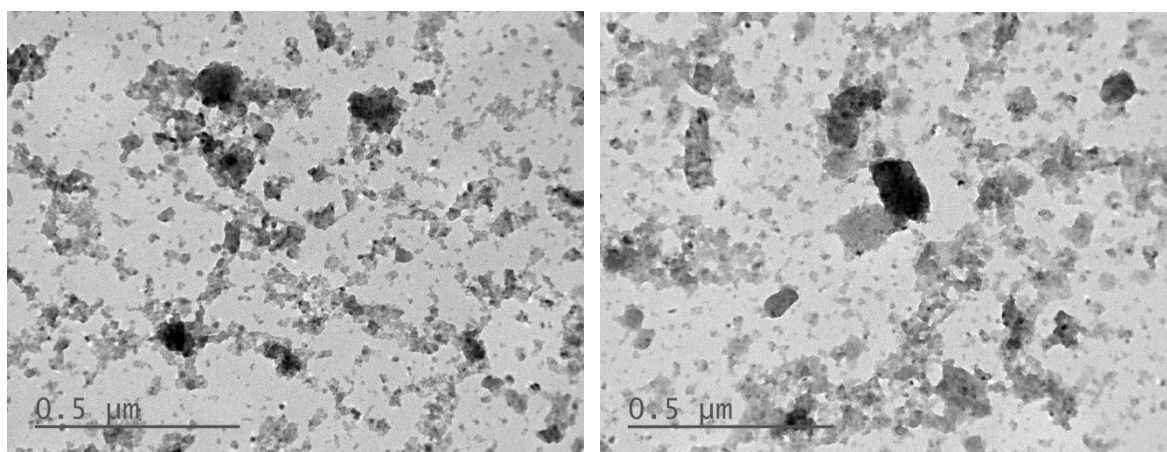


圖 5-11 Wet-grinded CaO₂ (J)電子顯微鏡影像圖

5-2-2 X 光粉末繞射儀圖譜

圖 5-12 為 Commercial A-CaO₂ 之圖譜，顯示 2θ 為 20° 、 23.5° 、 30.9° 、 34.5° 。圖 5-13 為 CTAB-CaO₂ 之圖譜，訊號較弱僅顯示 2θ 為 19.4° 與 23.8° 。圖 5-14 為 PEG-CaO₂ 之圖譜，訊號顯示 2θ 為 19.4° 、 23.7° 、 25.9° 與 28.3° 。圖 5-15 為 TX-100-CaO₂ 之圖譜，訊號顯示 2θ 為 19.4° 、 23.4° 、與 31.6° 。圖 5-16 為 Commercial A-CaO₂ 進行溼式研磨後而得之 Wet-grinded CaO₂ 的圖譜，訊號顯示 2θ 為 19.85° 、 23.5° 、 30.95° 、 35.4° 、 40.45° ，由於 XRD 光束線波長為 1.0285\AA ，根據文獻進行兩者波長轉換並進行擬合，在特定的 2θ 角度都出現了代表過氧化鈣的特定波峰，這些顆粒的 XRD 繞射波峰在此波長下 2θ 為 20.07° 、 23.08° 、 31.53° 。市售的樣品及合成的樣品皆具有過氧化鈣的特徵峰出現，顯示所合成的是過氧化鈣顆粒。

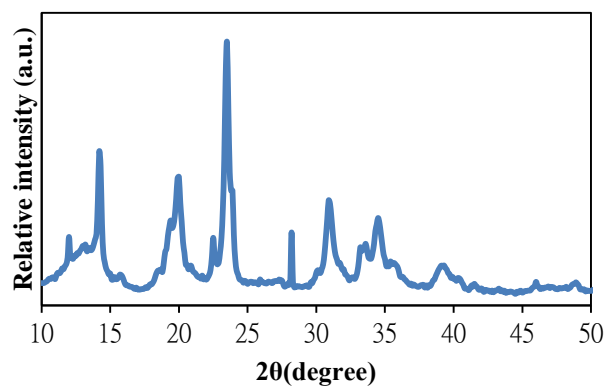


圖 5-12 Commercial A-CaO₂ (A)之 XRD 圖譜

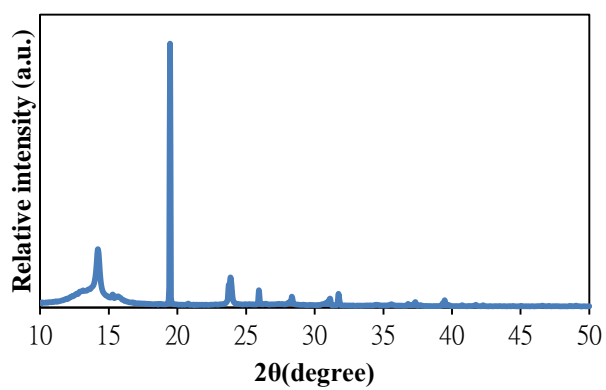


圖 5-13 CTAB-CaO₂ (D)之 XRD 圖譜

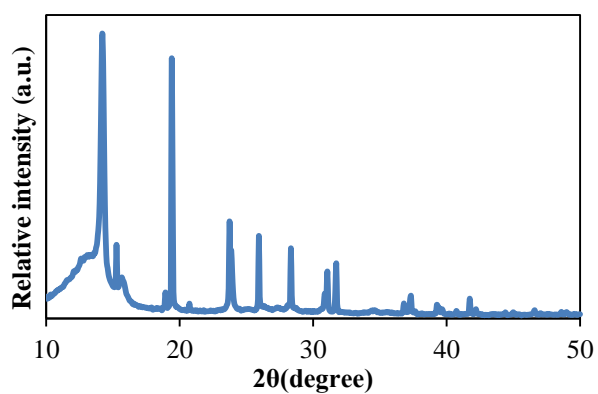


圖 5-14 PEG-CaO₂ (E)之 XRD 圖譜

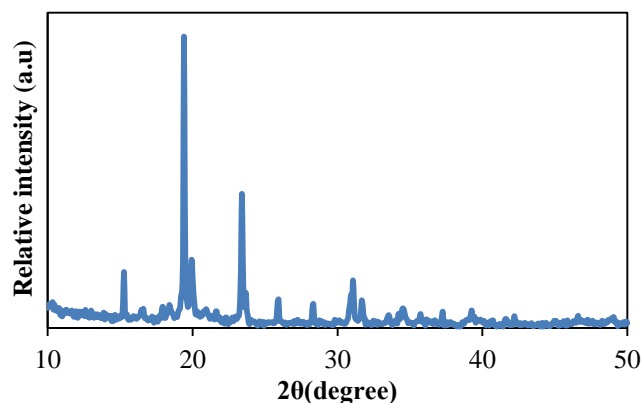


圖 5-15 TX-100-CaO₂ (F)之 XRD 圖譜

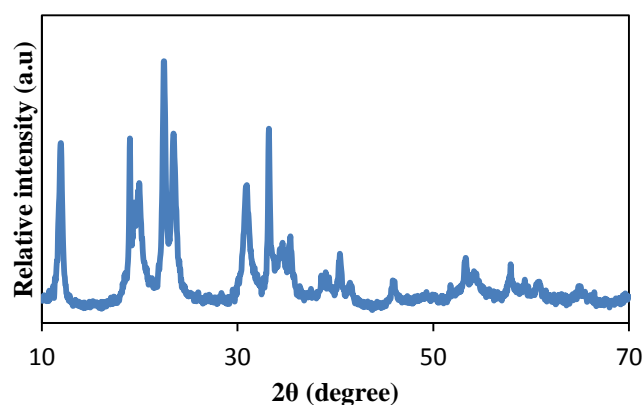


圖 5-16 Wet-grinded CaO₂ (J)之 XRD 圖譜

5-2-3 傅立葉轉換紅外光譜儀圖譜

圖 5-17 至圖 5-20 分別為不同過氧化鈣顆粒的 FTIR 圖譜: Commercial A (A)、Commercial B (B)、PEG-CaO₂ (E)及 Wet-grinded CaO₂ (J)。此四圖譜皆觀察到位於波長 3641 cm⁻¹ 之吸收峰,顯示來自於表面之 OH 官能基;另外波長位於 1448 cm⁻¹ 之吸收峰及訊號較弱的 874 cm⁻¹ 之吸收峰,應為 CO₃⁻² 之官能基。Wet-grinded CaO₂ 於 1800 cm⁻¹ 左右有一吸收峰(圖 5-20), PEG-CaO₂ 於此波長也有一吸收峰,應為有機修飾物所造成,但因訊號較弱,可能表面吸附之有機化合物比例並不高。

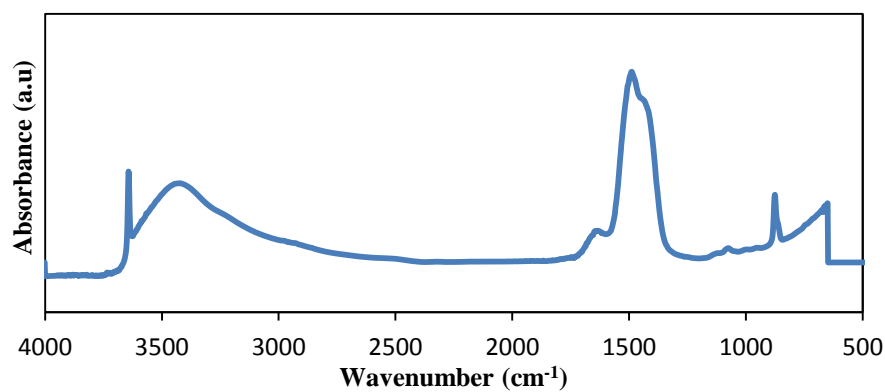


圖 5-17 Commercial A-CaO₂ (A)之 FTIR 圖譜

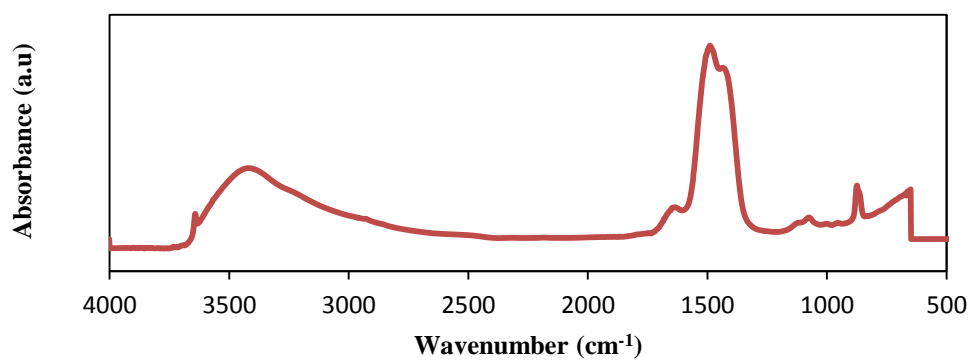


圖 5-18 Commercial B-CaO₂ (B)之 FTIR 圖譜

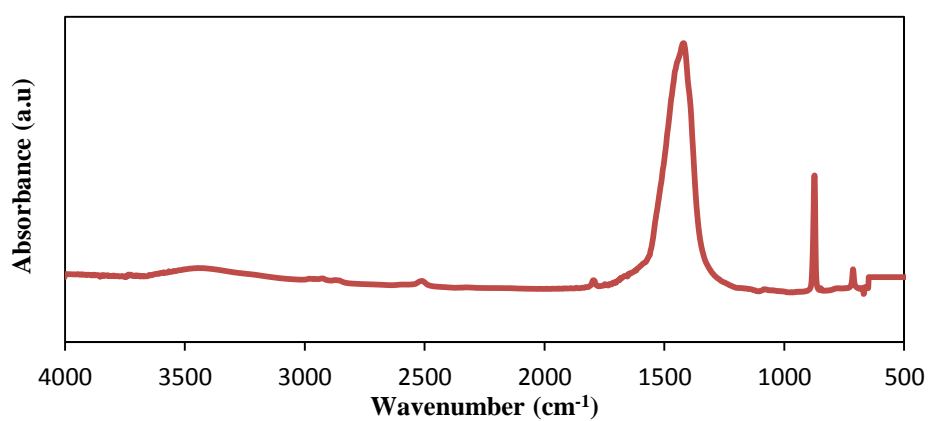


圖 5-19 PEG-CaO₂ (E)之 FTIR 圖譜

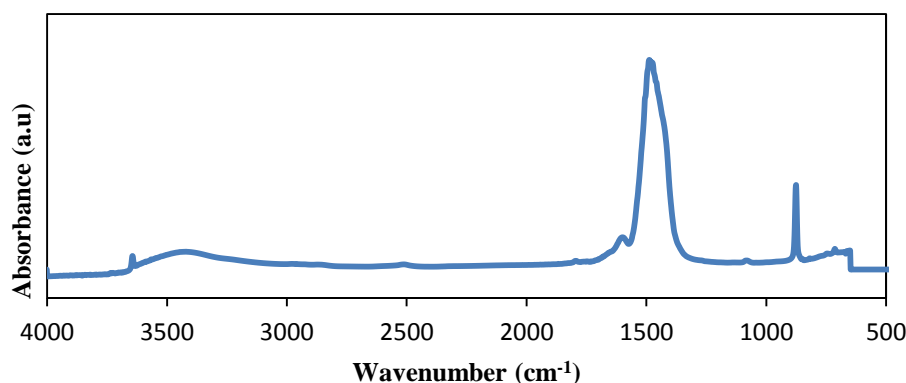


圖 5-20 Wet-grinded- CaO_2 (J)之 FTIR 圖譜

5-3 過氧化鈣顆粒於溶液中的聚集沉降特性

圖 5-21 為過氧化鈣顆粒於溶液中的聚集沉降特性之結果。其中 400 ppm Commercial A- CaO_2 於 1 小時後約 30% 已聚集沉降，之後吸光值不再變化。另外 400 ppm Commercial B- CaO_2 (B) 隨著時間的增加，聚集沉降的比例隨之增加，且比例顯著大於 Commercial A- CaO_2 (A)，反應至 1 小時後約 40% 已聚集沉降，10 小時後已無懸浮之顆粒。圖 5-22 為原液(52600 ppm)之 Wet-grinded CaO_2 顆粒的聚集實驗結果，在含有分散劑中，顆粒相當穩定，在 8 天內沒有明顯的聚集現象，顆粒大小介在 123-128 nm 之間。圖 5-23 為原液(52600 ppm)之 Wet-grinded CaO_2 (J) 顆粒隨時間之沉降變化，可以觀察到隨時間變化由開始至 7 日，沉降之比例並無顯著變化，此結果證明 Wet-grinded CaO_2 (J) 顆粒之穩定性。

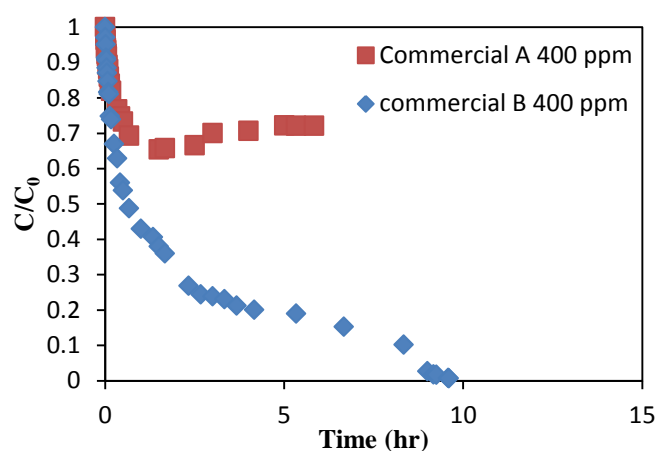


圖 5-21 Commercial A (A)與 Commercial B- CaO_2 (B)隨時間沉降之結果

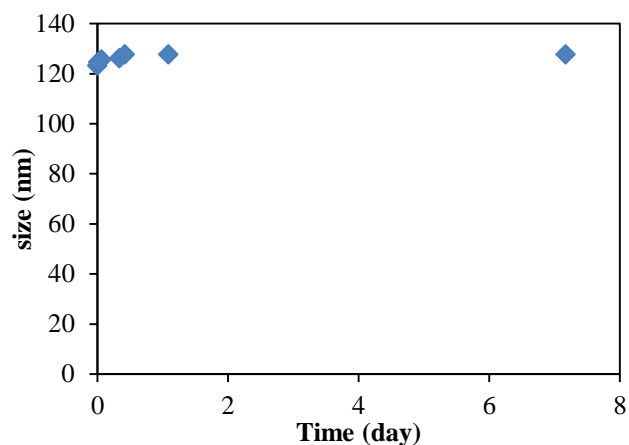


圖 5-22 Wet-grinded CaO_2 (J) 粒徑隨時間之變化情形

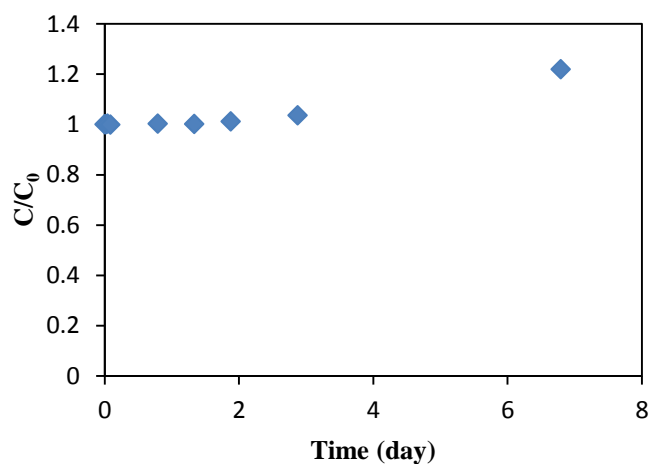


圖 5-23 Wet-grinded CaO_2 (J) 隨時間之沉降變化

5-4 過氧化鈣顆粒之釋氧速率

圖 5-24 至圖 5-27 是不同合成方法所得到之過氧化鈣顆粒釋氧速率。圖 5-24 顯示 Commercial B- CaO_2 (B) 經由約 8 天的反應，釋出 25 ml/g 之氧氣。圖 5-25 顯示 Aldrich- CaO_2 (C) 經由約 1 天的反應，釋出 4 ml/g 之氧氣。圖 5-26 結果顯示 PEG- CaO_2 合成後以不同方法清洗釋氧量與時間關係，經由甲醇清洗可得到較佳之顆粒釋氧速率，反應至第二天時，已釋出約 13 ml/g 之氧氣；然而以氫氧化鈉協同 DI 水清洗之 PEG- CaO_2 ，反應至第四天時釋出約 7 ml/g 之氧氣。

圖 5-27 顯示 Wet-grinded CaO_2 (J) 經由約 1.5 天的反應，釋出約 5 ml/g 之氧氣，之後氧氣生成量便不再增加。

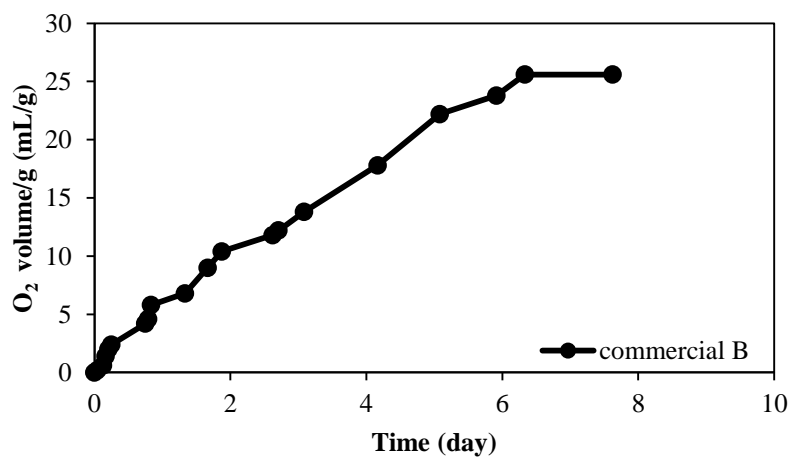


圖 5-24 Commercial B-CaO₂ (B) 釋氧量與時間關係

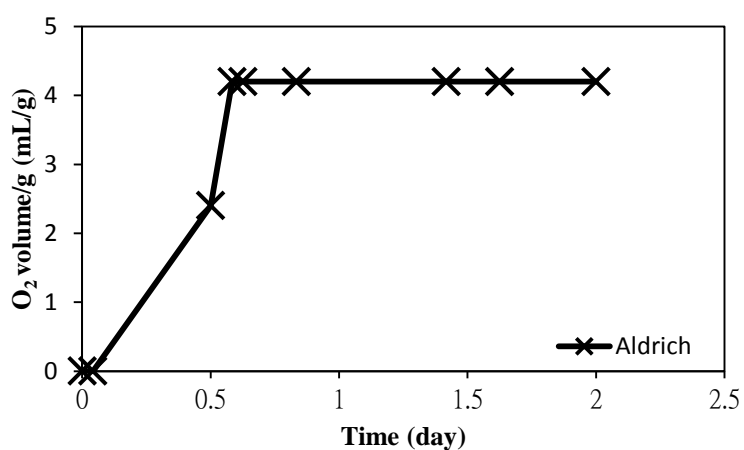


圖 5-25 Aldrich-CaO₂ (C) 顆粒釋氧量與時間關係

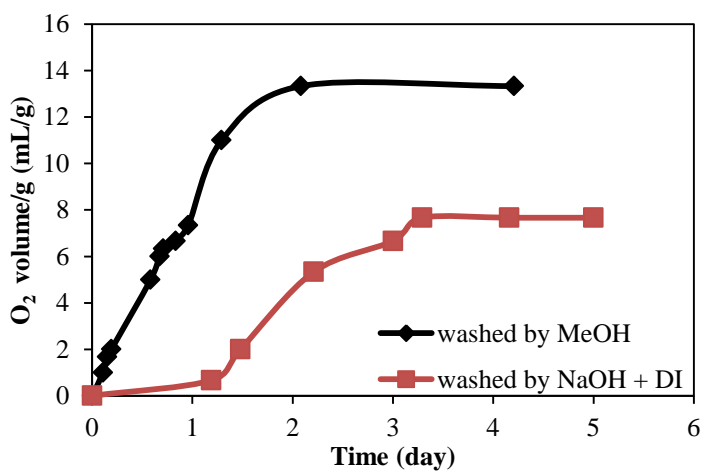


圖 5-26 合成之 PEG-CaO₂ (E) 合成後以不同方法清洗釋氧量與時間關係

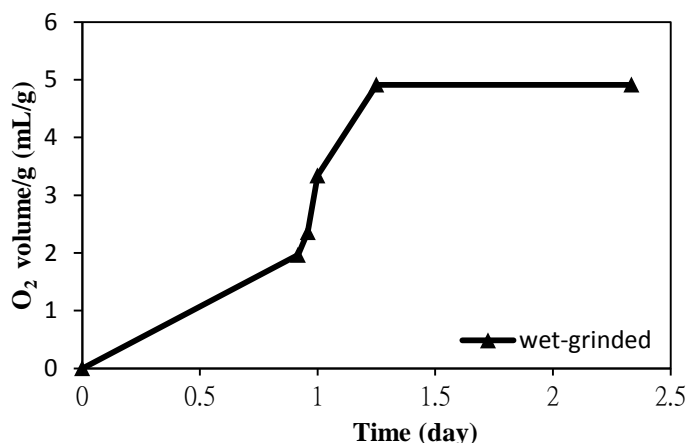


圖 5-27 Wet-grinded CaO₂ (J)釋氧量與時間關係

5-5 過氧化鈣顆粒對柴油水中含量之影響

於含有 10000 ppm 之柴油水溶液 20 ml 中，添加不同顆粒之過氧化鈣釋氧顆粒，比較其對柴油水中溶解量之影響。圖 5-28 顯示在未添加任何顆粒的情況下，溶於水相中偵測到之柴油量約為 8100 ppm，添加 Commercial A-CaO₂ (A)與 Commercial B-CaO₂ (B)會降低水中柴油溶解量，分別為 1885 ppm 與 1160 ppm，因為過氧化鈣於水中會釋放氧氣，不利於柴油之溶解，加上顆粒本身可能也會吸附柴油，所以溶解量下降。添加 Wet-grinded CaO₂ (J)則較前兩者有較高之柴油溶解量(3180 ppm)，顯示添加分散劑可促進柴油於水中之溶解量，其分散劑應具有介面活性劑的功能，進一步的使得油水相的分布受到改變，此特性將有助於後續微生物降解柴油實驗，水中柴油溶解量增加可以提高微生物之利用性。

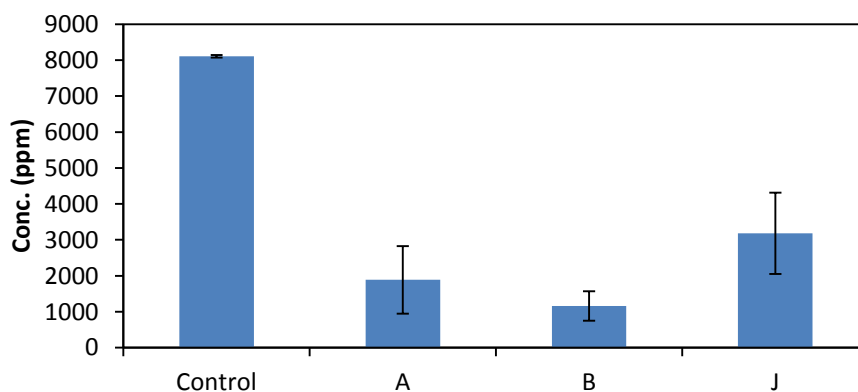


圖 5-28 不同過氧化鈣釋氧顆粒對柴油於水中溶解量之影響

5-6 氧化鈣釋氧顆粒對生物毒性之評估

分析三種氧化鈣釋氧顆粒(Commercial A-CaO₂ (A)、Commercial B-CaO₂ (B)及Wet-grinded CaO₂ (J))對生物生長之影響，以柴油分解菌株 *Gordonia alkanivorans* CC-JG39，因 CC-JG39 菌株有漂浮生長特性，所以用乾重作為菌量生長之指標。CC-JG39 與各氧化鈣釋氧顆粒共培養 2 天後，除去培養基並烘乾，測各實驗組菌量之乾重(圖 5-29)，以進行氧化鈣釋氧顆粒對 CC-JG39 菌株生物毒性之評估。

未處理氧化鈣釋氧顆粒之控制組，CC-JG39 測得乾重為 16.6 g VSS/l，處理 commercial A-CaO₂ (A)、B (F)及 Wet-grinded CaO₂ (J)之 CC-JG39 分別測得為 18.3、19.4 及 13.5 g VSS/l，相對於控制組，處理 commercial A-CaO₂ (A)及 commercial B-CaO₂ (B)之菌量都有相當的成長，顯示此 2 種 CaO₂ 對於 CC-JG39 並未有抑制毒性，反而是有促進生長之情形。然而以 Wet-grinded CaO₂ (J)處理 CC-JG39，相對於控制組，結果顯示菌量生長有減少。值得一提的是，根據後續利用 Commercial B-CaO₂ (B)及 Wet-grinded CaO₂ (J)處理 CC-JG39 與 EM 菌群之微生物生長結果(圖 5-30)，添加相同濃度(0.1%)之 Sample B 及 Sample J 處理，可觀察到 EM 菌在 7 天中的生長量隨時間皆有上升的趨勢，其中第 2 天雖以添加 Sample B 的 EM 菌生長數乾重較高，但在第 3 天 Sample J 處理的 EM 生長量可提升至 2.4(g/L)，且上升幅度明顯高於其他三種處理(without shaking、shaking 及 Sample B)，推測 Wet-grinded CaO₂ (J)對 EM 菌無抑制生長現象。

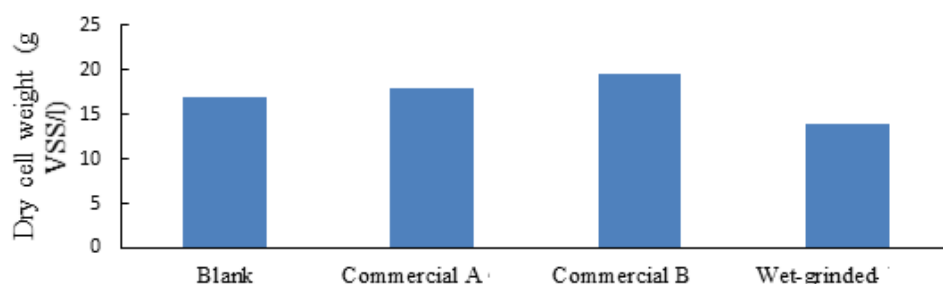


圖 5-29 三種氧化鈣釋氧顆粒對於柴油分解菌株生長之影響

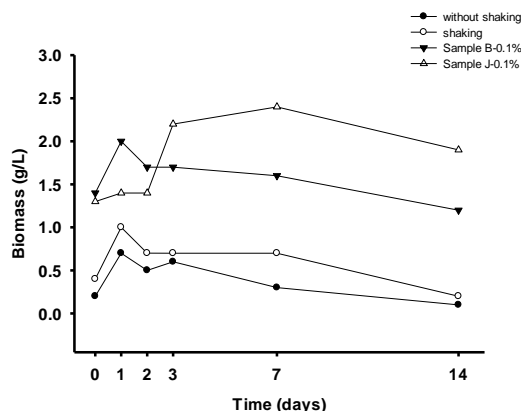


圖 5-30 Commercial B-CaO₂ 及 Wet-grinded CaO₂ 對於 EM 菌株生長之影響

5-7 微生物降解柴油試驗

5-7-1 可降解柴油微生物之柴油降解試驗

處理過程各種碳數碳氫化合物降解變化情形，利用GC試驗可以看出微生物降解過程中其碳數之減少變化。其圖5-31是以Basic medium作為基礎溶液並額外添加1,000 ppm柴油作為碳源之試驗；(a)為柴油降解14天無添加土壤微生物之空白對照組(Blank)中柴油之圖譜。另外圖5-31(b-d)分別為EM菌、JG39及EM菌與JG39同比例混合菌，由圖觀察14天後柴油降解的狀況，可以發現碳數小於12的peak明顯的變小，柴油因屬於低碳數輕質燃料尤其所含碳數在9-25，故較容易被微生物所利用分解。

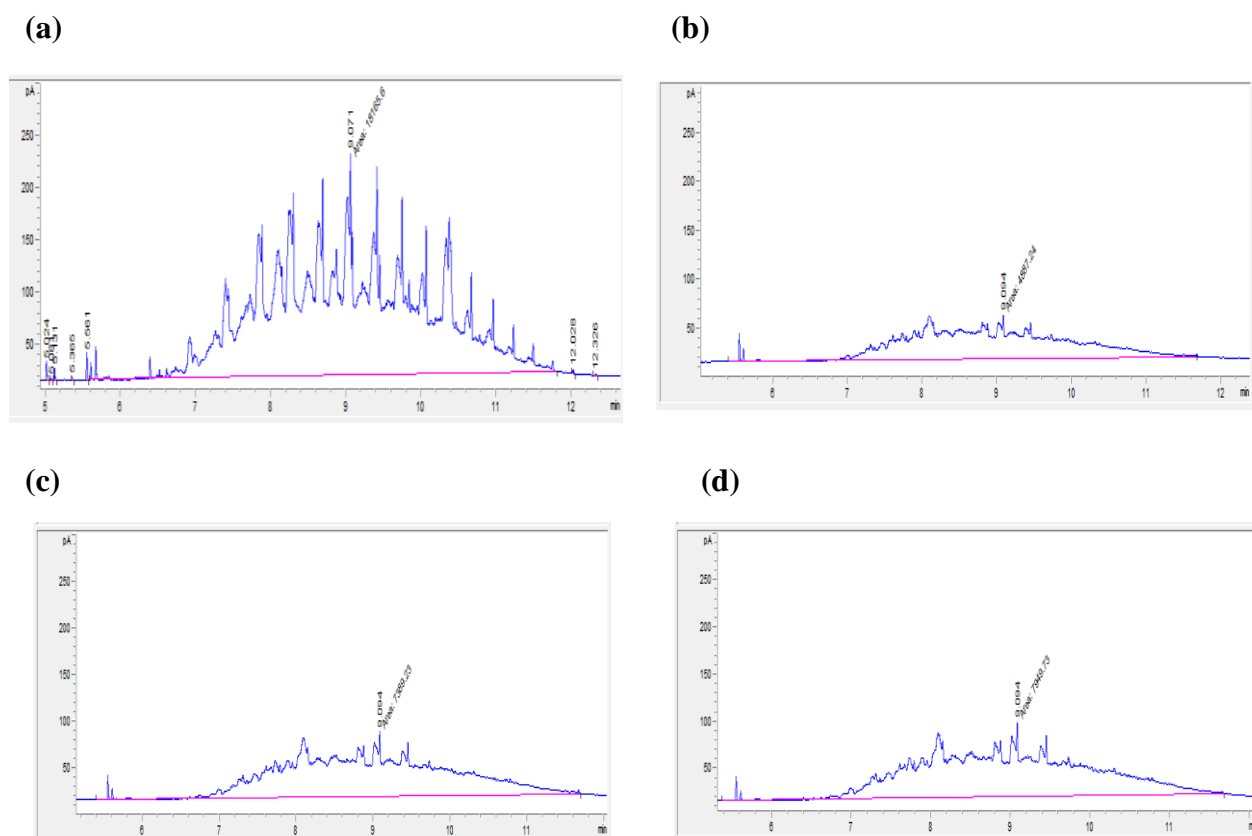


圖 5-31 微生物降解 1,000 ppm 柴油之 Basic medium 試驗

(a)空白對照組(Blank)；(b) EM 菌；(c)JG39；(d) EM 菌與 JG39 同比例混合菌

以 Commercial B-CaO₂ 兩種濃度(0.01%及 0.1%)添加進行微生物降解柴油結果，圖 5-32 為不同培養基(LB medium 及 Basic medium)添加 1,000 ppm 柴油之隨時間的柴油降解曲線，Mix 為 JG39 菌株混合同比例之 EM 菌群，T₀ 為初始柴油濃度，Bk 為無添加土壤微生物組別之柴油濃度，sealed Bk 為密封的條件下操作。結果顯示，添加各種菌群處理下，隨時間柴油皆有所下降的趨勢，但在 LB medium(圖 5-32(a))柴油降解至最低濃度變化以第 7 天為主，而 Basic medium (圖 5-32(b)) 除 JG39 添加 0.01% Commercial B-CaO₂ 時在第 7 天後降解率較無變動外，其他處理主要降低柴油濃度發生在 14 天。14 天柴油殘餘量在 LB medium 的實驗結果發現，JG39 在轉速 120 rpm(shaking)下降解率最佳(63.7%)，較添加 Commercial B-CaO₂ 有更佳之柴油降解率($P < 0.01$)，而 Commercial B-CaO₂ 濃度為 0.01% 或 0.1% 對柴油降解率並無統計上無顯著差異，分別為 43.4% 及 42.9%，JG39 菌株在各處理組的柴油降解皆明顯比 Bk 與 sealed Bk 低($P < 0.001$)，而 EM 菌群與 Mix 組(EM 與 JG39 同比例添加)有相似趨勢，柴油降解率依序為 shaking、Commercial

B-CaO₂ 濃度為 0.01% 與 0.1%，而以 EM 菌為例，分別為 64.1%、44.1% 及 24.8%，彼此在統計上皆有顯著差異($P<0.001$)。14 天在 Basic medium 結果，EM 菌及 JG39 菌株在 shaking 及 Commercial B-CaO₂ 處理下，柴油降解並無顯著差異，可見在添加兩種不同濃度之 Commercial B-CaO₂ 與 shaking 組對微生物生長無明顯限制，僅 Mix 在 Commercial B-CaO₂ 0.1% 的柴油降解有顯著低於 shaking 及濃度 0.01% 之處理($P<0.05$)。綜合兩種培養基(LB medium 與 Basic medium)的柴油降解結果，14 天柴油降解結果以 Basic medium 添加 0.01% Commercial B-CaO₂ 之 EM 菌群結果最佳(81.5%)，高於 shaking 處理之 JG39 及 Mix($P<0.05$)，相較於 LB medium 結果，更高於有添加 Commercial B-CaO₂ 之處理($P<0.001$)。藉由上述實驗結果，EM 菌群具有降解柴油的能力，搭配 Commercial B-CaO₂ 的添加更能提高對柴油的降解效率，且屬本土菌株，對環境生態不至造成影響，故選擇 EM 菌並使用 Basic medium 進行後續實驗。

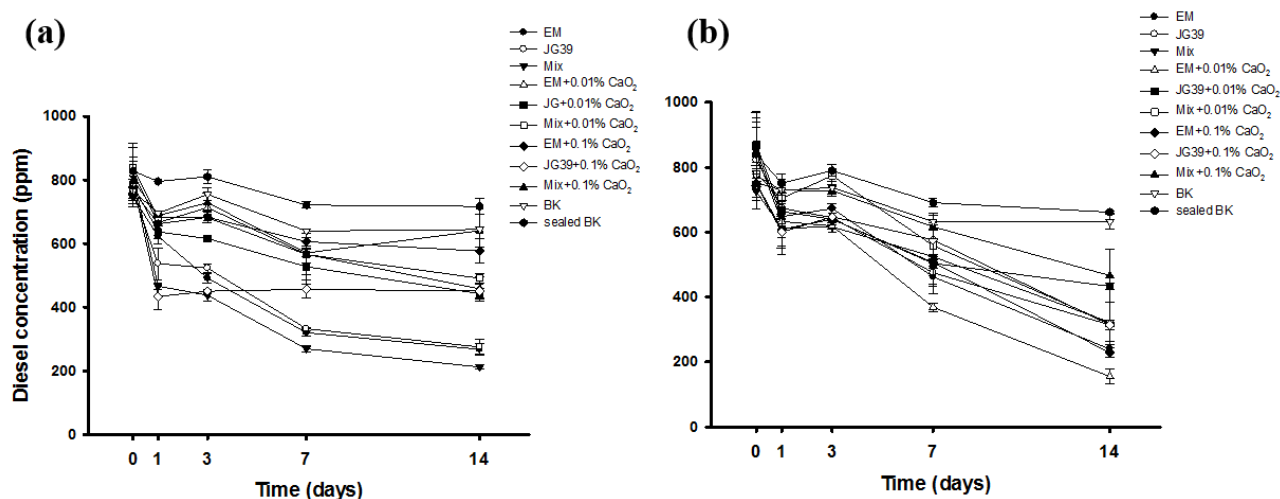


圖 5-32 Commercial B-CaO₂ 濃度對於不同柴油分解菌降解柴油能力之影響

(a) LB medium ; (b) Basic medium

5-7-2 過氧化鈣添加對可降解柴油微生物生長影響試驗

以添加 1,000 ppm 柴油作為 LB medium 額外碳源(圖 5-33(a))與 Basic medium 唯一碳源(圖 5-33(b))，結果發現微生物在各組處理皆在培養第 1 天時增加，但 7 天後菌數有持平的現象，反而伴隨污染物的減少而降低。推測原因為污染物過高增加為生物毒性，加上營養鹽不充足的情況，使其無法在初期維持較高的菌量，儘管污染物有減少，但生物降解形成的代謝副產物對微生物也可能造成持續的傷害，因此菌數從初始到結束都呈現減少的趨勢，但最終菌數皆以添加 0.1% 過氧化

鈣的菌數較高，尤其是 EM 菌群。LB medium 為營養培養基，微生物的量皆高於 Basic medium，但增加的菌數與柴油降解結果不成比例，推測微生物還是優先利用 LB medium 中的碳源，故對柴油降解的效率並無高於 Basic medium。

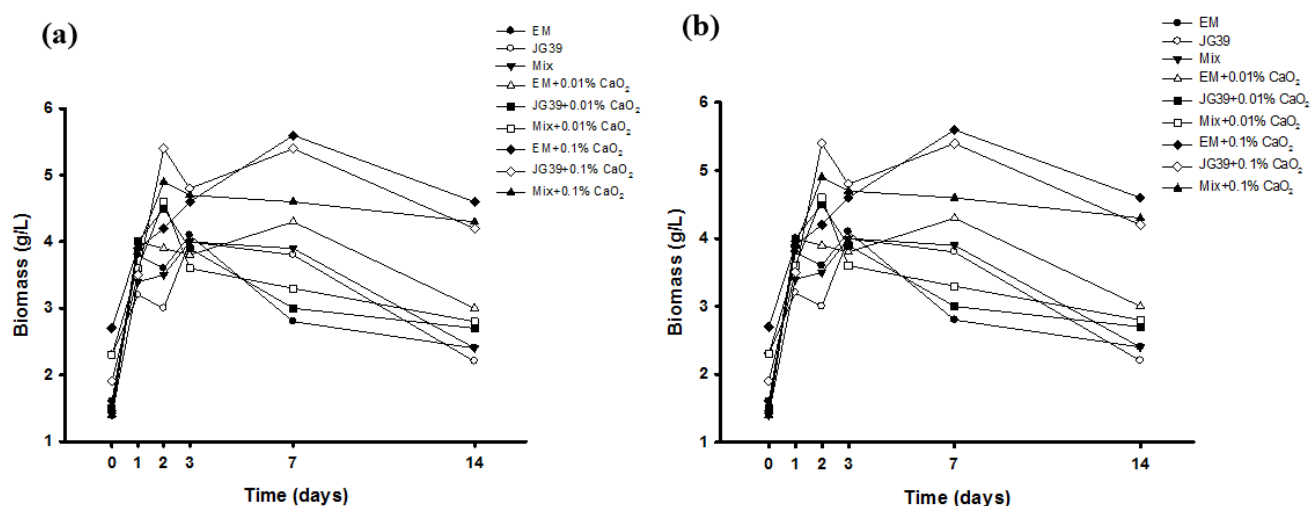


圖 5-33 兩種不同濃度 Commercial B- CaO_2 對不同柴油分解菌生長之影響

(a) LB medium ; (b) Basic medium

5-8 添加過氧化鈣之微生物土壤水溶液試驗

5-8-1 汙染土壤基本性質分析結果

汙染土壤取自於雲林某加油站因油管洩漏而汙染之土壤，且經過風乾處理，含水率因此降低為 5.1%，pH 為 7.2，溶氧量 5.0 $\text{O}_2\text{mg/L}$ ，氧化還原電位為 332 Mv。土壤成分組成：砂(sand)佔 52%、粉粒(silt)佔 20%、黏粒(clay)佔 28%，依據美國農業部(U.S. Department of Agriculture, USDA)的土壤質地分類法，屬於壤土(medium loam)。土壤化學性質分析結果，土壤中營養成分中有機碳(Organic Carbon)為 0.323 %，總氮(N)佔 0.130 %。平衡其 C:N=100:40，比較文獻上最佳適合生物復育之 C:N=100:10，其氮含量較為缺乏，為長期受到總石油碳氫化合物汙染之土壤常有的現象(Brook et al., 2001)。利用氣相層析-火焰離子偵檢器(GC-FID)之層析圖譜，汙染土柴油初始濃度為 500~700 mg/kg dry soil。

5-8-2 pH 與溶氧之監測

當微生物降解烷類碳氫化合物時，若走好氧路線，一開始就需要大量的氧來做電子的傳輸。氧氣是最重要的電子接受者，微生物在降解碳氫化合物的途徑中皆有氧化酵素的參與，使烷類變成醇類、酮類或醛類，再進一步變成脂肪酸，這

一連串的變化，溶氧隨著作用而被消耗，pH值隨著化合物變化而改變。分別以 Basic medium 與兩種土壤溶液 Treated soil solution(復育土之土壤水溶液)及 Untreated soil solution(高污染土之土壤水溶液)進行實驗，BK為無添加土壤微生物組別之柴油濃度，比較有無添加 Commercial B-CaO₂ 及 Wet-grinded CaO₂ 與 shaking(120 rpm)、without shaking 對 pH 值與溶氧之影響。Basic medium pH 值在操作開始時範圍在 6.9~7.7，經過 28 天反應後，shaking、without shaking 與 0.1% 過氧化鈣濃度的 pH 值與開始時變化並不明顯(圖 5-34(a))。Treated soil solution(圖 5-34(c)) 與 Untreated soil solution(圖 5-34(e)) 具有相似之 pH 變化趨勢，CaO₂ 添加兩種濃度之 pH 值在起始的 pH 值 10.0~11.3，而 Wet-grinded CaO₂ 要以濃度 0.1% 處理之較為偏鹼 (pH~10.6)，但在濃度 0.01%，經 1 天後 pH 值就隨之下降，0.1% CaO₂ 與 Wet-grinded CaO₂ 處理約經過 7 天後，pH 值才有較明顯的下降，到 28 天 pH 範圍在 8.2~8.4，與其他處理之 pH 值相似，但以 shaking 之 pH 值最偏酸 (pH=5.0~5.5)。

具柴油降解微生物之溶氧量試驗是與外界空氣相通的，利用隨時間變化的 DO 值結果，Basic medium 僅加入 0.1% 過氧化鈣之兩種處理 (Commercial B-CaO₂(B) 與 Wet-grinded CaO₂(J)) 的溶氧量到 28 天溶氧值還是可以維持約約為 4.0 O₂ mg/L 左右，其它處理溶氧值有上升有下降，約為 1.0 ~2.5 mg/L 左右(圖 5-34(b))。相較於 Basic medium，添加 0.1% 過氧化鈣於 Treated soil solution(圖 5-34(d)) 與 Untreated soil solution(圖 5-34(f)) 有較高的溶氧量，CaO₂ 在 Treated soil solution 土壤水溶液試驗結果初始溶氧量就高達 9.1 O₂ mg/L，且溶液具有較高之 pH 值(約 11.3)，Untreated soil solution 初始溶氧量則為 7.9 O₂ mg/L，經過 1 天後溶氧量下降至約 5.2 O₂ mg/L，Treated soil solution 土壤水溶液可維持溶氧量至 28 天，Untreated soil solution 則維持到 21 天(約 4.7 O₂ mg/L)，28 天後就下降至 0.7 O₂ mg/L，而 Wet-grinded CaO₂ 在兩種土壤水溶液試驗結果初始溶氧量，以 Treated soil solution 溶氧量高於 Untreated soil solution (分別為 6.3 O₂ mg/L 及 4.2 O₂ mg/L)，與 CaO₂ 具相似結果。經過 1 天後 Treated soil solution 溶氧量微下降至 4.7 mg/L，隨天數增加溶氧量一樣維持約 3.6 O₂ mg/L，Untreated soil solution 則從起始溶氧量就維持至 14 天，21 天後兩者土壤水溶液溶氧量下降約 1.7 O₂ mg/L。本實驗溶氧量試驗中，以 Basic medium 添加過氧化鈣處理之初始溶氧為 0.5~3.2 O₂ mg/L 左右，以溶氧量值明顯低於 Treated soil solution 及 Untreated soil solution 兩種土壤水溶液之初始溶氧量，以柴油降解百分比來看(圖 5-33(a)) 柴油降解的能力影響並不明顯，根據 Alvarez and Vogel (1995) 初始溶氧對於降解碳氫化合物的重要性，推測這樣的初始溶氧可能已足夠提供微生物作用。

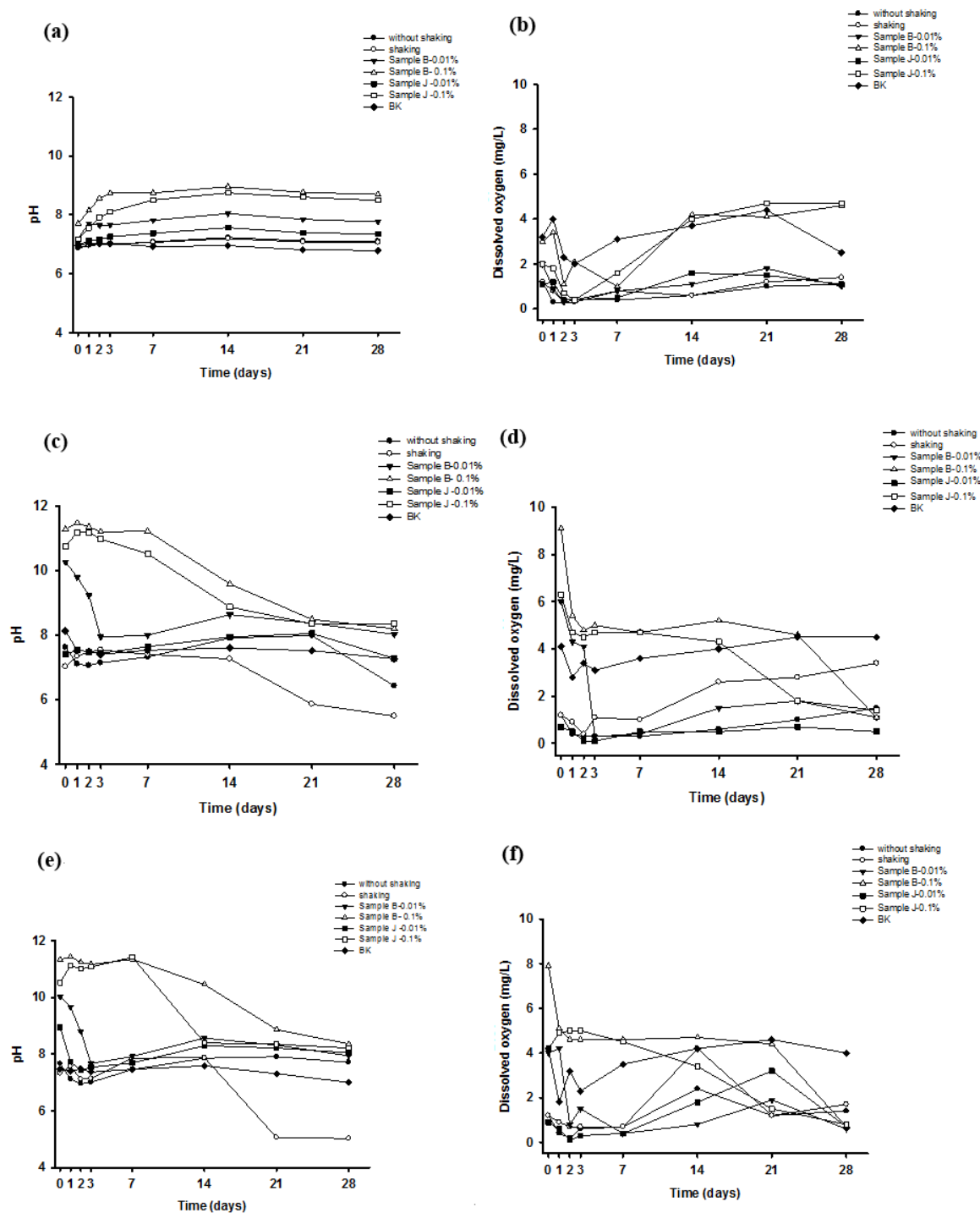


圖 5-34 不同培養基溶液與添加過氧化鈣處理之 pH 值與溶氧分析

(a)Basic medium 之 pH 值；(b)Basic medium 之溶氧量；(c)Treated soil solution 之 pH 值；(d)Treated soil solution 之溶氧量；(e)Untreated soil solution 之 pH 值；(f) Untreated soil solution 之溶氧量

5-8-3 不同培養基溶液與添加過氧化鈣之微生物降解柴油結果

以兩種不同濃度之過氧化鈣添加在三種培養溶液進行微生物降解柴油試驗，圖5-33為不同培養基之柴油隨時間的降解曲線，以EM混菌作為柴油降解菌群， T_0 為初始柴油濃度，Bk為無添加土壤微生物組別之柴油濃度，sealed為密封的條件下操作。圖5-35(a)、圖5-35(b)及5-35(c)分別是以Basic medium、Treated soil solution及Untreated soil solution作為培養溶液進行EM混菌之柴油0、3、7、14、21及28天降解結果，Basic medium與Treated soil solution在shaking與添加0.01%及0.1%之 CaO_2 (Commercial B- CaO_2)皆無顯著差異(柴油降解率約82.8%)，但在Untreated soil solution則是添加0.1%之 CaO_2 之柴油降解率高於濃度0.01%之 CaO_2 (分別為76.7%與62.0%)，且高於shaking(柴油降解率約42.8%， $P<0.001$)。Wet-grinded CaO_2 則在Basic medium與Treated soil solution溶液中28天，shaking與添加0.1% Wet-grinded CaO_2 之柴油降解率約82.6%，明顯高於without shaking及添加0.01低濃度之Wet-grinded CaO_2 處理，柴油降解率分別約為26.7%及44.4%($P<0.001$)，而Untreated soil solution的柴油降解與 CaO_2 具有相同趨勢，同樣以添加0.1%之Wet-grinded CaO_2 之柴油降解高於濃度0.01%之(分別為77.9%與66.0%)，更高於shaking柴油降解率($P<0.001$)。圖5-35(b)、5-35(c)柴油的殘存量，可以發現柴油在1~3天下降約26%，對照5-34(d)及5-34(f)，加入0.1% CaO_2 處理之兩種土壤溶液試驗皆在初始溶氧量達最高值，在1~3天急速下降至4.7~5.4 O_2 mg/L，這表示EM混菌在分解柴油前需要足夠的氧氣，根據Viliesid and Lilly (1992)研究報告指出，系統中的溶氧張力影響開環氧化酵素酶的產生，而EM混菌在可利用氧氣來生產開環酵素達到降解的效果。

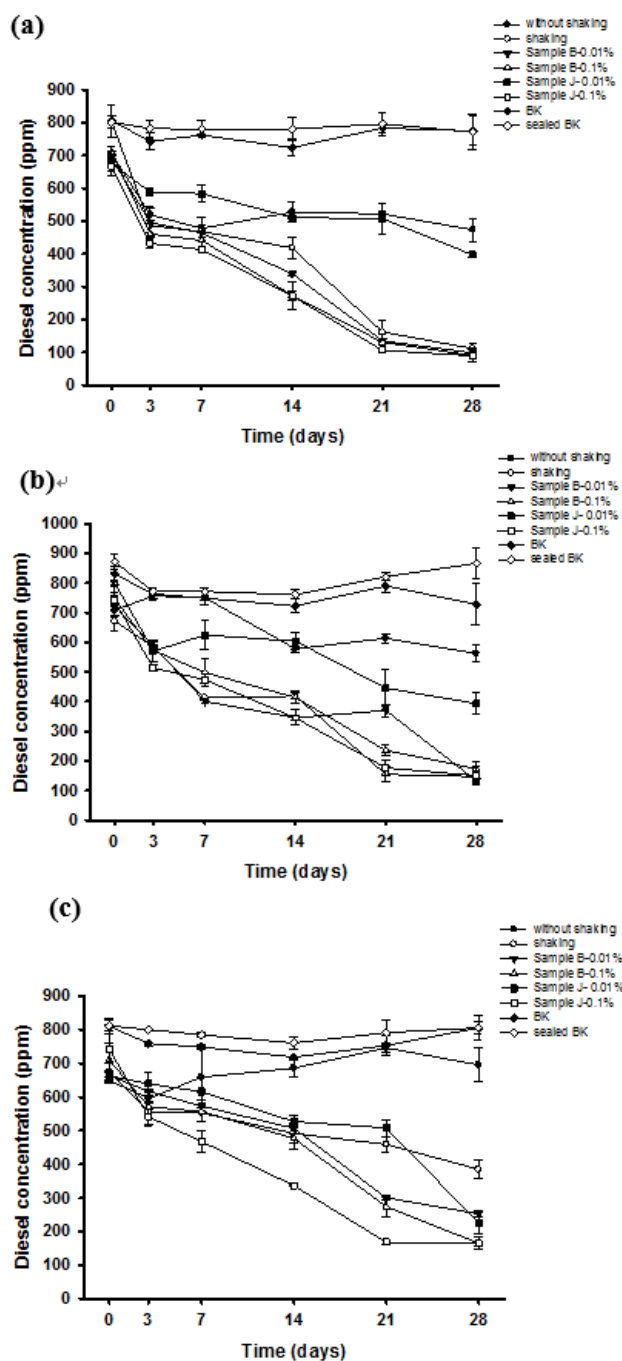


圖 5-35 不同培養基溶液與添加過氧化鈣對微生物降解柴油試驗結果

(a)Basic medium ; (b)Treated soil solution ; (c)Treated soil solution

5-9 微生物降解柴油之土壤試驗

5-9-1 馴養之土壤微生物降解柴油

以2,000 ppm柴油添加於基礎鹽類培養液中進行土壤微生物之馴養，於馴養一

段時間後量測培養液中柴油殘量，如圖5-36，其中 T_0 為馴養初始柴油濃度，Blank為無添加土壤微生物組別之柴油濃度，Treated soil為復育土，Untreated soil為高污染土，Control為滅菌無微生物活性之復育土。結果顯示初始柴油濃度測得為 1643.6 ± 552.5 ppm，經過241天後進行柴油濃度量測，無添加土壤微生物之空白對照組(Blank)中柴油濃度降為 685.1 ± 1.7 ppm，顯示系統在長時間(241天)下，因空氣流動，仍有部分柴油散逸。滅過菌並添加疊氮化鈉之控制組中柴油濃度約為 1357.2 ± 505.2 ppm。然而復育土經馴養後可以將柴油濃度降低至 23.9 ± 4.6 ppm，而高污染土經馴養後亦可將柴油濃度降低至 112.4 ± 6.3 ppm。顯示原生菌群中已具有可分解柴油之微生物，經馴養後可經由降解實驗驗證其降解能力。

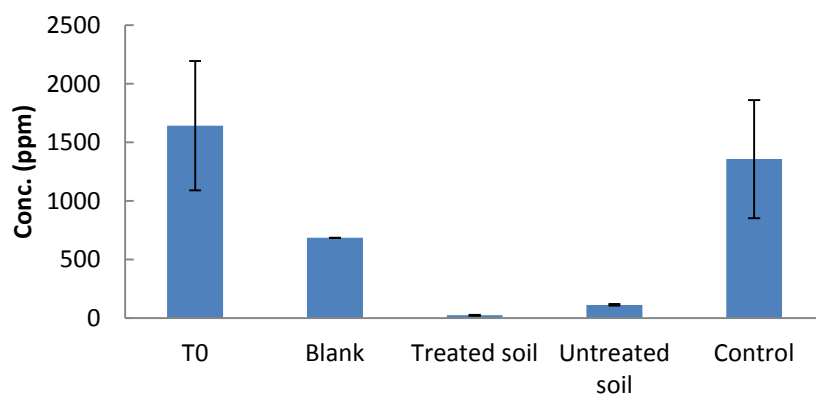


圖 5-36 馴養 241 天後土壤微生物降解 2,000 ppm 柴油之結果

觀察上述樣品之 GC 圖譜，可以更清楚瞭解微生物降解柴油之作用。圖 5-37(a)為馴養初始時以 GC 分析柴油之圖譜，總 TPH 之訊號主要分布於 7 分鐘至 21 分鐘左右。圖 5-37(b)為馴養 241 天無添加土壤微生物之空白對照組(Blank)中柴油之圖譜，可以觀察到 7 分鐘至 12 分鐘左右之訊號銳減，顯示系統因空氣流動，散逸的柴油主要為低分子量、燃點較低之成分。5-37(c)為復育土經馴養後可以將大部分的柴油分解，剩下特定種類之成分殘留於培養液中。5-37(d)為高污染土經馴養後可以將部分柴油分解，剩下的亦集中於高分子量、不易降解之特定成分。

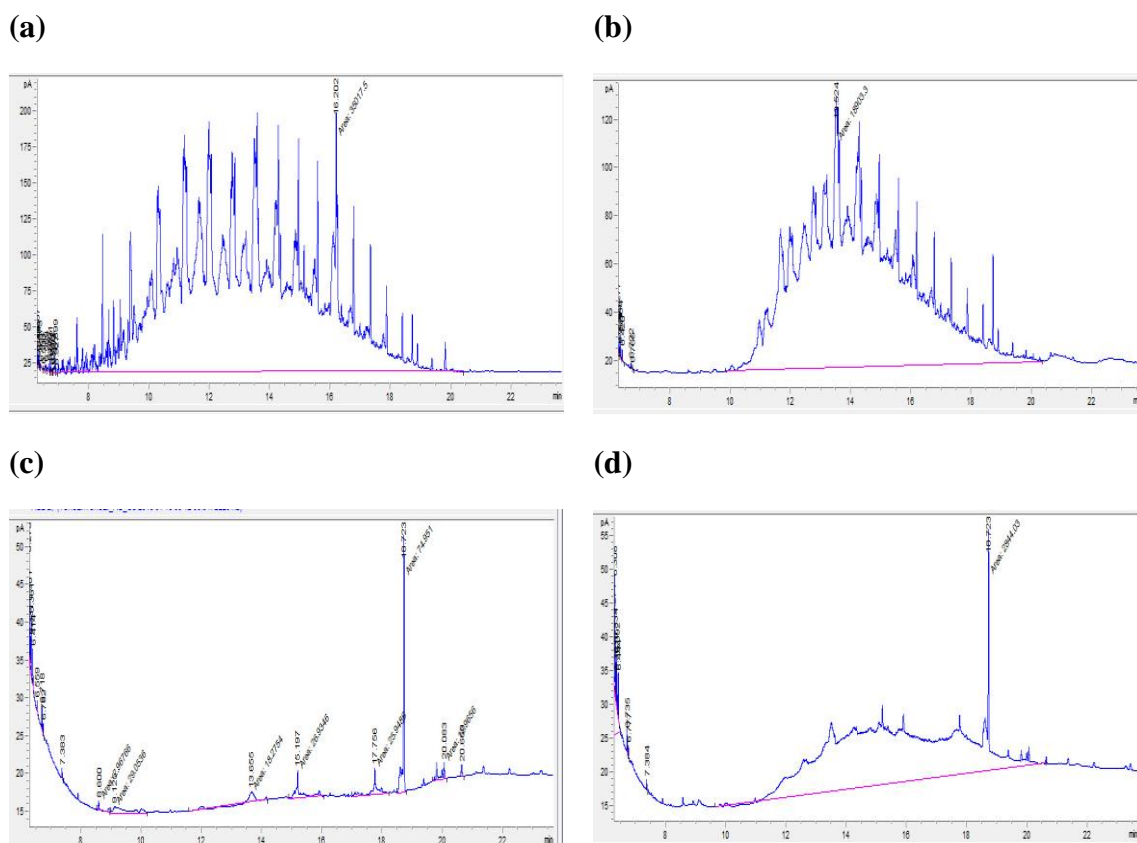


圖 5-37 土壤微生物降解 2,000 ppm 柴油之 GC 圖譜

5-9-2 添加溶液特性分析與其對土壤微生物降解效應之影響

由豆類食品工廠取得廢水，針對基本水質特性進行分析，項目包括：酸鹼值、氧化還原電位、導電度、總有機碳、總氮與總磷。其中酸鹼值為 pH 5.49，氧化還原電位為 -443 mV，導電度為 $2.97 \mu\text{S}/\text{cm}$ ，總有機碳濃度為 568.68 ppm，總氮濃度為 275 ppm，總磷濃度為 170 ppm。後續將依照其碳氮磷組成，添加於土壤或降解為生物馴養環境中，以分析其對微生物降解柴油之貢獻。

由食品工廠廢水之特性分析得知其水中 TOC 含量高，直接使用將易使系統變成厭氧狀態，所以先以直接添加氮磷進行試驗，將降解純菌添加於土壤中，並測試不同比例之氮磷溶液，對於土壤微生物降解柴油之效應。經 3 個月後比較柴油殘量，以 15:1 效果最佳，而以 7:1 效果最差(圖 5-38)。

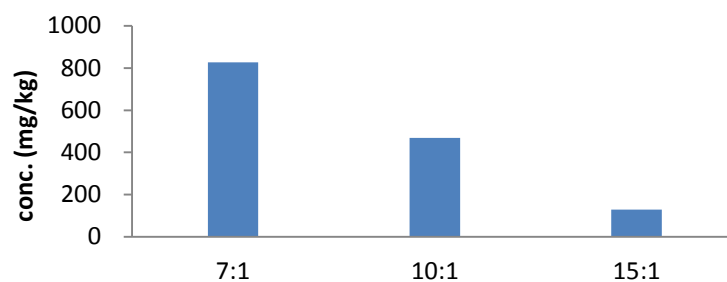


圖 5-38 添加溶液對土壤微生物降解效應之影響

5-10-1 分子生物監測系統建立

在不同純菌試驗組別之培養液中，每週萃取其中的 DNA 樣本，依照特定降解酵素基因保守區域設計的 PCR 引子(Panicker et al. 2010)，以 PCR 增幅後測得樣本中各降解基因之存在。同時配合微生物之生長曲線，以此推估酵素基因真實的表現量。並搭配柴油中各物質降解動力之結果，依此評估各酵素基因在降解柴油中各物質時扮演之角色。並建立出可以利用基因表現量做為降解能力指標之方法。

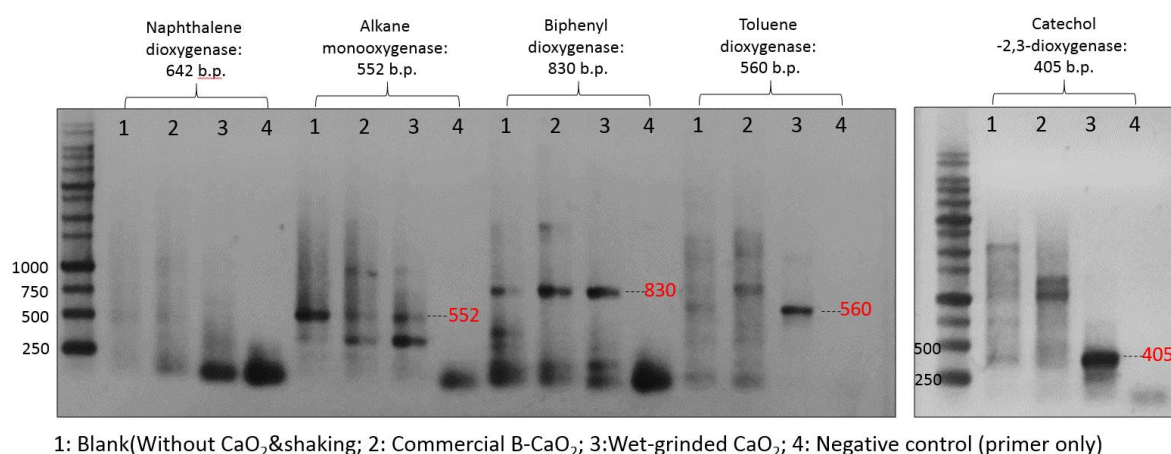
表 5-2 選用於增幅特定降解酵素基因之引子

Gene/primer name	Primer sequence (50–30)a
Naphthalene dioxygenase (<i>ndoB</i>)	
L-ndoB	cactcatgatagcctgattcctgaccccggcg
R-ndoB	ccgtcccaacacacccatgccgctgccg
Catechol 2,3 dioxygenase (C23DO, <i>cat</i>)	
cat2,3 1a-F	aggtgctcggtttctacctggccg
cat2,3 6a-R	acggtcatgaatcgttcgttgag
Toluene dioxygenase (<i>todC1</i>)	
todC1-F	Cgggtgggcttacgacaccgccggcaatct
todC1-R	tcgagccgcgctccacgctaccagacgtt
Biphenyl dioxygenase (<i>bphA1</i>)	
bphA1-F	tcacctgcagctatcacggctgg
bphA1-R	ggatctccaccagttctcgccatcgtctg

5-10-2 PCR 增幅作用後進行序列分析

菌株的PCR的結果，可以看到使用的五對與柴油降解相關引子，經28個循環放大，表5-2為選用於增幅特定降解酵素基因之引子對，經增幅作用所產生的產物大小分別diNaphthaleneoxygenase 642bp、Alkane monooxygenase 552bp、Biphenyl dioxygenase 830bp、Toluene dioxygenase 560bp與Catechol-2,3-dioxygenase 405bp，分析三種處理，分別為1.Blank(Without CaO_2 &shaking)、2. Commercial B- CaO_2 (0.1%)及3.Wet-grinded CaO_2 (0.1%)，4. Negative control為不加DNA。圖5-39結果可以觀察到，Basic medium 添加 1,000 ppm 柴油處理 21 天後，diNaphthaleneoxygenase在各處理皆無表現，Wet-grinded CaO_2 在其他四對柴油降解相關引子皆有表現，請表現量也較為明顯。處理1. Blank、2. 0.1% Commercial B- CaO_2 下在 Alkane monooxygenase、Biphenyl dioxygenase 與 Catechol-2,3-dioxygenase下有特定降解酵素基因之引子對的產物，在兩種有氧與無氧的處理(Blank與 0.1% Commercial B- CaO_2)下皆有降解柴油酵素基因的表現，推測菌株可能為兼性厭氧菌。

石油洩漏及污染所造成的環境破壞，除了物理及化學的處理之外，還必須配合自然降解的方式來處理，細菌被認為是具有處理環境中的碳氫化合物的能力(Joseph et al.,1990)。一般微生物降解烷類是經由一系列烷類(alkanes) 的氧化作用成為醇類(alcohols)、醛類及最終的脂肪酸(fatty acids)。決定性的步驟是在起始惰性烷類到初級醇類的氧化作用，此作用是受烷類單氧化酶(alkane monooxygenase)所催化形成(Phrommanich et al.,2007)。產生catechol 2,3-dioxygenase可分解catechol，進入nitrobenzene代謝路徑，最後生成pyruvate進入TCA cycle。微生物對芳香羧族碳氫化合物代謝反應是利用雙氧酶(dioxygenases)先將氧分子中的氧原子與苯環結合轉化成二氫二醇化合物(dihydrodiol)。



1: Blank(Without CaO_2 &shaking; 2: Commercial B- CaO_2 ; 3:Wet-grinded CaO_2 ; 4: Negative control (primer only)

圖 5-39 16s rRNA 之 DNA 序列進行 PCR 增幅所得到的產物結果

5-10-3 應用分子生物監測微生物多樣性及菌群消長

首先了解添加 1,000 ppm 之 Basic medium 中原生菌群在降解柴油過程的變化，如圖 5-40 所示，DGGE 指紋圖譜，分別以 1.shaking、2. Commercial B-CaO₂(0.1%)、3. Wet-grinded CaO₂ (0.1%)及 4. Blank(Without CaO₂&shaking)四種處理在第 0 天、第 21 天與第 28 天的菌相變化。可看出 21 天菌種豐富度有隨復育天數而上升之趨勢，此現象可能是由於環境中之油污染物質被分解後產生之代謝物質為它種無油污分解能力菌群所利用且隨柴油濃度降低，環境更適合微生物生長，使許多在原本環境下活性很低之菌種族群數量增加，出現於指紋圖譜上，造成整體菌群之多樣性上升。樣本中菌群數量之消長現象可能與環境中油污染物質的降解有所關聯，結果與 KE 場址 TPH-d 降解圖(鄭幸雄，2006)相似，場址中油污染物質於降解大半時，降解產生之代謝物質可能被其他無法分解油污染物之菌群所利用進而增長，然原本存在於環境中之菌群並未消失，促使第 24 天之指紋圖譜條帶數量增加。第 28 天菌群則有明顯的下降，菌群下降約 0 天菌群的一半，這可能是因為柴油為此環境中微生物營養的主要碳源，因此營養的需求影響整個環境的微生物族群。文獻指出不同的油污染程度及後續的生物處理結果，不同的氮源環境下或濃度污染環境下微生物菌相亦不相同(Wilfred et al., 2002；Harayama et al., 2004；Uyttebroeket al., 2007)。在 0 天的菌相分布，可觀察到 Commercial B-CaO₂(0.1%)的處理菌相最為單純，對照圖 5-34(a)的 pH，Commercial B-CaO₂(0.1%)的 pH 為 7.7，較其他處理 pH 約 7.0 的值稍微偏鹼，推測大部分的異營菌和真菌喜好生長於中性的環境中，真菌在酸性的環境條件下耐受度較強。在有些土壤中含有極端的 pH 值，這樣的環境對微生物族群在降解碳氫化合物會有不利的影響(Joseph et al., 1990)。此外，0 天的菌相 a 及 b 點在 2~3 處理皆有菌群現象，但在處理 1 時有不明顯之菌相，4 處理則並無菌群，對照圖 5-34(b)的含氧量，0 天有添加 0.1% 過氧化鈣具有 2~3 O₂ mg/L，到 21 天含氧量則上升至約 4.6 O₂ mg/L，反之，含氧量維持約 1.2 O₂ mg/L，推測此菌株可能為好氧性，且維持至 21 天菌相仍能觀察到，可能具有降解柴油能力。此外，根據圖 5-35(a)的柴油降解結果，1~3 種處理柴油降解結果皆明顯高於 4 處理，而 c 點可觀察除了處理 4(Blank)外，皆有此菌相之現象，且維持至 21 天尚未被淘汰的結果，推測此菌株亦可能具有柴油降解能力。

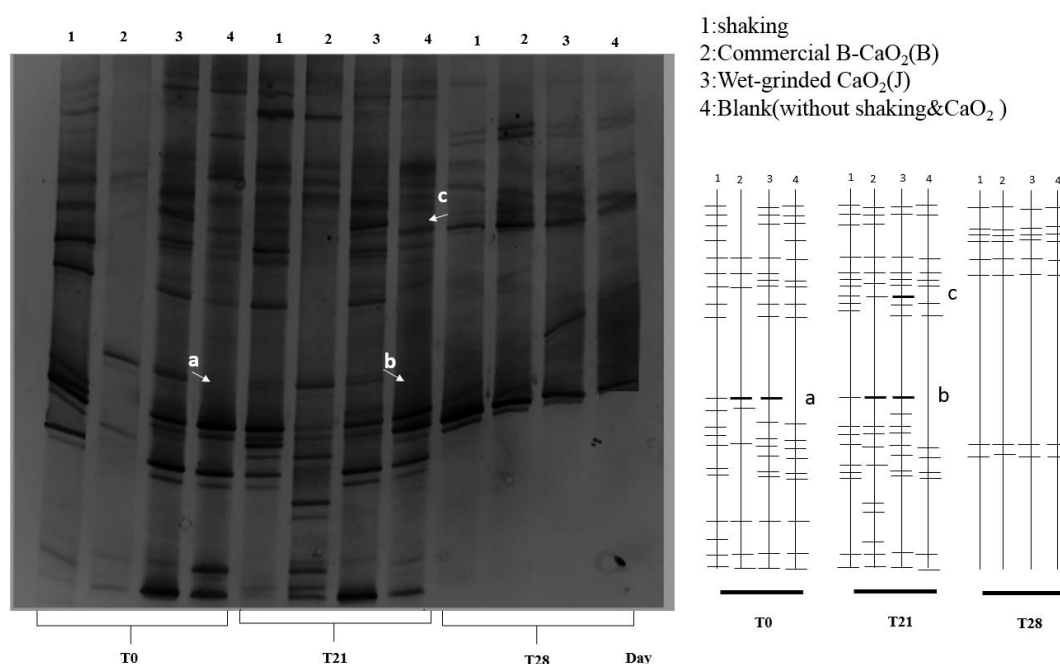


圖 5-40 Basic medium 中柴油降解測試在不同處理天數的菌相變化

5-11 結論

過氧化鈣顆粒已合成多種與已取得共約 10 種，因其基本特性之差異(包括粒徑及聚集沉降等)，而造成不同之釋氧速率，此也將影響微生物降解柴油之效率。目前研究中，合成之過氧化鈣顆粒粒徑最小的為 Wet-grinded CaO₂，粒徑大小為 123 nm。持續馴養原柴油污染場址之土壤微生物，同時開始以添加混菌同時處理柴油，並且與國立中興大學環境工程學系楊秋忠教授合作，取得已發表能降解柴油分解菌株 *Gordonia alkanivorans* CC-JG39。對於 CC-JG39 菌株生長方面，在測試已合成過氧化鈣顆粒對降解柴油微生物之抑制性時，發現 Wet-grinded CaO₂ 對於 CC-JG39 菌株生長，相對於控制組，有些微抑制生長之情形。降解柴油之微生物方面，14 天在 Basic medium 結果，與國內文獻報導之最佳柴油分解菌 *Gordonia alkanivorans* (CC-JG39)相比 EM 菌在 shaking 及過氧化鈣處理下，添加過氧化鈣與 shaking 組無差異性，對微生物生長無明顯限制且可提供微生物所需之氧氣量，最終菌數以添加 0.1%過氧化鈣的 EM 菌數較高，柴油降解結果也是以具有添加過氧化鈣處理 EM 菌結果最佳(81.5%)，高於 shaking 處理之 JG39 及 Mix($P<0.05$)藉由上述實驗結果，以篩選出具有降解柴油的能力之 EM 菌群，搭配過氧化鈣的添加更能提高對柴油的降解效率，且屬本土菌株，對環境生態不至造成影響。在兩種土壤水溶液也具有相似結果，在 28 天的柴油降解實驗 Treated soil solution 只要添加 Commercial B-CaO₂ 之柴油降解率與 shaking 相似約 78.1%，而

Wet-grinded CaO_2 需添加較高濃度之過氧化鈣(0.1%)才有相同效果。Untreated soil solution 則是添加 0.1%之 Commercial B- CaO_2 之柴油降解率高於 shaking(分別為 76.7%及 42.8%, $P<0.001$), Wet-grinded CaO_2 同樣以添加濃度 0.1%之柴油降解(77.9%)高於 shaking 柴油降解率($P<0.001$)。微生物降解柴油之土壤試驗,以復育土所馴養微生物經 241 天降解 2,000 ppm 柴油,可降低至 23.9 ± 4.6 ppm,而高污染土經馴養後亦可將柴油濃度降低至 112.4 ± 6.3 ppm。顯示原生菌群中已具有可分解柴油之微生物,經馴養後可經由降解實驗驗證其降解能力,並以菌株協同過氧化鈣顆粒進行柴油降解試驗。

5-12 建議

本計畫為開發穩定型奈米金屬釋氧顆粒添加劑,釋氧顆粒及已培養之柴油降解微生物作為後續搭配處理柴油的重要參考因素。目前最佳奈米金屬釋氧顆粒粒徑大小為 123 nm,穩定型奈米金屬釋氧顆粒目前在具有持續在 Basic medium 的實驗中,可維持至 28 天的穩定釋氧量,碳氫化合物降解菌中,多屬於好氧菌,因此土壤生物復育以好氧處理為主,微生物在降解碳氫化合物的途徑中皆有氧化酵素的參與,但土壤為通氣不佳的環境中,加上生物作用使土壤更容易變成厭氧的環境,需保持好氧微生物之活性,氧氣為一重要的關鍵因素。美國 EPA 於 2003 年的研究報告指出,受石油碳氫化合物污染場址,在生物復育過程中微生物兩階段分解現象,在兩個階段間會有一段遲滯期,整治策略是以第二階段(未進入遲滯期)添加過氧化鈣與具柴油降解菌處理,促進污染物在被土壤與土壤中微生物持續降解難分解化合物,縮短遲滯期時間以降低整治成本。

目前多樣的生物復育技術常見的離場生物復育技術有土耕法(land farming)及生物堆法(biopiles),整治時程約為六個月到兩年不等,整治費用分別為 US\$30-60/ton (USEPA, 2004)與 US\$ 30-90/ton (USEPA, 2004);現地土壤氣體抽除法在理想情況下,成本處理約 US\$ 10-50/ton;一般開挖處理法(excavation)的開挖與處置成本約 US\$ 300-510/ton 之間,其費用高低取決於土壤的污染特性與開挖方法。反之,本試驗使用微奈米等級顆粒的過氧化鈣處理,以雲林污染土為例原始土壤含氧量約 $5.0 \text{ O}_2 \text{ mg/L}$ 水溶液需較高的需氧量計算過氧化鈣所需濃度約 1%,整治費用約 US\$ 53/ton,但利用接種自受污染土壤既存之微生物菌群可增加降解的生物量並縮短生物修復處理過程,提高生物修復效率的良好刺激條件。

實場應用上,透過奈米釋氧物質添加,進而提升欲降解處的溶氧量來提升降解效益。本次研究可屬於現地生物復育法,現地生物復育法適用於土壤質地較粗的土壤、生物的背景大於 1000 CFU/g-soil、柴油濃度小於 50000 ppm、重金屬小於 2500 ppm、

pH 介於 6 至 8 左右、地下水溫度介於 10-45 °C、溶解態鐵小於 10 mg/L(盧至人, 2004), 在此條件下會有較佳的效益。未來在操作階段可透過監測井了解地下水流向、水位、流速、水質(pH、導電度、溶氧、無機離子), 柴油降解濃度等進行監測, 了解降解的效益。

在菌株含量過低的情況下, 適時地添加入柴油降解菌, 可進一步的提升柴油降解的效益。由於土壤因地而異, 若欲進一步地透過添加微生物進入現地, 也可先將微生物先進行現地相似的條件馴養或是將該現地的微生物取出進行培養, 以利於提升效益(盧至人, 2004)。在分子生物監測技術之建立上, 利用分子生物監測系統分析可分解柴油之微生物之變化, 利用聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)結果, 目前已篩選出具有特定柴油降解基因之柴油降解菌群, 此降解酵素基因表現成果可做為進一步試驗依據。未來希望能夠建立實場規模之環境油污染土壤之分子生物技術整治復育的標準操作手冊, 提供給未來的技術施用者作為參考, 落實污染土壤之整治, 期望更能有效解決受柴油污染土壤之復育整治。

參考文獻

- Alvarez, P. J. J. , T. M. Vogel. 1995. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Wat. Sci. Tech.* 31:15–28.
- Arienzo, M., 2000. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in water and soil slurry utilizing a calcium peroxide compound. *Chemosphere* 40, 331-337.
- Aspray, T.J., Gluszek, A., Carvalho, D., 2008. Effect of nitrogen amendment on respiration and respiratory quotient (RQ) in three hydrocarbon contaminated soils of different type. *Chemosphere* 72, 947-951.
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl Environ Microbiol* 65, 2697-2702.
- Bento, F.M., Gaylarde, C.C., 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. In *International Biodeterioration & Biodegradation* 47, 107-112.
- Bianchimosquera, G.C., Allenking, R.M., Mackay, D.M., 1994. Enhanced Degradation of Dissolved Benzene and Toluene Using a Solid Oxygen-Releasing Compound. *Ground Water Monitoring and Remediation* 14, 120-128.
- Borden, R.C., Goin, R.T., Kao, C.M., 1997. Control of BTEX migration using a biologically enhanced permeable barrier. *Ground Water Monitoring and Remediation* 17, 70-80.
- Bossert, I., Bartha, R. (Eds.), 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology* Macmillan Publishing Company, New York.
- Brook, T.R., Stiver, W.H., Zytner, R.G., 2001. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *Soil & Sediment Contamination* 10, 539-553.
- Calabrese, E., Kostecki, P., 1988. Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils. Taylor & Francis, London.
- Cassidy, D.P., Irvine, R.L., 1999. Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil. *Journal of Hazardous Materials* 69, 25-39.
- Chaîneau, C.H., Rougeux, G., Yéprémian, C., Oudot, J., 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial

- populations in the soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1490-1497.
- Chaillan, F., Chaîneau, C.H., Point, V., Saliot, A., Oudot, J., 2006. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution* 144, 255-265.
- Chanteau, B., Fresnais, J., Berret, J.F., 2009. Electrosteric Enhanced Stability of Functional Sub-10 nm Cerium and Iron Oxide Particles in Cell Culture Medium. *Langmuir* 25, 9064-9070.
- Cookson, J.T., 1995. *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Inc., Toronto, ON.
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98, 1339-1345.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* 2011.
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 47-64.
- Harayama, S., Y. Kasai, A. Hara, 2004. Microbial communities in oil contaminated seawater, *Current Opinion in Biotechnology*, 15:205-214.
- Huang, G.X., Liu, F., Yang, Y.Z., Kong, X.K., Li, S.P., Zhang, Y., Cao, D.J., 2015. Ammonium-nitrogen-contaminated groundwater remediation by a sequential three-zone permeable reactive barrier (multibarrier) with oxygen-releasing compound (ORC)/clinoptilolite/spongy iron: column studies. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 3705-3714.
- Ilori, M.O., Amund, D.I., 2001. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. *Z Naturforsch C*. 56, 547-552.
- Jorgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.M., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107, 245-254.
- Joseph G. Leahy, Rita R. Colwell, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological Reviews*, 54:305-315.
- Joseph, P.J., Joseph, A., 2009. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. *Journal of Hazardous Materials* 161, 522-525.
- Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2011. Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas*

- fluorescens (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the Presence of Surfactants: A Cell Surface Modification. *Water Air Soil Pollut* 214, 451-459.
- Kang, S.-W., Kim, Y.-B., Shin, J.-D., Kim, E.-K., 2010. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sophorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 780-790.
- Kanyinji, F., Moonga, M., 2014. Effects of replacing maize meal with rumen filtrate-fermented cassava meal on growth and egg production performance in Japanese quails (*Cortunix japonica*). 2014 1, 7.
- Khan, S.S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2011. Impact of exopolysaccharides on the stability of silver nanoparticles in water. *Water research* 45, 5184-5190.
- Łebkowska M, Zborowska E, Karwowska E, Miaskiewicz-Peska E, Muszynski A, Tabernacka A, Naumczyk J, Jeczalik M., 2011. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field-scale processes in Poland. *Ecol Eng* 37:1895–1900
- Lee, S.-H., Lee, S., Kim, D.-Y., Kim, J.-g., 2007. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials* 143, 65-72.
- Lima, D.Q., Oliveira, L.C.A., Bastos, A.R.R., Carvalho, G.S., Marques, J.G.S.M., Carvalho, J.G., de Souza, G.A., 2010. Leather Industry Solid Waste as Nitrogen Source for Growth of Common Bean Plants. *Applied and Environmental Soil Science* 2010, 7.
- MacCusprie, R.I., 2011. Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 2893-2908.
- Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., El Mabrouki, K., Quesada, E., Calvo, C., 2007. Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource Technology* 98, 3130-3135.
- McCray, J.E., Brusseau, M.L., 1998. Cyclodextrin-Enhanced in Situ Flushing of Multiple-Component Immiscible Organic Liquid Contamination at the Field Scale: Mass Removal Effectiveness. *Environmental Science & Technology* 32, 1285-1293.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology* 2, 317-322.
- Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Esteves, J.L., Bucalá, V., 2008. Biodegradation

- pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials* 154, 96-104.
- Nogueira, F.G.E., Castro, I.A., Bastos, A.R.R., Souza, G.A., de Carvalho, J.G., Oliveira, L.C.A., 2011. Recycling of solid waste rich in organic nitrogen from leather industry: Mineral nutrition of rice plants. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1064-1069.
- Nykanen, A., Kontio, H., Klutas, O., Penttinen, O.P., Kostia, S., Mikola, J., Romantschuk, M., 2012. Increasing lake water and sediment oxygen levels using slow release peroxide. *Science of the Total Environment* 429, 317-324.
- Odencrantz, J.E., Johnson, J.G., Koenigsberg, S.S., 1996. Enhanced intrinsic bioremediation of hydrocarbons using an oxygen-releasing compound *Remediation Journal* Volume 6, Issue 4. *Remediation Journal*, pp. 99-114.
- Olyaie, E., Banejad, H., Afkhami, A., Rahmani, A., Khodaveisi, J., 2012. Development of a cost-effective technique to remove the arsenic contamination from aqueous solutions by calcium peroxide nanoparticles. *Separation and Purification Technology* 95, 10-15.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry* 115, 238-242.
- Ovissipour, M., Kenari, A.A., Motamedzadegan, A., Nazari, R.M., 2012. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioprocess Technology* 5, 696-705.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci* 12, 633-654.
- Panicker, G., Mojib, N., Aislabie, J., Bej, A., 2010. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 275-287.
- Phrommanich S, Suanjit S, Upatham S, Grams SV, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Korge G, Hofmann A., 2007. Quantitative detection of the oil-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. Strain MUB1 by hybridization probe based real-time

- PCR. *Microbiol Res.* 164(4):486-92.
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11, 2477-2490.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., Ron, E.Z., 1992. Petroleum bioremediation — a multiphase problem. *Biodegradation* 3, 337-350.
- Ruanglek, V., Maneewatthana, D., Tripetchkul, S., 2006. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 41, 1432-1437.
- Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A., Rasco, B., 2012. Use of Hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Heads as a Complex Nitrogen Source for Lactic Acid Bacteria. *Food and Bioprocess Technology* 5, 73-79.
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B.A., 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 127-144.
- Seklemova, E., Pavlova, A., Kovacheva, K., 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 12, 311-316.
- Semple, K.T., Cain, R.B., Schmidt, S., 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters* 170, 291-300.
- Siriwardana, K., Wang, A.L., Vangala, K., Fitzkee, N., Zhang, D.M., 2013. Probing the Effects of Cysteine Residues on Protein Adsorption onto Gold Nanoparticles Using Wild-Type and Mutated GB3 Proteins. *Langmuir* 29, 10990-10996.
- Thomas, C.P., Duvall, M.L., Robertson, E.P., Barrett, K.B., Bala, G.A., Inc., E.G.I., 1993. Surfactant-Based EOR Mediated by Naturally Occurring Microorganisms *SPE Reservoir Engineering* 8, 285-291.
- Uyttebroek, M., S. Vermeir, P. Wattiau, A. Ryngaert, Springael, D., 2007. Characterization of Cultures Enriched from Acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil for Growth on Pyrene at Low pH, *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3159–3164.
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., Gushterova, A., 2007. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Current Microbiology* 54, 54-57.
- Venosa, A.D., Zhu, X., 2003. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine

- Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin* 8, 163-178.
- Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1997. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401-417.
- Walworth, J., Braddock, J., Woolard, C., 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold Regions Science and Technology* 32, 85-91.
- Wang, Y.J., Hua, F.L., Tsang, Y.F., Chan, S.Y., Sin, S.N., Chua, H., Yu, P.H.F., Ren, N.Q., 2007. Synthesis of PHAs from waster under various C : N ratios. *Bioresource Technology* 98, 1690-1693.
- Whang, L.-M., Liu, P.-W.G., Ma, C.-C., Cheng, S.-S., 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 151, 155-163.
- Whang, L.-M., Liu, P.-W.G., Ma, C.-C., Cheng, S.-S., 2009. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation—Effects of pH and ammonium addition. *Journal of Hazardous Materials* 164, 1045-1050.
- White, D.M., Irvine, R.L., Woolard, C.R., 1998. The use of solid peroxides to stimulate growth of aerobic microbes in tundra. *Journal of Hazardous Materials* 57, 71-78.
- Wilderer, P.A., Bungartz, H.J., Lemmer, H., Wagner, M., Keller, J., Wuertz, S., 2002. Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. *Water research* 36, 370-393.
- Wilfred F. M. Roling, M.G. Milner, D.M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R.J.P. Swannell, Head I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 68:5537–5548.
- Yerushalmi, L., Lascourreges, J.F., Guiot, S.R., 2002, Kinetics of benzene biotransformation under microaerophilic and oxygen-limited conditions. *Biotechnol and Bioengineer* 79:347-355.

鄭幸雄。高場污染土壤離場生物復育技術驗證技服工作成果簡報。2006。

邱漢瑜，2013。以監測式自然衰減控制受石油碳氫化合物污染之地下水。環境工程研究所。國立中山大學，高雄市，p. 207。

馬志強，2005。應用生物界面活性劑促進柴油污染土壤中原生菌生物降解效率。

- 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 130.
- 張儷馨, 2008. 受油污污染土壤之生物復育測試與微生物族群變化之研究. 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 151.
- 郭育嘉, 2009. 以釋氧化劑物質處理受石油碳氫化合物污染之地下水. 環境工程研究所. 國立中山大學, 高雄市, p. 112.
- 陳廷育, 2007. 以釋氧物質加強受石油碳氫化合物污染地下水之好氧生物復育效率. 環境工程研究所. 國立中山大學, 高雄市, p. 111.
- 曾依蕾, 2005. 柴油降解菌組合的最佳化. 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 128.
- 黃威翔, 2015. 以加強式硫酸鹽還原法處理受石油碳氫化合物污染之地下水. 環境工程研究所. 國立中山大學, 高雄市, p. 140.
- 楊宇祥, 2010. 複合式生物復育技術應用於油污土壤之離場整治. 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 164.
- 楊竣智, 2014. 結合土耕法及抽出處理法整治受石油碳氫化合物污染之土壤及地下水. 環境工程研究所. 國立中山大學, 高雄市, p. 103.
- 廖翊廷, 2007. 應用生物刺激及菌種添加之離場土耕法整治總石油碳氫化合物污染土壤之模場研究. 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 181.
- 潘祈良, 2009. 應用細胞固定化技術於生物滲透性反應牆之地下水中柴油整治研究. 環境工程學系碩博士班. 國立成功大學, 台南市, p. 129.
- 盧至人, 2004. 土壤及地下水污染整治技術手冊:生物處理技術. 經濟部工業局, 台北市, p.4-73
- 盧至人, 2004. 土壤及地下水污染整治技術手冊:生物處理技術. 經濟部工業局, 台北市, p.4-58

專案執行績效審核－自評表

項次	類別	缺失點數	自評項目	執行單位檢核		本署審核
				是	否	
一	計畫書核定修正	1 點	依規定期限內備文提送	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	書面資料完整且無補件情況	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	報告依格式規定撰寫	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	依規定期限內繳交電子檔	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	系統資料依規定期限內登錄且資料登錄完整（含 GRB 系統與本署專案系統）	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
二	期中及期末	1 點	依規定期限內備文提送	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	書面資料完整且無補件情況	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	報告依格式規定撰寫	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	依規定期限內繳交電子檔	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	系統資料依規定期限內登錄且資料登錄完整（含 GRB 系統與本署專案系統）	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
三	結案及核銷	1 點	依規定期限內備文提送	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		4 點	結案提送原始憑證清冊及相關資料完整且無補件情況	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
四	其他	3 點	計畫主持人配合出席本專案成果發表活動（或指定代理人如協同主持人、同專業且為助理研究員以上職等，備文經本署同意者）	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	發表期刊論文、專利、技轉等，註明補助單位及中英文致謝，備文副知本署。	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
		1 點	計畫執行者於執行期間與單位內各處室溝通良好，行政作業效率良好。	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
合計		20 點				

註：執行單位於計畫執行期間進行缺失檢核於期中期末送本署審核，並於期末統一計算。
未依實況登錄者，由本署補登依各階段執行紀錄進行缺失點數扣款。

缺失扣款機制：

1. 依結案標準，於專案執行期間，視各執行單位行政作業配合度，依「專案執行績效審核－自評表」（附表 4）進行績效缺失記點，缺失點數達扣款規定者，依核定第三期款項（總金額 20%）按比例扣款（或追繳）。
2. 缺失點數達 5 點者第三期款項扣 5%，缺失點數達 7 點者第三期款項扣 10%，每增加缺失 1 點，加扣 1%至滿 20%為限。