



## 環境部環境管理署

112 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

# 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

成果報告(定稿)

主辦單位： 環境部環境管理署

專案執行單位：大仁科技大學／環境與職業安全衛生系

專案主持人：賴文亮 教授

協同主持人 洪堂耀 副教授

專案執行期間：112 年 12 月 15 日起至

113 年 11 月 29 日止

中華民國 113 年 12 月 印製



審查意見回覆對照表

環境部環境管理署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

構想書 申請計畫書 期中報告  
修正計畫書 成果報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	112 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他	主持人：賴文亮 NO：C4	
計畫名稱	新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤		
審查意見		執行單位回覆	
<p><b>委員一</b></p> <p>1. 本計畫文獻探討及實驗數據紀錄完整詳細，予以肯定。</p> <p>2. P.39 提及少量 BSFL 預蛹及成蟲難以量測低、高碳數 TPH 之殘留情形，建議補充說明導致此問題之詳細原因，並評估有無替代量測方案，或考慮增加樣本數來提高檢測準確性。</p>		<p>1. 感謝委員對本計畫執成果持正向的肯定。</p> <p>2. (1)本次研究取約 4,000 隻之 BSFL 幼蟲進行相關試驗，不同油劑量對應之預蛹約佔總數之 2-6%(圖 5-13)，若換算數量約為 200 隻，但因為需要進行羽化記錄，羽化率約 60-90%(圖 5-16)。(2)BSFL 最後蟲重約 0.1 克，預蛹前 BSFL 會排空所進食量，每隻預蛹 BSFL 平均重 0.0411 g±0.0183 g (N=10)，BSFL 成蟲平均重 0.0109 ±0.00 36 g (N=10)，未轉換成蟲之預蛹數量僅剩 20-80 隻，成蟲落於 120-180 隻，由於高低 TPH 之量測樣本至少各需要樣本 20 克，故在本研究若預檢測預蛹及成蟲之 TPH，誠如委員所提或許增加樣本數，最後再採混合樣本之方式進行 TPH 量測，應是可行的。(3)此部分內文修正詳見期末報告定稿。</p>	
<p><b>委員二</b></p> <p>1. 由於影響黑水虻各階段生長之因素包括溫度、濕度、陽光、水分含量、pH 值等參數，又以溫度影響黑水虻成蟲壽命之長短，建議未來可研究在不同的溫度條件下測試黑水虻幼蟲的生長，與 TPH 去除效果，以找出最佳的環境條件，並評估其應用於不同氣候環境的可行性。</p> <p>2. 若技術成熟後，建議於實際污染場址進行小規模測試，並與實驗室數據進行比較，以驗證黑水虻幼蟲技術在真實環境中的穩定性和適用性，有助於未來應用於實場中。</p> <p>3. 報告於意見回覆中說明，本研究團隊建置的相關 BSFL 之培育術技術，目前轉移及重建中。配合該校老師專長，準備向農業部進行有關</p>		<p>1. (1)感謝委員提供實實務有用的建議，關於 BSFL 幼蟲於不同溫度對 TPH 去除效能，確實是可進行的主題。(2)本計畫屬初期性之探究，除溫度外，BSFL 數目、土樣量、米糠量、及柴油與燃料油劑量，均會造成 BSFL 對各項功能之影響，但各參數間之作用，如何透過實驗設計，進行參數間對油品高低碳數 TPH 劑量去除之影響，應是值得進行的主題 (5-3 建議(2))。</p> <p>2. 依回應 1 之說明，誠如委員建議，應可以實際污染場址進行小規模測試，驗證黑水虻幼蟲技術在真實環境中的穩定性和適用性。</p> <p>3. 近年以 BSFL 處理農業副資材及廢棄物之研究場域，原設置於本校研究大樓頂樓，但今年二次颱風，場域破壞嚴重，短期時間難以復</p>	



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

<p>BSFL 進行農業廢棄資材之循環再利用研究。建議多補充說明後續執行方向。</p> <p>4. 本計畫探討透過黑水虻幼蟲進行處理受重質石油碳氫化合物污染土壤，屬於低碳、複合功能的生物整治技術，建議未來可研究蟲糞和蟲體的再利用途徑，如作為有機肥料或土壤改質劑，並依循相關安全標準進行重金屬與有害成分測試，以確保其環保性與安全性。</p>	<p>原，故關於 BSFL 之培育術技術轉移及重建中，可分二部分說明：</p> <p>(1)專利申請:目前在培育技術部分，已與專利公司規劃新型及發明專利申請，分別為「循環培育系統」及「重油處理方法」，預計送件日期為 113 年 12 月 31 日。</p> <p>(2)重建:有關後續執行方向，整合委員所提有用的建議，並回應於期末報告 5-3 建議 (2)，然而，若要進行相關研究，仍需要 BSFL 培育之重建規劃，除與友校合力建置場域外，校內場域重建規劃，作為未來共同合作支援模式，但發展主題，屏科大則以農業副資材為主，本校則針對土壤中油品及重金屬之方向，藉以降低計畫執行推動之風險。</p> <p>4. 感謝委員再次提醒，本計畫屬低碳、複合功能的生物整治技術。計畫產生的蟲糞及土樣混合之初步研究，包括之物化性質變化及其對禾本植物生長之影響，整理說明如 5-1-5。另蟲體目前無檢測到原油品中低碳及高碳數 TPH 之殘留，代表其後續利用之可行性高，但如同委員之建議，相關安全標準進行重金屬與有害成分測試，仍需關注，以確保其環保性與安全性。</p>
<p><b>委員三</b></p> <p>1. 在 5.1.2 有提到在柴油部分，低劑量似乎會抑制每隻 BSFL 蟲體重，高劑量反而不會，是否有相關文獻解釋此現象？</p> <p>2. 建議可以針對不同時間段的菌相動態變化進行深入探討，特別是優勢菌種如何隨時間或油品濃度變化而演替，這樣能更全面地了解 BSFL 與微生物在 TPH 降解中的協同作用。</p> <p>3. 頁次 32... 第 4 天時，不同「柴油」濃度仍持續呈現增重之現象，2,000-10,000mg/kg 燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重均高於對照組。此「柴油」是否為燃料油，請確認。</p> <p>4. 結論比較像是總論(summary)，建議依據研究目的，提出明確的結論。</p>	<p>1. (1)關於低劑量 2,000 mg/kg 柴油，每隻 BSFL 重在 0-5 天，其重量為 0.08 g，略低於控制組，0.09 g，其間些微差異，應與本研究採隨機進行量測及樣本數低相關(N=10，佔總 BSFL 幼蟲數之 0.25%)，若要避開始此問題，加大取樣數目(N=40-400，1-10%)，應可減少此問題，此部分文句修正，詳見於期末報告。(2)另以 BSFL 進行受油品污染土壤之相關研究，目前少有文獻可進行比對，實難提出更多的討論及解釋，但 BSFL 攝入土壤之停留時間、米糠、油品轉換 BSFL 生物質之速率及 BSFL 能量消耗速率，均可能 BSFL 重量測量差異之原因。</p> <p>2. (1)感謝委員建議。關於油品中 TPH 是否會影響到 BSFL 的生長，BSFL 是否具有分解 TPH</p>



審查意見回覆對照表

	<p>的能力，為研究計畫之重點，且由於無相關之研究文獻可作評估，故僅能規劃實驗前與後的土壤，及實驗結束後之 BSFL 腸道菌相，進行分析，並沒有針對不同的時間點解菌相的動態變化。(2)如同委員建議，未來在申請新計畫時，可針對不同時間點與優勢菌種或油品濃度變化的演替，進行更深入的探討，此部分會納入建議。(3)事實上，所分離的十幾株各別菌株，曾於含 TPH 最低營養培養基中培養，並無直接觀察到分解 TPH 的效果，可能是菌株間透過協同作用進行分解 TPH。</p> <p>3. 感謝委員檢視到報告中繕打錯誤，已完成修正於期末報告。</p> <p>4. 關於結論之修正，已依研究目的及參酌委員建議修正於期末報告定稿。</p>
<p><b>委員四</b></p> <p>1. 建議應考慮未來應用時所遇到的困難進行研究。</p> <p>2. 建議未來考慮使用實際受污染土壤進行測試。</p>	<p>1. 感謝委員提供有用的建議，有關現未來應用之困難，詳如委員二意見回覆之(1)及(2)。另實際公告的受污染場址，除含油品外，另銅、鉻、鋅與鎳等重金屬共同存在時，進行 BSFL 對油品 TPH 之減量，及重金屬對 BSFL 去除 TPH 之影響，應是研究可能需面對問題。</p> <p>2. 基礎研究成後，朝向放大規模於實際受污染土壤之應用，應是研究團隊的目標。</p>



## 112 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗申請計畫書

一、專案基本資料表

申請編號： (由本署填寫)

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案技術編碼	LAB-R-R-C2-B <small>(如非實驗性質含氣溶劑之生物整治模場為 NLAB-S-R-C1-B，填寫請參考附件 1-4)</small>	
專案類別(單選)	<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 政策類或其他	
申請機構系所	大仁科技大學/環境與職業安全衛生系			
機構地址	屏東縣鹽埔鄉新二村維新路 20 號			
專案主持人	賴文亮	職等/職稱	教授	
協同主持人	洪堂耀	職等/職稱	副教授	
專案名稱	中文	新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤		
	英文	Novel Insect-Mediated Remediation Technique to remediate Heavy Petroleum Hydrocarbon contaminated soils		
	關鍵字	石油碳氫化合物、黑水虻、綠色土壤整治技術		
執行期程	自民國 112 年 12 月 15 日起至民國 113 年 11 月 29 日止			
專案主持人	姓名：賴文亮	E-mail：lai@tajen.edu.tw	專線：(08)7624002#2607 手機：0937382102	
專/兼任人員	姓名：曹靜雯	E-mail：dbd2608@gmail.com	專線：(08)7624002#2608 手機：0934166771	
經費分析總表  (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估 總經費		第一年 申請經費	編列說明
	1.	人事費用	535,724	(1-5 項相加之 50% 為限)
	2.	設備使用含維護費	84,000	(與計畫實驗相關)
	3.	耗材與主要費用	297,426	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	0	(含差旅與租賃費用)
	5.	行政管理費	161,850	(1-5 項相加之 15% 為限)
	6.	自籌款	0	(申請單位自行籌備款項)
	申請補助經費(1~5 項)		1,079,000	總金額：1,079,000
計畫總經費(1~6 項)		1,079,000	總金額：1,079,000	

說明：

1. 本署以部份補助為原則，得指定不補助項目，不補助項目應為自籌款項，應自行核銷不得申請。
2. 非實驗性質之專案，若第一項費用編列金額超出比率，須於申請公文內向本署說明，俾利審查。
3. 補助專案經費編列自申請起經專案核准後，經費編列中各項費用單價與需求只可減少與下修。

專案主持人： 賴文亮 (簽名或蓋章)      日期： 113.12.4

(定稿本請蓋上申請單位大小章)



# 112 年度專案成果績效自評表

填表日期：113 年 5 月 20 日

## 一、專案基本資料

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 type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
執行機構	大仁科技大學	專案主持人	賴文亮
專案名稱	新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input checked="" type="checkbox"/> 期中 <input type="checkbox"/> 成果		

## 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	成果 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因 或學術產出發 表名稱)
A 學術 產出 及活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	-	-	-	-	
		(2)研討會論文	1	0	1	100%	
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1	100%	
		(2)國際研討會論 文發表	1	0	1	100%	
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	1	0	1	100%	
		(2)研究報告	-	-	-	-	
	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	-	-	-	-		
7.技術獎項(項數)		-	-	-	-		
B 人才 培育	8.研發人員 (人數)	(1)碩士	1	0	1	100%	
		(2)博士	-	-	-	-	
	9.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊	1	0	1	100%	
		(2)跨機構團隊	-	-	-	-	
		(3)形成研究中心	-	-	-	-	
(4)形成實驗室		-	-	-	-		
10.其他指標	大學部專題生	2	0	2	100%		



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

(二) 產業面

項目		目標達成程度		申請 預估數	期中 達成數	成果 達成數	結案後半年 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)
		已核准	申請中					
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	1	0	-	-	
			新型/設計	0	-	1	100%	
			合計	1	0	1	100%	
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	1	0	1	100%	
金額(仟元)			10	0	10	100%		
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 (請自行命名)		-	-	-	-			



(三) 政策面

項目		目標達成程度		申請預估數	期中達成數	成果達成數	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
		次數	收入(仟元)					
A 服務 便民	1.技術服務	次數		1	0	1	100%	
		收入(仟元)		0	0	0	100%	
	2.諮詢服務	次數		1	0	1	100%	
		收入(仟元)		0	0	0	100%	
B 政策 推動	3.協助政府推動 (件數)	(1)政策		-	-	-	-	
		(2)法規		-	-	-	-	
C 技術 效益	4.整治技術提升(%)			-	-	-	-	
	5.整治成本降低(%)			-	-	-	-	
	6.提升能源效率(%)			-	-	-	-	
7.其他指標 (請自行命名)				-	-	-	-	

三、請依前述學術面、產業面、政策面等預期量化成果，具體敘明研究成果對本署政策推動之助益。(200 字為限)

<b>學術面(如國內外研討會、期刊投稿件數、或人才培育碩博士生說明)</b>
1.投稿期刊 1 篇、參與國內外研討會發表論文 1 篇。 2.培育 1 名碩士生、3 名大學部專題生。
<b>產業面(如合作研發產業、申請專利、洽談技術移轉廠商件數說明)</b>
1.申請新型專利 1 件。 2.洽談產業合作開發 1 案。
<b>政策面(如整治費用降低、特定污染物整治效益提升、或提供政府作為監測/管制標準、污染場址管理等政策及法規研訂之參考)</b>
1. 提供受重質 TPH 污染土壤整治的新方案，可較傳統化學或生物處理工法有其他選擇。 2. 未來整治工法趨向低碳排、生物性及永續性等原則之綠色整治技術(GSRR)，蟲生整治技術相較於傳統整治技術仰賴機具設備灌注藥劑或開挖混拌等高碳排工法，本工法僅利用蟲體代謝土壤中之污染物，若蟲體完全代謝污染物且可持續繼代，即可符合永續性原則，另污染代謝後之蟲體亦可開發生質燃料、土壤肥力回復或其他再利用方向，故極具開發潛力。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

#### 四、主要研究人力

請依照「專案主持人」、「協同主持人」、「專任人員」及「兼任人員」等類別之順序分別填寫

姓名	服務機構/系所	職稱	在本研究專案內擔任之具體工作性質、項目及範圍	*每月平均投入 工作日數比率(%)
賴文亮	大仁科技大學/環境管理研究所	教授	計畫進度追蹤/報告撰寫/期末簡報/投稿	40%
洪堂耀	大仁科技大學/環境管理研究所	教授	文獻整理/菌相分析/數據分析/ 專利申請	50%
曹靜雯	大仁科技大學/環境管理研究所	專任助理	實驗分析/經費核銷/各項文書工作	100%



## 一、中文摘要

本本研究團隊選用三齡黑水虻幼蟲(Black soldier fly larvae, BSFL) 進行人工配製受柴油與燃料油污染土壤，總石油碳氫化合物(Total petroleum hydrocarbons,TPH)劑量介於 2,000-10,000 mg/kg，土樣 1 公斤加 10% 米糠，投入適量三齡 BSFL 幼蟲數，進行 BSFL 在兩種油品耐受力、生長速率、BSFL 對低碳數(C6-C9)及高碳數(C10-C50)TPH 之總去除率、土壤肥力評估及土壤與 BSFL 菌相豐富度變化進行探討，作為未來綠色工法整治之參考。

研究成果區分四部分，說明如下：(1)在蟲體耐受性及安全性：BSFL 於燃料油之死亡率及預蛹率，均低於同劑量柴油之值。BSFL 幼蟲存活比例於受油品污染土壤，超過 90%，代表其在油品之耐受程度相當高。BSFL 經處理柴油及燃料油後，蟲體內並無檢測到油品標準中高低碳數 TPH 成份之累積。(2)減量評估：BSFL 對柴油與燃料油中  $TPH_{low-carbon}$  去除應可有效控制(6,000-10,000 mg/kg)，但在燃料油低劑量(2,000mg/kg)，需注意 BSFL 代謝釋出  $TPH_{low-carbon}$  之干擾。BSFL 對燃料油中  $TPH_{high-carbon}$  去除率表現於柴油更佳。BSFL 對 TPH 之生物質轉換速率，在低碳數部分，燃料油高於柴油；在高碳數部分，則是柴油高於燃料油。油品劑量落於 4,000-8,000 mg/kg，BSFL 在燃料油之生長速率明顯高於在柴油之表現。(3)減污土壤肥力測試：不同油品劑量土壤，經 BSFL 處理後之 pH 值、導電度、有機質、有效氮含量，均高於對照組，且  $Amino_{(I+II+VI)}$  acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比值，隨處理時間之增加而增加，兩油品呈現一致趨勢。油品萃出液對小麥發芽率之影響，燃料油之表現優於柴油，兩種油品對小麥發芽率均優於對照組，但對玉米及水稻發芽率，兩種油品則低於對照組。(4)菌種鑑定：土壤中菌相豐富度分析中，對照組與實驗組雖有所變化，可觀察 *Dysgonomonas* 對兩種油品高低劑量燃料之耐受力高；*Brevibacterium* 菌屬，在兩種油品劑量增加時，其菌相豐富度隨之增加，BSFL 腸道中菌相 *Rhodococcus* (紅球菌屬)實驗組(添加柴油或是燃料油)豐富度比對照組多出 10 倍以上。利用 QIIME 中的 Sorensen dice index analysis 統計方法，對照組與含柴油或是燃料油之土相或 BSFL 腸道菌相具有差異性。本研究初步驗證 BSFL 應用於受油品污染場址之可行性，但受限各項資源，仍有需完善補強不足之處，進而作為綠色整治開發技術及現場應用之參考。

**關鍵字：**總石油碳氫化合物；黑水虻幼蟲；菌相豐富度；肥力測試；綠色整治



## 二、英文摘要

In this study, we selected third-instar Black Soldier Fly Larvae (BSFL) to treat artificially contaminated soil with diesel and fuel oil, with total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations ranging from 2,000 to 10,000 mg/kg. One kilogram of soil was mixed with 10% rice bran and inoculated with an appropriate number of third-instar BSFL to evaluate their tolerance to both oils, growth rates, total removal rates of low-carbon (C6-C9) and high-carbon (C10-C50) TPH, changes in soil fertility, and microbial diversity in both soil and BSFL. These findings are intended as a reference for future green remediation technologies.

The study is divided into four parts: (1) **Larval Tolerance and Safety:** BSFL mortality and pre-pupation rates in fuel oil were lower than those in diesel at the same TPH levels. The survival rate of BSFL in oil-contaminated soil exceeded 90%, indicating a high tolerance to both oil types. No accumulation of TPH components (low or high carbon number) was detected in the larvae after exposure to diesel or fuel oil. (2) **TPH Reduction Assessment:** BSFL should effectively control TPH low-carbon removal (6,000-10,000 mg/kg) from diesel and fuel oil, but at low doses in fuel oil (2,000 mg/kg), attention should be paid to potential interference from BSFL metabolic release of TPH<sub>low-carbon</sub>. BSFL demonstrates better TPH high-carbon removal efficiency in fuel oil than diesel. Regarding the biomass conversion rate of TPH, in the low-carbon fraction, fuel oil surpasses diesel; in the high-carbon fraction, diesel exceeds fuel oil. For TPH levels between 4,000 and 8,000 mg/kg, BSFL exhibited significantly higher growth rates in fuel oil, likely due to the more straightforward conversion of low-carbon TPH in fuel oil. (3) **Soil Fertility Tests:** Soil treated with BSFL showed higher pH, electrical conductivity, organic matter, and available nitrogen content than the control group. The fluorescence intensity ratio of Amino acids (I+II+VI) to Humic acids (III+V) increased over time, with both oil types showing a consistent trend. Wheat germination rates in the oil-contaminated extracts were higher for fuel oil than diesel. Both oils improved wheat germination compared to the control, though germination rates for corn and rice were lower than the control. (4) **Microbial Identification:** Microbial diversity analysis of soil revealed changes between the control and experimental groups. *Dysgonomonas* showed high tolerance to both oils at various concentrations, while the abundance of *Brevibacterium* increased with higher oil concentrations. In the BSFL gut microbiome, the abundance of *Rhodococcus* was over ten times higher in the oil-treated groups compared to the control. Statistical analysis using the Sorensen Dice Index in QIIME showed significant differences in microbial diversity between the control and oil-treated groups in both soil and BSFL guts. This study preliminarily confirms the feasibility of using BSFL to remediate oil-contaminated sites. However, resource limitations require further improvement before these findings can be applied as green remediation technologies for field applications.

**Keywords:** Total petroleum hydrocarbons; Black Soldier Fly Larvae; Microbial diversity; Soil fertility tests; Green remediation.



## 目次

1 第一章 前言 .....	1
2 第二章 研究目的 .....	2
3 第三章 文獻探討 .....	3
3.1 TPH 生物整治技術.....	3
3.1.1 環境因子對微生物之影響.....	3
3.1.2 小型模型研究 .....	4
3.1.3 國內外現地整治案例 .....	6
3.1.4 土壤復育常見之微生物 .....	6
3.2 黑水虻之特性 .....	7
3.3 黑水虻的培育 .....	9
3.3.1 環境因子 .....	9
3.3.2 進料特性 .....	10
3.3.3 幼蟲聚集 .....	11
3.4 黑水虻在環境領域之應用 .....	12
3.5 黑水虻於亞洲各國之應用 .....	13
3.5.1 中國 .....	13
3.5.2 韓國 .....	13
3.5.3 馬來西亞 .....	14
3.5.4 印尼 .....	14
3.5.5 其它國家 .....	14
3.6 蛇糞肥力試驗 .....	15



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

3.7 螢光激發發射光譜在有機物性質之應用 .....	16
3.7.1 有機物之性質分類 .....	16
3.7.2 HIX 及 BIX .....	17
3.7.3 SFS 於油品之分析 .....	17
4 第四章 研究方法與過程 .....	19
4.1 人工配製柴油及燃料油污染土壤 .....	19
4.2 幼蟲培育及選擇 .....	20
4.3 菌相分析 .....	21
4.3.1 樣品 DNA 的抽取 .....	21
4.3.2 次世代定序 .....	21
4.3.3 菌種分解 TPH 能力分析 .....	22
4.4 蟲體、蛹重量大小之量測 .....	23
4.5 TPH 濃度分析 .....	23
4.6 土壤腐植化測定 .....	23
4.7 肥力試驗 .....	24
4.7.1 pH (AFS2904-1) .....	24
4.7.2 電導度值 (AFS2905-1) .....	24
4.7.3 有機質 (AFS2101-1) .....	25
4.7.4 全氮 (AFS1110-1) .....	25
4.7.5 全磷酐 (AFS1120-1) .....	26
4.7.6 全氧化鉀 (AFS1130-1) .....	26
4.7.7 全氧化鈣 (AFS1140-1) .....	26
4.7.8 全氧化鎂 (AFS1150-1) .....	27



## 目次

4.8 研究進度及預期完成之工作項目 .....	27
4.8.1 原訂定進度 .....	27
4.8.2 計畫進度 .....	27
5 第五章 結果與討論(含結論與建議).....	30
5.1 結果與討論 .....	30
5.1.1 BSF 蟲卵之計數、孵化及 1 齡至 3 齡之蟲體重及長度.....	30
5.1.2 BSFL 重量、死亡數(率)及預蛹蟲數(率)之變化.....	31
5.1.3 濁度法、FEEM 與同步螢光掃描法及 GC-FID 進行 TPH 濃度分析	44
5.1.4 受油品污染土壤經 BSFL 處理後，土壤及 BSFL 之 TPH 含量 .....	47
5.1.5 經 BSFL 處理受油品污染土壤之物化性質變化及其對禾本植物生長 之影響 .....	63
5.1.6 土壤中有機物 BIX、HIX 及 Amino(I+II+VI) acid/Humic(III+V)螢光 強度比值 .....	70
5.1.7 土樣及 BSFL 腸道菌相分析.....	75
5.2 結論 .....	86
5.3 建議 .....	86
5.4 後續工作說明 .....	87
6 參考文獻 .....	88
7 附錄 .....	101



## 圖次

圖 3-1 黑水虻之生命週期(自行繪製) .....	7
圖 3-2 幼蟲的中腸特點、功能及對營養感知、分解和吸收及生物體內的大分子營養物質之酶解及微生物分解(Gold <i>et al.</i> , 2018).....	8
圖 3-3 黑水虻蟲體之優勢菌種及殘留物中之優勢菌種(Xiang <i>et al.</i> , 2023) .....	9
圖 3-4(A) Chen <i>et al.</i> ( 2003) (B) Bilal <i>et al.</i> (2010) 對螢光激發發射光譜圖中有機物性質之定義 .....	16
圖 3-5 同步掃描於螢光全譜圖中之對角線(a) $\Delta \lambda = 20 \text{ nm}$ (b) $\Delta \lambda = 40 \text{ nm}$ (c) $\Delta \lambda = 60 \text{ nm}$ (d) $\Delta \lambda = 80 \text{ nm}$ .....	17
圖 4-1 BSFL 對受油品 TPH 污染之實驗示意圖 .....	19
圖 4-2 幼蟲培育及投入實驗規劃 .....	20
圖 4-3 實驗初期 (A) 飼養至 3 齡之 BSFL (B) 對照組(土樣 1kg+0.1 kg 米糠 (C) 人工配製受柴油污染土壤(2,000 mg/kg)(D)人工配製受燃料油污染土壤(2,000 mg/kg).....	20
圖 5-1 不同蟲卵重於 99 %酒精之分散及計數 (A) 0.0011 g(B)0.0012 g (C) 0.0013 g .....	30
圖 5-2 BSF 蟲卵孵化成初生幼蟲(1 齡蟲)之外觀變化 .....	31
圖 5-3 初生黑水虻幼蟲至 3 齡 BSFL 長度及重量變化(A) 1 齡(0.0013 g) (B) 2 齡 (0.0105 g) (C) 3 齡(0.0633 g).....	31
圖 5-4 三齡 BSFL 在不同(A)柴油(B)燃料油劑量下生長之蟲重變化(N=10).....	32
圖 5-5 三齡 BSFL 在對照組土壤 (A)第 0 天 (2) 第 4 天 之大小及重量變化 .....	33
圖 5-6 三齡 BSFL 在受柴油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 試驗之蟲體大小及重量變化(第 0 天) .....	34
圖 5-7 三齡 BSFL 在受受柴油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 試驗之蟲體大小及重量變化(第 4 天)	



## 目次

.....	35
圖 5-8 三齡 BSFL 在受燃料油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 之蟲體大小及重量變化(第 0 天).....	36
圖 5-9 三齡 BSFL 在受燃料油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 之蟲體大小及重量變化(第 4 天).....	37
圖 5-10 BSFL 在受二種不同油品濃度污染土壤之成長速率(A)柴油 (B)燃料油(21 天).....	38
圖 5-11 三齡 BSFL 第 10 天死亡外觀相片(A)柴油 (B)燃料油 (10,000 mg/kg).....	40
圖 5-12 三齡 BSFL 在 21 天內蟲體之總死亡率變化 .....	41
圖 5-13 三齡 BSFL 在 21 天內蟲體之總預蛹率變化 .....	41
圖 5-14 三齡 BSFL 生長於不同劑量柴油下，試驗期間(21 天)蟲蛹之羽化狀況..	42
圖 5-15 三齡 BSFL 生長於不同劑量燃料油下，試驗期間(21 天)蟲蛹之羽化狀況 .....	43
圖 5-16 三齡 BSFL 在試驗期間(21 天)內蟲蛹之羽化率.....	44
圖 5-17 TPH 快篩-濁度法之檢量線(A)柴油(B)燃料油 .....	45
圖 5-18 去離子水萃取受污染土壤 (A)柴油 10,000 (mg/kg) (B)燃料油 10,000 (mg/kg) ; (1) 0 day (2) 7 天 FEEM 之 FFEM 圖 .....	45
圖 5-19 (A) $\Delta\lambda$ 對 SFS 之影響(B)不同油品濃度之 SFS 掃描(C)檢量製作(1)柴油(2)燃料油 .....	46
圖 5-20 (A)柴油(B)燃料油之(1)低碳數(C6 ~ C9) (2)高碳數(C10 ~ C50) TPH 之檢量線(信賴區間 95 %) .....	47
圖 5-21 三齡 BSFL 處理不同油品(A)柴油(B)燃料油劑量，土壤中 TPH 殘留劑量 (SFS 螢光特徵波峰強度).....	48
圖 5-22 (A)背景土樣及(B)米糠 (C) 2,000 mg/kg 柴油標準品(D) 2,000 mg/kg 燃料油標準品中低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 分析圖譜 .....	50



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

- 圖 5-23 (A)對照組(B)含 2,000 mg/kg 柴油土樣(C) 含 2,000 mg/kg 燃料油土樣中  
低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 分析圖譜；經 BSFL 處理(1)7 天(2)21 天 ... 52
- 圖 5-24 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理後，土壤中低碳數圖譜積分  
面積及對應殘留劑量之變動 ..... 53
- 圖 5-25 (A)背景土樣及(B)10%稀釋米糠 (C) 2,000 mg/kg 柴油標準品(D) 2,000  
mg/kg 燃料油標準品中高碳數(C10 ~ C50)TPH 之 GC/FID 分析圖譜 ..... 54
- 圖 5-26 (A)對照組(B)含 2,000 mg/kg 柴油土樣(C) 含 2,000 mg/kg 燃料油土樣中高  
碳數(C10 ~ C50)TPH 之 GC/FID 分析圖譜 (1) 經 BSFL 處理 7 天 (2)經 BSFL  
處理 28 天 ..... 55
- 圖 5-27 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理後，土壤中高碳數圖譜積分  
面積及對應殘留劑量之變動 ..... 56
- 圖 5-28 BSFL 蟲體內低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 圖譜(A)對照組(B)柴油(C)燃  
料油(21 天)..... 57
- 圖 5-29 BSFL 蟲體內高碳數(C10~C50)TPH 之 GC/FID 圖譜(A)對照組(B) 2,000  
mg/kg 柴油(C) 2,000 mg/kg 燃料油(21 天)..... 59
- 圖 5-30 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身低碳數  
TPH 之變動..... 60
- 圖 5-31 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身高碳數  
TPH 劑量之變動 ..... 60
- 圖 5-32 BSFL 對土壤油品添加劑量(A)低碳數(B)高碳數之 TPH 移除率 ..... 62
- 圖 5-33 BSFL 本身體內(A)低碳數(B)高碳數 TPH 之轉換速率 ..... 62
- 圖 5-34 BSFL 處理受(A)柴油(B)燃料油污染土壤(28 天)後，土壤中(1)pH(2)導電度  
之變化 ..... 64
- 圖 5-35 BSFL 處理受不同(A)柴油(B)燃料油劑量污染土壤 28 天，土壤中有機質含  
量之變化 ..... 65
- 圖 5-36 BSFL 處理受不同(A)柴油(B)燃料油劑量污染土壤 28 天，土壤中(1)有效性  
磷(2)有效性鉀含量..... 67



- 圖 5-37 BSFL 處理受(A)柴油(B)燃料油污染土壤(28 天)後，土壤萃取液對(1)小麥 (2)玉米(3)水稻 發芽率之影響(N=25) ..... 69
- 圖 5-38 BSFL 處理受油品污染土壤(28 天)之萃取液對小麥生長 7 天(A)全株長(B) 根長 之變化 ..... 70
- 圖 5-39 三齡 BSFL 對照組樣本之(A)BIX (B)HIX (C)Amino/Humic 之變化..... 71
- 圖 5-40 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油於(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 BIX 變化 .... 72
- 圖 5-41 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油劑量(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 HIX 變化 .... 73
- 圖 5-42 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油於(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 Amino/Humic 比值之變化 ..... 74
- 圖 5-43 3 以 1.2% Agarose 進行電泳檢測(A)土壤 (B)BSFL 腸道菌 樣本染色體 DNA 品質。A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油/kg;A-03:10,000 mg 柴油 /kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg；A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組； B-02:2,000 mg/kg 柴油；B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg 燃料油 ..... 75
- 圖 5-44 圖以 2% Agarose 進行電泳檢測(A)土壤 (B)BSFL 腸道菌 樣本染色體 DNA 品質。A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油 /kg;A-03:10,000 mg 柴油 /kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg；A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組； B-02:2,000 mg/kg 柴油；B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg 燃料油 ..... 76
- 圖 5-45 圖以 2% Agarose 進行電泳檢測割膠回收檢測(A)土壤(B)腸道菌 樣本之 PCR 產物。A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油/kg;A-03:10,000 mg 柴油 /kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg；A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組； B-02:2,000 mg/kg 柴油；B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

燃料油 .....	77
圖 5-46 不同土壤樣本菌種分類比例柱狀圖 .....	78
圖 5-47 不同 BSFL 腸道菌相分類比例柱狀圖 .....	80
圖 5-48 BSFL 腸道菌於 1/2 營養培養基 25°C 培養 3 天生長狀況。(A)柴油 2,000 mg/kg (B)柴油 6,000 mg/kg (C) 柴油 10,000 mg/kg (D)燃料油 2,000 mg/kg (E) 燃料油 6,000 mg/kg (F)燃料油 10,000 mg/kg .....	83
圖 5-49 利用 QIIME 中的 Sorensen dice index analysis 統計方法進行(A)土壤 (B)BSFL 腸道菌相樣本相似度比對(色塊顏色越黑 代表相似越高,越紅代表相似度越低) .....	84
圖 5-50 BSFL 腸道菌於含柴油(A、B、C)或燃料油(D、E、F) 10,000 mg/kg 的 1/5 營養培養基, 25°C 培養 14 天生長狀況。(A)柴油 2,000 mg/kg 所篩選菌株 (B) 柴油 6,000 mg/kg 所篩選菌株 (C)柴油 10,000 mg/kg 所篩選菌株 (D)燃料油 2,000 mg/kg 所篩選菌株 (E)燃料油 6,000 mg/kg 所篩選菌株 (E)燃料油 10,000 mg/kg 所篩選菌株 .....	85



## 表次

表 4-1 全譜螢光掃描 (EEFM)之操作參數設定值.....	23
表 4-2 本研究計畫原規劃工作之甘特圖 .....	28
表 5-1 BSFL 於土壤對照組、柴油或燃料油添加 2,000 及 10,000 mg/kg 經處理 21 天後，土壤樣品菌相豐富度排名前 20 名之比較.....	79
表 5-2 BSFL 腸道對照組、柴油或燃料油添加 2,000、6000 及 10,000 mg/kg 經處理 21 天後，腸道樣品菌相豐富度排名前 20 名之比較.....	81



## 第一章 前言

總石油碳氫化合物(Total petroleum hydrocarbons, TPHs)洩漏造成之土壤污染一直為土壤污染場址棘手問題。用於處理土壤中 TPH 污染物的方法包括各種物理、化學和生物方法，例如高級氧化過程(AOP) (Chen *et al.*, 2019)、土壤蒸氣萃取(SVE) (Yu *et al.*, 2014)、熱脫附(J. Liu *et al.*, 2019)、生物修復(Rabodonirina *et al.*, 2019; Subashchandrabose *et al.*, 2019)和植物修復(Sivaram *et al.*, 2019)。但各方法均有其優缺，並限制其在現場的應用。現有方法的缺點包括(1) AOP 的非選擇性過程和二次污染；(2) SVE 僅適用於高揮發性化合物；(3)熱脫附的能量需求高；及(4)植物修復效率低限制應用於實場的吸引力。現地生物修復被認為是成本最低、最安全的方法之一，對現場作業的干擾最小。在生物強化(bioaugmentation)過程中使用增強的本地微生物可以降低污染場地所造成的風險。與其他技術相比，生物修復還提供更快的處理時間。生物修復對大多數受污染的介質有效，如地下水、廢水和固體、含油污泥。

目前常見常用工法分為開挖移除、熱處理、安定化、土壤淋洗等，雖然前述工法可有效將污染物移除或阻絕污染與人類接觸，但施作過程中碳足跡累積已不符合現今對於綠色整治技術之期待。關於石油碳氫化合物(TPHs)之生物整治技術，常見使用蚯蚓堆肥或 TPHs 分解菌，並添加活性污泥和堆肥能夠增加土壤微生物群落的數量，仍需長期時間作用後才可提高 TPHs 降解效率，整治時間較其他工法長。利用黑水虻幼蟲進行處理生物可分解之廢棄物，為一種新興的廢物處理技術。相關研究亦指出黑水虻幼蟲在 2-3 週內對多環芳香烴碳氫化合物(poly aromatic hydrocarbon, PAHs)之去除能力落於 34.1 ~ 84.2%，且低濃度 PAHs 的去除率大於高濃度，提供黑水虻幼蟲在 PAHs 減量應用上的可行性。

研究團隊近年有能力自行培育黑水虻(Black soldier fly, BSF)，並應用於各類有機物廢棄物之減量控制，除曾使用黑水虻 3 齡幼蟲(Larvae)及 1 ~ 2 齡幼蟲分別針對豬糞原物料進行減量試驗，發現不同齡幼蟲會影響豬糞原物料之處理量，且生長速率也不相同。另黑水虻幼蟲應用於不同農產加工廢料與廚餘混合比例，發現高廚餘量含量百分比之混合物料，黑水虻利用物料速率高於低廚餘量含量百分比之混合物料，此現象與產生虻肥速率相同，但在物料轉換幼蟲重速率則相反，顯然物料成份之差異會影響蟲體生長速率及虻糞產生量。另針對現有工法，TPH 污染土壤加強式生物整治一般以土耕法搭配基質營養鹽補充碳氮磷方式進行處理，惟翻土需機具進行，整治過程碳足跡過高，朝向黑水虻幼蟲及蟲糞菌相之扮演角色-屬綠色土壤整治技術(Green Soil remediation, GSR)新技術展，此創新性技術具複合式功能的生物整治工法，似乎符合綠色整治期待之工法，值得政府公部門投入更多資源進行更詳實的基礎研究。



## 第二章 研究目的

石油碳氫化合物(Total petroleum hydrocarbons, TPHs)洩漏造成之土壤污染一直為土壤污染場址棘手問題，目前常見常用工法分為開挖移除、熱處理、安定化、土壤淋洗等，雖然前述工法可有效將污染物移除或阻絕污染與人類接觸，但施作過程中碳足跡累積已不符合現今對於綠色整治技術之期待。關於 TPHs 之生物整治技術，常見使用蚯蚓堆肥或 TPHs 分解菌，並添加活性污泥和堆肥能夠增加土壤微生物群落的數量，仍需長期時間作用後才可提高 TPHs 降解效率，整治時間較其他工法長。本研究以 3 齡 BSFL 進行 TPH 劑量控制在 2,000-10,000 mg/kg 受污染土壤，進行 21 天之實驗，完成如下研究目的：

- (1) 蟲體耐受性評估。
- (2) 減量能力評估。
- (3) 蟲體安全性評估。
- (4) 減污土壤肥力測試
- (5) 菌種鑑定，尋找優勢菌種，進行純化放大培育。



## 第三章 文獻探討

### 3.1 TPH 生物整治技術

用於處理土壤中 TPH 污染物的方法包括各種物理、化學和生物方法，例如高級氧化過程 (AOP) (Chen *et al.*, 2019)、土壤蒸氣萃取(SVE) (Yu *et al.*, 2014)、熱脫附(J. Liu *et al.*, 2019)、生物修復(Rabodonirina *et al.*, 2019; Subashchandrabose *et al.*, 2019)和植物修復(Sivaram *et al.*, 2019)。但各方法均有其優缺，並限制其在現場的應用。現有方法的缺點包括(1) AOP 的非選擇性過程和二次污染；(2) SVE 僅適用於高揮發性化合物；(3)熱脫附的能量需求高；及(4)植物修復效率低限制應用於實場的吸引力。現地生物修復被認為是成本最低、最安全的方法之一，對現場作業的干擾最小。在生物強化(bioaugmentation)過程中使用增強的本地微生物可以降低污染場地所造成的風險。與其他技術相比，生物修復還提供更快的處理時間。生物修復對大多數受污染的介質有效，如地下水、廢水和固體、含油污泥。

#### 3.1.1 環境因子對微生物之影響

由於微生物在代謝各類污染物時，其分解能力受如下環境因子影響(Troquet *et al.*, 2003)，並說明如下：

##### (1) 溫度

溫度會改變污染物的物理與化學組成，由其以油品污染最盛，低溫時油品黏稠度增加，使生物降解降低。Antizar-Ladislao *et al.*(2007)指出生物降解主要與生物酵素有關，溫度在 30~40°C 可使碳氫化合物代謝速率達到最高點。Palanisamy *et al.* (2014) 評估生物降解柴油發生最佳溫度在 35°C，反之低溫則造成微生物合成 ATP 減少，降低分解速度(Takamatsu *et al.*, 1996)。

##### (2) 土壤濕度

土壤中的濕度也是影響微生物的中要因素之一，土壤含水率過低，易造成土壤中微生物活性受抑制，相反，若含水率過高，容易造成土壤毛系孔隙占據，阻礙氧氣的交換供應。當土壤中含水率達 15~20%時，對 TPH 分解能力效果最好(Leahy and Colwell, 1990)。土壤含水率應處於最佳範圍。低含水量會降低微生物的活性，然而過量的水會對氧氣轉移產生阻力，也可能產生無法被利用的滲濾液(Schjønning *et al.*, 2011)。

##### (3) 氧氣

研究指出分解 1 g 石油需 3 ~ 4 g 的氧氣，土壤中的含氧量也是影響降解效率的因素



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

(Joseph, 1990)。Von Wedel *et al.*(1988)證實在厭氧狀態下分解烴類效率很低，在有氧狀態時 14 天可分解 20%，厭氧狀態時 223 天不到 5%。

#### (4) pH

根據微生物不同，其適應 pH 範圍亦有所不同，正常而言，微生物分解最佳之 pH 範圍為(5.5~8.5)。有研究指出 pH 在 5.0~7.8 時，土壤油污染的礦化情形佳，其中最適宜的為 7.8 (Boszczyk-Maleszak *et al.*, 2006)。而當 pH 小於 5 時，微生物呼吸作用會受到抑制，降低分解效率(Young and Cerniglia, 1995)。

#### (5) 營養物質

土壤中的營養物質包羅萬象，但必須維持一定比例才能讓微生物生長。遭受油品污染之土壤，通常含碳量很高，其 N、P 相對降低，而 N、P 也是微生物生長條件之一，故在遭受油品污染土壤中添加 N、P，可促進生物分解，但也不是添加越多其分解能力也相對增加。Sarkar *et al.*(2005)指出土壤中的營養物如(N、K、P)濃度過高，對 TPH 降解能力會變小。

#### (6) 土壤質地

土壤類型和質地會影響生物修復。粘土等細粒土壤滲透性低，會延緩土壤中的氧氣和養分運輸。由於細粒土壤的孔隙小和表面積大，很難控制細粒土壤中的水分含量(Balba *et al.*, 1998)。粘土還可以催化腐植酸的形成，並保護有機材料在聚集體中不分解(Stott & Martin, 1990)。因此，粘土的生物修復是一項具有挑戰性的任務。土壤顆粒的外部面積與總表面積的比率也是一個重要因素，因為只有外表面才能被微生物接觸(Kwok & Loh, 2003) *Acinetobacter* SZ-1 strain KF453955S 菌株的經六周培育後可降解 34% 的 TPH (Wu *et al.*, 2016)。Wu *et al.* (2017)使用 TPH 降解聯合菌株體(*Pseudomonas stutzeri* GQe4 strain KF453954, *Pseudomonas* SZe2 strain KF453956, 及 *Bacillus* SQe2 strain KF453961)可增強 58% 的 TPH 降解。

#### (7) 其他因素

土壤中 TPH 濃度過高會抑制微生物成長，但石油是天然有機物質，可被微生物當成碳源利用，只是利用方式及難易度隨著微生物有所不同。通常土壤中微生物會先選擇分解含苯數較低的 PAH，其次再分解較難的 PAH (Bastiaens *et al.*, 1998)。Tiehm *et al.*(1997)及 McNally *et al.*(1999)均指出 *Mycobacterium* 的濃度會增進芘的分解，對芴反而產生拮抗反應。

### 3.1.2 小型模型研究

研究指出利用生物堆肥試驗對受石油碳氫化合物(TPHs)之移除能力之探討探討，發現未添加任何改良劑的土壤及添加無機營養源刺激生物成長之兩種試程，經實驗 195 天後，未添加改良劑之樣本去除量為 10 ~ 32 %，添加無機營養源樣本去除量達 49%，證明生物修復法與是否添加營養鹽相關(Elise A. Asquith *et al.*, 2012)。Wang *et al.*(2016)研究添加不同添加劑(營養源、石油精煉廢水處理設施之活性污泥、堆肥、TPHs 分解細菌和蕨類)進行石油碳氫化合物



(TPHs)的去除效果，結果顯示，添加活性污泥和堆肥能夠增加土壤微生物群落的數量，可提高 TPHs 降解效率(在 175 天的培養期內，TPH 去除率高達 83%，初始 TPHs 為 4100 mg/kg)。添加活性污泥(土壤質量比為 50:1)之樣本，TPHs 的一階降解速率達到 0.011/d，土壤中檢測到 34 種特定的 TPH 分解細菌，結果顯示若增加微生物群落或 TPHs 分解細菌、生物可降解之碳源、營養源濃度及土壤透水性，可增加 TPHs 去除能力。

針對機械停車場受污染土壤中總石油烴 (TPHs) 使用生物修復及有機改良劑進行驗證受不同碳氫化合物、礦物油和重金屬污染的土壤的修復結果，發現添加蚯蚓堆肥使可利用磷 (P) 和可交換鉀 (K) 的量分別增加了 5 倍和 2 倍，由於土壤酸化，微生物活性增加，這影響 P 和其他微量營養素的溶解度，添加蚯蚓堆肥後，TPHs 的降解效率分別達到初始碳氫化合物水平的 32.5% 和 34.4%，土壤中多環芳香烴(PAHs)濃度降低，均呈現減少之趨勢(Curiel-Alegre *et al.*, 2022)。

土壤污染中總石油碳氫化合物(TPH)的生物復育方法，易受到污染各場址的氣候如降雨量、降雨天數、氣溫及相對濕度與土壤性質等影響(Kuppusamy *et al.*, 2017)。國內相關的研究中也顯示可能因污染組成物的差異性，長期的污染土壤經自然衰減後讓生物可降解性變得較低些(高俊璿, 2007)。有些實驗室利用通氣與堆肥法，活化土壤中嗜熱菌噬油菌來提高總石油碳氫化合物的降解(陸家偉, 2023)。醒吾科大周錦東教授研究團隊有多株對重油或柴油分解具分解潛力菌株曾成功運用於實地整治，包含 *Enterobacter pyrinus* (腸桿菌)、*Pseudomonas stutzeri*(施氏假單胞菌)、*Klebsiella pneumonia* (克雷伯氏肺炎菌)、*Morganella morganii* (摩氏摩根菌)、*Stenotrophomonas maltophilia*(嗜麥芽窄食單胞菌)與 *Bacillus thio-parans*(芽孢桿菌屬)。台大施養信教授團隊於【用可快速高效降解高碳數油污染之微生物菌群於促進土壤整治】計畫中使用具有分解柴油的兩株菌株，添加一些農業廢棄資材及提供充足氧氣的環境之下，可以促進土壤微生物菌群快速降解土壤中的柴油污染，快速降低土壤中 TPH 含量，此種生物復育方法為現地污染土壤整治低成本高效益的方法。宜蘭大學劉鎮宗教授團隊則是以酒廠污泥所篩選的菌種，利用生物土堆法模擬柴油污染場的降解過程，發現混合菌株的柴油降解率較單一菌株略高一些。朝陽科大程淑芬教授團隊以環境友善的綠色整治技術為題，試驗模場土壤採自台灣中部某油庫污染場址，土堆法中利用原生菌或威尼斯不動桿菌(*Acinetobacter venetianus*)其土壤 TPH 降解率大約 50 % 及 70 %，若再加上培地茅(*Vetiveria zizanioides* L.)的植生復育，對 TPH 的去除效率可增加 18.1%~29 %，其團隊發現種植培地茅有助於穩定土壤 pH 及導電度，並可增加場址的景觀綠化效果。



### 3.1.3 國內外現地整治案例

國內較有名的例子為高雄港旁之苓雅寮輸油站面積約 10 公頃土地，於 94 年 9 月 12 日被公告為污染場址，其整治計畫係由任中油煉製研究所環境及生化科技組負責，其利用生物堆土法作為主要的復育方法，有分現場與離場兩種處理，其土壤先經大型機械篩選其粒徑小於 2 公分，再添加中油自行研發微生物製劑，而整體處理費用預估需 4-5 億餘元，因其土地位於都市重劃區內，高雄市政府又限時整治完成，所以中油公司採用多種物理與生物復育程序加速污染場址之整治(陳等人,2011)。國際上生物堆土法近年來廣泛應用在 TPH 污染的土壤上，甚至科學家在南極大陸利用生物堆土法中的微生物分解柴油與煤油的污染土壤，經過一年的復育後 TPH 濃度僅為原來的 25% (Whelan *et al.*, 2016)，在南極所施作的例子中並無添加外源性微生物，也無法離場施作，微生物分解 TPH 主要在夏季效果較佳。利用生物復育整治石油污染土地的過程中，微生物的菌相會不斷的變

化，到目前科學家還常以變性梯明膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法，偵測石油污染之土地中微生物菌相的變化(de Jesus *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013)，但此方法僅能看出微生物菌相有變化，但無法得知是那些菌群發生變化，近年來隨著次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)的普及，學者們也開始利用 NGS 的技術來偵測石油污染土地中菌群的變化，其以焦磷酸定序(Pyrosequencing)法對短到中等長度的 DNA 序列樣品進行高通量、高精確度的定序，其作法係利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)放大 16S rDNA 其中一小段 300 多個鹼基的變異區，再將 PCR 的產物經由 NGS 定序儀定出大量 DNA 序列資訊，接著透過演算軟體的拼接與計算後可得知採樣時間點樣品的菌種種類，其可較 DGGE 方法得到更明確菌相變化之資訊，有利於了解微生物菌相在降解 TPH 污染土地的變化，可作為生物復育效率的監測策略之一(Liang *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2015; Peng and Wang., 2015)。

### 3.1.4 土壤復育常見之微生物

TPH 污染土壤生物復育時常見微生物有真菌、細菌與古細菌，2015 年 Rodrigues 等人的研究中發現在油污表面主要的菌群為細菌，這些菌群具有分解油污的能力。具有 TPH 分解能力的菌株非常多，不同地方的污染樣品，所篩選出來的細菌種類各不相同，台灣收集最多這類菌株的為中油公司，這類菌株包含了鏈球菌屬 (*Staphylococcus sp.*)、多種假單孢菌屬 (*Pseudomonas sp.*)、多種桿菌屬 (*Bacillus sp.*)、腸球菌屬 (*Enterobacter sp.*)、*Ochrobacterium sp.*等，包含了煤油利用菌、柴油利用菌、燃油分解菌、生物界面活性菌生產菌、多環芳碳氫化合物分解菌等(林等人, 2003)。

Sun 等人在 2015 年的研究指出，不同油田的污染土壤所採集分析的微生物多樣性有顯著的不同，顯示微生物會因所在地的土壤、溫度、養分的關係呈現不同的演化，雖主要分解 TPH 菌群以細菌為主，但有科學家自厄瓜多爾亞馬遜雨林的石油污染的土壤樣本中，除篩出



具有強分解 TPH 能力桿菌屬菌株外，也篩到具有很強分解石油的真菌 *Geomyces sp.* (Maddela *et al.*, 2015)。Wu *et al.* (2013) 的研究中從 3 個不同的 PAHs 污染土壤中，篩選了具有分解這些污染的菌株，菌株培養過程中若加入原本生長地的土壤，其分解 PAHs 效果較加入它地的土壤來的有效率，這個研究顯示若是使用外源性的微生物分解 PAHs 的效果可能會比較差，要有讓分解 PAHs 效果較佳的話，應該要使用同一污染土壤所篩選的菌株。

### 3.2 黑水虻之特性

影響黑水虻各階段生長之因素包括溫度、濕度、陽光、水分含量、pH 值等，屬耐寒耐溫之物種，存活溫度落在 15~47 °C，適應不同種氣候，各階段生命週期繪製如圖 3-1。文獻指出幼蟲卵孵化期，蟲卵在高溫下孵化率高於低溫，幼蟲的發育在不同溫度和不同飼養基質之間均存在顯著差異，溫度影響黑水虻成蟲壽命之長短(Chia *et al.*, 2018)；在糧食供應不足和低溫條件下，黑水虻可通過延長幼蟲階段(大約 4 個月)來實現靈活的生命週期，這種現象出現於幼蟲食物短缺期間用以維持幼蟲群體的可行性，而卵的產量和幼蟲的發育受食物的量所影響 (Song *et al.*, 2021)。在一般狀況下蟲卵孵化時間約 3-7 天，1~6 齡幼蟲所需時間為 20~30 天，受餵食食物所影響，蛹則約 10 天羽化為成蟲，此階段與氣候條件相關，成蟲壽命約 7~9 天。

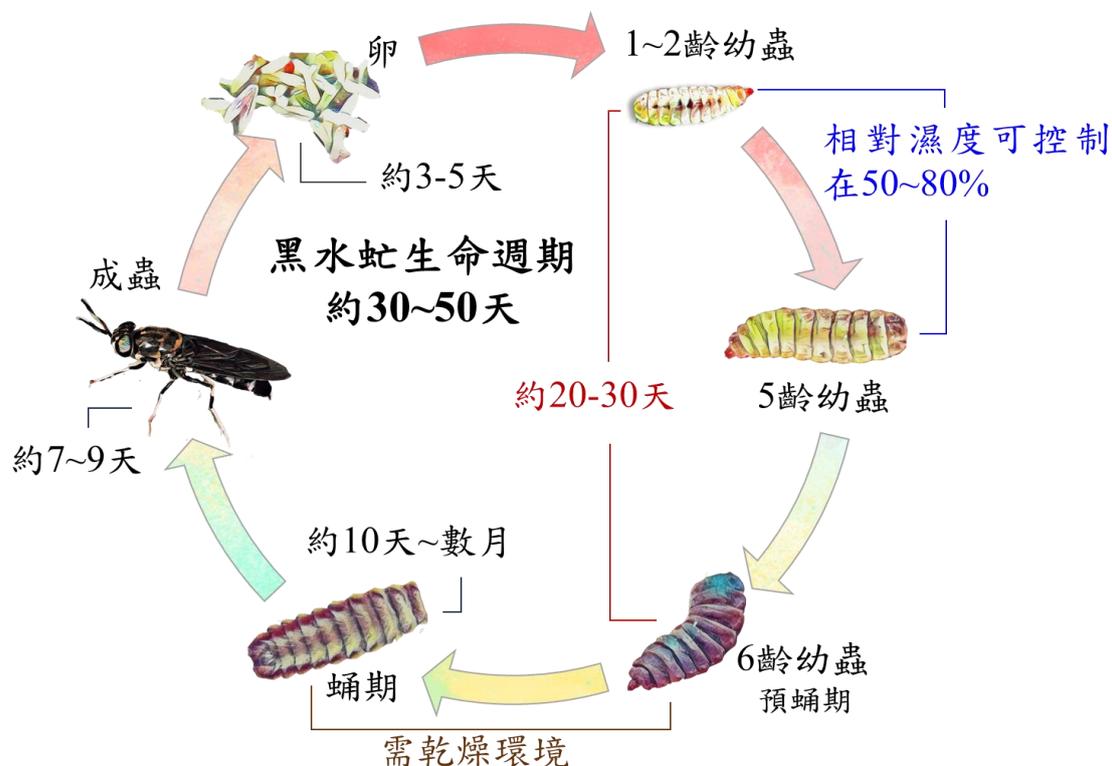


圖 3-1 黑水虻之生命週期(自行繪製)



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

利用黑水虻幼蟲(Black soldier fly larvae, BSFL)進行處理生物可分解之廢棄物，為一種新興的廢物處理技術，此技術的可擴展性取決於高性能處理的生物廢棄物的可用性(例如，有機物轉化為蛋白質和脂肪)。此方法與其他廢物處理技術(如堆肥或厭氧消化)相比，過程的性能尚未成熟，並且針對有機廢棄物營養素分解、微生物及化學轉化的過程瞭解不足。圖 3-2 為幼蟲中腸對於營養物質的感知、分解和吸收及生物反應器中的生物酶和微生物分解營養之方式(Gold *et al.*, 2018)，在瞭解此生物特性後，有望提高處理性能。

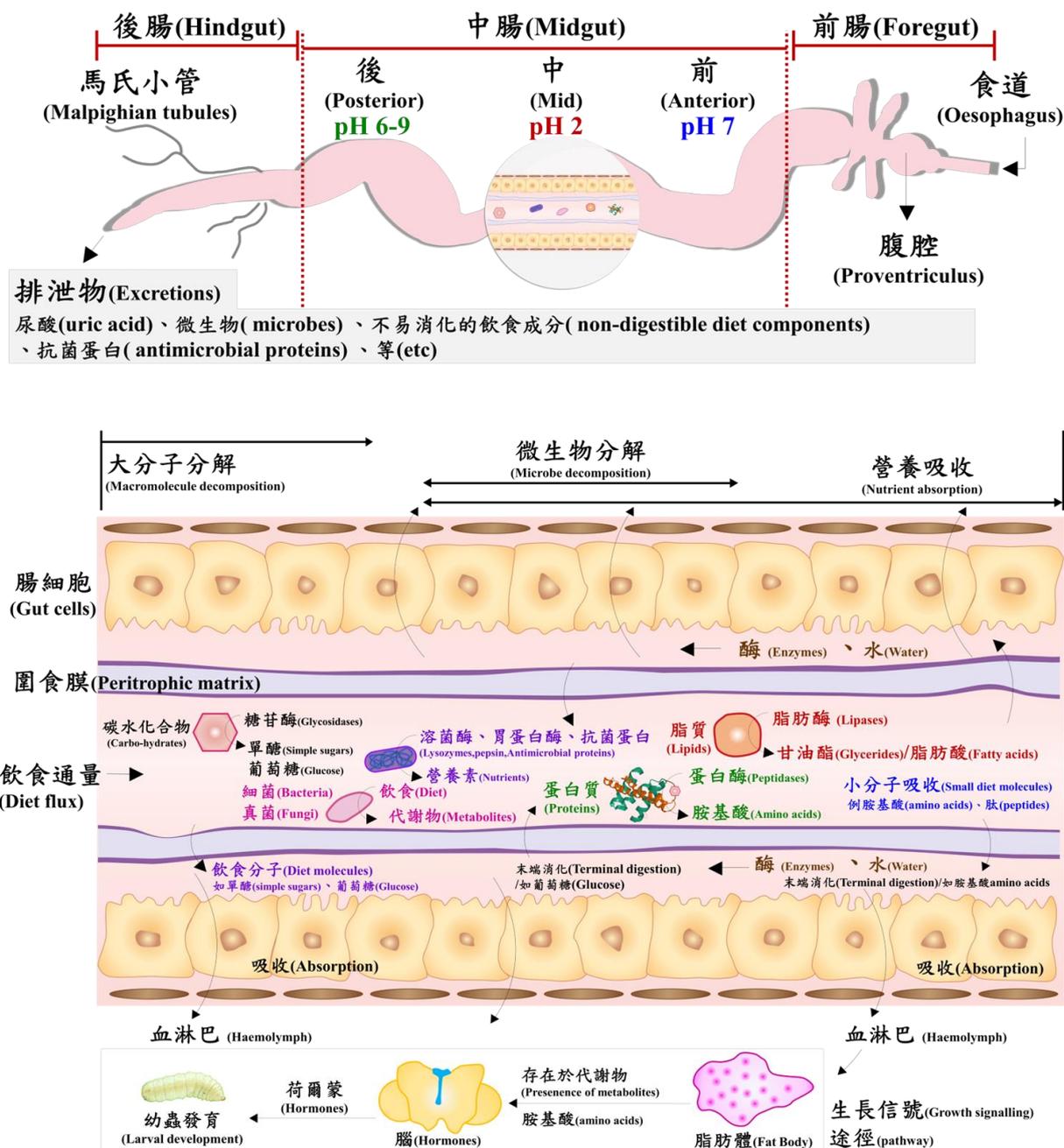


圖 3-2 幼蟲的中腸特點、功能及對營養感知、分解和吸收及生物體內的大分子營養物質之酶解及微生物分解(Gold *et al.*, 2018)



木質纖維素為生活可生物降解廢物(domestic biodegradable waste, DBW))的重要成分，其複雜結構特性為生物處理上的障礙。因 BSFL 腸內微生物具有有效降解木質纖維素能力(Lee *et al.*, 2014)，BSFL 在 14 天內對木質纖維素的降解研究顯示，幼蟲組(larvae intestines, LI)處理組的木質纖維素生物降解率達 26.5%，高於自然堆肥組(natural composting, NC) 4.06%。為瞭解微生物群落，研究者針對幼蟲腸道(Larvae intestines, LI)、LT 和 NC 進行基因體序列分析，發現 LT 和 LI 中的木質纖維素降解細菌和碳水化合物活性酵素(Carbohydrate-Active Enzymes, CAZymes)基因的相對豐度均高於 NC，而 LI 中纖維素酶和半纖維素酶基因分別比 LT 高 3.36 及 2.79 倍，而 LT 中的木質素酶基因比 LI 中的高 1.82 倍，且 Enterocloster 和 Luteimonas 分別為幼蟲腸道和殘渣中的關鍵微生物種，與木質纖維素降解細菌有協同關係。通過幼蟲腸道中之功能性細菌的機制促進 DBW 中的木質纖維素降解，提高 BSFL 生物技術和資源再生的效率(Xiang *et al.*, 2023)。

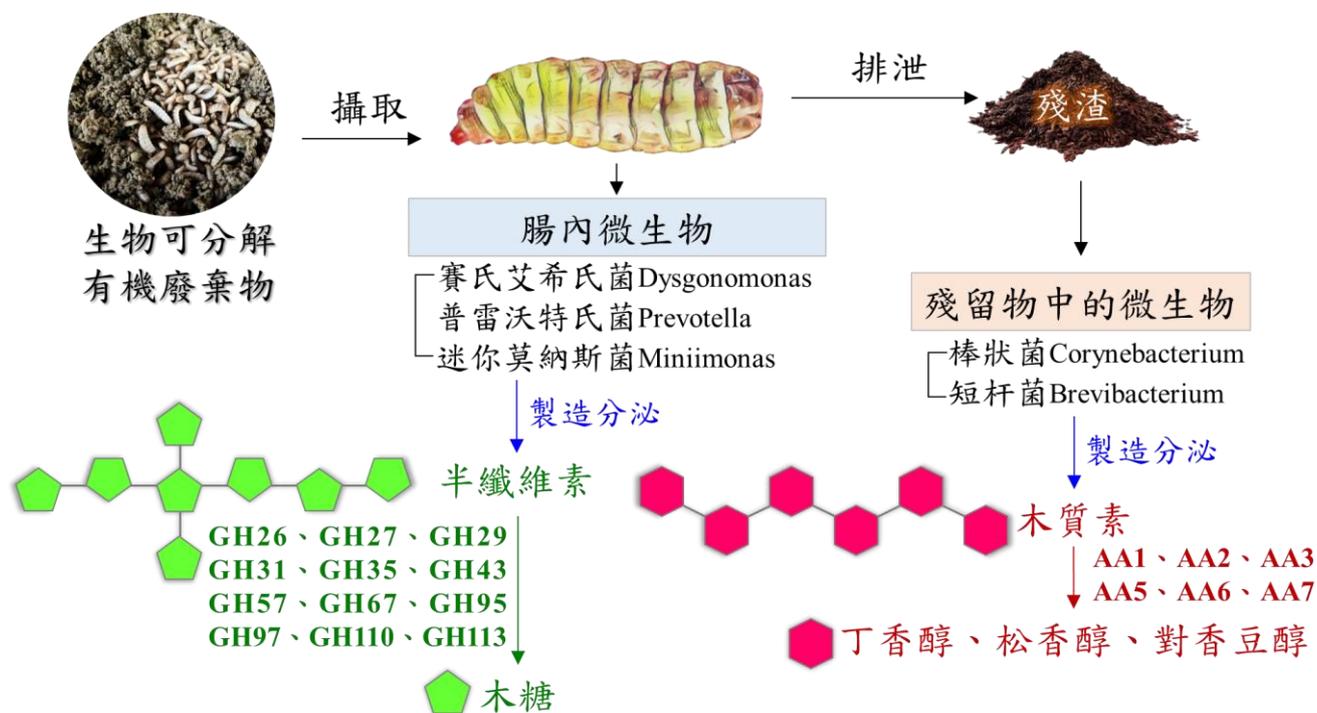


圖 3-3 黑水虻蟲體之優勢菌種及殘留物中之優勢菌種(Xiang *et al.*, 2023)

### 3.3 黑水虻的培育

#### 3.3.1 環境因子

BSFL 廣泛分佈於世界各地，意謂它們可以韌性生存於不同的環境條件;然而 BSFL 生命週期各階段培養確實存在最適條件，飼養 BSF 的最佳溫度和相對濕度分別為 26-27 °C 和 60 °C



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

和 60°C(K. B. Barragan-Fonseca *et al.*, 2017)；基材的最佳含水率為 52-70%，與相對濕度相似，最佳光照強度為 135-200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  (Shumo *et al.*, 2019)，這種飼養條件，考慮到包括東南亞國家在內的許多亞洲國家都存在高溫和高濕度的地區，實施與 BSF 養植相關的行業具有很高的潛力。

在有機廢物的處理過程中，可以通過分析幼蟲發育的各個方面來監測 BSFL 的生長。依相關研究指出幼蟲發育時間、最終幼蟲體重、生長速率和幼蟲存活率分別為 15-36.7 d、154-271 mg、2.3-37 mg/d 和 85.6-97.1% (Julita *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2018; Pastor *et al.*, 2015)。BSFL 的生長可能因基質類型和飼養條件而異。例如，當用食物垃圾、水果和蔬菜以及家禽飼料餵養時，BSFL 的存活率分別為 87%、90%和 93%。然而，當用消化污泥餵養時，存活率則降至至 39% (Lalander *et al.*, 2019)。

在溫帶國家，BSF 在冬季活動能力弱，需在室內進行人工飼養(Zhang *et al.*, 2010)。在實驗室條件下，BSF 幼蟲具有六個幼蟲齡，包括前蛹，在 30°C 下兩周內達到前蛹階段(Furman *et al.*, 1959)。蛹前離開食物基質化蛹(Sheppard *et al.*, 1994)。成蟲在 27-30°C 下 10-14 天後出現(Sheppard *et al.*, 2002)。成年 BSF 不需要食物即可生存，但需提供水(Tomberlin & Sheppard, 2002)和糖(Nakamura *et al.*, 2016)或蜂蜜(Rachmawati *et al.*, 2010)時，它們的壽命會延長。兩天的成蟲交配，雌性在交配後兩天產卵(Tomberlin & Sheppard, 2002)，雌性傾向於在食物來源附近的縫隙中產卵，卵在 27°C 下四天後孵化(Booth & Sheppard, 1984)。

如前所述，BSF 的生命週期特徵，如存活率和發育時間，是由多種因素決定的，如溫度(Holmes *et al.*, 2016)、相對濕度(Holmes *et al.*, 2012)、食物供應(Diener *et al.*, 2009)和食物成分(Gobbi *et al.*, 2013)等。BSF 的廣泛地理分佈表明其對各種非生物條件的耐受性，但是，很明顯，這些條件存在最佳值，可大幅提昇 BSF 性能。

### 3.3.2 進料特性

食是影響 BSFL 發育的決定性因素，已知幼蟲期的營養會影響成蟲發育。食物質量會影響 BSF 的幼蟲大小、存活率、成蟲大小和繁殖力(Gobbi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013)。因此，基質的預處理是 BSFL 栽培的關鍵，例如，食品加工，包括熱處理和壓碎，會改變基質的結構，使 BSFL 改善對廢棄食物的消化(Pastor *et al.*, 2015)；BSF 的生長也受基質含水率的較大影響(Cheng *et al.*, 2017)，過多的水分會降低基質的降解速率(Diener *et al.*, 2011)。一些研究完成基質中鹽類濃度對 BSFL 發育的影響，將含氯化鈉廚餘垃圾餵食 BSFL 時，幼蟲的生長發育和基質分解速率低於餵食不含氯化鈉的廚餘，此與氯化鈉抑制幼蟲的生長相關(Cho *et al.*, 2020)，Kwon & Kim (2016)證實基質含 3%的氯化鈉會抑制 BSFL 的生長。

幼蟲的食物品質是非攝食性成蟲階段的植食性昆蟲適應性的決定因素(Moreau *et al.*, 2006)，這也適用於在幼蟲階段儲存大部分營養物質的 BSF。BSF 幼蟲更喜歡食用脂肪含量高的飲食，以建立完成發育所需的脂肪體(Nguyen *et al.*, 2015; Tomberlin & Sheppard, 2002)，此



意謂食物品質是影響 BSF 生長率的重要因素，且與存活率和幼蟲長度呈正相關的原因(Gobbi *et al.*, 2013; Newton *et al.*, 2005b)。再者，BSF 幼蟲的體重增加，與依賴其生長之細菌分解食物能力相關(Liu *et al.*, 2008)。Yu *et al.* (2011) 從 BSF 幼蟲腸道中分離出的枯草芽孢桿菌通過發酵食物促進 BSF 幼蟲的生長和發育。相關研究文獻亦證實枯草芽孢桿菌具有消化蛋白質和提供有機磷的能力(Supriyatna & Ukit, 2016; Yi *et al.*, 2010)。Zheng *et al.* (2013) 對 BSF 幼蟲、蛹前、蛹、成蟲和卵樣品中取得 78 屬細菌進行分類，擬桿菌門(*Bacteroidetes*) 42.0 %和變形菌門 *Proteobacteria* 33.4 %，是所有生命階段與 BSF 相關的最主要菌種，此證明與 BSF 相關的細菌種類具有高度多樣性。然而，食物品質物可能會影響微生物菌相的組成(Jeon *et al.*, 2011)。

另一方面，基質的物理因子會影響昆蟲進食效能。例如，如果食物基質層太厚，包括肉粉、豬肉、魚或肝臟，此情形會減少幼蟲對食物的攝入量，導致存活率降低和發育時間延長(Gobbi, 2012; Gobbi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013)。Lardé (1989)觀察到 BSF 幼蟲喜歡在更均勻、更緻密和更乾燥的基質上生長，並且已經確定雞飼料中 60-70%的水分足以滿足 BSF 幼蟲的需求。然而，由於有機廢物的成分多變，食物水分難以控制，不僅需要在實驗室中進行評估，另在現場的蒸發速率更需評估。Kalová and Borkovcová (2013)發現，BSF 幼蟲於含水量高 (>90%) 的有機廢物，雖可存活，但處理性能較低。

### 3.3.3 幼蟲聚集

幼蟲擁擠可能會影響發育生長的主要因素，就像其他雙翅目物種所報導的那樣(Baldal *et al.*, 2005; Jirakanjanakit *et al.*, 2007)，然而少有 BSF 幼蟲密度的研究。Pastor *et al.* (2015)使用 BSFL 分解廚餘時，需考慮幼蟲密度，幼蟲間的競爭會改變幼蟲行為，並對幼蟲的存活率產生不利影響；因此，在培養幼蟲時，應根據基質條件控制幼蟲密度，依研究指出用於培養 BSFL 的幼蟲數量與基質克數的最有效比例為 2:1。考慮到不同研究中使用容器的大小(Diener *et al.*, 2009; Gobbi, 2012; Nguyen *et al.*, 2013; Sheppard & Tomberlin, 2002; Tomberlin *et al.*, 2009)，假設基質層厚度約為 1-2 cm，則可以計算出每  $\text{cm}^2$  之平均幼蟲數約 1.4 隻(最小 0.1 隻幼蟲/ $\text{cm}^2$  和最多 3.33 隻幼蟲/ $\text{cm}^2$ )。

Sheppard *et al.* (2002) 建議 BSF 飼養的雞飼料的密度為每  $\text{cm}^2$  表面積 2.5 隻幼蟲，以獲得足夠的生長。Banks *et al.* (2014) 研究相似的幼蟲發育時間(28 - 30 天)，在以不同密度(0.02、0.2 和 0.31 幼蟲/ $\text{cm}^2$ ) 餵食人類糞便的 BSF 幼蟲，它們在最低密度下達到最高的預蛹重量和最低的食物轉換率，密度是雙翅目動物(如 BSF)的重要生物因素，因為幼蟲聚集是這些物種生，幼蟲聚集會產生諸如熱量積聚和糞噬等後果，並導致更詳盡的營養利用，應進行更深入的研究。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

由於生物和非生物因素會影響 BSF 的性能及其營養成份，因此選擇適應特定因素的 BSF 菌株作為飼養特定目標動物。許多因素明顯影響幼蟲階段之生長，但相關之研究仍不足。例如，食物的水分和食物的性質、幼蟲密度和飼食比，只能部分解釋對相近作為 BSF 飼食成分差異原因之思考。

### 3.4 黑水虻在環境領域之應用

在人口、經濟的成長與都市化狀況下，特別是在低收入和中等收入國家，加上極端的天氣模式下，處理大量有機廢棄物之方式上需進行觀念改變。BSFL 為多樣性的有機廢物養殖昆蟲，可生產營養豐富的動物飼料、燃料和有機肥料，呈現廢物再利用之優點，此外，BSF 蛹中存在的生物活性化合物，如抗微生物肽、中鏈脂肪酸以及蟲殼及其衍生物，也可為動物飲食增值 (Surendra *et al.*, 2020)。

BSFL 在家畜糞便處理方面具有巨大潛力，使用豬糞飼養 BSFL 被視為一種新的循環策略，可回收糞便中的氮，減少其對環境的影響，並將其升級為昆蟲蛋白質以供動物飼料使用，研究使用 NH<sub>3</sub> 中的穩定同位素 15N，結果得知有 13 % 豬糞中之 NH<sub>3</sub>-N 可被轉化為 BSFL 之重量，從而減少糞便中 NH<sub>3</sub> 的排放 (Parodi *et al.*, 2022)。研究使用 BSFL 將豬糞便轉化為 BSFL 糞便，轉化後，幼蟲體內 Cu 及 Zn 的累積量不到 10 %，與初始腸道相比，後期 BSFL 腸道中含大量的屎腸球菌屬 (*Enterococcus*)、梭狀芽孢桿菌屬 (*Clostridium sensu stricto* 1)、孢狀芽孢桿菌屬 (*Terrisporobacter*) 和龍邦絲菌屬 (*Romboutsia*)。BSFL 轉化顯著減少 89 % 來自豬糞便的病原體，金屬平衡和抗性的功能基因 (例如 CutC、pcoC、cusR、zurR 和 zntB) 在 BSFL 腸道中明顯增強，增加 2.3 ~ 7.7 倍，解釋了 BSFL 在家畜糞便轉化過程中的金屬耐受能力 (Wu *et al.*, 2021)。

多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 作為廣泛認識的有毒化學物質，在環境中造成公共危害。Fan *et al.* (2020) 進行 BSFL 對 PAHs 耐受度及減量，研究者將四種典型的 PAHs (1.0、10.0 和 100.0 mg/kg)，即萘、芴、菲、芘，分別加入 BSFL 轉換系統中。在添加組和無添加對照組中確定了幼蟲生長、轉換過程及 PAHs 去除的參數。結果顯示，在半數 PAH 組中，幼蟲發育時間為 19.7 ~ 21.0/d，明顯比對照組長 2 ~ 4 天，而多數 PAH 組中的相對生長速率 1.88 ~ 1.99 %/d 較低。多數 PAH 組中，幼蟲死亡率為 0 ~ 2.83 %、收穫產量為 80.20 ~ 85.91 g、轉換率為 14.71 ~ 15.83 % 和羽化率為 60.27 ~ 82.67 %，與對照組無顯著差異。四種 PAHs 可能延遲了 BSFL 的發育時間，減緩幼蟲的生長速度，降低污染物的去除率，此應與 PAHs 對微生物活動的抑制所引起。PAHs 對 BSFL 的死亡率、轉換率、產量和羽化率的影響不大，BSFL 在 18 ~ 21 天內，PAHs 被去除 34.1 ~ 84.2 %。BSFL 在低濃度 PAHs 的去除率高於高濃度，此結果有效地提供 BSFL 處理 PAHs 污染減量上的可行性評估。



## 3.5 黑水虻於亞洲各國之應用

### 3.5.1 中國

在中國，許多關於使用 BSFL 處理食廚的研究，研究 BSFL 處理廚餘過程中碳氮和溫室氣體排放的轉化率，結果證實廚餘的 pH 值是影響處理效能關鍵因素。具體而言，廚餘的 pH 值與 CO<sub>2</sub> 的產生量呈現負相關，但與 NH<sub>3</sub> 呈正相關，其原與 CO<sub>2</sub> 在高 pH 值下轉化為碳酸鹽；高 pH 值，加速有機氮和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 降解為 NH<sub>3</sub>。此外，使用 BSFL 處理廚餘產生的溫室效應氣體（如 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O）濃度低於露天堆肥，且廚餘 pH 值越高，結果越明顯(Pang *et al.*, 2020)。前述研究亦發現使用 BSFL 處理廚餘的過程排放的 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O 量分別為 2.4±0.4 mg/kg 和 1.0±0.4 mg/kg，然在堆肥過程中，CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O 的排放量分別為 1,500 mg/kg 和 1,200 mg/kg；相較與露天堆肥，BSFL 處理廚餘的模式提供的空氣循環減少厭氧菌，如產甲烷菌和反硝化劑，防止了 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O 的產生；另 BSFL 的腸道微生物群落幾乎不產生 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O (Jeon *et al.*, 2011)。

在中國，隨著人口的增加，對牛奶和肉類的需求逐漸增加，導致畜牧業的增加。Liu *et al.* (2019) 評估使用 BSFL 堆肥不同牲畜糞便過程中有機質和 VFA 的轉化率以及糞便土壤性能，發現雞、豬和牛的糞便接種 BSFL，然後堆肥 9 天，減少 20.3-22.2% 有機質和 6.1-14.4% 的氮，VFAs 減少 25.6-80.1%。因此，在中國等發展中國家，使用 BSFL 堆肥是一種有效的方法，因為它可以提高糞便的成熟度和堆肥產品的品質。

### 3.5.2 韓國

在韓國，主要集中在 BSF 的分子生物學和從中提取的物質的抗菌活性，從 BSF 的血淋巴中提取純化 ceropin 胜肽 1 (CLP1) 時，對革蘭氏陰性菌具有抗菌活性(Park & Yoe, 2017a)。在另一項研究中，從 BSF 中分離出類似 defensin (一種由真菌分泌的抗菌胜肽) (Park & Yoe, 2017b)，這些防禦素胜肽 (DLP3 和 DLP4) 對革蘭氏陽性菌具有抗菌活性。Kim *et al.* (2011) 分析黑水虻唾液腺和腸道分泌的消化酶的生化特性，黑水虻腸道提取物具有胰蛋白酶樣蛋白酶活性，亮氨酸芳基醯胺酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶和  $\alpha$ -岩藻糖苷酶的活性高於家蠅腸道提取物；因此，與其他種類的果蠅相比，BSF 介導的有機物（如食物垃圾）分解的改善似乎歸因於其更高的澱粉酶、脂肪酶和蛋白酶活性。Kim *et al.* (2019) 使用熱水和超臨界 CO<sub>2</sub> 萃取測試使用 BSFL 作為飼料所需的脫脂工藝，發現當使用熱水進行 BSFL 脫脂時，BSFL 中的脂肪含量降低到 16%；相反地，當採用超臨界 CO<sub>2</sub> 萃取法時，BSFL 中的脂肪含量降低到 5% 或更低，此意謂超臨界 CO<sub>2</sub> 萃取法適用於 BSFL 脫脂作為飼料之需。



### 3.5.3 馬來西亞

在馬來西亞進行的關於 BSF 的各種研究中，Noor *et al.* (2018) 一項研究使用當地生產的椰子作為 BSFL 生長之基質，並分析醱酵椰子廢料上生長幼蟲的脂質和蛋白質含量，證實在發酵 4 周的椰子廢料上生長的 BSFL 中生長速率最高，脂質含量最高為 48%，相較於未發酵的椰子廢料上生長的 BSFL 的脂質含量最低為 33%；此外，當椰子廢料發酵時間較長時，BSFL 的蛋白質含量增加。Mohd-Noor *et al.* (2018) 則嘗試通過用椰子胚乳廢料和豆腐的混合物餵養幼蟲增加 BSFL 的脂質和蛋白質含量，當以 3:2 的比例作為進料基質，發現 BSFL 的脂質含量最高(58%)，蛋白質含量為 21%。

馬來西亞一些研究者，使用 BSFL 生產生物柴油的方法，從在廚餘生長的 20 天齡 BSFL 中提取脂質，並成功轉化為生物柴油，還確定使用 BSFL 生產生物柴油的潛力，BSFL 的脂質含量為 32%，酯化時含有 84% 的 FAME (Ishak & Kamari, 2019; Wong *et al.*, 2018)。因此，使用 BSFL 生產生物柴油可緩解馬來西亞糧食短缺的有效策略，因為 BSFL 的 FAME 含量與從椰子油或棕櫚油等植物中提取的 FAME 含量相似。

### 3.5.4 印尼

印尼產生的廢物總量中約有 60% 是有機廢物，蔬菜和水果是具有代表性的有機廢物，BSFL 的低成活率歸因於蔬菜和水果廢物的高水分含量 (Julita *et al.*, 2019)。Kastolani (2019) 在 Citarium 河附近的 Dayeuhkolot 地區用 BSFL 處理有機物，有機物減少 56%。Julita *et al.* (2019) 還分析馬、羊糞便與糞便及蔬菜混合物餵養的 BSFL 的生長速度、發育時間、成活率和營養成分，結果發現，用馬糞和蔬菜混合物餵養的 BSFL 發育時間最短，成活率和繁殖率和蛋白質含量最高。作者建議為提高 BSFL 的生長速度和蛋白質含量，有必要在動物糞便中添加蔬菜。

在印尼，農業和住宅活動會產生各種類型的有機廢物，植物性廢物佔有機性總量百分比相當高。菲律賓桐樹是一種常綠喬木，在印尼被廣泛種植用於木材或醫藥，其含油量相對較高，為 37.6-39.2%，蛋白質含量為 14.9-28.2%。以菲律賓桐樹餵養 BSFL 的蛋白質和油含量分別為 45% 和 27%，是 BSFL 的合適基質 (Abduh *et al.*, 2018)。蛋白質水解產物是蛋白水解過程中產生的肽和氨基酸的混合物，具有多種生物活性，包括抗氧化和抗菌活性，具有許多工業應用。Firmansyah and Abduh (2019) 藉由鳳梨蛋白酶水解 BSF 獲得蛋白質水解產物，包括 8.0% 的賴氨酸、7.7% 的亮氨酸和 7.2% 的纈氨酸組成，通過清除二苯基苦肼 (DPPH) 自由基表現出抗氧化活性。

### 3.5.5 其它國家

Mai *et al.* (2019) 進行 BSFL 中提取油的脂肪酸組成分析，發現純化的月桂酸、亞油酸和亞麻酸含量分別為 28.8%、11.1% 和 0.4%；成品油的粘度、游離脂肪酸值、酸值、皂化值、碘值、



過氧化指數分別為  $96 \pm 0.14$  cP、 $0.45 \pm 0.017\%$ 、 $0.9 \pm 0.043$  mg KOH  $g^{-1}$ 、 $215.78$  mg KOH  $g^{-1}$ 、 $53.7$  g  $I_2/100$  g、 $133$  mEq·kg<sup>-1</sup>。Nguyen et al. (2018)使用包括甲醇在內的溶劑進行酯交換，從 BSFL 生產生物柴油，在用於酯交換的溶劑中，以正己烷高出未使用溶劑的 14.5 倍，因此被認為是酯交換反應最有效的溶劑。當正己烷和甲醇以體積比以 1:2 混合時，生物柴油產生率最高，為 94%。因此，使用正己烷進行酯交換反應可能有助於降低使用 BSFL 生產生物柴油的成本。

由於傳統方法需要大量的萃取溶劑和較長的萃取時間，在台灣研究者提出一種基於酶的方法用於 BSFL 生產生物柴油，在己烷萃取之前，使用不同的蛋白酶從 BSFL 中提取生物柴油，在使用的酶中，使用 Protamex® 時的脂質產量是未使用該酶時的 2.2 倍，是使用 BSFL 生產生物柴油的有效預處理方法。提取的生物柴油符合美國材料與試驗協會規範 D6751 和歐洲標準 EN 14214。基於這些發現，酶應是從 BSFL 中提取脂質的有效方法(Su et al., 2019)。Wong et al.(2018)以 BSF 的蛹殼生產具有抗菌活性和細胞相容性的聚羥基鏈烷酸酯納米纖維，其可在用於接種男性包皮成纖維細胞後，細胞增殖並進一步抑制細菌大腸桿菌和金黃色葡萄球菌的生長，結果證實這種納米纖維在生物保護材料等醫療材料中的應用潛力。

### 3.6 蛇糞肥力試驗

近年，基於營養價值，黑水虻顯然成為推動循環經濟中，將有機廢物轉值上最受歡迎的物種之一。黑水虻糞在人工飼養體系中為主要的副產品，具有極大的潛力用於補充或替代商業化肥。實驗以不同飲食飼養的蟲糞作為土壤改良劑，並將其與  $NH_4NO_3$  肥料進行對照，土壤性質未顯示礦物肥料和蟲糞之區別，主成分分析顯示主要歸因於硝酸鹽和溶解氮含量的顯著差異。在不同處理中未發現多年生黑麥草生長方面的顯著差異，表明蛆糞作為一種迅速作用的肥料與  $NH_4NO_3$  相媲美，雖然蟲糞成熟時大腸桿菌的豐富度增加，但在施加到土壤後，被革蘭氏陰性菌所淘汰。因此，我們得出結論，蟲糞可能作為有價值的肥料，並不損害土壤的衛生性質(Klammsteiner et al.,2020)。BSFL 對有機廢物進行的生物轉化產生蟲糞的副產品，以純豆渣餵食之幼蟲可減量廢棄物 85%，取 10%、20 % 和 30% (體積/體積) 之蟲糞與土壤混合，用於種植萵苣植物。在 10% 的濃度下，萵苣植物的生物質與對照組相當。蟲糞濃度較高之樣本抑制萵苣的生長，可能原因為蛇糞中營養物質的快速礦化作用導致的低碳氮比(C:N)。蛇糞也被發現能夠為萵苣的生長提供足夠的營養，在第一生長週期後僅需施用肥料，顯示適用於土壤改良。微生物群落分析顯示，在黑水虻蟲糞中沒有常見的食源性病原體存在，元素分析結果顯示無重金屬污染物，綜觀結果，黑水虻蟲糞適合作為土壤改良劑(Chiam et al., 2021)。

Liu et al.(2020)探討使用黑水虻幼蟲(black soldier fly larvae, BSFL)進行家畜糞肥堆肥對腐



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

植化和微量元素(Cu 和 Zn)之影響，實驗設計 6 種處理方式，使用不同的糞肥類型（雞、豬及牛），其中混合了 BSFL (以新鮮重量為基礎的 7:1.2 的比例)，對照組則不使用 BSFL。結果顯示，在 BSFL 處理中腐植酸/黃酸比率的範圍為 1.24 ~ 1.56 %，在無 BSFL 處理中為 0.40 ~ 0.47 %。BSFL 的添加增強腐植酸的生成，因此糞肥的腐植酸/黃酸比率高於 1%。在微量元素(trace elements ,TEs)的萃取結果，BSFL 添加到雞和豬糞肥中增加 TEs 的流動性和生物可用性，添加的 BSFL 增強了它們的活性。在 BSFL 在牛糞肥系統中，TEs 的形態分佈在 Zn 和 Cu 之間存在差異，Zn 部分減少，而 Cu 為部分增加。所有處理中總 Cu 和 Zn 的濃度均為增加，結果顯示，此方法在處理家畜糞上奠定基礎，同時通過應用 BSFL 轉換的有機肥料增強土壤中 TEs 的可用性，提供重要有用的訊息。

### 3.7 螢光激發發射光譜在有機物性質之應用

#### 3.7.1 有機物之性質分類

Chen *et al.*(2003)將三維螢光全譜中激發與發射波長位置區分為 5 個區塊 (圖 3-4 A), 激發波長小於 250 nm, 發射波長小於 350 nm 屬芳香型之蛋白質 (aromatic protein), 如 tyrosine 或 tryptophan, 此部分屬第 I 及 II 區; 激發波長小於 250-280 nm, 發射波長小於 380 nm 屬於溶解性微生物代謝物質 (Soluble microbial by-product-like), 為第 IV 區; 激發波長大於 280 nm, 發射波長大於 380 nm, 屬似腐植酸 (humic acid-like)物質, 為第 V 區; 激發波長小於 250 nm, 發射波長大於 350 nm 屬黃酸 (fulvic acid)所構成, 為第 III 區; 而 Bilal *et al.*(2010)依照農牧廢水則修正 Chen *et al.*(2003)劃分之區域(圖 3-4 B), I 及 II 類芳香族蛋白質為修正短激發波長 < 250 nm 及短發射波長 < 380 nm; III 類黃酸物質修正為激發波長 230-300 nm, 發射波長 380-570 nm, IV 類溶解性微生物副產物修正為激發波長 250-340 nm, 發射波長 > 380 nm, V 類腐植酸物質修正為激發波長 > 300 nm, 發射波長 > 380 nm。Patel-Sorrentino *et al.* (2002) 將 Amazon 流域中有機物中進行薄膜分離成不同分子量之水樣, 並以 EEFM 之方式進行有機物之定性, 發現 EX/EM: 240/440 nm 及 340/450 nm 之螢光強度值, 分別以  $I_A$  與  $I_C$  表之, 且  $I_A$  值較易受 pH 變化之影響, 且  $I_A/I_C$  與 pH 值呈線性關係。

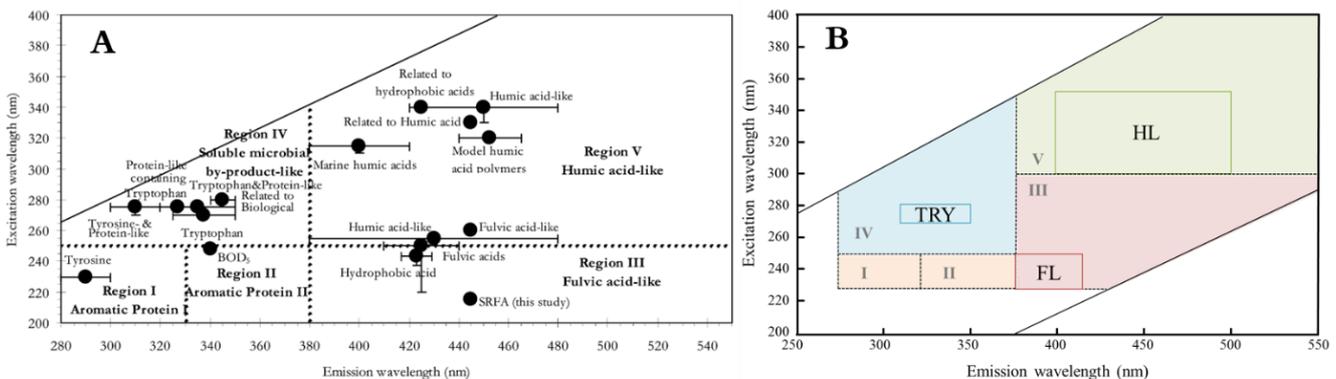


圖 3-4(A) Chen *et al.*( 2003) (B) Bilal *et al.*(2010) 對螢光激發發射光譜圖中有機物性質之定義



### 3.7.2 HIX 及 BIX

使用螢光激發發射光譜儀進行分析，可提供有機物之分子結構、化學及官能基等特性 (Stevenson, 1994)，故廣為許多研究者所採用。腐植化指數(Humification index, HIX) 為物質熟化及分解抵抗性的指標，是指固定 Ex: 254 nm, Em: 435-480 nm 時螢光強度之總和除以 Em: 300-345 nm 時的螢光強度(Huguet *et al.*, 2009)。HIX 會因腐質化程度的增加而上升，HIX 可作為 DOM 中腐植化來源之判斷，屬陸地來源者，其值大於 16，10-16 者，表含有大部分之腐植酸及部分原生性(autochthonous)細菌代謝之有機物；4-6 時，水體腐植酸含量少及原生性細菌代謝有機物；小於 4 時，是以生物性及細菌代謝有機物所造成。水可萃取之土壤與孔隙水 DOM 之 HIX 範圍則介於 10-30 之間。生物指數(Biological index, BIX)為 Ex: 310 nm 時，Em: 380 與 430 nm 螢光強度之比值，用來評估原生性微生物對 DOM (Dissolved organic matter)的相對貢獻度，當 BIX 值大於 1 時，代表水樣中有機物來源是以生物性及細菌代謝造成；0.8-1.0 間，含大量原生性細菌代謝有機物；0.7-0.8 者，屬中間強度之原生性細菌代謝有機物；0.6-0.7 者，屬低原生性細菌代謝有機物(Huguet,2009)。

### 3.7.3 SFS 於油品之分析

三維螢光光譜圖與同步螢光光譜圖之間的關係繪製如圖 3-5，掃描過程中，激發波長和發射波長兩者之間保持固定之波長間隔，於 EEFM 全譜圖投影以發射(Em) 軸成 45° 角的掃描路徑得到之此圖譜(王氏,2005)，選擇  $\Delta \lambda = 20$ 、40、60 與 80 nm 之同步螢光光譜圖實際上等於三維螢光光譜圖上斜率為 1，截距分別為 -20、-40、-60 與 -80 nm 之斜線(薛氏等,2010)。

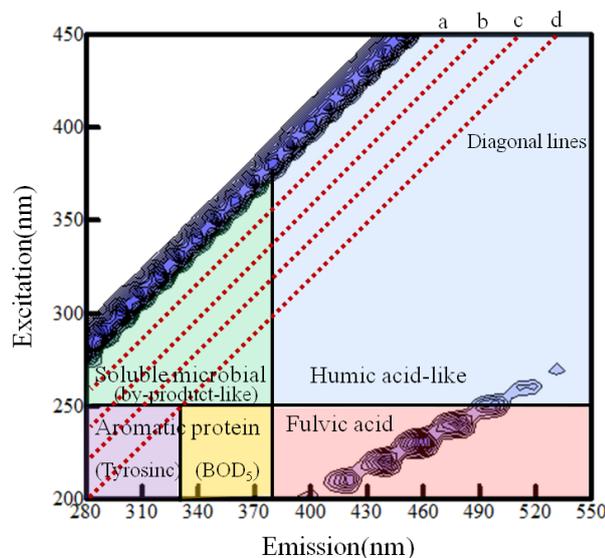


圖 3-5 同步掃描於螢光全譜圖中之對角線(a)  $\Delta \lambda = 20$  nm (b)  $\Delta \lambda = 40$  nm (c)  $\Delta \lambda = 60$  nm (d)  $\Delta \lambda = 80$  nm



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

為確定土壤中總石油碳氫(Total petroleum hydrocarbons, TPHs)污染物的總量，螢光光譜被廣泛認為是確定多環芳烴的強大及靈敏的分析工具，因為它在選擇激發和發射波長方面具有很大的選擇性(Nakashima *et al.*, 2000; Lombardi and Jardim, 1999; Qun Li *et al.*, 1992)。螢光光譜法是一種光譜化學分析方法，其中分析物分子受到短波長的激發能量，並在 1  $\mu$ s 內至低能階，並釋放出較長波長的輻射，而分析物的特徵激發發射光譜提供定性和定量的資訊。這是一種可攜式技術，用於檢測多環芳烴 (poly aromatic hydrocarbon, PAHs) 等螢光化合物，基於發射輻射的強度，可反映 PAHs 的相對濃度及芳香環數量。PAHs 在 200 到 400 nm 的波長範圍內吸收能量，並在 280 到 500 nm 的範圍發出螢光，每個分子在特定波長處發出螢光，從而可以區分不同的分子種類。單環芳烴(Monocyclic aromatic hydrocarbons, MAHs)比 PAHs 更低的波長處發光，而低沸點 PAHs，如萘，比高沸點 PAHs，如 Benzo[a]pyrene 更低的波長處發光(Okparanma & Mouazen, 2013)。然而，儘管能夠同時選擇激發波長和發射波長，但傳統的發光方法的適用性有限，因為複雜混合物的光譜通常不能令人滿意地解析有機物性質(Lombardi and Jardim, 1999; Kister *et al.*, 1996)，例如，寬峰在最大值的檢測中引入了更多誤差。因此，同步發光等衍生技術的應用在監測芳香族污染物方面具有更大的應用意義;此外，同步激發比傳統的螢光發射具有更多的結構選擇性(Eiroa *et al.*, 2000; Sabry, 1997)。同步發光光譜涉及以固定波長差( $\Delta\lambda$ )同時掃描兩個單色器(Vo-Dinh, 1978; GreenandO'Haver, 1974)。



## 第四章 研究方法與過程

### 4.1 人工配製柴油及燃料油污染土壤

模擬一系列受污染土壤樣本，本研究取自校園未受污染的土壤，先去除大顆粒雜質以篩網(10 mesh, 2 mm, 台製)過篩後備存，進行酸鹼度、導電度、有機質、有效性磷、有效性鉀、有效性鎂、質地分析與重金屬含量測定，作為背景測值。將柴油(中油股份有限公司)及甲種燃料油(高雄礦油行)分別溶於正己烷中，倒入含未受污染土壤(乾土)之 20 L 玻璃容器，再使用玻璃攪拌棒將其均勻攪拌等待至乾燥狀態(溶劑完全揮發)，兩種油品濃度控制在 2,000 ~ 10,000 mg/kg 以模擬現地環境污染狀況進行 BSFL 減量效能評估(圖 4-1)。

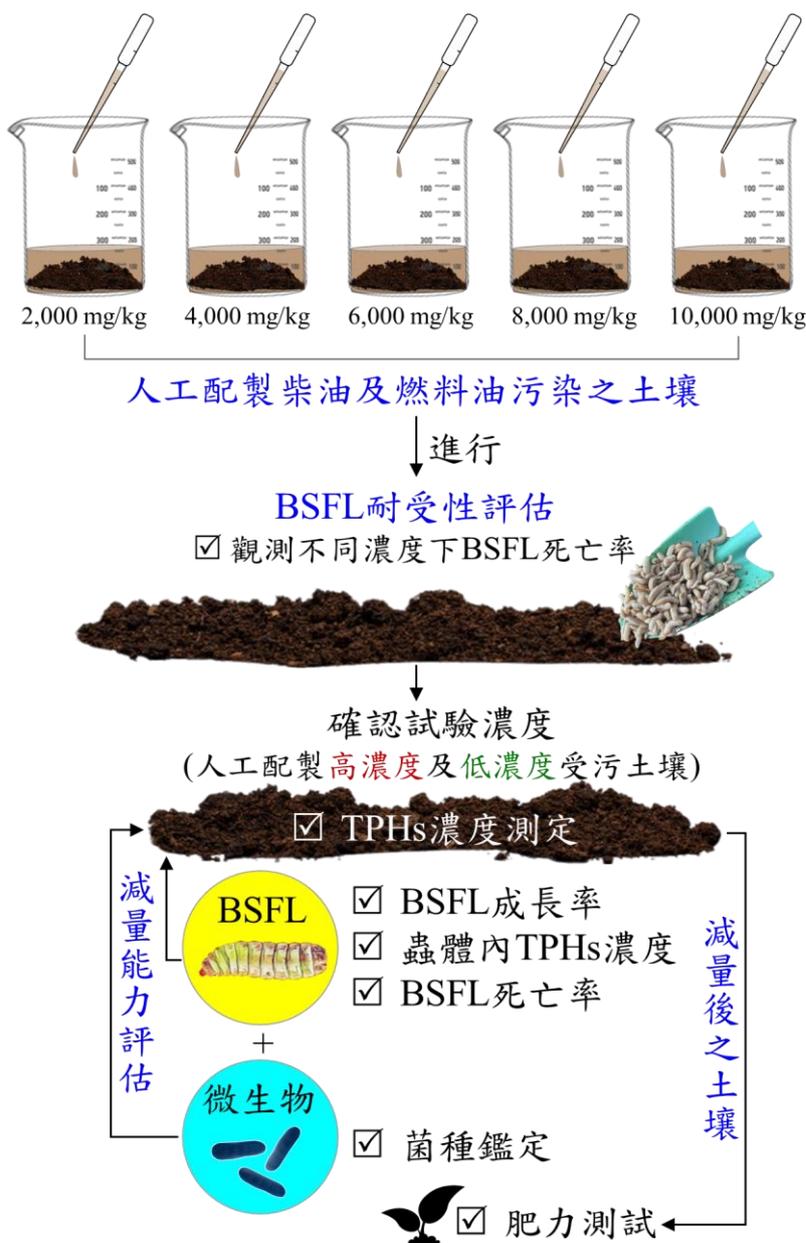


圖 4-1 BSFL 對受油品 TPH 污染之實驗示意圖



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

## 4.2 幼蟲培育及選擇

使用 18 cm (L) × 25.5 cm (W) × 10.3 (H) 之塑膠盆飼養，取 0.1 g 黑水虻蟲卵進行孵化，根據實驗室前期試驗 0.1 g 蟲卵可孵化約 3,846 ~ 4,600 隻幼蟲，投入配製之受污土壤量為 1 kg，每個實驗進行三重複試驗，研究期間分四階段(圖 4-2)，第一階段為孵化期，確保幼蟲完全孵化後，進入下階段，第二階段為餵養幼蟲期，使用米糠營養源(於屏東碾米廠購得)餵養 7 天至 3 齡後(蟲重約  $385 \pm 15$  g)，開始進行所規劃之試程，第三階段為實驗飼養期，投入受不同濃度污染之土壤，及添加小於 10 % 之營養源(如米糠)作為蟲體之基質，此階段定期紀錄蟲體之變化，飼養期間盆內固定濕度為 60 ~ 80 %，最後為收成期，將蟲體挑出後，紀錄蟲體之變化狀況外，將樣本進行處理後分析。圖 4-3 為 3 齡 BSFL 之幼蟲(0.1 g 蟲卵孵化)，投入不同柴油及燃料油及對照組(背景土+米糠)，每種濃度均採用三重覆樣本進行，實驗期間會固定期使用 RO 水調整樣本濕度於 60 ~ 80 %。

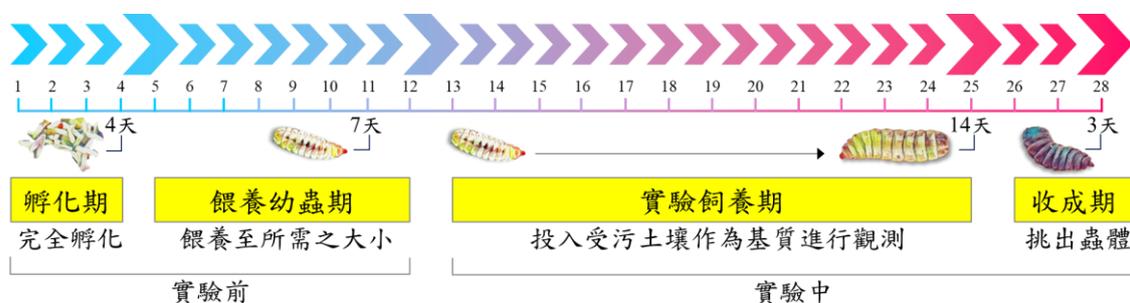


圖 4-2 幼蟲培育及投入實驗規劃

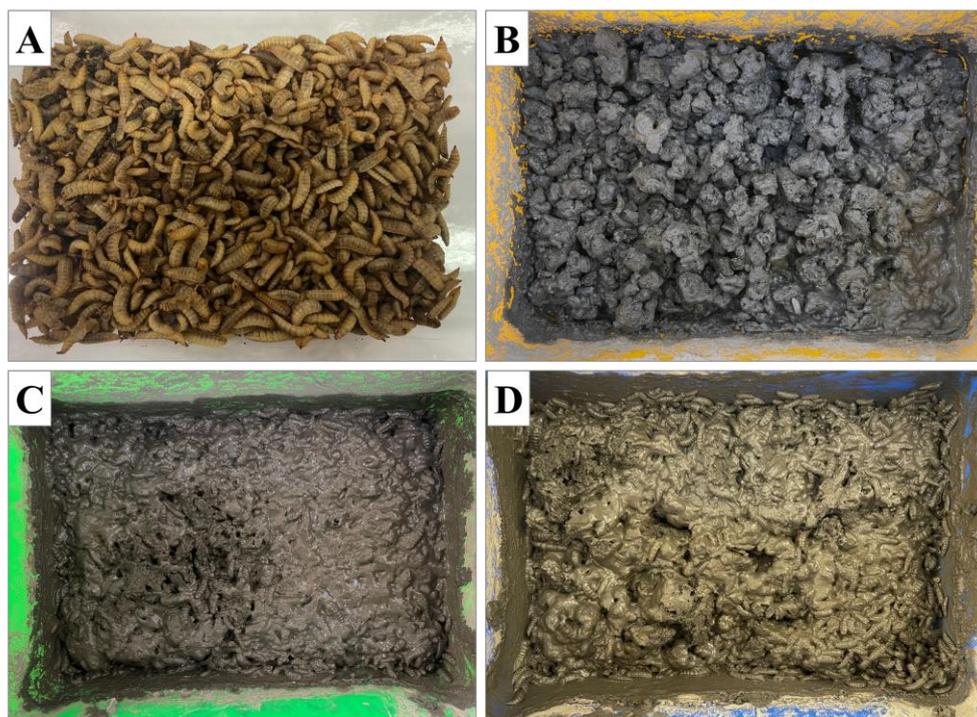


圖 4-3 實驗初期 (A) 飼養至 3 齡之 BSFL (B) 對照組(土樣 1kg+0.1 kg 米糠) (C) 人工配製受柴油污染土壤(2,000 mg/kg) (D) 人工配製受燃料油污染土壤(2,000 mg/kg)



## 4.3 菌相分析

### 4.3.1 樣品 DNA 的抽取

#### (1) 土壤樣品細菌 DNA 的抽取

係利用 Qiagen 公司所出產之強力土壤 DNA 抽取試藥組(DNeasy power soil kit) 進行 DNA 萃取。萃取步驟如下：稍微離心讓 PowerBead Pro 管中的珠子會沉澱在底部，添加 250 mg 土壤和 800  $\mu$ l CD1 溶液，震盪混合均勻；PowerBead Pro 管固定在旋轉盤上，旋轉 10 分鐘；將 PowerBead Pro 管 15,000 x g 離心 1 分鐘；將上清液移至乾淨的 2 ml 微量離心管中；加入 200  $\mu$ L CD2 溶液震盪 5 秒；15,000 x g 離心 1 分鐘。將上清液移至乾淨的 2 mL 微量離心管中；加入 600  $\mu$ L CD3 溶液並震盪 5 秒；將 650  $\mu$ L 上清液裝入 MB 管柱中；15,000 x g 離心 1 分鐘；丟棄流出液並重複上述步驟，以確保所有液體通過 MB 管柱；將 MB 管柱放入乾淨的 2 mL 收集管；將 500  $\mu$ L EA 溶液加入 MB 管柱中；以 15,000 x g 離心 1 分鐘丟棄流出液；將 500  $\mu$ l C5 溶液加入 MB 管柱中；以 15,000 x g 離心 1 分鐘丟棄流出液，以 16,000 x g 離心 2 分鐘，將 MB 管柱放入新的 1.5 mL 微小離心管；將 50 - 100  $\mu$ l C6 溶液加入白色濾膜的中心，靜置 5 分鐘；15,000 x g 離心 1 分鐘，DNA 即存在於微小離心管中，DNA 冰存於-20°C 暫存。DNA 樣品以冷凍寄送至源資生物科技股份有限公司進行次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)。

#### (2) 腸道菌 DNA 的萃取

蟲體於-20°C 冷凍 10 分鐘後，以無菌 RO 水洗淨後，再用 70% 酒精清洗一次，待乾燥後於無菌操作台，以消毒過的大頭針頭固定蟲體，以消毒過的解剖剪刀將蟲體沿著口器剪開，肚皮部分也用消毒過的大頭針固定，剪下其腸道部分，置於無菌離心管中(De Filippis *et. al.*, 2023)。腸道菌的分離係將回溫後的腸道，置於無菌生理水中，以超音波振盪機將腸道的內容物震出，以低速離心(1000 g x 1 min) 去除較重的組織碎片，取上清液離心(6000 xg 10 分鐘)，腸道菌即在沉澱物中，細菌的染色體 DNA 利用 Bacteria Genomic DNA Kit (Qiagen) 抽取，抽取的 DNA 則冰存於-20°C 暫存。DNA 樣品以冷凍寄送至源資生物科技股份有限公司進行次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)。

### 4.3.2 次世代定序

#### (1) 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

使用引子 (Primer) 341 F (341 F" CCTACGGGNGGCWGCAG) 及 805 R (805 R :GACTACHVGGGTATCTAATCC) 進行 16S rDNA V3-V4 區域的擴增(大小約為 465 bp)。反條件為：染色體 DNA 使用量為 2ng，PCR 條件為 95°C 3 min；98°C 20 sec、57.5°C 20 sec、72°C 20 sec 共 25 循環；72°C 3 min。土壤樣本或是腸道菌所抽取的 DNA 經由 PCR 增幅 16S



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

rDNA V3-V4 區域。利用 PCR 增幅 16S rDNA V3-V4 區域結果中顯示很多非專一性的增幅結果，大於 465 bp 的產物，尚需要利用割膠回收的方法，自 2% Agarose 切下~500 bp 位置的條帶，以 QIA quick PCR Purification Kit 進行純化，樣本以 2% Agarose 進行電泳，切取目標條帶 (400-600 bp) 後，以 MinEluteGel Extraction Kit (QIAGEN)純化後，得到大小約 500 bp 的 16S rDNA V3-V4 區域 DNA。

## (2)DNA library 的構築與 DNA 定序方法

使用 CeleroDNA-Seq Library Preparation Kit (TECAN)將 DNA 構築為 library，其後進行 library 品質的檢測。此樣本為 PCR-free 的 library 製備方式，library 有效濃度決定於 adapter ligation 的效率，故一般 dsDNA 之定量法無法測得實際有效濃度，須以 qPCR 測量其有效濃度為何，濃度需求以一個完整的 Run 計算，Library 濃度須大於 1nM。DNA 的定序主要是經由 MiSeqSystem 進行 2×301 bp Paired-end Sequencing，在經過合併 (merge) 雙端序列可獲得較長的 read。

## (3) 序列比對分析結果

由於不同種細菌的 16S rRNA 基因(16S rDNA)，是由高度保守區域與高度變異區域所組成，高度保守的區域常被用於對各種生物進行的系統發育學方面的研究，而高度變異的區域則常應用於微生物多樣性的分析上。將定序所得的 16S rRNA 區域原始數據進行資料分析，以獲得微生物菌相分布。所得原始數據透過 Qiime2 中的 Dada2 功能先過濾掉測序品質差的序列 (Denoised reads)後將兩端數據合併(merge)為單一條較長的序列(merge read)，並移除嵌合體序列(chimera from PCR error)，最後後得為有效序列(effective reads)，再將這些有效序列進行菌種分類，以獲得擴增子序列變體分類(Amplicon sequence variant (ASV), taxonomy)。將資料進行生物資訊的整理分析，即可了解土壤中原本的菌相、添加 TPH 後的菌相及黑水虻腸道原本的菌相，進食 TPH 後的黑水虻腸道菌相，透過比對分析了解 TPH 對於土壤與黑水虻腸道菌相族群的影響。

### 4.3.3 菌種分解 TPH 能力分析

#### (1) 腸道菌的分離

將黑水虻的蟲體的腸道經過上述 4.3.1 的前處理後，去除大碎片組織後，將含有腸道菌的樣品的上清液，以無菌生理食鹽水(0.85% NaCl)經過連續稀釋後，取 0.1 mL 稀釋菌液均勻塗於 1/2 營養培養基(nutrient agar)中，於 25°C培養 2 天後，計數並觀察其菌落數。

#### (2) 配製含柴油或燃料油的培養基

將柴油或是燃料油 2 mL 先與氫化蓖麻油之環氧乙烷類介面活性劑(Hydrogenated Casstor Oil Ethoxylates) 6 mL 混合均勻，加入已經滅菌完成的 200 mL 1/5 營養培養基中，混合均勻，每片培養基倒入約 25 mL 混合培養基，柴油或是燃料油的濃度約為 10,000 mg/kg。將前述培



養於 1/2 營養培養基的菌落，這其中包含了不同濃度的柴油或燃料油的樣品，每個培養基隨機挑選 20 個菌落，以滅過菌牙籤轉點於含柴油或是燃料油的培養基上，置於 25 °C 培養觀察。

#### 4.4 蟲體、蛹重量大小之量測

試驗期間隨機取出適量之蟲體數進行測重；試驗結束後，將蟲體移至暗室進行預蛹，除測量蛹之大小及重量外，亦觀察預蛹時間，可與廚餘為食之蟲體進行差異性比較。

#### 4.5 TPH 濃度分析

土壤樣本前處理為環保署公告之標準方法(NIEA.M165)，經正己烷與丙酮(1:1 v/v)混合溶劑萃取後；蟲體及蛹以去離子水清洗後進行冷凍乾燥再進行破碎，使用正己烷與丙酮(1:1 v/v)混合溶劑萃取，再依環保署公告之標準方法(NIEA S703.63B)，以氣相層析儀進行低碳數/高碳數之 TPH 分析，低碳數分析管柱為 DB-624(30 m × 0.53 mm × 3.0 μm)/高碳數分析管柱為 ZB-1 HT(30 m × 0.32 mm × 0.1 μm)。氣相層析儀(gas chromatograph/flame ionization detector, GC/FID)分析條件使用環保署公告之標準方法(NIEA S703.63B)進行。

另濁度快篩法之實驗步驟，使用萃取試劑萃取土壤中之 TPH，經過濾後加入呈色試劑，其萃取液中油品與呈色試劑反應後形成乳化懸浮濁液，再利用濁度計分析並推算出 TPH 濃度。

計算生物累積因子(bioaccumulation factor, BAF)，當生物累積因子(BAF)大於 1 時，表示幼蟲中 TPH 累積量高；當值低於 1 時，則意味著消耗(Wu *et al.*, 2021, Seyedalmoosavi *et al.*, 2023)，計算公式如右： $BAF = \frac{BSFL \text{ 體內 TPH(mg/kg)}}{\text{基質中之 TPH(mg/kg)}}$ 。

#### 4.6 土壤腐植化測定

分析前將試劑水作為空白掃描，隨後取約八分滿之樣本過濾液(0.22 μm)，進行樣本掃描，掃描後利用螢光圖譜分析軟體，將水樣圖譜扣除空白圖譜後，得到樣本之螢光圖譜，該設備光源採用氙燈作為光源，功率為 150 W，偵測器採用光電倍增管設定條件如表 4-1。

表 4-1 全譜螢光掃描 (EEFM)之操作參數設定值

Parameter	Value
Measurement type	3-D scan
Data mode	Fluorescence
EX Start – End WL	200 - 400 nm
EM Start – End WL	280 - 550 nm



Parameter	Value
EX & EM Slit	10 nm
Scan speed	30000 nm/min
PMT Voltage	700 V

## 4.7 肥力試驗

選擇 2~3 種禾本植物進行試驗，盆栽外層置於盆座內，以防止澆水時，污染土壤隨著水分流出，造成二次污染，將黑水虻去化後之受污土壤進行植物栽培，觀測黑水虻去化前後樣本對植物之生長狀況，為了預防天氣等因素影響，將植物置於半開放空間，實驗進行 90 天監測，評估植物生長狀況，定期量測每株植物高度及葉片數。將肥力試驗參數與土壤腐植化參數進行相關性分析，藉以瞭解腐植化對肥力之影響。另關於土壤肥力對應參數，包括 pH (AFS2904-1)、電導度值 (AFS2905-1)、有機質 (AFS2101-1)、全氮 (AFS1110-1)、全磷酐 (AFS1120-1)、全氧化鉀 (AFS1130-1)、全氧化鈣 (AFS1140-1)、全氧化鎂 (AFS1150-1)，亦會進行適當量測。

### 4.7.1 pH (AFS2904-1)

- (1) 儀器查核：pH 測定儀以 pH 4、7、10 標準緩衝液校正，若樣品測值超出此範圍者，則再以 pH 1 或 pH 13 標準緩衝液校正。取適量緩衝溶液於燒杯中，依儀器操作手冊校正步驟進行校正。再以另一來源標準緩衝液（工作緩衝溶液），查核其 pH 值。pH 測定儀之溫度探棒應每 3 個月以標準溫度計進行校正，誤差不大於 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，並記錄之。
- (2) 固態樣品製備及 pH 值測定：有機質肥料樣品在  $70^{\circ}\text{C}$  下烘乾至恆重，以磨碎機磨碎，並通過 35 mesh 篩網，再在  $70^{\circ}\text{C}$  下烘乾 4 小時，移入乾燥器內冷卻至室溫，正確稱取樣品 5.00 g，置於 100 mL 燒杯內，加入 50 mL 試劑水，以玻棒攪拌均勻後，靜置 60 分鐘，其間攪拌 2-3 次，測定前再行攪拌，以 pH 測定儀測定。
- (3) 液態樣品製備及 pH 值測定：測定前先將樣品充分混合搖勻，倒取約 50 mL 置於 100 mL 塑膠燒杯中，再以 pH 測定儀測定。

### 4.7.2 電導度值 (AFS2905-1)

- (1) 儀器查核：取適量 0.01 N 氯化鉀標準液，加入燒杯中，依儀器操作手冊校正步驟進行校正。再以另一來源 0.01 N 氯化鉀標準液，查核其 EC 值。
- (2) 固態樣品製備及 EC 值測定：有機質肥料樣品在  $70^{\circ}\text{C}$  下烘乾至恆重，以磨碎機磨碎，並通過 35 mesh 篩網，再在  $70^{\circ}\text{C}$  下烘乾 4 小時，移入乾燥器內冷卻至室溫，正確稱取樣品 5.00 g，置於 100 mL 塑膠燒杯內，加入 50 mL 試劑水，以玻棒攪拌均勻後，靜置 60 分鐘，其間攪拌 2-3 次。將樣品倒入已放置濾紙之抽氣漏斗中，利用真空幫浦抽氣收集濾液於抽氣瓶內。如濾液有混濁現象，需再重新過濾。將所抽出之濾液倒入



玻璃平底試管中，再以電導度計測定之。

- (3) 液態樣品製備及 EC 值測定：測定前先將樣品充分混合搖勻，倒取適量約 50.0mL 置於 100 mL 塑膠燒杯中，再以電導度計測定之。

#### 4.7.3 有機質(AFS2101-1)

- (1) 樣品處理：固態有機質肥料樣品在 70°C 下烘乾至恆重，以磨碎機磨碎，並通過 35 mesh 篩網，再在 70°C 下烘乾至恆重，移入乾燥器內，冷卻至室溫。液態肥料樣品無須烘乾，於取樣前須混合均勻。
- (2) 取乾淨附蓋坩鍋置於烘箱內，以 105°C 烘乾 4 小時，取出加蓋，置於乾燥器內冷卻至少 45 分鐘後，正確量稱附蓋坩鍋空重(W0)。稱取約 10 g 肥料（液態者直接稱取）置入坩鍋中，正確量稱含樣品之附蓋坩鍋重(W1)。
- (3) 去除水分：將含樣品之坩鍋放入烘箱內，以 105°C 之溫度烘乾至重量變化不超過 0.01 g 之恆重（約 24 小時以上）後，取出加蓋，置於乾燥器內冷卻至少 45 分鐘，正確量稱 105°C 烘乾後含樣品之附蓋坩鍋重(W2)。
- (4) 樣品灰化：將前項經 105°C 烘乾後含樣品之坩鍋置入高溫灰化爐內以階段加溫的方式（如先在 250°C 恆溫 2 小時，再緩慢升溫至 600°C，恆溫 4 小時）加熱灰化，待降溫至約 100°C 後，取出加蓋，置於乾燥器內冷卻至少 45 分鐘，正確量稱灰化後含灰分之附蓋坩鍋重(W3)。

#### 4.7.4 全氮(AFS1110-1)

- (1) 樣品處理：取適量肥料樣品置於研鉢內，充分研磨，混合均勻。
- (2) 利用氮蒸餾裝置，將盛有 20 mL 2% 硼酸吸收液之三角瓶，置於冷凝管下，並將冷凝管端浸入 2% 硼酸吸收液內。
- (3) 加熱蒸餾：
- I. 分別正確量取上述 5.2.1、5.2.2、5.2.3 試樣液 10 mL 於蒸餾瓶中，並加入 10 mL 10 M 氫氧化鈉溶液，再進行加熱蒸餾。待蒸餾瓶中滴下第一滴餾出液起，計時 7 分鐘後，取出三角瓶。
  - II. 正確量取 5.2.4 試樣液 10 mL 於蒸餾瓶中，加入約 1 g 德瓦達合金，再加入 10 mL 10 M 氫氧化鈉溶液，進行加熱蒸餾。待蒸餾瓶中滴下第一滴餾出液起，計時 7 分鐘後，取出三角瓶。
  - III. 餾出液（綠色）以硫酸滴定溶液滴定至與原硼酸吸收液相同之顏色（紫或紫紅色，



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

可用 pH meter 測到原液 pH)，並記錄滴定毫升數。另對試劑水、樣品空白溶液及鉍標準液進行定量，並記錄其滴定毫升數。

#### 4.7.5 全磷酞(AFS1120-1)

- (1) 樣品處理：取適量肥料樣品置於研鉢內，充分研磨，混合均勻。
- (2) 試樣液：正確稱取 2.000 g，置於 100 mL 分解管或 150 mL 高腳燒杯中，加入 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸，蓋上分解管蓋或蓋上錶玻璃，置於高溫加熱分解爐中或加熱板徐徐加熱，若激烈產生泡沫時，移離，放冷片刻，俟激烈反應終了，稍微移開分解管蓋或錶玻璃繼續加熱蒸發至幾近乾涸，待冷卻後，以 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸沿著內壁洗滌加入，重複加熱蒸發至幾近乾涸。加入約 2 M 鹽酸溶液 25 mL，稍為加熱使之溶解，冷卻至室溫，以試劑水洗滌移入 100 mL 定量瓶中定量後，立即以濾紙過濾。
- (3) 測定：以感應耦合電漿原子發射光譜儀測定濃度，並對樣品空白溶液進行測定。

#### 4.7.6 全氧化鉀(AFS1130-1)

- (1) 樣品處理：取適量肥料樣品置於研鉢內，充分研磨，混合均勻。
- (2) 試樣液：正確稱取 2.000 g，置於 100 mL 分解管或 150 mL 高腳燒杯中，加入 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸，蓋上分解管蓋或蓋上錶玻璃，置於高溫加熱分解爐中或加熱板徐徐加熱，若激烈產生泡沫時，移離，放冷片刻，俟激烈反應終了，稍微移開分解管蓋或錶玻璃繼續加熱蒸發至幾近乾涸，待冷卻後，以 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸沿著內壁洗滌加入，重複加熱蒸發至幾近乾涸。加入約 2 M 鹽酸溶液 25 mL，稍為加熱使之溶解，冷卻至室溫，以試劑水洗滌移入 100 mL 定量瓶中定量後，立即以濾紙過濾。
- (3) 測定：以感應耦合電漿原子發射光譜儀測定濃度，並對樣品空白溶液進行測定。

#### 4.7.7 全氧化鈣(AFS1140-1)

- (1) 樣品處理：取適量肥料樣品置於研鉢內，充分研磨，混合均勻。
- (2) 試樣液：正確稱取 2.000 g，置於 100 mL 分解管或 150 mL 高腳燒杯中，加入 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸，蓋上分解管蓋或蓋上錶玻璃，置於高溫加
- (3) 熱分解爐中或加熱板徐徐加熱，若激烈產生泡沫時，移離，放冷片刻，俟激烈反應終了，稍微移開分解管蓋或錶玻璃繼續加熱蒸發至幾近乾涸，待冷卻後，以 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸沿著內壁洗滌加入，重複加熱蒸發至幾近乾涸。加入約 2 M 鹽酸溶液 25 mL，稍為加熱使之溶解，冷卻至室溫，以試劑水洗滌移入 100 mL 定量瓶中定量後，立即以濾紙過濾。



(4) 測定：以感應耦合電漿原子發射光譜儀測定濃度，並對樣品空白溶液進行測定。

#### 4.7.8 全氧化鎂(AFS1150-1)

(1) 樣品處理：取適量肥料樣品置於研鉢內，充分研磨，混合均勻。

(2) 試樣液：正確稱取 2.000 g，置於 100 mL 分解管或 150 mL 高腳燒杯中，加入 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸，蓋上分解管蓋或蓋上錶玻璃，置於高溫加熱分解爐中或加熱板徐徐加熱，若激烈產生泡沫時，移離，放冷片刻，俟激烈反應終了，稍微移開分解管蓋或錶玻璃繼續加熱蒸發至幾近乾涸，待冷卻後，以 15 mL 濃鹽酸及 5 mL 濃硝酸沿著內壁洗滌加入，重複加熱蒸發至幾近乾涸。加入約 2 M 鹽酸溶液 25 mL，稍為加熱使之溶解，冷卻至室溫，以試劑水洗滌移入 100 mL 定量瓶中定量後，立即以濾紙過濾。

(3) 測定：以感應耦合電漿原子發射光譜儀測定濃度，並對樣品空白溶液進行測定。

### 4.8 研究進度及預期完成之工作項目

#### 4.8.1 原訂定進度

表 4-2 為本計畫甘特圖。需完成之工作事項，分述如下：

- (1) 文獻整理及探討。
- (2) 營養鹽及標準品配製。
- (3) 幼蟲培育。
- (4) 幼蟲投入試驗(柴油)。
- (5) 幼蟲投入試驗(燃料油)。
- (6) pH、EC 及蟲體重。
- (7) 蛹重及大小量測。
- (8) 期中報告撰寫。
- (9) 肥力試驗。
- (10) 菌相分析。
- (11) 期末報告撰寫。

#### 4.8.2 計畫進度

目前工作進度內容均依據甘特圖進行，並完成各項實驗工作及撰寫期末報告。另本計畫



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

目前完成 International Conference on Green Energy and Environmental Technology (GEET-24) 海報論文發表(7月葡萄牙里斯本)，主題為 Approach of Specific Fluorescent Peak in Synchronous Fluorescent to Measure TPH Content Contaminated by Dissel(如附錄 34)。國內則預定 11 月份參與中華民國環境工程學會 2024 土壤地下水研討會口頭發表，論文主題:黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異(如附錄 35)。另國內外期刊論文，則等 11 月份期末報告完成，旋即可依結果進行國外期刊投稿。在專利規劃，目前已透過校內研發處申請新型專利，著重於 BSFL 系統之架設。

關於產研計畫部分，(1)本計畫提案初之初，即與私人企業寶田畜牧場簽定產學合作案(1120801-1120831，仁合 112006)，進行 BSFL 處理養豬廠豬糞之可行性研究，產學合作金額為 50 萬，業主也希望從事本研究之學生進入畜牧場工作。(2)計畫期間，與富立業工程顧問股份有限公司提供現地受油染之土樣，探討 BSFL 處理受油品污染現地土樣之效能(112 學年度碩士論文:黑水虻幼蟲降解受污染土壤中 TPHs 之效能)，成果提供該公司參考，朝向委員所期待方向發展。(3)受限本計畫原場域及人力，113 學年度與屏東科技大學農園生產系趙雲洋(教授) 共同合作，本研究團隊建置的相關 BSFL 之培育術技術，目前轉移及重建中。

表 4-2 本研究計畫原規劃工作之甘特圖

年月 工作項目	112 年 12 月	113 年 1 月	113 年 2 月	113 年 3 月	113 年 4 月	113 年 5 月	113 年 6 月	113 年 7 月	113 年 8 月	113 年 9 月	113 年 10 月	113 年 11 月	備 註
文獻整理及探討													
營養鹽及標準品配製													
幼蟲培育				1※									
幼蟲投入試驗(柴油)													
幼蟲投入試驗(燃料油)													
pH、EC 及蟲體重													
蛹重及大小量測													
期中報告撰寫					2※								
肥力試驗													
TPHs 分析					3※		3※		3※				



## 第四章 研究方法與過程

年月	112 年 12 月	113 年 1 月	113 年 2 月	113 年 3 月	113 年 4 月	113 年 5 月	113 年 6 月	113 年 7 月	113 年 8 月	113 年 9 月	113 年 10 月	113 年 11 月	備 註
工作項目							4*		4*				
菌相分析													
期末報告撰寫											5*		
工作進度估計百分比 ( 累 積 數 )	5 %	10 %	20 %	35 %	40 %	50 %	55 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %	
預定查核點	期中		1. 培育幼蟲至實驗其階段(3 齡期)，並記錄幼蟲生理狀態。 2. 完成標準品配製及幼蟲投入試驗，撰寫期中報告。 3. 蟲體及土壤 TPHs 分析。 4. 蟲體及土壤菌相分析。										
	成果		1. 完成期末報告(完成試驗並整理分析結果、申請專利及投稿送出)。										
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、以 12 個月作規劃，其中期中報告書初稿提送要件需達計畫執行進度 50% 以上，成果報告書初稿需於計畫結束前 1.5 個月提送。													

註：表格不敷使用時，請自行增列。



## 第五章 結果與討論(含結論與建議)

### 5.1 結果與討論

#### 5.1.1 BSF 蟲卵之計數、孵化及 1 齡至 3 齡之蟲體重及長度

在進行受油品污染土壤使用 BSFL 進行相關實驗前，需添加之 BSFL 幼蟲數，若採人工計數進行，恐需花費更多人力及時間，故研究初期，先進行推估每克蟲卵所含的幼蟲數目，藉以可有效及控制添加於受油品污染土壤之幼蟲數目。本研究以蟲卵計數盤 (MARIENFELD, McMaster, Germany)，分別稱取 0.0011 g、0.0012 g 及 0.0013 g 蟲卵，置放於蟲卵計數盤 (MARIENFELD, McMaster, Germany)，並藉 99 % 酒精分散進行計數(圖 5-1)，數量依序分別為 47、61 及 69 顆蟲卵，每顆蟲卵之重分別為 0.023 mg、0.020 mg 及 0.019 mg，平均每顆蟲卵重為 0.021 mg，理論上，0.1 g 在 100 % 孵化率下，平均蟲數應為 4,888 隻幼蟲，但實際上，依本研究於 28 °C 培養箱下，0.1 g 蟲卵孵化平均約為 3,846 隻幼蟲，實際孵化率僅接近 80 %。



圖 5-1 不同蟲卵重於 99 % 酒精之分散及計數 (A) 0.0011 g (B) 0.0012 g (C) 0.0013 g

圖 5-2 為 BSF 蟲卵在 28 °C 培養箱經 92 小時孵化為新生黑水虻幼蟲之外觀變化。圖 5-2 顯示，左(1)蟲卵之色澤呈現深棕色；左(2)至左(4)，約 40 小時，蟲卵之色澤變成淡棕色，蟲卵週邊變成透明狀，且呈現黑水虻幼蟲初期的體態，代表黑水虻蟲卵已開始進行演化；至左(5)，蟲卵上方顯示 2 個黑點，如 BSFL 之視覺器官；左(6)蟲卵呈現透明，棕色已漸漸消失，BSFL 之形態清晰可見；(左)7 則 BSFL 已開始進行脫殼，期間約經 92 小時，轉換成新生的 BSFL(1 齡幼蟲)。

依本研究團隊在過去在 BSFL 幼蟲去除不同農業有機副資材之經驗，適齡 BSFL 之選擇為重要關鍵因子，本計畫以 3 齡 BSFL 作為受油品污染土壤處理之對象，從 BSFL 新生幼蟲培育至 1 齡及 3 齡之蟲體長度及重量繪製如圖 5-3，其間餵食米糠。圖 5-3 顯示，每隻 1 齡蟲之重量約 0.0013 g，長度為 0.4 cm；每隻 2 齡蟲之重量約 0.0105 g，長度為 0.7 cm；每隻 3 齡蟲之重量約 0.0633 g，長度為 1.3 cm。

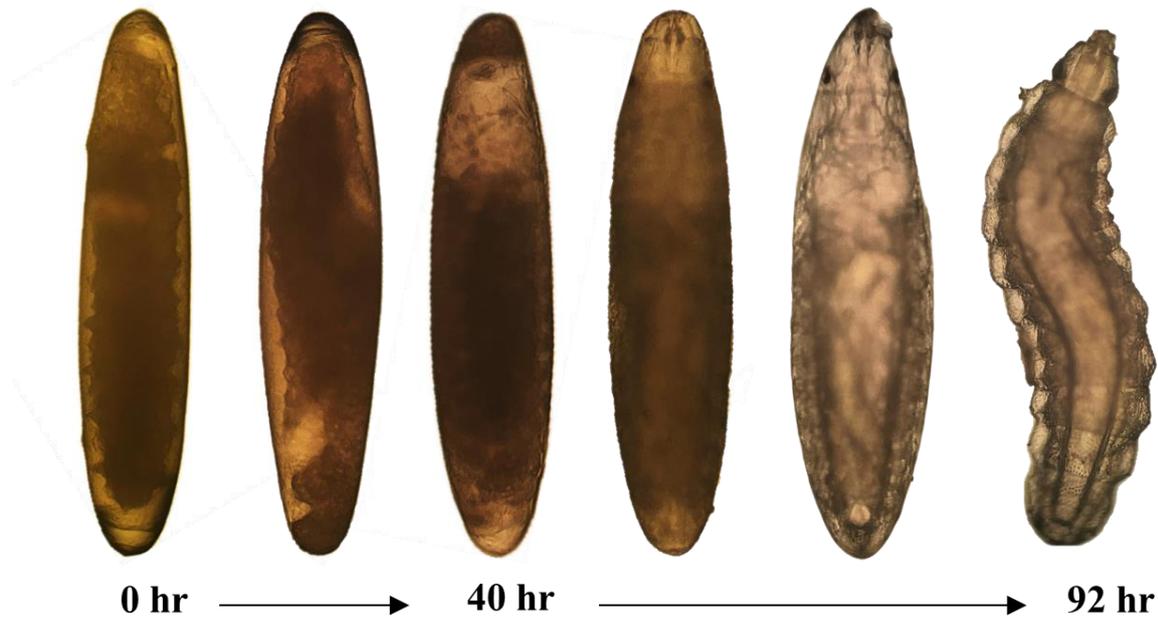


圖 5-2 BSF 蟲卵孵化成初生幼蟲(1 齡蟲)之外觀變化

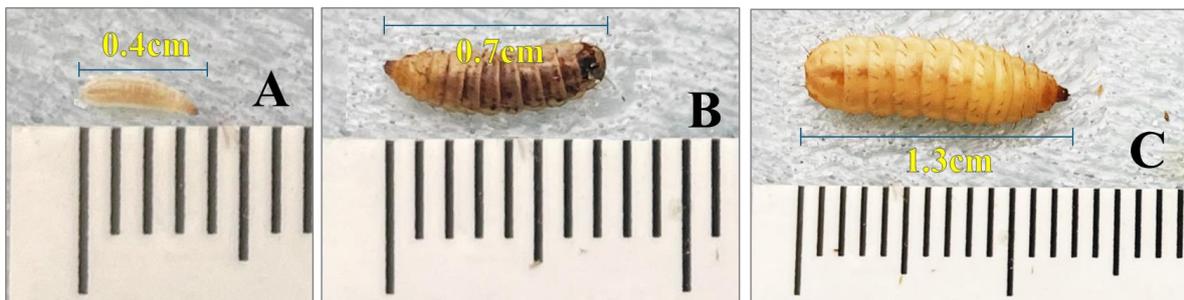


圖 5-3 初生黑水虻幼蟲至 3 齡 BSFL 長度及重量變化(A) 1 齡(0.0013 g) (B) 2 齡(0.0105 g) (C) 3 齡(0.0633 g)

### 5.1.2 BSFL 重量、死亡數(率)及預蛹蟲數(率)之變化

不同餵食物料對 BSFL 之蟲體重會造成不同的影響，當然以三齡 BSFL 處理受不同柴油及燃料油劑量是否差異，結果整理如圖 5-4。圖 5-4 A 顯示，在柴油部分，每隻 BSFL 從對照組之 0.004 -0.050 g 增至第 2 天之 0.070-0.110 g，僅 10,000 mg/kg 柴油劑量，每隻 BSFL 蟲體重明顯高於對照組，其它的劑量，特別是 2,000 mg/kg 柴油劑量，每隻 BSFL 蟲體重明顯低於對照組。關於低劑量 2,000 mg/kg 柴油，每隻 BSFL 重在 0-5 天，其重量為 0.08 g，略低於控制組，0.09 g，應與本研究採隨機進行量測及樣本數低相關(N=10)，若要避開始此問題，加大取樣數目(N=40-400，1-10%)，應可減少此問題。第 4 天時，不同柴油濃度仍持續呈現增重之



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

現象，0.08-0.12 g，4,000-10,000 mg/kg 柴油劑量，每隻 BSFL 蟲體重明顯高於對照組，2,000 mg/kg 柴油劑量，每隻 BSFL 蟲體重仍明顯低於對照組；第 6 天後，不同劑量對每隻 BSFL 蟲體重之影響與第 4 天同。第 10 天，僅 2,000 mg/kg 柴油劑量，每隻 BSFL 蟲體重高於對照組，其餘劑量則是低於對照組。第 12 天時，除 2,000 mg/kg 及 6,000 mg/kg 柴油劑量外，每隻 BSFL 蟲體重較對照為低，其餘與對照組相近。在第 16 天時，所有柴油劑量，呈現相同的結果，每隻 BSFL 蟲體重均高於對照組。此現象，初期生長現象與米糠有機物可提供 BSFL 進行生長相關，後期 BSF 可利用的基質僅剩柴油時，因為 BSFL 之活動需消耗能量，BSFL 分解利用柴油基質速度慢，當可提供 BSFL 能量少時，BSFL 之蟲體重減少，應是可理解。至於後期，每隻 BSFL 蟲體重均高於對照組，推測除油品累積積於 BSFL 體中外，另是 BSFL 蟲體腸道的分解菌發揮功能，有效轉換柴油為可同化基質相關，此部分可藉由蟲體所含油品量或菌相分析進行驗證解析。第 0 天及第 4 天對照組(圖 5-5)與三齡 BSFL 受柴油污染土壤，蟲體大小及重量變化之外觀圖(圖 5-6 及圖 5-7)。

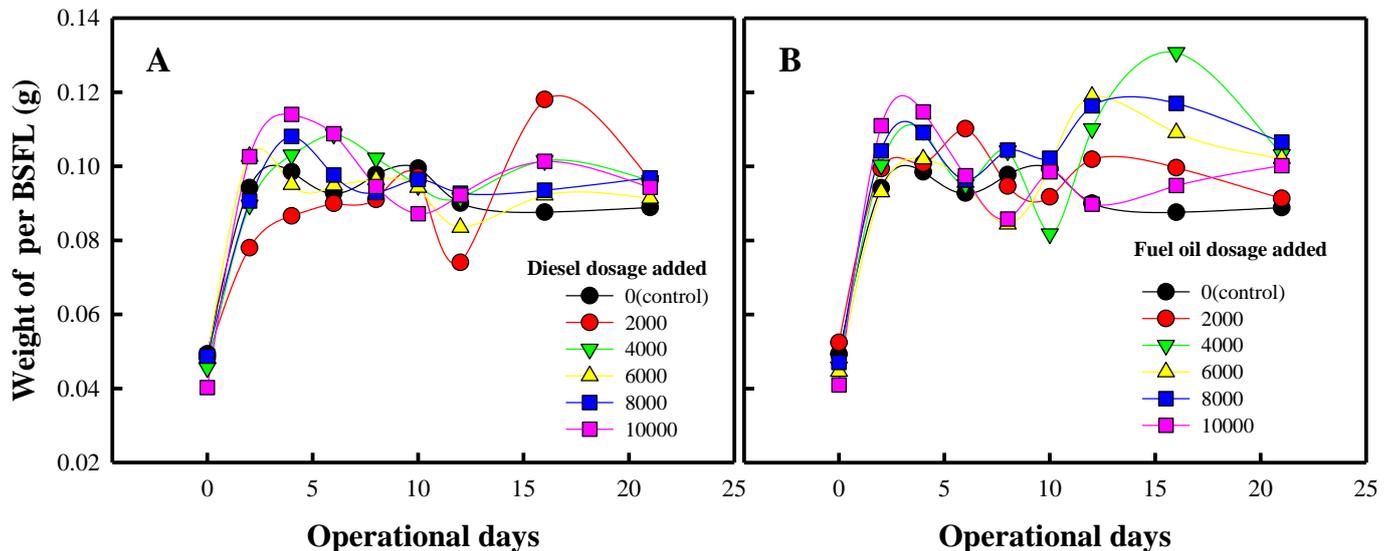


圖 5-4 三齡 BSFL 在不同(A)柴油(B)燃料油劑量下生長之蟲重變化(N=10)

圖 5-4 B 顯示，在燃料油部分，每隻 BSFL 從對照組之 0.040 - 0.050 g 增至第 2 天之 0.080 - 0.100 g，除 6,000 mg/kg 燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重與對照組相近外，其它劑量下，每隻 BSFL 蟲體重明顯高於對照組。第 4 天時，不同燃料油劑量仍持續呈現增重之現象，2,000-10,000 mg/kg 燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重均高於對照組。第 6 天，2,000 mg/kg 燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重明顯高於其它劑量，其它劑量，每隻 BSFL 蟲體重與對照組相近；第 8 天後，不同劑量對每隻 BSFL 蟲體重之影響呈現不規則。第 10 天，大部分燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重高於對照組，此現象至第 12 天時，呈現更大的差異性。三齡 BSFL 受燃料油污染土壤，蟲體大小及重量變化之外觀圖(圖 5-8 及圖 5-9)

比較柴油與燃料油，初期階段(前 4 天)，相同油品劑量，每隻生長在燃料油 BSFL 蟲體重較柴油為大，柴油對 BSFL 利用米糠之影響明顯大於燃料油。在後期階段(12-16 天)，大部分



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

燃料油劑量，每隻 BSFL 蟲體重高於對照組；柴油劑量，則僅在第 16 天呈現此現象，此是否意謂 BSFL 對油品中高低碳數 TPH 之轉換及利用相關，可由後續 BSFL 蟲體內高低碳數 TPH 劑量及性質與菌相豐富度分析，會較有清楚的輪廓。



圖 5-5 三齡 BSFL 在對照組土壤 (A)第 0 天 (2) 第 4 天 之大小及重量變化



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

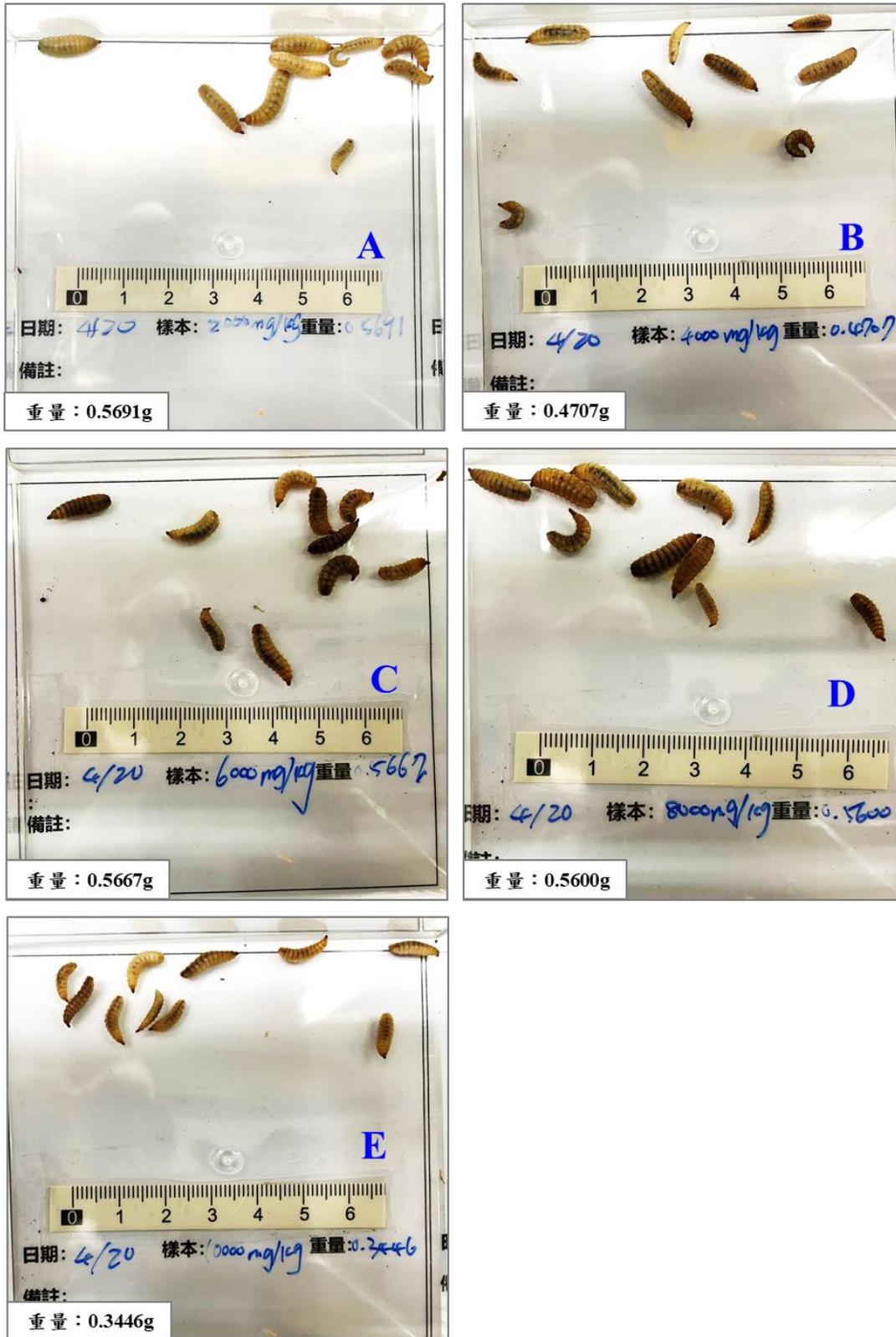


圖 5-6 三齡 BSFL 在受柴油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 試驗之蟲體大小及重量變化(第 0 天)



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

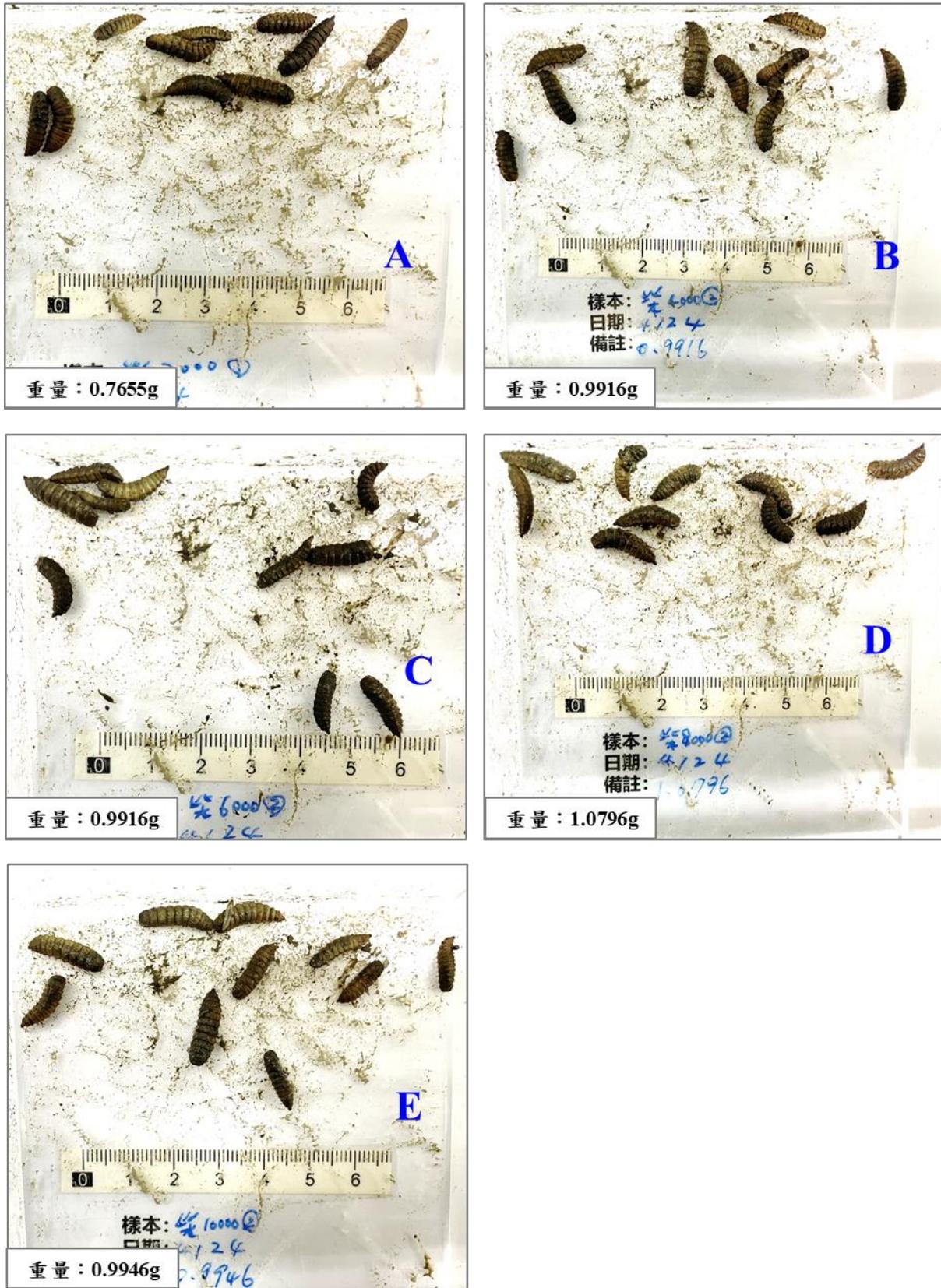


圖 5-7 三齡 BSFL 在受受柴油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 試驗之蟲體大小及重量變化(第 4 天)



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

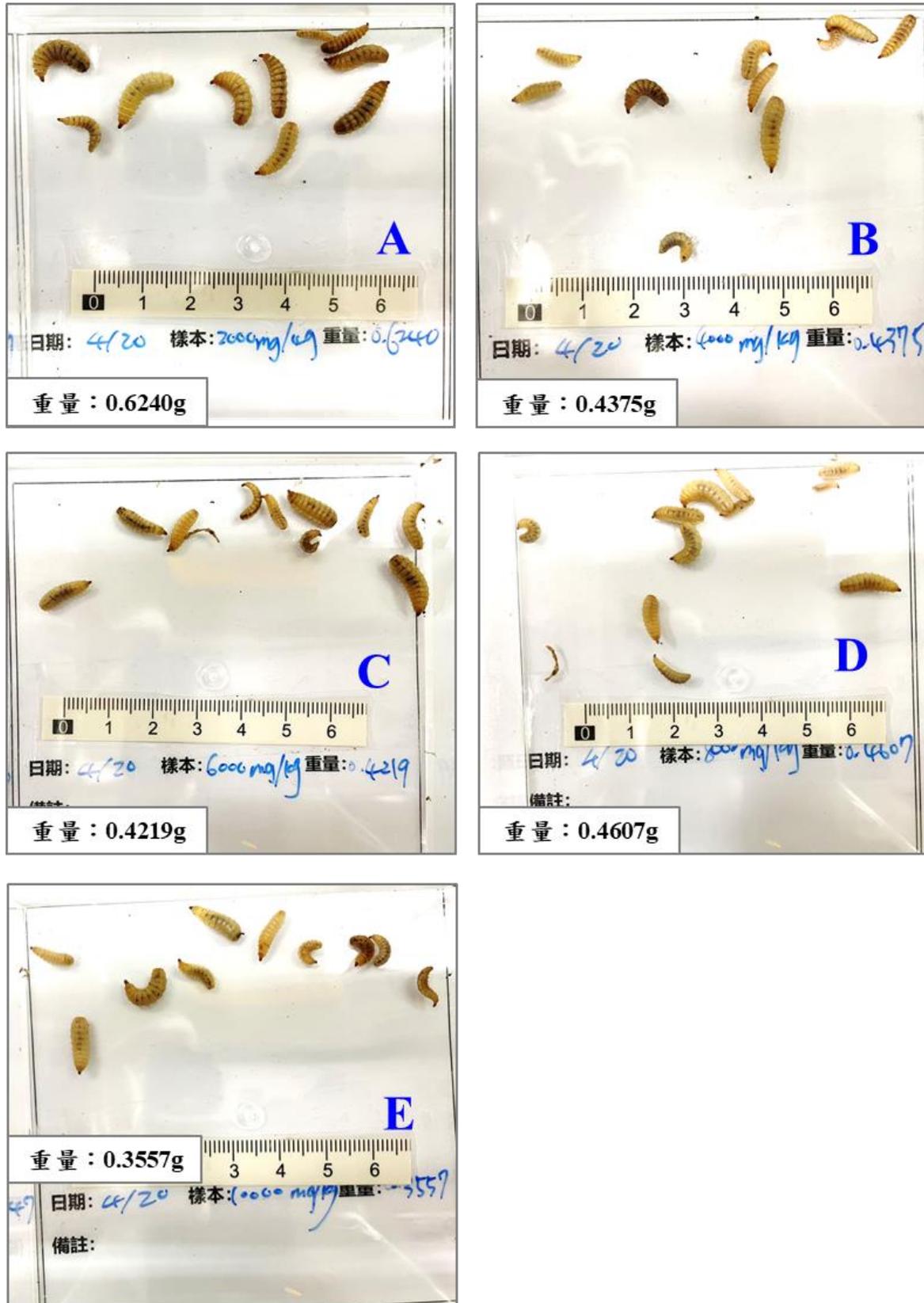


圖 5-8 三齡 BSFL 在受燃料油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 之蟲體大小及重量變化(第 0 天)



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

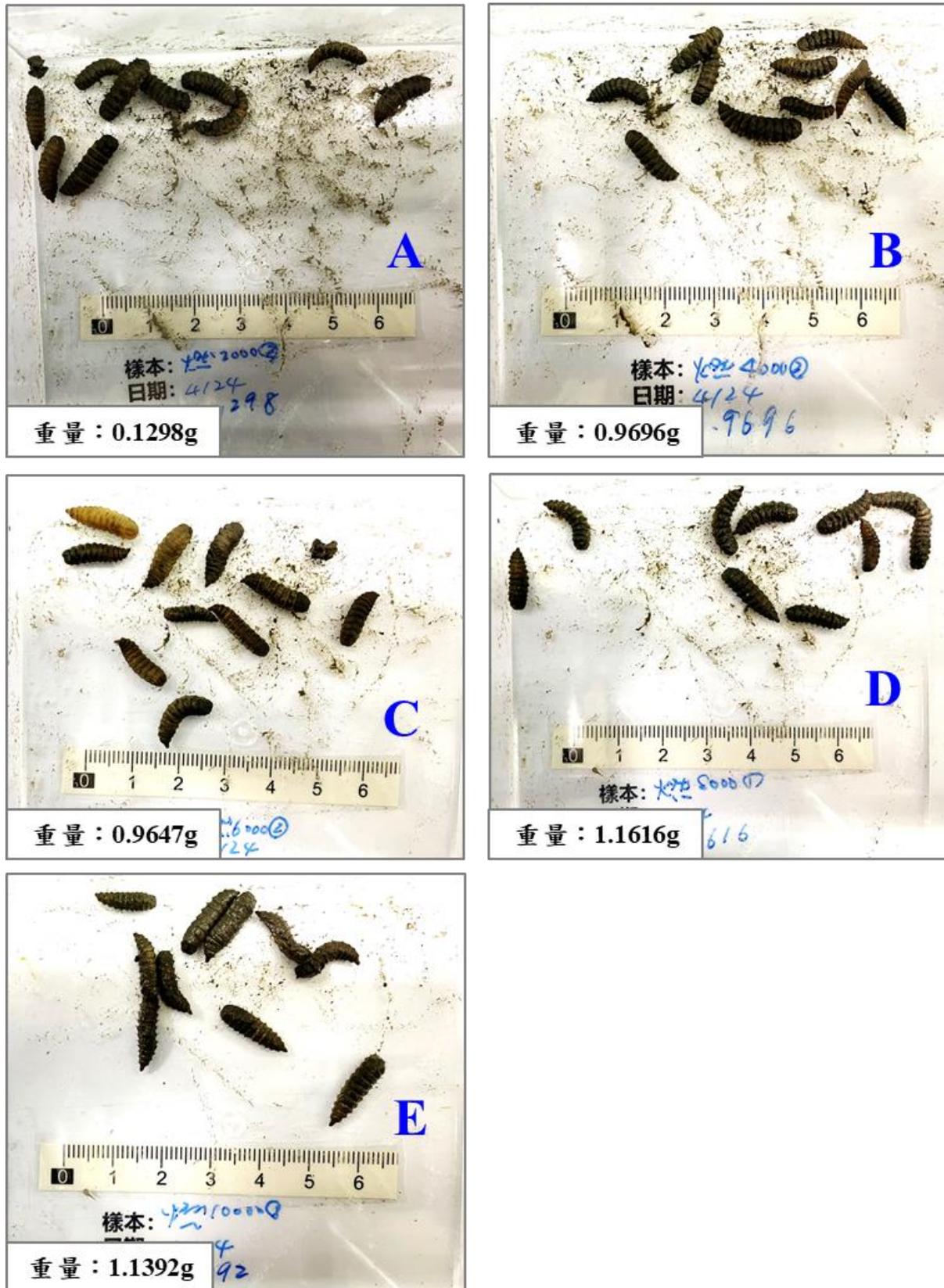


圖 5-9 三齡 BSFL 在受燃料油污染土壤 (A) 2,000 mg/kg (B) 4,000 mg/kg (C) 6,000 mg/kg (D) 8,000 mg/kg (E) 10,000 mg/kg 之蟲體大小及重量變化(第 4 天)



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

圖 5-10 為 BSFL 於受不同柴油與燃料油濃度污染土壤之成長速率((收樣前重-起始蟲重)/收樣時間)(growth rate)。圖 5-10 A 顯示在未添加柴油之背景土，僅添加米糠 10% 之對照組，經 21 天培養後，其生長速率為 6.9 g/day。當土壤中柴油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 之生長速率增至 12.6 g/day，高於對照組，顯示 BSFL 除對原米糠有移除轉換之外，另添加之柴油亦可為其利用，轉換為生質體重；土壤中柴油劑量增為 4,000 mg/kg，BSFL 之生長速率，降至 10.1 g/day，但仍高於對照組，BSFL 對米糠及柴油劑量仍有利用效能，但土壤中柴油劑量增加時，BSFL 之成長速率也隨之下降；土壤中柴油劑量為 6,000-8,000 mg/kg，BSFL 之生長速率則持續降至 8.0-8.1 g/day，但仍高於對照組，高柴油劑量對 BSFL 之生長速率仍有一定的抑制能力；當土壤中柴油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 之生長速度反升至 11.1 g/day，是否因 BSFL 攝入油品，蟲體難以分解油品或土壤微粒，故產生增重現象，此部分可由 BSFL 蟲體內高低碳數 TPH 劑量增加，進行確認。

當受污染土壤中燃料油劑量為 2,000 mg/kg (圖 5-10 B)，BSFL 之生長速率為 8.5 g/day，高於對照組 6.9 g/day，顯示 BSFL 在燃料油劑量為 2,000 mg/kg，可增加對米糠或柴油之利用效能；土壤中燃料油劑量增為 4,000 mg/kg，BSFL 之生長速率增至 15.4 g/day，高於對照組及燃料油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 對米糠及燃料油劑量利用效能，持續放大；土壤中燃料油劑量為 6,000-8,000 mg/kg，BSFL 之生長速率則降至 11.7-12.7 g/day，但仍高於對照組，高柴油劑量對 BSFL 之生長速率已受到抑制；當土壤中柴油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 之生長速率則持續下降至 9.7 g/day，推測 BSFL 攝入過多油品，影響 BSFL 腸道內菌相活性，降低 BSFL 轉換生物質之能力。整體而言，在 2,000-10,000 mg/kg 柴油或燃料油劑量之受污染土壤，BSFL 成長速率均高於對照組，BSFL 對米糠及柴油之利用轉換，受油品劑量影響，且在 4,000-8,000mg/kg 範圍，BSFL 在燃料油之成長速率表現優於柴油，但在 10,000 mg/kg 柴油或燃料油劑量，柴油略高於燃料油，BSFL 於不同油品劑量生長速率之表現呈現相反，此部分在後續 BSFL 蟲體在不同油品對高低碳數 TPH 劑量之變動，會有更清楚的說明。

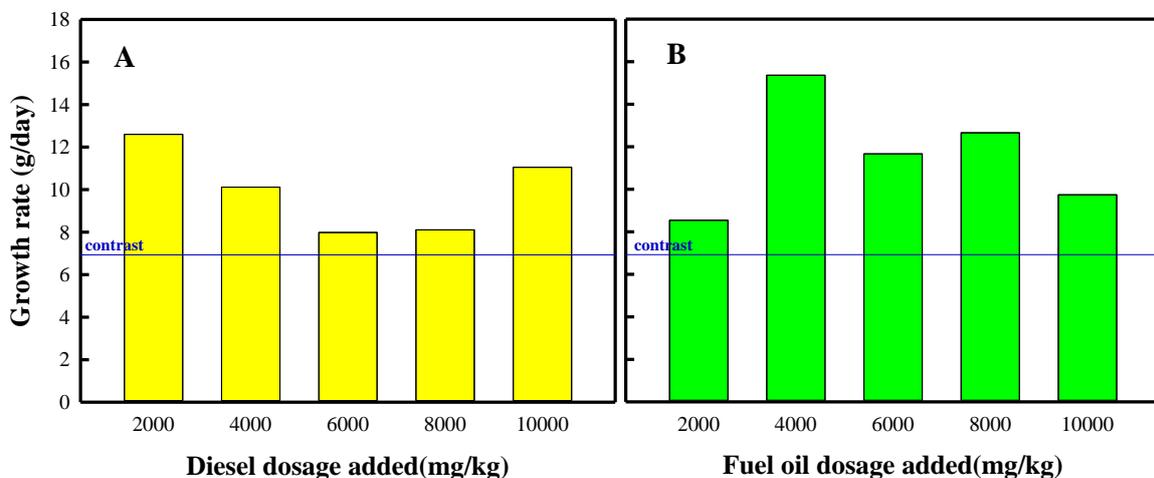


圖 5-10 BSFL 在受二種不同油品濃度污染土壤之成長速率(A)柴油 (B)燃料油(21 天)



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

關於 BSFL 於兩種油品在高濃度 10,000 mg/kg 之死亡外觀，整理如圖 5-11。圖 5-11A 顯示 BSFL 在 10,000 mg/kg 柴油劑量，BSFL 在第 2 天死亡後，蟲體觀察記錄，在體長有大及小，形狀變扁及扭曲，同樣現象，亦發生燃料油部分(圖 5-11 B)。關於 BSFL 在逆向環境條件，除會造成 BSFL 之死亡外，亦可能造成 BSFL 提前預蛹。在本研究進行 BSFL 於不同油品劑量環境生長 21 天，BSFL 整體死亡率及預蛹率結果，整理於圖 5-12 及圖 5-13。不同油品劑量對 BSFL 死亡率之影響(圖 5-12)，在柴油部分，其值落於 0.8-1.3%，燃料油則介於 0.2-0.7%，對照組 (土樣+米糠)之 BSFL 僅 0.2%。整體而言，BSFL 於燃料油之死亡率，比較同劑量油品，均低於 BSFL 於柴油之值。不同油品劑量對 BSFL 預蛹率之影響(圖 5-13)，在柴油部分，其值落於 3.5-6%，燃料油則介於 2.5-4.5%，對照組 (土樣+米糠)之 BSFL 僅 1.5%，整體而言，BSFL 於燃料油之預蛹率，比較同劑量油品，均低於 BSFL 於柴油之值。整合預蛹率及死亡率，BSFL 幼蟲持續存活於受油品污染土壤之比例，超過 90%，甚至 BSFL 在 10,000 mg/kg 高劑量油品之存活率，仍可高達 95%，此代表 BSFL 對油品之耐受程度相當高。

關於 BSFL 在兩種不同劑量油品下之蟲蛹羽化之相片如圖 5-14 及圖 5-15，對照組之 BSF 成蟲羽化應是可預期，然而其它不同劑量柴油，部分預蛹亦可產生羽化，此部分亦發生於其它預蛹週次，這是值得關注之議題。預蛹之羽化率則整理於圖 5-16。圖 5-16 對照組羽化率為 75%，柴油根據濃度依序為 85、79、74、69 及 70 %；燃料油根據濃度依序為 78、70、72、88 及 63 %。在 10,000mg/kg 高劑量燃料油，亦可發生羽化。另受限 TPH 之量測方式，少量 BSFL 預蛹及成蟲則難以量測低碳數及高碳數 TPH 之殘留情形，此部分會建議增加樣本數，最後再採混合樣本之方式進行 TPH 量測，應是可行的方式。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

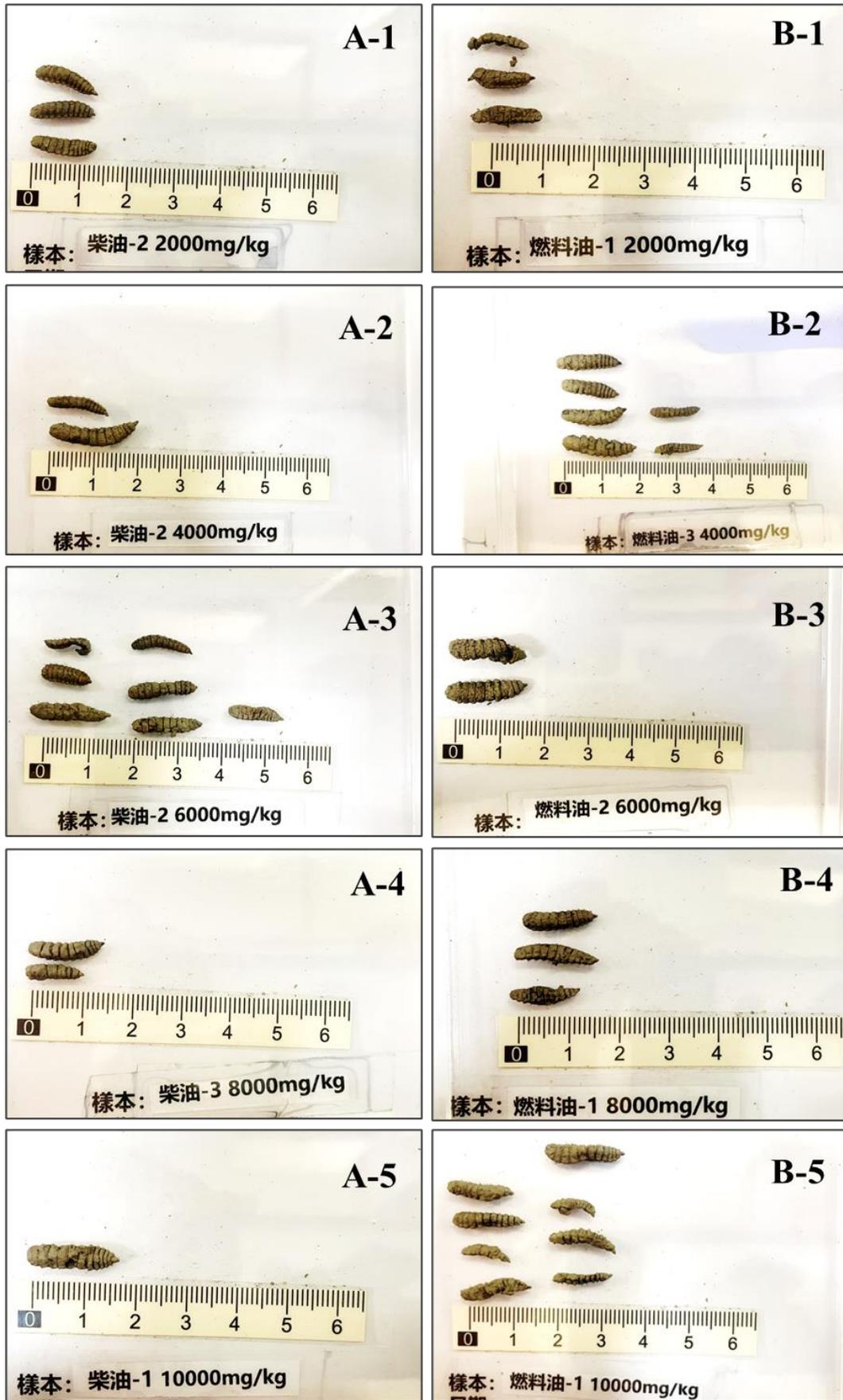


圖 5-11 三齡 BSFL 第 10 天死亡外觀相片(A)柴油 (B)燃料油 (10,000 mg/kg)



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

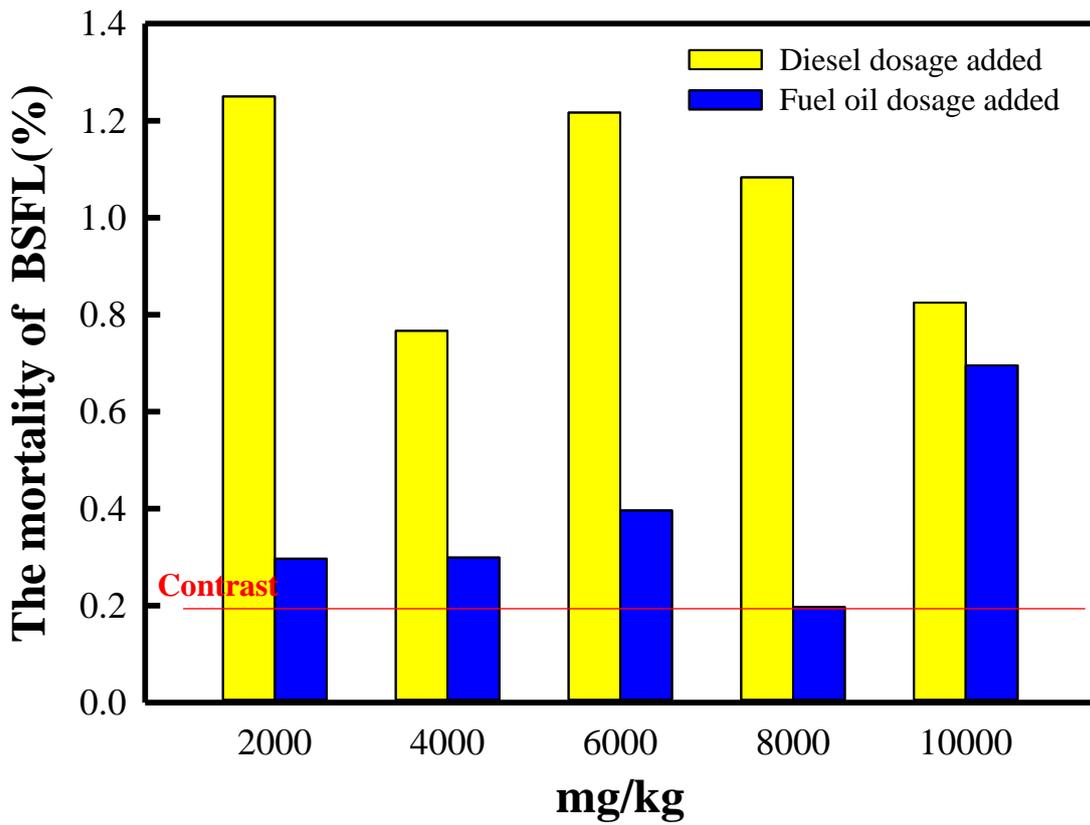


圖 5-12 三齡 BSFL 在 21 天內蟲體之總死亡率變化

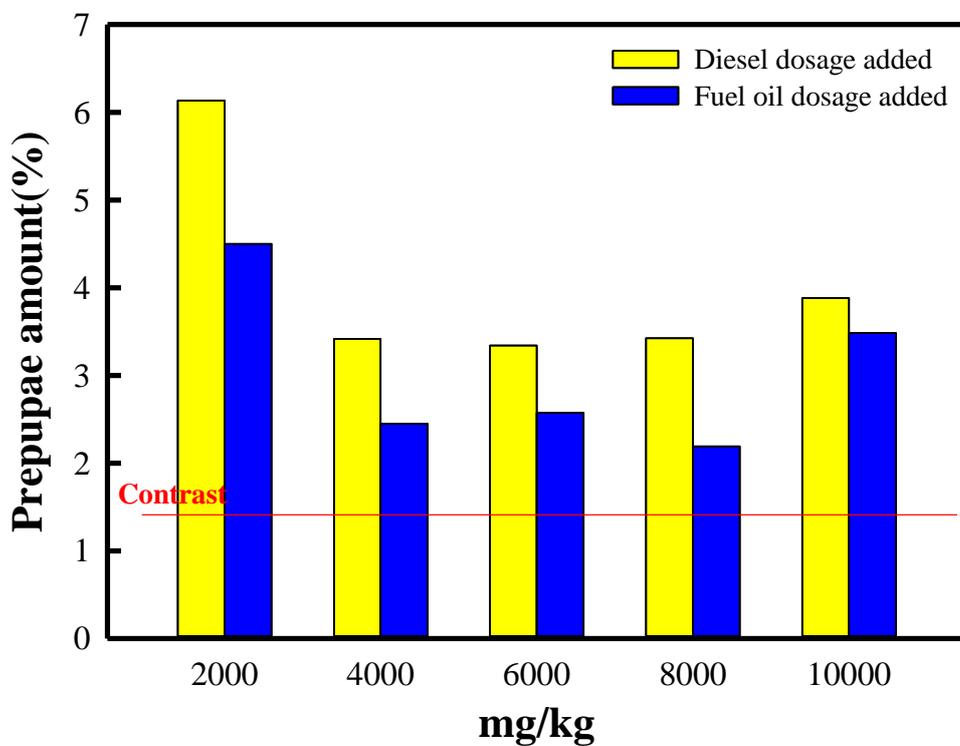


圖 5-13 三齡 BSFL 在 21 天內蟲體之總預蛹率變化



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

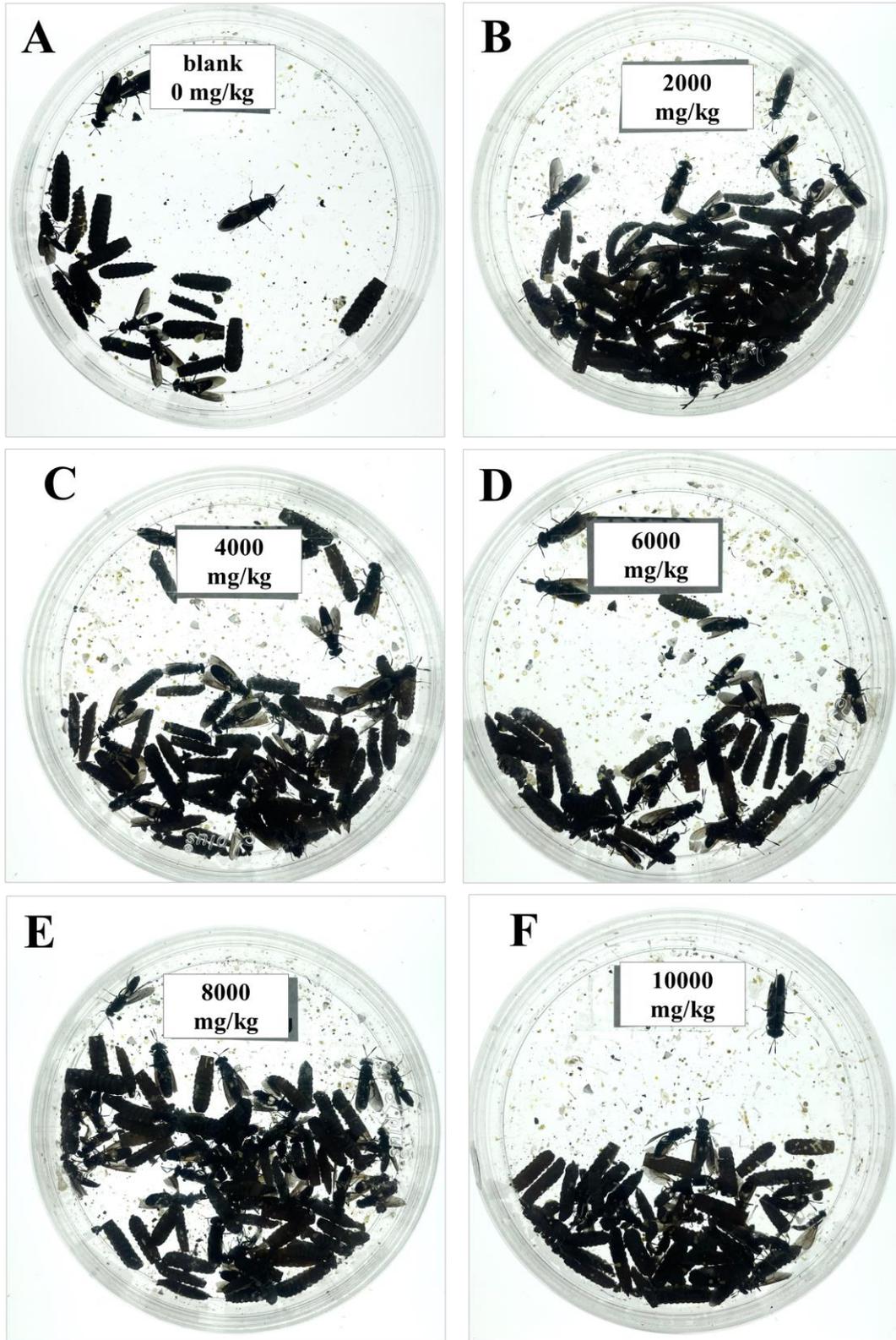


圖 5-14 三齡 BSFL 生長於不同劑量柴油下，試驗期間(21 天)蟲蛹之羽化狀況



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

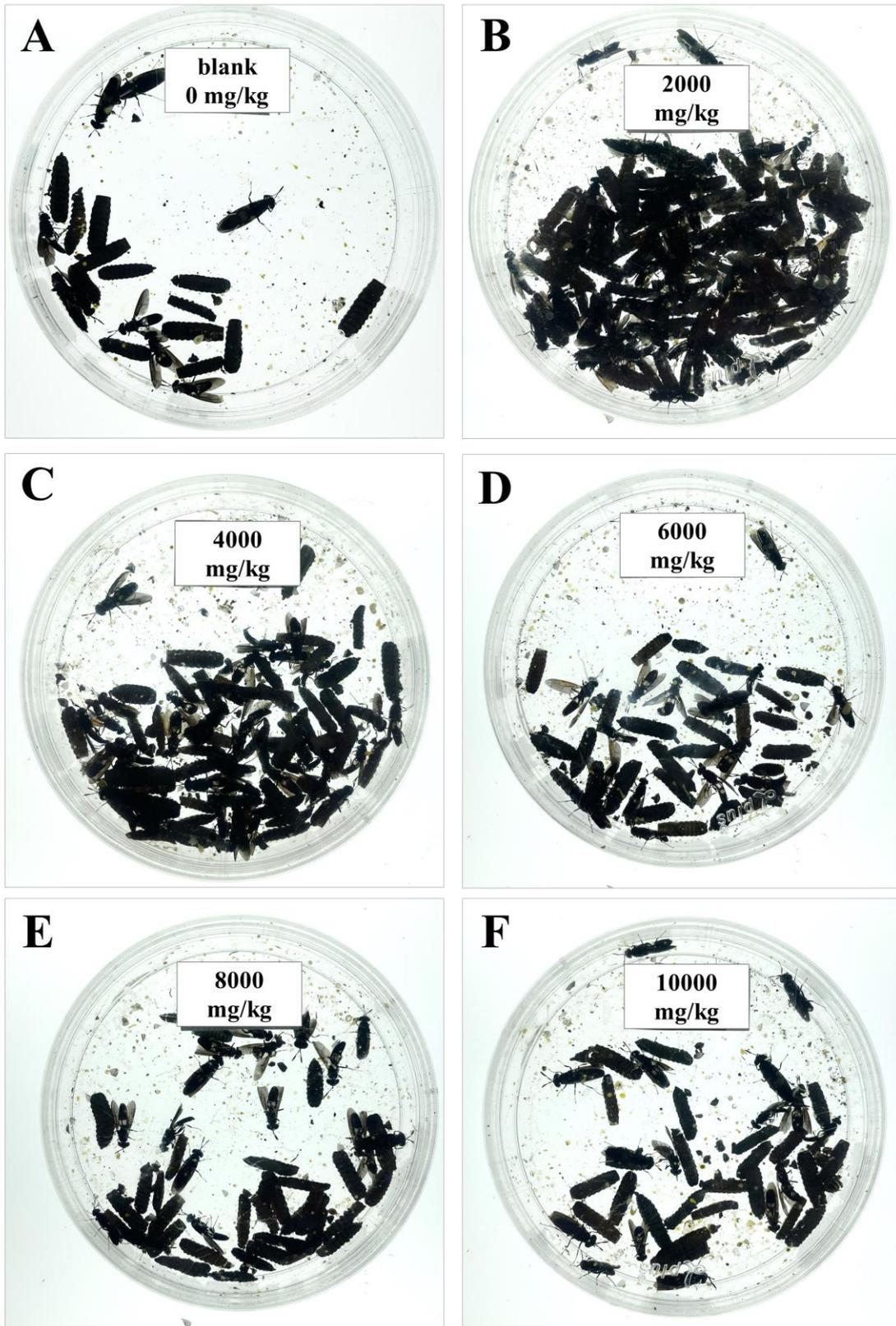


圖 5-15 三齡 BSFL 生長於不同劑量燃料油下，試驗期間(21 天)蟲蛹之羽化狀況



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

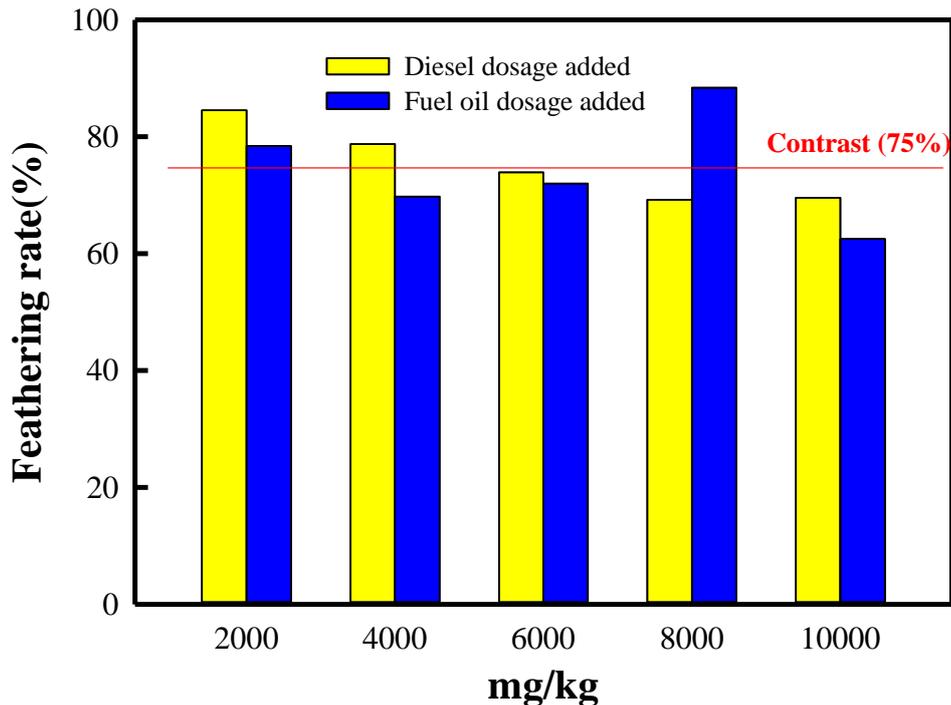


圖 5-16 三齡 BSFL 在試驗期間(21 天)內蟲蛹之羽化率

### 5.1.3 濁度法、FEEM 與同步螢光掃描法及 GC-FID 進行 TPH 濃度分析

關於 TPH 之濃度分析，考量實驗項目規劃，本研究選定濁度法、FEEM 與同步螢光掃描法及 GC-FID 法進行比較。目前，完成前二項之檢量線及對應樣本之測定，並分述說明如下。

圖 5-17 為兩種油品，包括柴油與燃料油，在 2,000-10,000 mg/kg，以濁度法進行之檢量線製作。在柴油部分，濁度與 TPH 之線性關係式為  $Tur=0.0072 \times TPH-16.692$ ， $R=0.8909$ 。在料油部分，濁度與 TPH 之線性關係式為  $Tur=0.0622 \times TPH-191.81$ ， $R=0.8973$ 。比較兩油品之斜率，R 值低於 0.9，在數據明顯與 6,000 mg/kg 訊號強度低於 4,000 mg/kg，此部分實驗將會進行重新補測測試。另柴油之值高於燃料油，表示單位油品濃度，柴油之訊號敏感度高於燃料油，應與兩油品成份及結構，導致油品溶於界面活性劑之不同相關。

取出受污染土壤 (A)柴油 10,000 (mg/kg) (B)燃料油 10,000 (mg/kg)經三齡 BSFL 處理後之樣本，經去離子水萃取後之螢光激發發射光譜圖(Fluorescent excitation emission matrix, FEEM)，整理如圖 5-18。圖 5-18 A-1 柴油濃度為 10,000 mg/kg 之特徵位置為 Ex/Em 280 nm/330 nm(205) 及 Ex/Em 310/420 nm (194)；圖 5-18 A-2 柴油經 BSFL 處理 7 天後，其特徵位置及強度轉換至為 EX/EM 280/340 nm (894)及 230/330 nm (917)，除 Ex/Em 位置變動外，螢光強度也變得更強。圖 5-18 B-1 為 10,000 mg/kg 柴油濃度，Ex/Em 特徵位置及螢光強度為 Ex/Em 450/510 nm(166)，經 BSFL 處理 7 天後(圖 5-18 B-2)，Ex/Em 特徵位置及螢光強度為 Ex/Em 340/410 nm(1086)及 Ex/Em 300/380 nm(685)，除 Ex/Em 衍生新的特徵波峰外，Ex/Em 位置移動較短波長，顯示 BSFL 對油品分解及 BSFL 代謝物釋出產生，均是可能原因。

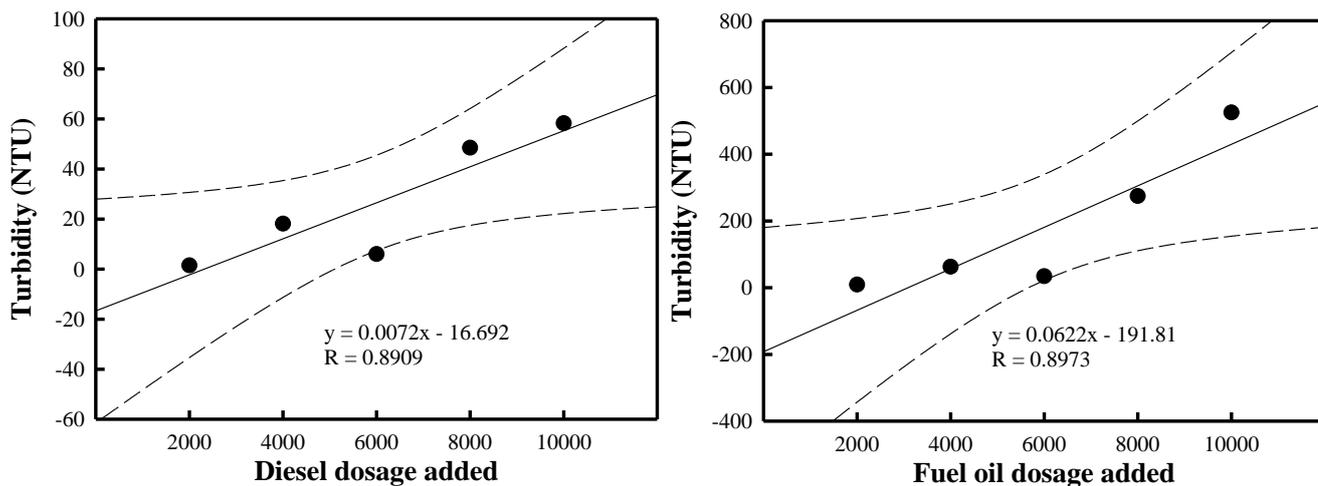


圖 5-17 TPH 快篩-濁度法之檢量線(A)柴油(B)燃料油

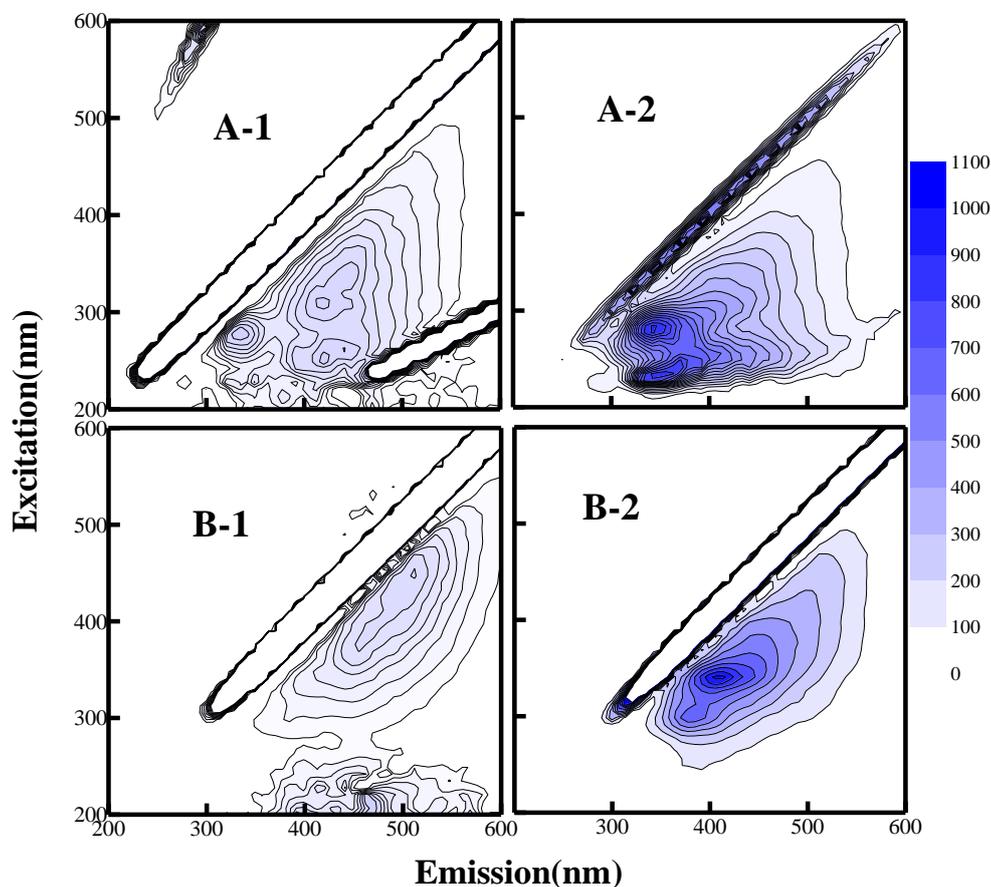


圖 5-18 去離子水萃取受污染土壤 (A)柴油 10,000 (mg/kg) (B)燃料油 10,000 (mg/kg); (1) 0 day (2) 7 天 FEEM 之 FFEM 圖

圖 5-19 為 SFS 在兩種人工配製之油品分析，包括 $\Delta\lambda$ 之選擇、特徵波峰之選擇及檢量線之製作。在 $\Delta\lambda$ 之選擇，在考量波峰訊號強度及波型，柴油取 40 nm(圖 5-19 A-1)，燃料油則是取 30 nm 為宜(圖 5-19 A-2)，對應 Ex 波長分別 340 nm 及 410 nm。在 2,000-10,000 mg/kg 之 SFS



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

全譜圖，柴油之結果，整理如圖 5-19 B-1，燃料油則是整理如圖 5-19 B-2。TPH 分析，以特徵 Ex 波長之螢光強度值對 TPH 濃度進行檢量量線製作，在柴油部分， $S_{FI}$  與 TPH 之線性關係式為  $S_{FI}=0.039 \times TPH + 420.11$ ， $R=0.9715$ (圖 5-19 C-1)；在燃料油部分， $S_{FI}$  與 TPH 之線性關

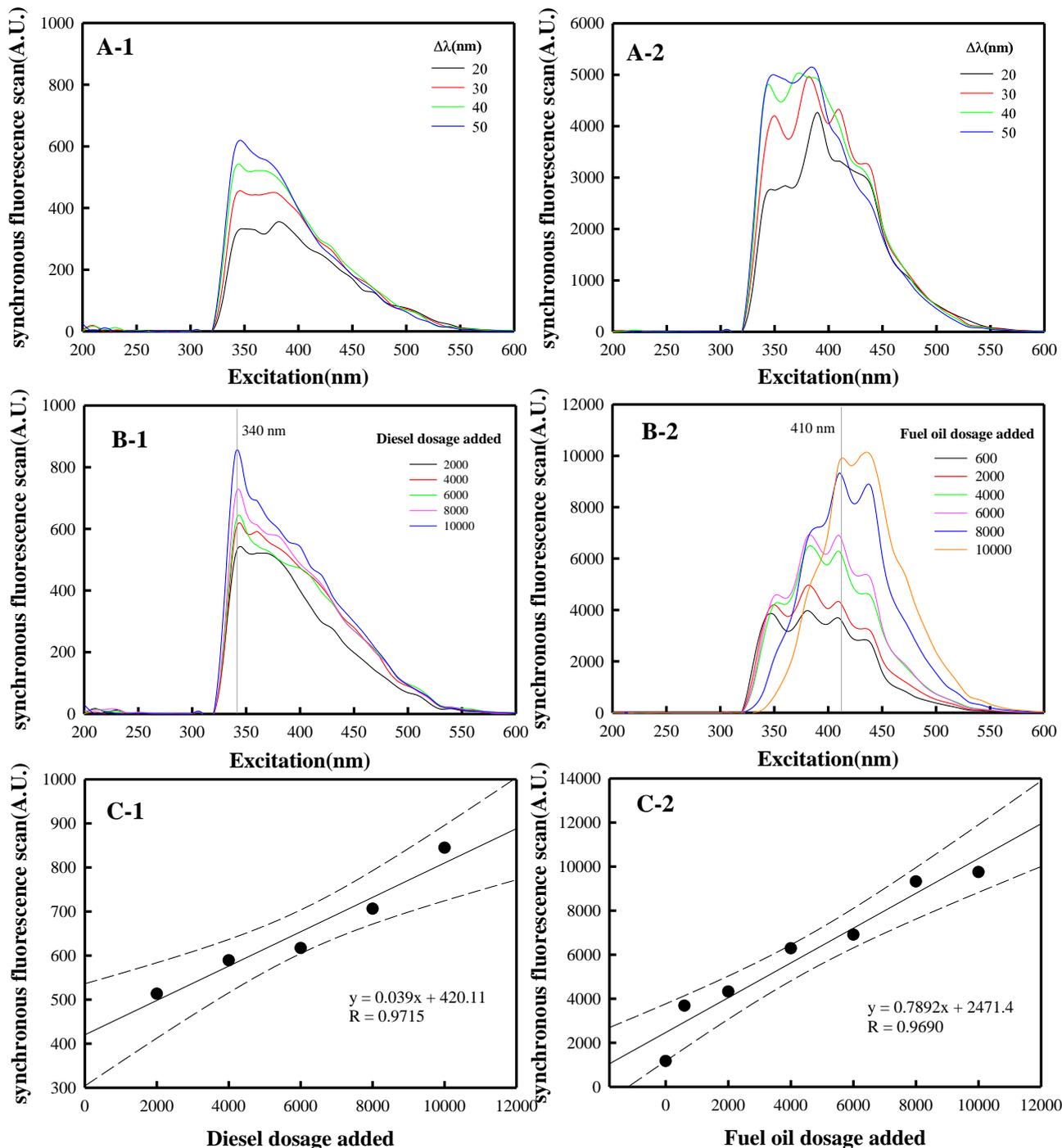


圖 5-19 (A) $\Delta\lambda$ 對 SFS 之影響(B)不同油品濃度之 SFS 掃描(C)檢量製作(1)柴油(2)燃料油

係式為  $S_{FI}=0.7892 \times TPH + 2471.4$ ， $R=0.9690$ (圖 5-19 C-2)。比較兩油品之斜率，柴油之值低於燃料油，表示單位油品濃度，柴油訊號敏感度低於燃料油，此結果與濁度法相反，兩者之檢測原理及偵檢器感度之不同，均是可能之因素。



圖 5-20 為兩種油品在低碳數(C6 ~ C9)及高碳數(C10 ~ C50)TPH 之檢量線，關於兩種油品不同劑量之 GC/FID 圖譜分析詳見附錄 1。柴油低碳數 TPH 積分面積對應柴油劑量之檢量線為關係式  $Area_{low-carbon}=0.49 \times TPH + 111.8$ ， $R=0.951$ (圖 5-20 A-1)；燃料油低碳數 TPH 積分面積對應油劑量之檢量線為  $Area_{low-carbon}=0.0289 \times TPH + 105.81$ ， $R=0.945$ (圖 5-20 B-1)；柴油高碳數 TPH 積分面積對應柴油劑量之檢量線為  $Area_{high-carbon}=0.0606 \times TPH + 47.383$ ， $R=0.942$ (圖 5-20 A-2)；燃料油高碳數 TPH 積分面積對應燃料油劑量之檢量線為  $Area_{high-carbon}=0.119 \times TPH + 139.5$ ， $R=0.995$ (圖 5-20 B-2)。

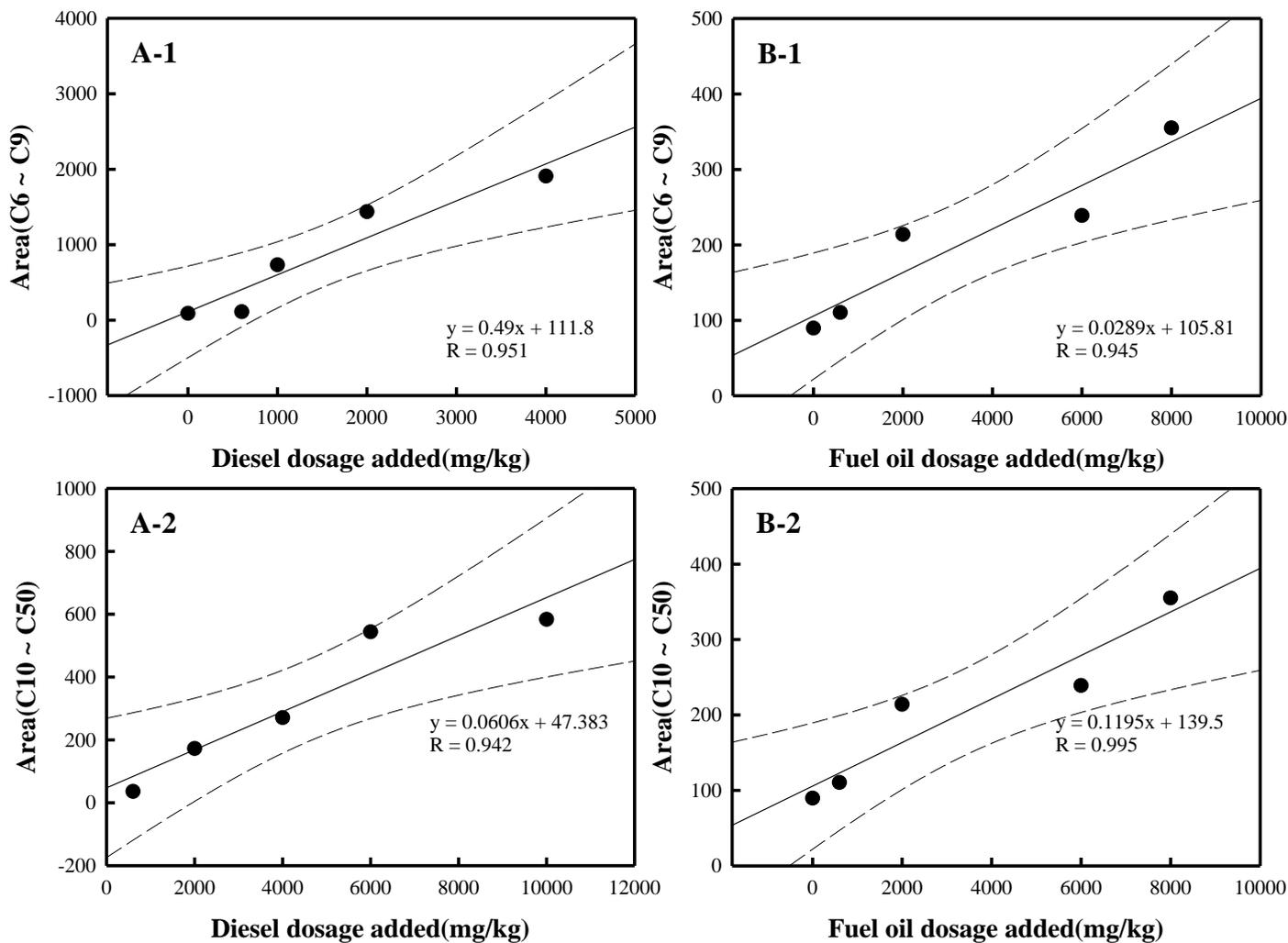


圖 5-20 (A)柴油(B)燃料油之(1)低碳數(C6 ~ C9) (2)高碳數(C10 ~ C50) TPH 之檢量線(信賴區間 95 %)

#### 5.1.4 受油品污染土壤經 BSFL 處理後，土壤及 BSFL 之 TPH 含量

在含不同油品劑量經 BSFL 處理後，土壤中殘留 TPH 之測定，本研究初期採 SFS 及 GC/FID 方法比較。關於兩種油品於不同劑量經 BSFL 處理後 SFS 之特徵波峰強度，整理圖 5-21。圖



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

5-21A 顯示對照組經 BSFL 處理 7 天及 21 天，對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 362 及 521，對應之劑量分別為 < 2000 mg/kg 及 2587 mg/kg，代表 BSFL 在無油品存在時，其可利用空白土壤中及米糠的有機物，產生的代謝物可在 EX=310 nm 產生螢光強度，且隨著處理時間之增長，訊號強度也隨之放大，對應似柴油劑量也隨之增加；在柴油劑量 2,000 mg/kg，經 BSFL 處理 7 天及 21 天，對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 514 及 289，對應之劑量分別為 3,969 mg/kg 及 2,636 mg/kg，高於初始添加之柴油劑量 2,000 mg/kg，其原因應來自於 BSFL 本身釋放出似柴油物質所致；在柴油劑量 4,000 mg/kg，經 BSFL 處理後不同天數對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 456 及 790，對應之劑量分別為 6,054 mg/kg 及 6,923 mg/kg，高於初始添加之柴油劑量 4,000 mg/kg，其原因與 BSFL 本身釋放出似柴油物質相關；在柴油劑量 6,000 mg/kg，經 BSFL 處理 7 天及 21 天，對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 516 及 510，對應之劑量分別為 6,584 mg/kg 及 2,800 mg/kg，7 天之 TPH 濃度高於初始添加之柴油劑量 6,000 mg/kg，其原因與前述同，但 21 天後，土壤中 TPH 之移除率，則有 53%；在柴油劑量 8,000 mg/kg，經 BSFL 處理 7 天及 21 天，對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 544 及 867，對應之劑量分別為 7,117 mg/kg 及 8,451 mg/kg，前者低於初始添加量，而後者高於初始添加之柴油劑量 8,000 mg/kg，代表 BSFL 利用柴油或釋放擬柴油成份間之競合關係相關；在柴油劑量 10,000 mg/kg，經 BSFL 處理 7 天及 21 天，對應 EX=340 nm 螢光強度分別為 517 及 687，對應之劑量分別為 8,226 mg/kg 及 10,000 mg/kg。受限 SFS 以最大特徵螢光強度，無法區別原油品與濃度之差異性，但以積分面積進行或採多點螢光特徵波峰強度值或導入 peak-fit 分解圖譜，強化劑量感度差異化，低劑量濃度可以進行判別，將是未來可持續進行方式。

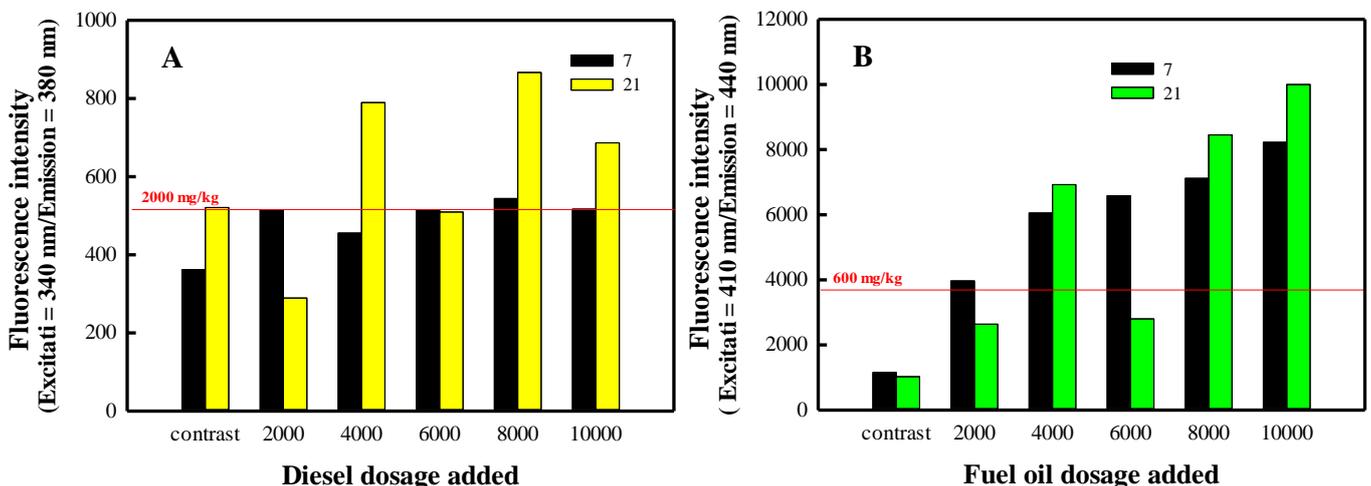


圖 5-21 三齡 BSFL 處理不同油品(A)柴油(B)燃料油劑量，土壤中 TPH 殘留劑量(SFS 螢光特徵波峰強度)

對照組經 BSFL 處理後在 7 天及 21 天，對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 1,154 及 1,024，對應之劑量均小於 600 mg/kg，代表 BSFL 在無油品存在時，其可利用空白土壤中及米糠的有機物，產生的代謝物可在 EX=410 nm 產生螢光強度，可視為似燃料油成份，訊號強度並未隨



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

BSFL 處理時間之增長而放大(圖 5-21 B);在燃料油劑量 2,000 mg/kg, 經 BSFL 處理 7 天及 21 天, 對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 3,969 及 2,636, 對應之劑量分別為 1,897 mg/kg 及 209 mg/kg, 低於初始添加之柴油劑量 2,000 mg/kg, 土壤 TPH 之移除率分別為 5 % 及 90 %, 若扣除似燃料油含量, 相信 BSFL 移除燃料油能力應可提昇;在燃料油劑量 4,000 mg/kg(圖 5-21 B), BSFL 處理 7 天及 21 天, 對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 6,054 及 6,923, 對應之劑量分別為 4,540 mg/kg 及 5,641 mg/kg, 高於初始添加之柴油劑量 4,000 mg/kg, 應與 BSFL 產生似燃料油含量相關。在燃料油劑量 6,000 mg/kg(圖 5-21 B), BSFL 處理 7 天及 21 天, 對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 6,584 及 2,800, 對應之劑量分別為 5,211 mg/kg 及 416 mg/kg, 均低於初始添加之燃料油劑量 6,000 mg/kg, 土壤中 TPH 移除率分別為 13 % 及 93 %, 事實上, 若排除似燃料油含量, 相信 BSFL 移除燃料油之效能應可提昇;在燃料油劑量 8,000 mg/kg(圖 5-21 B), 經 BSFL 處理 7 天及 21 天, 對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 7,117 及 8,451, 對應之劑量分別為 5,886 mg/kg 及 7,577 mg/kg 低於初始添加之柴油劑量 8,000 mg/kg, 去除率分別為 26 % 及 5 %, 若扣除似燃料油劑量, 相信 BSFL 處理料油能力應可提昇;在燃料油劑量 10,000 mg/kg(圖 5-21 B), 經 BSFL 處理 7 天及 21 天, 對應 EX=410 nm 螢光強度分別為 8,226 及 10,000, 對應之劑量分別為 5,211 mg/kg 及 416 mg/kg 低於初始添加之柴油劑量 10,000 mg/kg, 去除率分別為 27 % 及 5 %, 若扣除似燃料油劑量, BSFL 移除土壤中燃料油劑量之效能應可提昇。

受限 SFS 以最大特徵螢光強度, 呈現 BSFL 對受油品染土壤之移除效能, 但無法區別似柴油或似燃料油成份對 BSFL 對原油品去除之干擾, 但採積分面積或採多點螢光特徵波峰強度值或導入 peak-fit 分解圖譜進行討論, 應是值得探討的方向。綜合 SFS 螢光特徵波峰強度值進行 BSFL 去除含油品土壤之效能評估, 初步顯示應可作為 BSFL 對油品初步減量之替代判讀工具, 但在量化部分, 採多點螢光特徵波峰強度值或 SFS 圖譜面積計算法或導入 peak-fit 分解圖譜, 重新製作檢量線, 分析樣本濃度, 應可提昇方法應用之可能性。經此方法初步瞭解受油品污染土壤經 BSFL 處理後, 土壤油品 TPH 劑量確實有減少, 且可能濃縮於 BSFL 蟲體, 但 BSFL 蟲體是否可進一步去除 TPH, 則仍有待 GC/FID 進行受油品污染土壤及 BSFL 蟲體之低碳數(C6 ~ C9)及高碳數(C10 ~ C50)T 之檢測分析, 才能進一步討論。

關於土壤樣本中 TPH 含量之測定, 本研究分別以 GC/FID 之低碳數(C6 ~ C9)及高碳數(C10 ~ C50)分析, 進行相關探討。在探討含油品土樣中 TPH 劑量經 BSFL 移除效能前, 需先瞭解背景土樣、添加米糠及兩種油品標準品之低碳數 TPH 之圖譜, 整理於圖 5-22。圖 5-22 A 顯示背景土樣低碳數圖譜分析, 在停留時間 4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值, 對應積分面積分別為 29.1、25.5、35.2 及 10.0; 米糠積分面積採稀釋 10 倍進行(因添加量佔土樣 10%)之低碳數圖譜分析(圖 5-22 B), 除停留時間 3.0 min, 對應之 10 % 積分面積為 22.4, 與背景土樣不同外, 4.1 min、4.5 min 及 4.8 及 5.7 min 有明顯訊號值, 與背景土樣相同, 對應積



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

分面積分別為 22.4、3.1、3.1 及 2.0，低於背景土樣之值，在未來分析含油品土樣，仍需注意其換算劑量之扣除。

圖 5-22 C 顯示 2,000 mg/kg 柴油標準品低碳數 TPH 圖譜分析，在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min、5.4 min、5.7 min 及 6.7 min 有明顯訊號值，對應積分面積分別為 129.6、345.3、386.4、418.0、122.4、378.5 及 34.9，均遠大於背景土樣及糠於相同停留時間之對應積分面積，意謂米糠對含油品土樣之干擾，應可忽略。2,000 mg/kg 燃料油標準品低碳數圖譜分析(圖 5-22 D)，在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min 及 4.8 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 43.4、39.9、37.5、66.6 及 26.5，明顯低於柴油。

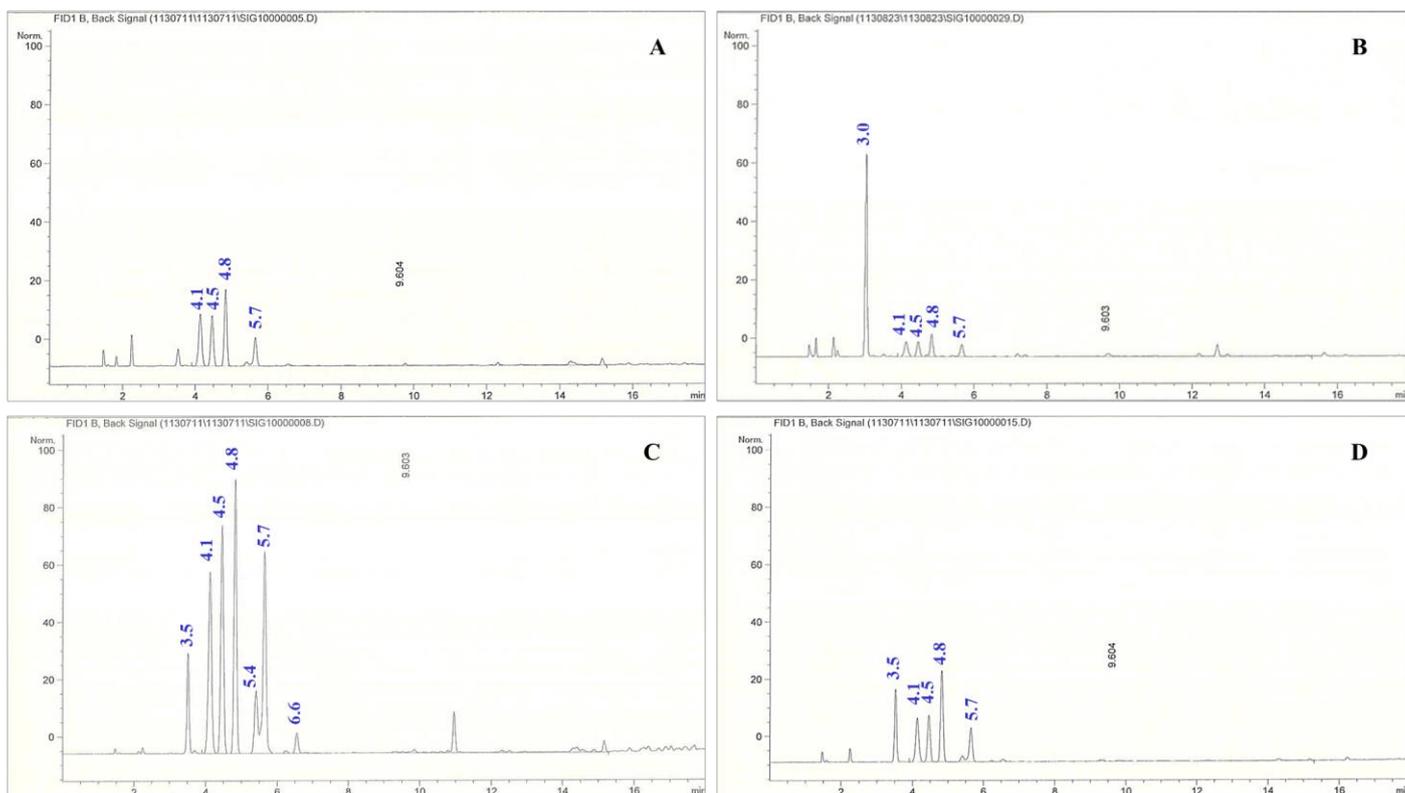


圖 5-22 (A)背景土樣及(B)米糠 (C) 2,000 mg/kg 柴油標準品(D) 2,000 mg/kg 燃料油標準品中低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 分析圖譜

圖 5-23 顯示對照組(不含油品)、2,000 mg/kg 柴油土樣及 2,000 mg/kg 燃料油土樣中經 BSFL 處理 7 天及 28 天後，土樣中低碳數 TPH (C6 ~ C9)GC/FID 分析圖譜。圖 5-23 A-1 說明對照組(不含油品)經 BSFL 處理後 7 天，土樣中低碳數 TPH 圖譜分析，發現在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應積分面積分別為 84.3、28.0、28.7、69.2 及 26.7，代表 BSFL 其生長過程中，會代謝與兩種油品相似低碳數物質；圖 5-23 A-2 顯示對照組(不含油品)經 BSFL 處理後 21 天後，土樣中低碳數 TPH 圖譜分析，發現在停留時間 3.0 min、3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應積分面積分別為 18.6、47.5、47.2、42.2、103.5 及 34.9。綜合上述說明，停留時間 4.8 min 低碳數積分面積明顯增加，約增加 1.5 倍。



圖 5-23 B-1 顯示含 2,000 mg/kg 柴油土樣經 BSFL 處理後 7 天，土樣中低碳數 TPH 之圖譜分析，發現在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 50.4、27.0、25.5、61.9 及 24.5；圖 5-23 B-2 顯示含 2,000 mg/kg 柴油土樣經 BSFL 處理後 28 天，土樣中低碳數之 GC-FID 圖譜分析，發現在停留時間 3.5 min 及 4.8 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 9.5 及 20.0，代表 BSFL 處理含 2,000 mg/kg 柴油之土壤，經 7 天後，各停留時間之積分面積與對照組相近，但經 21 天後，大部分低碳數柴油不存在於土壤，可能為 BSFL 蟲體利用轉換為生物質或累積於 BSFL 蟲體，此部分可體檢測蟲體低碳數 TPH 之成份，即可驗證。

圖 5-23 C-1 顯示含 2,000 mg/kg 燃料油土樣經 BSFL 處理後 7 天，土樣中低碳數 TPH 圖譜分析，發現在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 55.4、43.1、39.8、87.7 及 34.3；圖 5-23 C-2 顯示含 2,000 mg/kg 燃料油土樣經 BSFL 處理後 28 天，土樣中低碳數圖譜分析，發現在停留時間 3.5 min、4.1 min、4.5 min、4.8 min 及 5.7 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 67.0、21.5、21.5、53.2 及 21.0。代表 BSFL 處理含 2,000 mg/kg 燃料油之土壤，經 7 天後，各停留時間之積分面積，除 3.5 min 低於對照組外，其餘均高於對照組；經 21 天後，各停留時間，大部分低碳數之燃料油均較 7 天後為低，且低於 28 天後之對照組，代表土壤中低碳數之燃料油，部分可能為 BSFL 蟲體利用轉換為生物質或部分累積於 BSFL 蟲體，此部分可由後面章節中 BSFL 蟲體中 TPH 低碳數 GC-FID 分析圖譜，應可充份說明。

圖 5-24 為含不同油品劑量土壤經 BSFL 處理後，土壤中低碳數 TPH 圖譜積分面積之變動。關於柴油部分(圖 5-24 A)，經 BSFL 處理第 7 天後，土壤對照組之積分面積為 209，對應 TPH 劑量為 < 600 mg/kg；含 2,000 mg/kg TPH 土壤之積分面積則降至 162，對應 TPH 劑量為 < 600 mg/kg；6,000 mg/kg TPH 之土壤之積分面積，再微降至 140，對應 TPH 劑量為 < 600 mg/kg；10,000 mg/kg TPH 土壤之積分面積為，降至 133，對應 TPH 劑量為 < 600 mg/kg。經 BSFL 處理第 21 天後，土壤對照組之積分面積為 310，對應 TPH 劑量小於 600 mg/kg；含 2,000 mg/kg TPH 之土壤則降至 30，對應 TPH 劑量小於 600 mg/kg；6,000 mg/kg TPH 之土壤，則再微降至 17，對應 TPH 劑量小於 600 mg/kg；10,000 mg/kg TPH 土壤則降至 37，對應 TPH 劑量小於 600 mg/kg。比較 BSFL 處理 21 天及 7 天後，土壤中低碳數 TPH 積分面積，均呈現明顯之減量，但劑量均小於 600 mg/kg，故 BSFL 對土壤低碳數 TPH 劑量移除，從積分面積看，確實是持續減少，但在劑量確無法真實呈現，但若以移除率表現時，從積分面積或劑量均可呈現 BSFL 之角色，故 BSFL 處理土壤含油品經 7 天及 21 天，移除率<sub>積分面積</sub>從低劑量至高劑量，分別為 81.4%、87.8% 及 72.1%。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

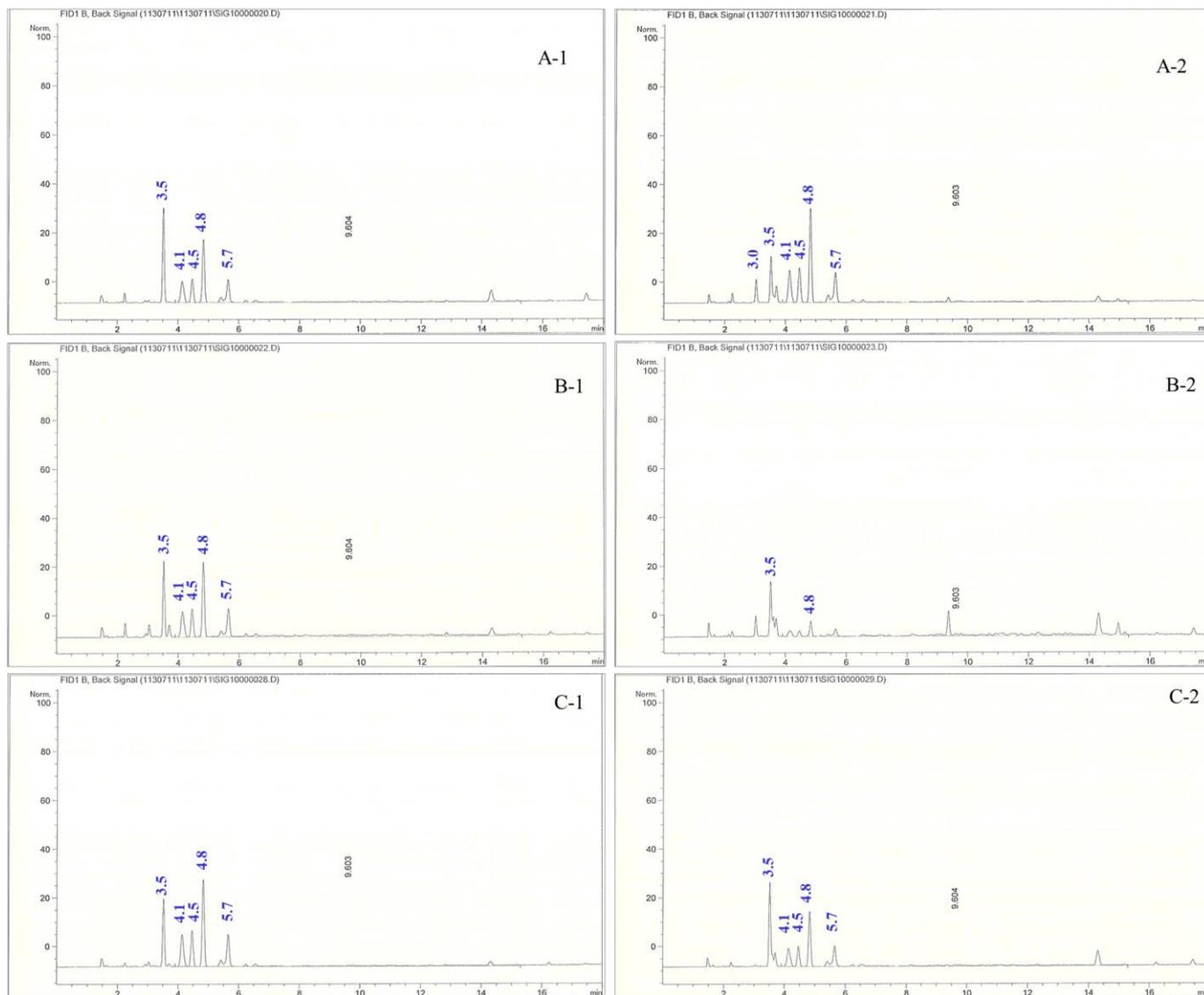


圖 5-23 (A)對照組(B)含 2,000 mg/kg 柴油土樣(C) 含 2,000 mg/kg 燃料油土樣中低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 分析圖譜；經 BSFL 處理(1)7 天(2)21 天

關於燃料油部分(圖 5-24 B)，比較 BSFL 處理第 7 天後及 21 天後，土壤對照組低碳數 TPH 劑量從 3,566 mg/kg 升至 7,081 mg/kg，不含油品時，BSFL 釋放出之似低碳數 TPH 物質，隨操作時間之增加而增加。含燃料油劑量為 2,000 mg/kg，比較 BSFL 處理第 7 天後及 21 天後，土壤殘留低碳數 TPH 劑量，從 5,343 mg/kg( $t_{4.1}$ 、 $t_{4.5}$ 、 $t_{4.8}$  及  $t_{5.7}$  之積分面積均高於對照組)降至 1,972 mg/kg(上述停留時間對應之積分面積下降，但  $t_{3.5}$  積分面積增加)，BSFL 對燃料油之移除效能為 63 %；含燃料油劑量為 6,000 mg/kg，土壤殘留低碳數 TPH 劑量，從 6,196 mg/kg( $t_{4.1}$ 、 $t_{4.5}$ 、 $t_{4.8}$  及  $t_{5.7}$  之積分面積均高於對照組)降至小於 600 mg/kg(所有對應停留時間之積分面積均較 7 天為低)，BSFL 對燃料油之移除效能為 90.3 % (21 天以 600 mg/kg 計)；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，土壤殘留低碳數 TPH 劑量，從 4,455 mg/kg( $t_{4.1}$ 、 $t_{4.5}$  及  $t_{4.8}$  之積分面積均低於對照組)降至小於 600 mg/kg( $t_{4.1}$ 、 $t_{4.5}$  及  $t_{4.8}$  之積分面積在此時大幅下降)，BSFL 對燃料油之移除效能為 86.5 % (21 天以 600 mg/kg 計)。

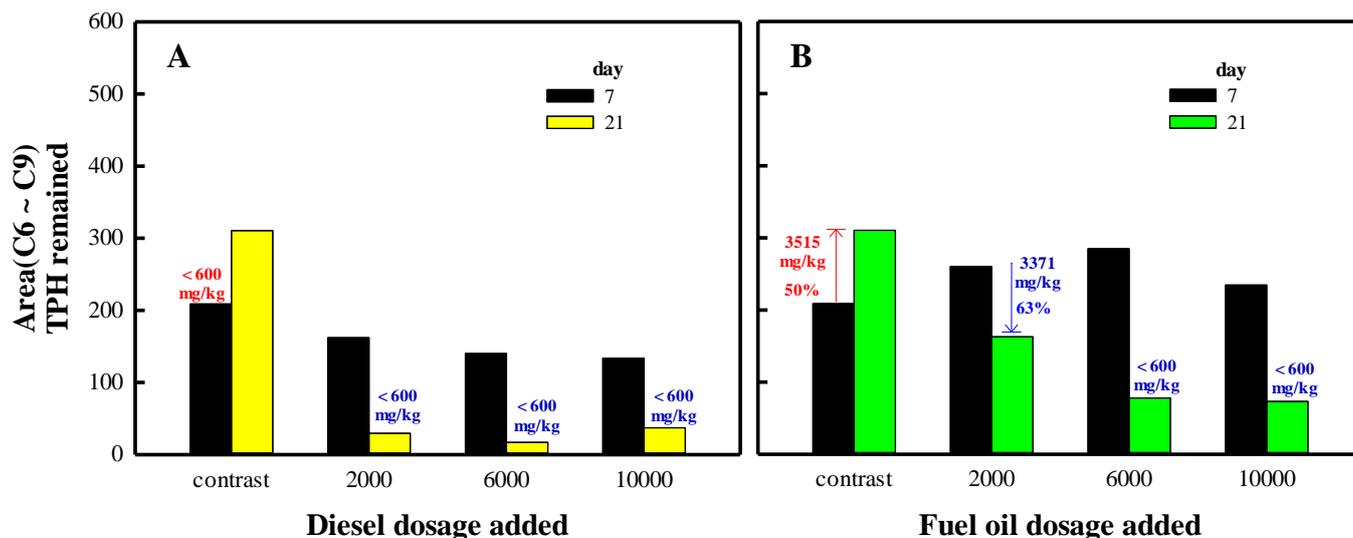


圖 5-24 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理後，土壤中低碳數圖譜積分面積及對應殘留劑量之變動

關於背景土樣中、添加米糠及兩種油品標準品之高碳數 TPH 之圖譜分析，整理於圖 5-25。圖 5-25 A 顯示背景土樣高碳數 TPH 圖譜分析，在停留時間 5.4 min、6.4 min、7.9 min、8.9 min、9.9 min 及 10.8 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 2.7、15.5、11.4、11.2、6.3 及 12.2；米糠積分面積採稀釋 10 倍進行(因其約佔土樣 10%) 高碳數 TPH 之圖譜分析(圖 5-25 B)，可區分為三區域，包括 9-12 min、12.8-15.2 min 及 18.8-19.5 min 有明顯訊號值，後面兩區域明顯與背景土樣不同，對應之積分面積分別為 90.7、153.9 及 75.5。圖 5-25 C 顯示 2,000 mg/kg 柴油標準品高碳數 TPH 之圖譜分析，停留時間落於 5.2 min-12.5 min 的區間，對應之積分面積為 172.5。2,000 mg/kg 燃料油標準品高碳數 TPH 圖譜分析(圖 5-25 D)，停留時間區間在 5.2 min-15.4 min，有明顯訊號值，對應積分面積為 327.9。

圖 5-26 顯示對照組(不含油品)、2,000 mg/kg 柴油土樣及 2,000 mg/kg 燃料油土樣中經 BSFL 處理 7 天及 28 天後，土樣油品高碳數 TPH 之圖譜分析。圖 5-26 A-1 顯示對照組(不含油品)經 BSFL 處理後 7 天，土樣油品高碳數 TPH 圖譜分析，發現在停留時間 5.2 min、6.6 min、7.8 min、8.9 min、9.9 min、10.4 min、11.2 min、12.8 min-15.2 min 及 18.8 min-19.87 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 10.8、12.1、10.4、7.9、8.3、138.7、46.3、118.1 及 58.1，其中 9.7 min、10.4 min、11.2 min 及 11.3 min 之訊號強度明顯，此為 BSFL 之代謝產物相關，屬似高碳數 TPH 成分；圖 5-23 A-2 顯示對照組(不含油品)經 BSFL 處理後 21 天後，土樣油品 TPH 高碳數圖譜分析，發現在停留時間有訊號強度者之停留時間與 7 天同，但 9.9 min、10.4 min 及 11.2 min 之訊號強度明顯下降，亦謂此類物質可為 BSFL 蟲體再利用轉換之生物質。



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

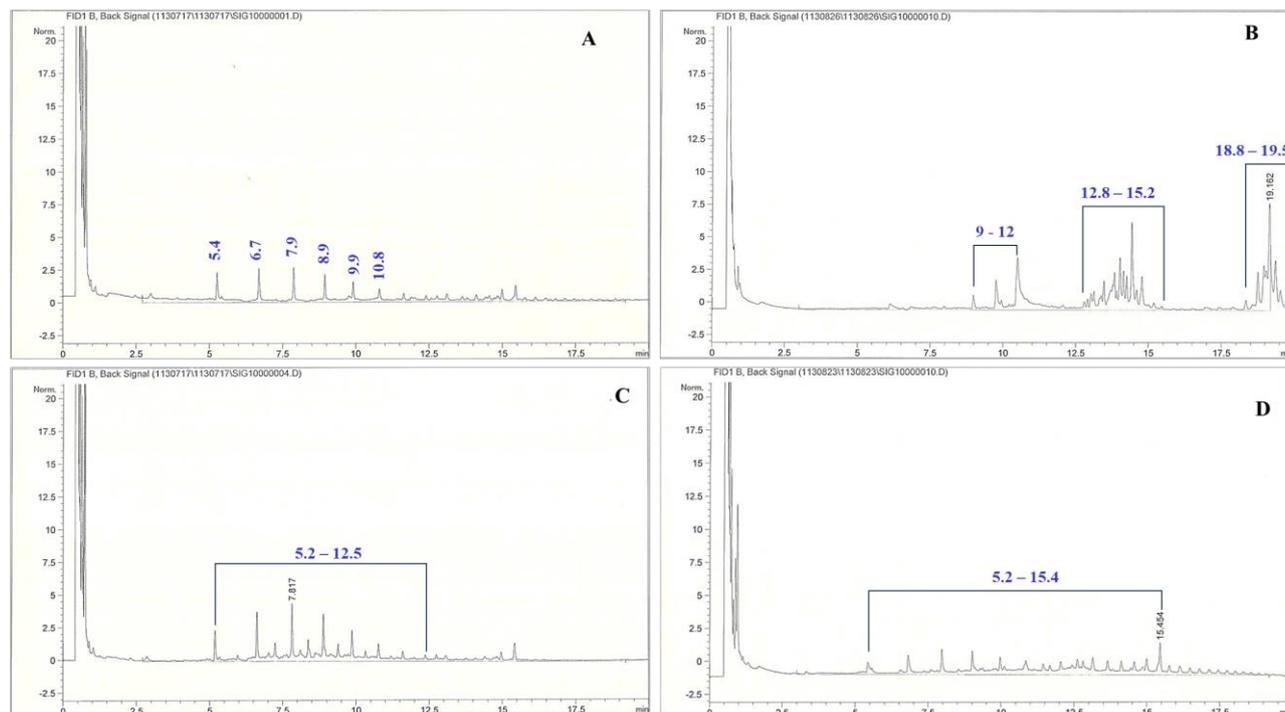


圖 5-25 (A)背景土樣及(B)10%稀釋米糠 (C) 2,000 mg/kg 柴油標準品(D) 2,000 mg/kg 燃料油標準品中高碳數(C10 ~ C50)TPH 之 GC/FID 分析圖譜

圖 5-26 B-1 顯示含 2,000 mg/kg 柴油土樣經 BSFL 處理後 7 天，土樣油品高碳數 TPH 圖譜分析，發現在停留時間有明顯訊號值與對照組相同，其中在 9.7 min 及 10.4 min 之訊號較為明顯，對應之積分面積分別為 60.6 及 118.3，較對照組為低，特別是 9.7 min，代表油品存在時會改變 BSFL 之代謝方式，導致部分似高碳數 TPH 物質之代謝量減少；圖 5-26 B-2 顯示含 2,000 mg/kg 柴油土樣經 BSFL 處理後 21 天，不同時停留時間之訊號面積也下降，其中 9.7 及 10.4 min 停留時間對應之積分面積分別為 14.3 及 20，下降更為明顯，但在 5.2 min、6.6 min、7.8 min、8.9 min，對應之訊號積分面積微增加，對應值分別為 9.5、13.2、17.8 及 21.0，代表 BSFL 在長時間處理柴油，因應環境的需求，會改變其代謝或利用有機物能力，特定的似高碳數 TPH 代謝有機物質，也會隨之改變。

圖 5-26 C-1 顯示含 2,000 mg/kg 燃料油土樣經 BSFL 處理後 7 天，土樣油品 TPH 高碳數圖譜分析，發現在停留時間有明顯訊號值與對照組相同，其中在 9.9 min、10.4 min 及 11.2 min 之訊號較為明顯，對應積分面積分別為 84.2、137.2 及 46.5；圖 5-26 C-2 顯示含 2,000 mg/kg 燃料油土樣經 BSFL 處理後 21 天，不同時停留時間之訊號面積也下降，其中 9.9 min、10.4 min 及 11.2 min 停留時間對應積分面積分別為 21.9、15.2 及 9.6，下降更為明顯，但在 5.2 min、6.6 min、7.8 min、8.9 min，對應之訊號積分面積微增加，對應值分別為 15.8、18.6、19.5 及 14.5，此現象亦發生於柴油，其原因說明如上，在此不再贅述。



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

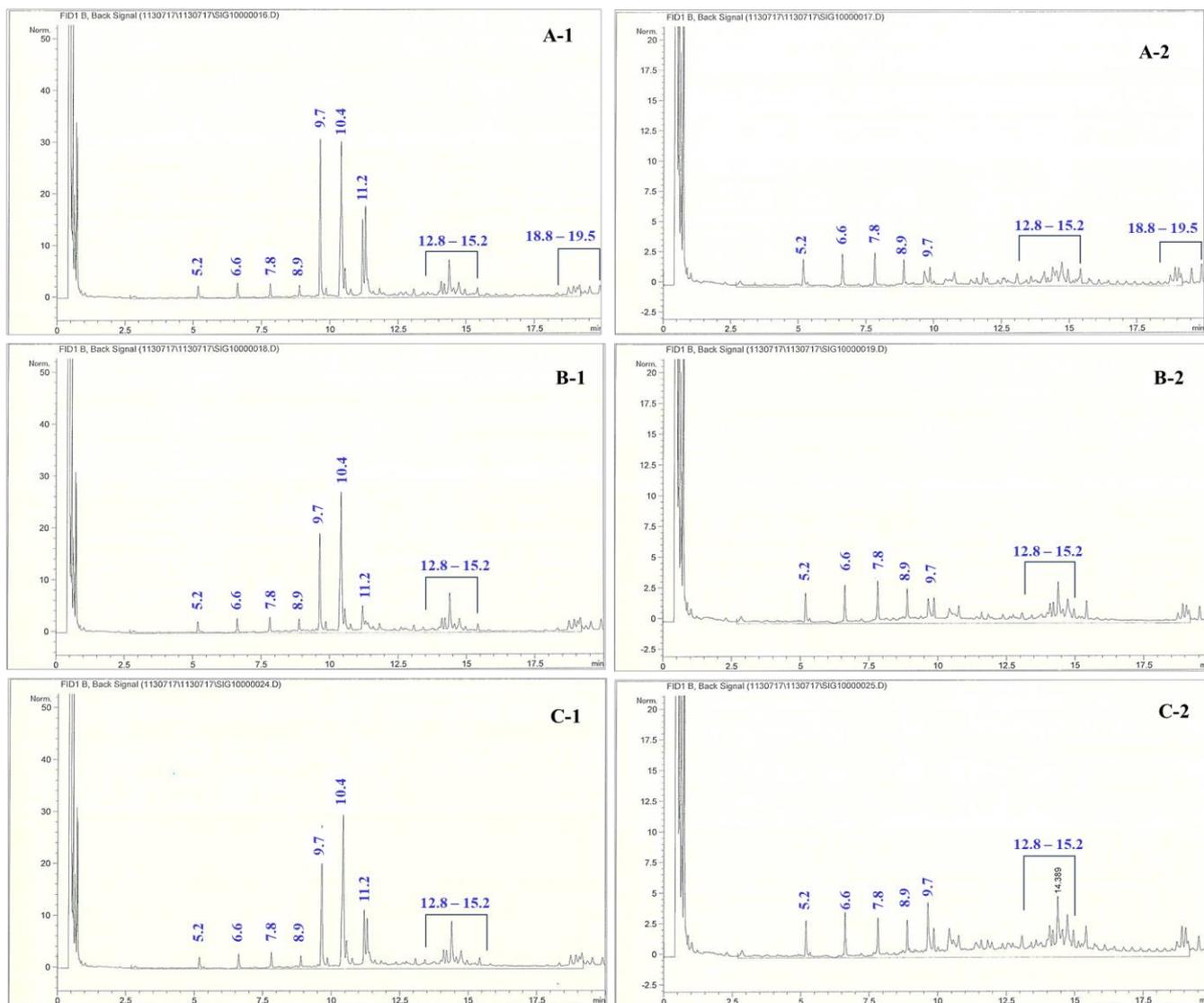


圖 5-26 (A)對照組(B)含 2,000 mg/kg 柴油土樣(C) 含 2,000 mg/kg 燃料油土樣中高碳數(C10 ~ C50)TPH 之 GC/FID 分析圖譜 (1) 經 BSFL 處理 7 天 (2)經 BSFL 處理 28 天

圖 5-27 為含不同油品劑量土壤經 BSFL 處理後，土壤中高碳數 TPH 圖譜積分面積及對應殘留劑量之變動。關於油品，因 9.7 min 及 10.4 min 未在原標準品成分出現，且由對照組圖譜(圖 5-26A)及圖 5-29 比對，推測此二波峰應是由蟲體釋出，故不納入油品 TPH 減量分析。比較 BSFL 處理含第 7 天後及 21 天後，土壤對照組似高碳數 TPH 劑量從 3,578 mg/kg，為 BSFL 代謝生成，降至 1,087 mg/kg，BSFL 較無油品下，長時間操作下會再移除利用似高碳數 TPH，移除率為 70 %。比較 BSFL 處理第 7 天後及 21 天後，含柴油劑量為 2,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH 劑量，從 2,983 mg/kg 降至 1,817 mg/kg，BSFL 對燃料油高碳數 TPH 之移除率為 39 %；含燃料油劑量為 6,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH，從 5,709 mg/kg 降至 2,118 mg/kg，BSFL 對燃料油高碳數 TPH 之移率為 63 %；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH，從 7,023 mg/kg 降至 4,768 mg/kg，BSFL 對燃料油高碳數 TPH 之移除率為 32 %。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

關於燃料油部分(圖 5-27 B)，比較 BSFL 處理第 7 天後及 21 天後，土壤對照組高碳數 TPH 劑量從 1,044 mg/kg(積分面積=232)降至小於 600 mg/kg(積分面積=13)，積分面積去除率為 84%，不含油品時，BSFL 釋放出之似高碳數 TPH 會隨操作時間增長而減少，代表 BSFL 可利用及轉換此類物質，此部分亦發生在柴油部分。比較 BSFL 處理含燃料油土壤，經第 7 天後及 21 天後，含燃料油劑量為 2,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH 劑量，從 852 mg/kg(積分面積=221)降至小於 600 mg/kg(積分面積=37)，積分面積去除率為 83%；料油劑量為 6,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH，從 4,084 mg/kg(積分面積=340)降至 14,44 mg/kg(積分面積=83)，積分面積去除率為 75%，BSFL 對燃料油高碳數 TPH 劑量移除率為 69%；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，土壤殘留高碳數 TPH，從 4,405 mg/kg(積分面積=269)降至小於 600 mg/kg(積分面積=80)，積分面積去除率為 70%。

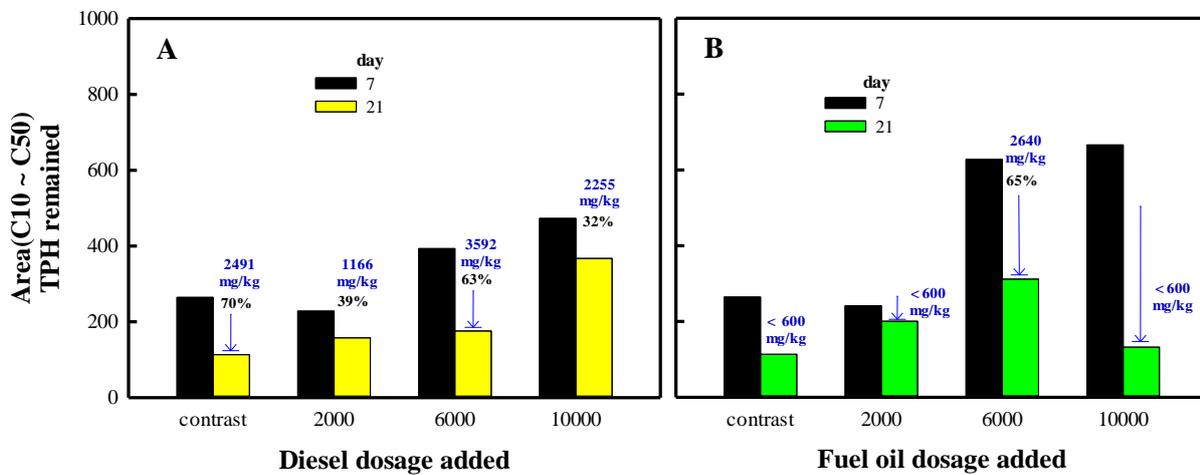


圖 5-27 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理後，土壤中高碳數圖譜積分面積及對應殘留劑量之變動

圖 5-28 為 BSFL 於對照組、含柴油及燃料油(2,000 mg/kg)，經 21 天後，蟲體中低碳數 TPH 之圖譜分析。圖 5-28A 顯示，在對照組部分，發現在停留時間 2.1 min、2.3 min 及 3.0 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 72.4、35.4 及 345.1(無稀釋)；圖 5-28B 顯示，在柴油部分，發現在停留時間 2.1 min、2.3 min、3.0 min 及 9.4 min 有明顯訊號值，對應積分面積分別為 66.6、415.1、699.5 及 35.8(無稀釋)；圖 5-28C 顯示，在燃料油部分，發現與柴油有明顯訊號值之停留時間相同，對應之積分面積分別為 9.6、218、99.6 及 54.2(稀釋 10 倍)。綜合上述說明，各樣本 2.3 及 3.0 min 對應積分面積應是最高。綜合上述說明，BSFL 蟲體內低碳數 TPH 出現停留時間與柴油及燃料油標準品中出現之停留時間不同，代表油品中低碳數 TPH 被 BSFL 轉換成蟲體本身低碳數 TPH 物質，甚至 BSFL 處理含油品土壤，BSFL 蟲體內也會衍生似低碳數 TPH 物質(9.4 min)。



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

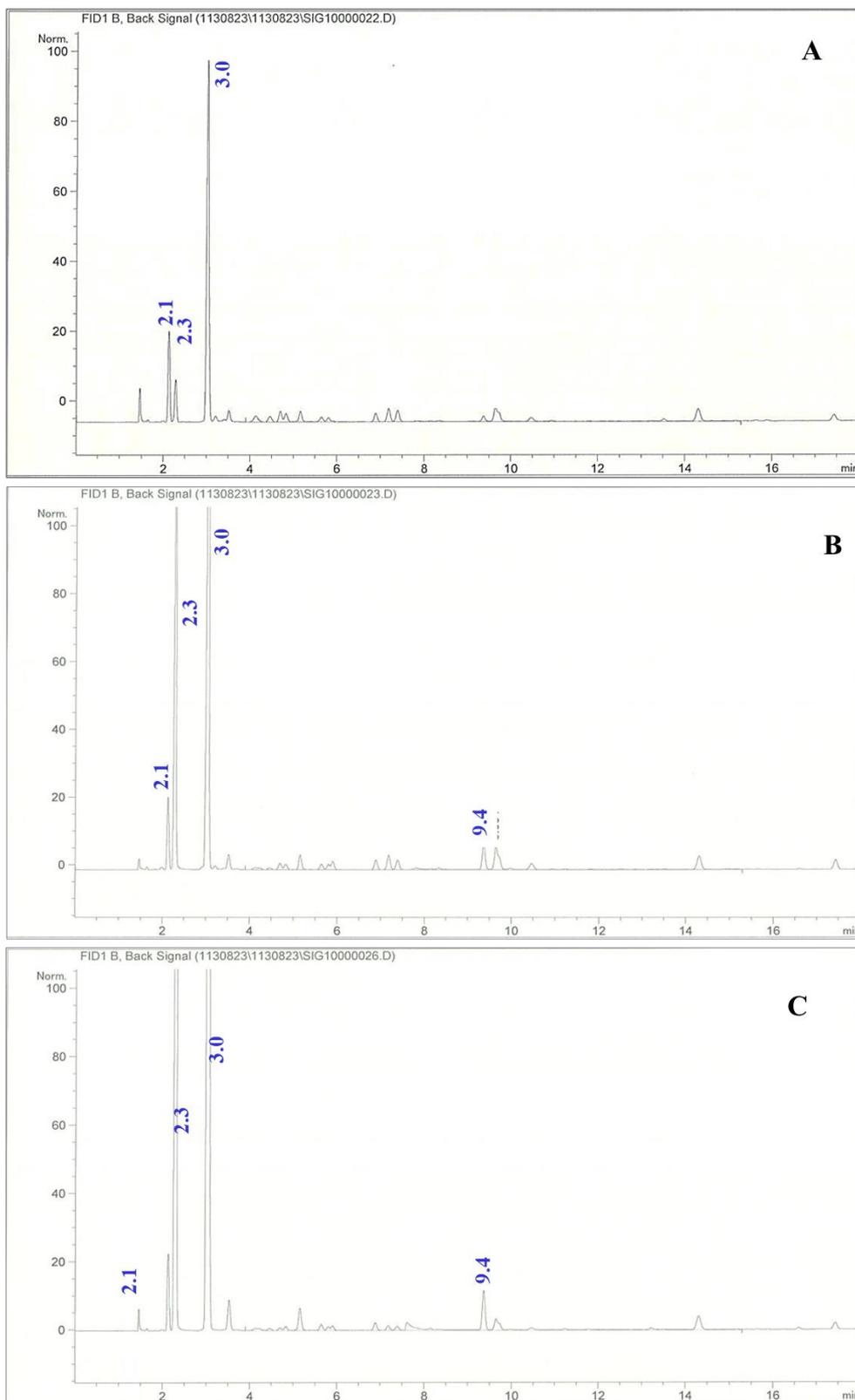


圖 5-28 BSFL 蟲體內低碳數(C6 ~ C9)TPH 之 GC/FID 圖譜(A)對照組(B)柴油(C)燃料油(21 天)

圖 5-29 為 BSF 於對照組、含柴油及燃料(2,000 mg/kg)，經 21 天後，蟲體中高碳數 TPH 之圖譜分析。圖 5-29A 顯示，在對照組部分，發現在停留時間 7.8 min、9.6 min、9.7 min 及



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

10.5 min 有明顯訊號值，對應之積分面積分別為 76.8、27.4、51.8 及 285.2(稀釋 20 倍)；圖 5-29B 顯示柴油部分有明顯訊號值之停留時間與對照組相同，對應之積分面積分別為 36.1、26.1、25.0 及 144.1(稀釋 20 倍)；圖 5-29C 顯示，在燃料油部分，發現與前二者具明顯訊號值之停留時間相同，對應之積分面積分別為 70.9、15.4、46.6 及 157.8(稀釋 20 倍)。綜合上述說明，各樣本以 10.5 min 對應積分面積最高。綜合上述說明，BSFL 蟲體內高碳數 TPH 出現停留時間，除 7.8 min 外，與柴油及燃料油標準品中出現之停留時間相同，屬 BSFL 體內專有，若土壤被檢測出，則代表由其排泄產生，但 7.8 min 之高碳數 TPH，除 BSFL 蟲體本身可能形成外，原存在於油品之此類高碳數 TPH，也應可能會被蟲體利用。

依圖 5-28 得知，BSFL 本身低碳數 TPH 成份，與標準油品之停留時間不同。不同油品劑量經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身低碳數 TPH 之變動，整理如圖 5-30。圖 5-30A 顯示柴油部分，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 480(無稀釋)，對應劑量為 751 mg/kg，此為 BSFL 於不含油品時，背景之 TPH 劑量；含柴油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 1,335(無稀釋)，TPH 劑量為 2,496 mg/kg；含柴油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 396(稀釋 10 倍)，TPH 劑量為 5,800 mg/kg；含柴油劑量為 10,000 mg/kg BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 328(稀釋 10 倍)，TPH 劑量為 4,421 mg/kg。基本上，BSFL 本身低碳數 TPH 之含量，隨添加油品劑量有增加之趨勢，因本研究採固定蟲數，隨添加油品劑量增加，因蟲體對 TPH 分解能力固定，故其累積之 TPH 隨之增加，應是可理解，其較對照組增加之倍率，分別為 3.32、7.72 及 5.89，代表 BSFL 對低碳數 TPH 柴油有一定分解能力，並轉換成本身的生物質。

關於燃料油部分(圖 5-30 B)，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 480(無稀釋)，TPH 劑量為 12,943 mg/kg，此為 BSFL 於不含油品時，背景之 TPH 劑量；含燃料油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 322(稀釋 10 倍)，TPH 劑量為 74,775 mg/kg；含燃料油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 245(稀釋 10 倍)，TPH 劑量為 48,199 mg/kg；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 本身低碳數 TPH 積分面積為 266(稀釋 15 倍)，TPH 劑量為 83,053 mg/kg。從低劑量至高劑量，相對於對照組，增加之倍率分別為 5.78、3.72 及 6.42，故推測燃料油油品中低碳數 TPH，如柴油。應可被利用於 BSFL 形成自身的低碳數 TPH 物質。



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

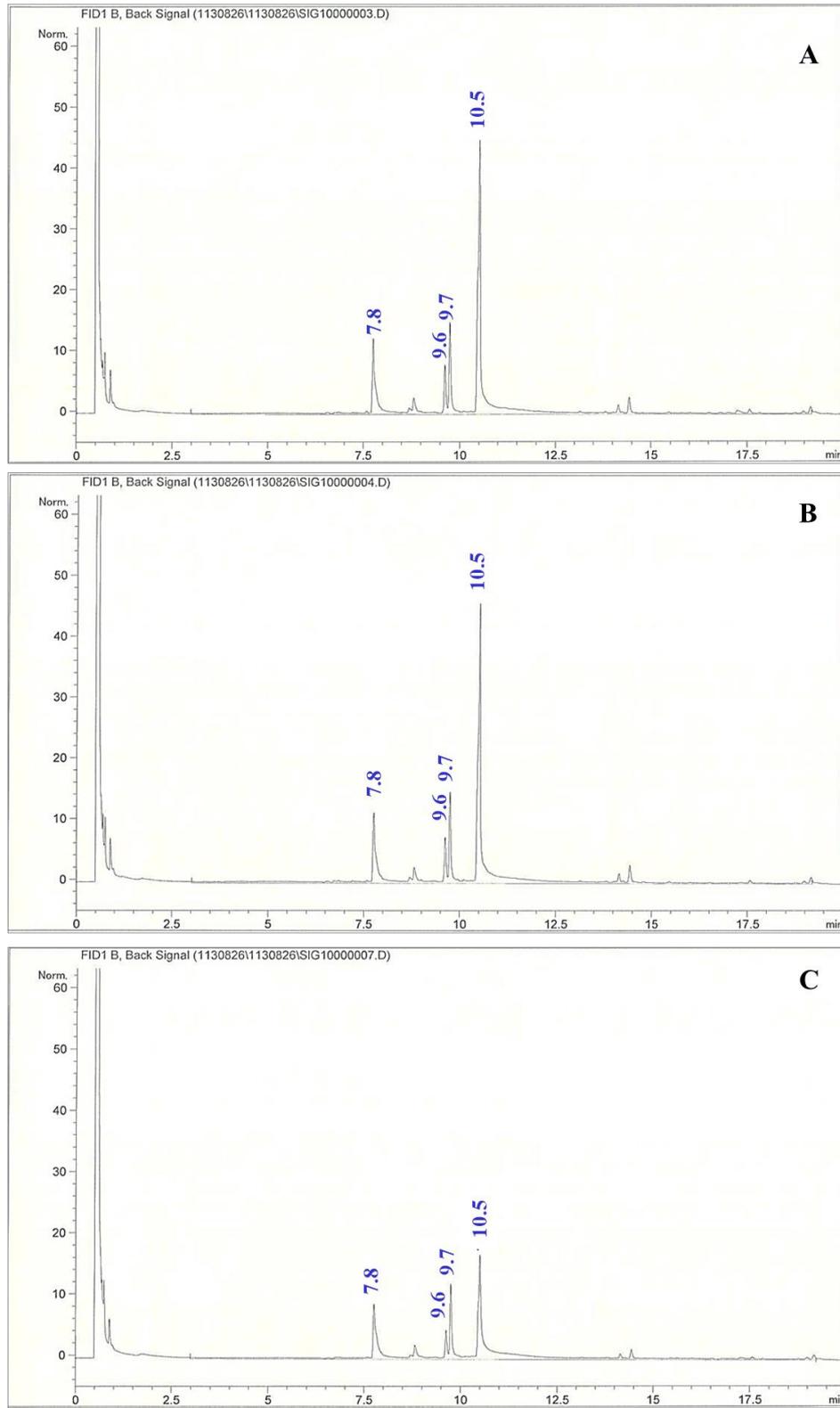


圖 5-29 BSFL 蟲體內高碳數(C10~C50)TPH 之 GC/FID 圖譜(A)對照組(B) 2,000 mg/kg 柴油(C) 2,000 mg/kg 燃料油(21 天)



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

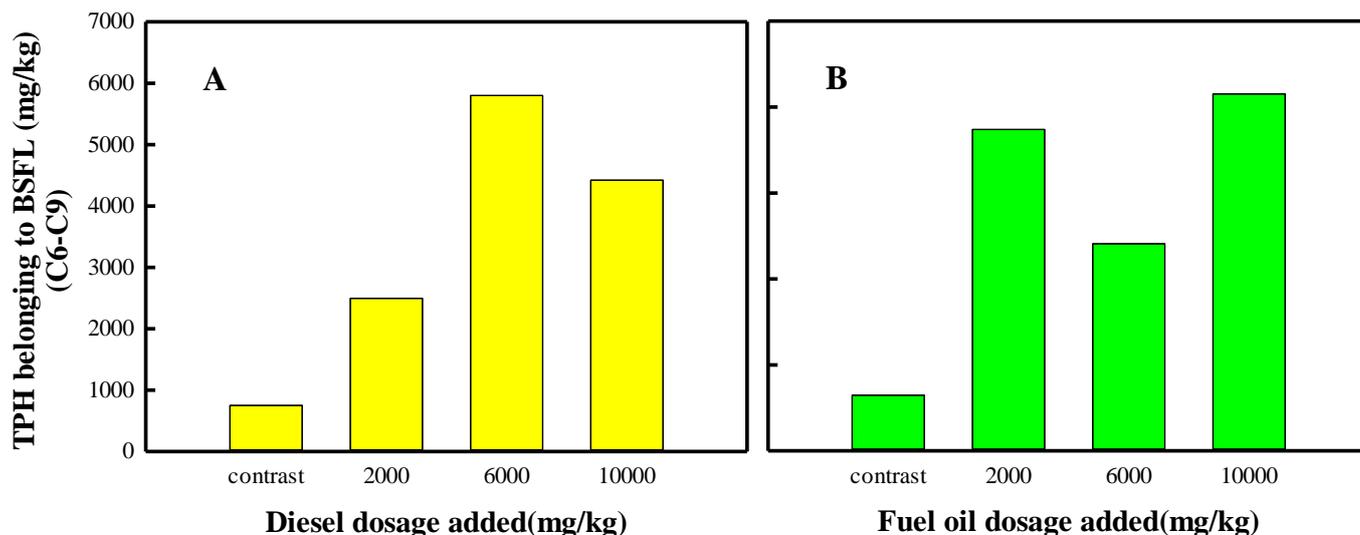


圖 5-30 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身低碳數 TPH 之變動

不同油品劑量經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身高碳數 TPH 之變動，整理如圖 5-31。

圖 5-31A 顯示柴油部分，對照組 BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 403(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 117,301 mg/kg；含柴油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 203(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 51,300 mg/kg；含柴油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 261(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 70,494 mg/kg；含柴油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 234(稀釋 20 倍)，累積 TPH 劑量為 61,637 mg/kg。從低劑量至高劑量，相對於對照組，增加之倍率分別為 0.40、0.49 及 0.52。基本上，BSFL 本身高碳數 TPH 劑量會受到油品劑量增加而減少，其意謂油品會抑制 BSFL 本身高碳數 TPH 物質之合成。

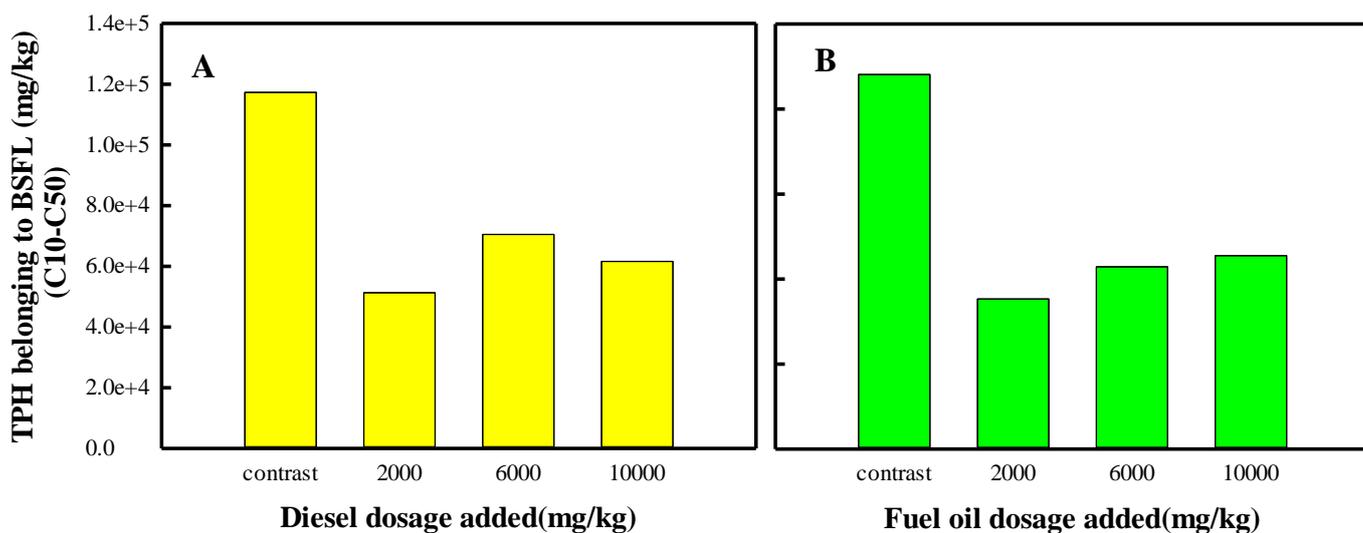


圖 5-31 不同油品劑量(A)柴油(B)燃料油經 BSFL 處理 21 天後，BSFL 本身高碳數 TPH 劑量之變動

圖 5-31B 顯示燃料油部分，BSFL 本身高碳數 TPH 在對照組積分面積為 403(稀釋 20 倍)，高碳數 TPH 劑量為 44,068 mg/kg；含燃料油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

分面積為 245(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 17,664mg/kg；含燃料油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 268，TPH 劑量為 21,443 mg/kg；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 275(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 22,752 mg/kg。從低劑量至高劑量，相對於對照組，增加之倍率分別為 0.40、0.49 及 0.52。基本上，BSFL 本身高碳數 TPH 劑量會受到燃料油增加而減少，意謂燃料油品高碳數會抑制 BSFL 本身高碳數 TPH 物質之合成，此與柴油現象相同。

關於與油品高碳數標準品有相同停留時間 7.8 min 部分，針對柴油對照組部分，BSFL 本身高碳數 TPH 在對照組積分面積為 77(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 17,518 mg/kg；含柴油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 36(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 4,094 mg/kg；含柴油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 81，TPH 劑量為 18,974 mg/kg；含柴油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 80 (稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 18,668 mg/kg。針對燃料油對照組部分，BSFL 本身高碳數 TPH 在對照組積分面積為 77(稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 1,175 mg/kg；含燃料油劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 71 (稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 < 600 mg/kg；含燃料油劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 83，TPH 劑量為 2,174 mg/kg；含燃料油劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 本身高碳數 TPH 積分面積為 74 (稀釋 20 倍)，TPH 劑量為 633 mg/kg。

比較受不同油品劑量污染土壤經 BSFL 處理 7 天及 21 天後，土壤低碳數及高碳數 TPH 之移除率，整理如圖 5-32。圖 5-32A 顯示柴油低碳數部分，均小於 600 mg/kg，故無法觀察量的變化；燃料油低碳數 TPH 部分，劑量為 2,000 mg/kg，BSFL 移除效率為  $241(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 6,000 mg/kg，BSFL 移除效率為  $400(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 10,000 mg/kg，BSFL 移除效率為  $275(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ 。圖 5-32B 顯示 BSFL 處理 7 天及 21 天後，土壤高碳數 TPH 之移除效率，在柴油部分，劑量為 2,000 mg/kg，移除效率為  $83(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 6,000 mg/kg，移除效率為  $257(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 10,000 mg/kg，移除效率為  $161(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；燃料油部分，劑量為 2,000 mg/kg，移除效率為  $18(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 6,000 mg/kg，移除效率為  $189(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 10,000 mg/kg，移除效率為  $272(\text{mg/kg} \pm) \times \text{day}^{-1}$ 。基本上，針對高碳數 TPH 之移除率，BSFL 明顯對柴油效能優於燃料油，對於低碳數 TPH 部分，受限柴油偵檢濃度，難以比較 BSFL 對兩種油品之差異，較為可惜。

關於 BSFL 經 21 天操作後，低碳數及高碳數 TPH 轉換為 BSFL 生物質 TPH 量之速率，整理如圖 5-33。在柴油低碳數 TPH 部分(圖 5-33 A)，對照組為  $36 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；劑量為 2,000 mg/kg，轉換速率為  $119(\text{mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 6,000 mg/kg，轉換效率為  $276 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；劑量為 10,000 mg/kg，累積速率為  $211(\text{mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；燃料油部分，對照組為  $616 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；劑量為 2,000 mg/kg，轉換速率為  $3,561(\text{mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為 6,000 mg/kg，轉換



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

速率為  $2,295 \text{ mg/kg day}^{-1}$  劑量為  $10,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換效率為  $3,955 \text{ mg/kg day}^{-1}$ 。高碳數 TPH 部分(圖 5-33 B)，柴油對照組為  $6,792 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；柴油劑量為  $2,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $3,010 \text{ (mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為  $6,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $4,633 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；劑量為  $10,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $4,196 \text{ (mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；燃料油部分，對照組為  $2,710 \text{ mg/kg day}^{-1}$ ；劑量為  $2,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $1,406 \text{ (mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ ；劑量為  $6,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $1,681 \text{ mg/kg day}^{-1}$  劑量為  $10,000 \text{ mg/kg}$ ，轉換速率為  $1,669 \text{ (mg/kg}_{\text{BSFL}}) \times \text{day}^{-1}$ 。高碳數 TPH 在 BSFL 之轉換速率，有添加油品者均低於對照組；低碳數，則呈現相反之趨勢。

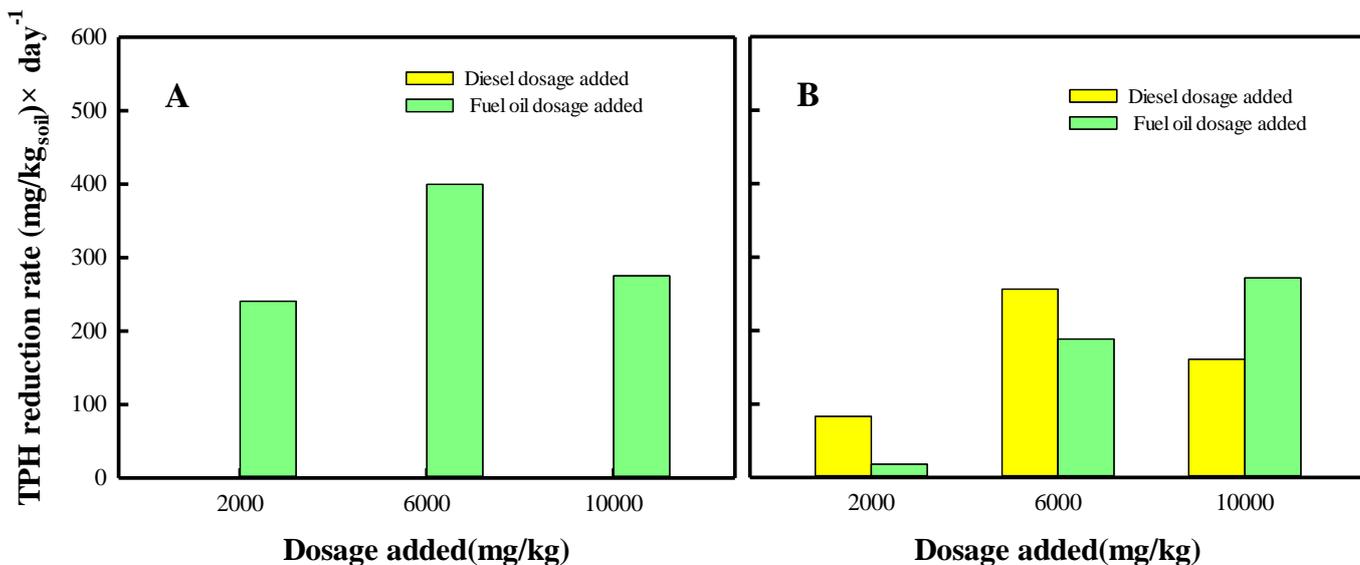


圖 5-32 BSFL 對土壤油品添加劑量(A)低碳數(B)高碳數之 TPH 移除率

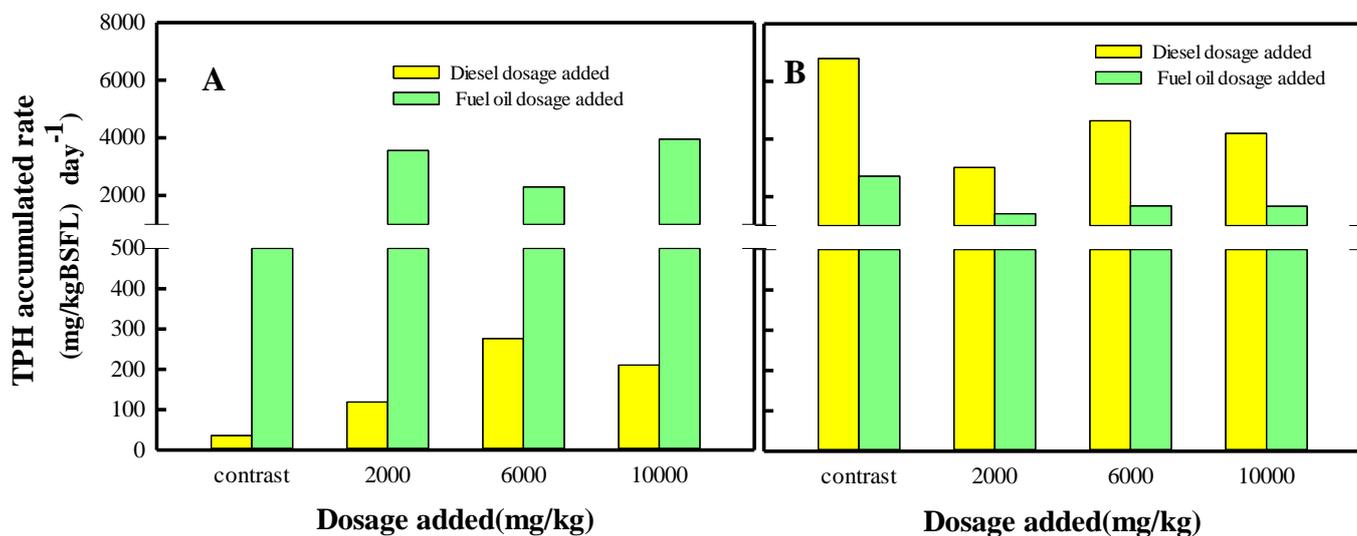


圖 5-33 BSFL 本身體內(A)低碳數(B)高碳數 TPH 之轉換速率

關於 BSFL 對含油品土壤之總去除效率，需考量原土樣添加之油品劑量、BSFL 處理後土壤中殘留 TPH 劑量及 BSFL 蟲體內之 TPH 劑量，並以質量平衡觀點計算，基本上可區分為  $\text{TPH}_{\text{low-carbon}}$  及  $\text{TPH}_{\text{low-carbon}}$  兩部分，分述如下：



### TPH<sub>low-carbon</sub> 總去除效率(%)

$$=[(\text{添加油品劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg})) - \text{土壤殘留 TPH}_{\text{low-carbon}} \text{劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg}) - \text{BSFL}_{21 \text{天}} \text{總重}(\text{kg}) \times \text{BSFL 體內 TPH}_{\text{low-carbon}} \text{劑量}(\text{mg/kg}) / (\text{添加油品劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg}))] \times 100 \text{-----}(1) \text{式}$$

### BSFL 對添加不同油品 TPH<sub>high-carbon</sub> 總去除效率(%)

$$=[(\text{添加油品劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg})) - \text{土壤 TPH}_{\text{low-carbon}} \text{劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg}) - \text{BSFL}_{21 \text{天}} \text{總重}(\text{kg}) \times \text{BSFL 體內 TPH}_{\text{high-carbon}} \text{劑量}(\text{mg/kg}) / (\text{添加油品劑量}(\text{mg/kg}) \times \text{土重}(\text{kg}))] \times 100 \text{.....}(2) \text{式}$$

由於 BSFL 生物質所含低碳數 TPH 之停留時間，明顯油品標準品不同，而高碳數僅  $t_{7.8}$  與油品標準品相同，但無油品之 BSFL 體內，本身亦有此停留時間之高碳數 TPH 物質，且劑量遠高於添加油品之劑量，故在此忽略此物質之累積效應，依(1)及(2)式計算，BSFL 對 TPH<sub>low-carbon</sub> 總去除率(21 天)，在柴油部分，三種油品劑量 2000 mg/kg、6,000 mg/kg 及 10,000 mg/kg，分別 70%、90% 及 94%，此部分應考量偵測配製濃度，均以 600 mg/kg 進行計算，事實上去除率應較現值更高；在燃料油部分，則是 1%、90% 及 94%，後二者之真實去除率應比現值更佳，原因如柴油說明。BSFL 對 TPH<sub>high-carbon</sub> 總去除效率，在柴油部分，三種油品劑量 2000 mg/kg、6,000 mg/kg 及 10,000 mg/kg，分別 -20%、52% 及 41%；在燃料油部分，則是 68%、64% 及 94%，2000 mg/kg 及 10,000 mg/kg 對應去除率應比現值更佳，原因如前述說明。

整體而言，BSFL 對油品 TPH<sub>low-carbon</sub> 高於 TPH<sub>high-carbon</sub> (6,000 及 10,000 mg/kg)，但對低劑量部分(2,000 mg/kg)，燃料油中低碳數 TPH 之低去除率，如何降低 BSFL 代謝於土壤中 TPH 物質，與油品標準相同之 TPH 之區分，仍需要克服。BSFL 對 TPH<sub>high-carbon</sub> 去除率，燃料油優於柴油，在低劑量 2,000 mg/kg 柴油，出現低去除率，其原因與前述說明相同。透過 BSFL 蟲數調控及其它相關物化環境調整至最佳化，以 BSFL 整治後污染土壤之後續應用性，仍是值得進一步在處理量能放大思考。

#### 5.1.5 經 BSFL 處理受油品污染土壤之物化性質變化及其對禾本植物生長之影響

關於 BSFL 處理受不同油品劑量污染土壤，28 天後，土壤中 pH 及導電度之變化，整理如圖 35。pH 部分(圖 34 A-1)，在未添加柴油之土壤+米糠經 BSFL 處理後，其值為 6.38，當添加柴油之土壤之劑量在 2,000-10,000 mg/kg，則落於 7.69-7.56，經 BSFL 處理後之 pH 相對於對照組，明顯提升，土壤性質偏向鹼性，此可能與 BSFL 腸道分解菌分解後，產生的排泄物之 pH 值提昇相關，相關研究以 BSFL 蛇肥施用於土壤後，亦發現 pH 值有增加的現象。當添加燃料油之土壤之劑量在 2,000-10,000 mg/kg(圖 34 B-1)，則落於 7.06-7.74。添加不同油品劑量土壤經 BSFL 處理後之 pH 值較對照組有明顯提升。

關於 BSFL 處理受不同油品劑量污染土壤，28 天後，土壤中導電度之變化，整理如圖 34-A2 及圖 34-B2。在未添加柴油之土壤+米糠經 BSFL 處理後，對照組之值為 0.47 mS/cm，



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

當添加柴油之土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg，則落於 0.62-0.68 mS/cm，且呈現隨柴油劑量濃度之增加而增加，導電值相較於對照組約增加 24 %-31 %。當添加燃料油土壤之劑量在 4,00-10,000 mg/kg，落於 0.52-0.72 mS/cm，導電值相較於對照組，增加 10 %-35 %，整體而言，導電值之變化，除 2,000 mg/kg 之樣本外，隨燃料油劑量之增加有增加趨勢，此與柴油變化趨勢相近。

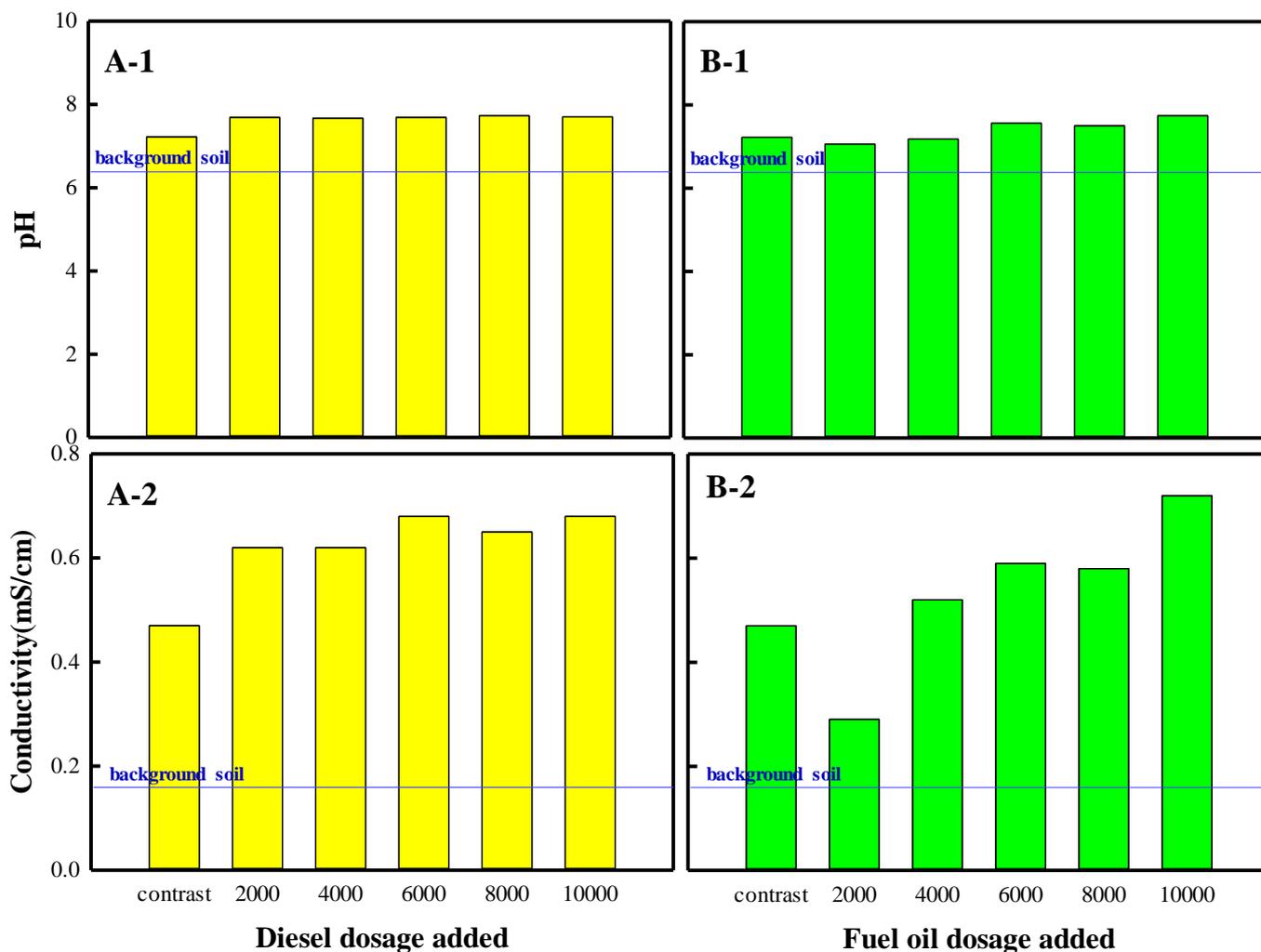


圖 5-34 BSFL 處理受(A)柴油(B)燃料油污染土壤(28 天)後，土壤中(1)pH(2)導電度之變化

關於 BSFL 處理受不同油品劑量污染土壤，28 天後，土壤中有機質含量之變化，整理如圖 5-35。在未添加柴油之土壤( 1 kg)+米糠(0.1 kg)，其初始測值為 13%。當添加柴油於土壤之劑量在 2,000-10,000 mg/kg(圖 5-35 A-1)，落於 9.07 % - 9.75 %，經表示部分土壤中油品、米糠及土壤中有機物被 BSFL 轉換成生物質，部分成為代謝物，屬於有機物，且隨著土壤中油品劑量之增加而增加，從低劑量至高劑量，對應之值分別 9.07 %、9.17 %、 9.23 %、9.60 %及 9.75 %。此現象亦發生於燃料油部分(圖 5-35 B-1)，從低劑量至高劑量，對應之值分別 8.83 %、8.87 %、 9.15 %、9.54 %及 10.39 %。

依 AFS2110-1 方法，有機碳含量佔有機物含量之 0.58，依此推算 BSFL 處理添加柴油之



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg，從低劑量至高劑量，有機碳對應值分別 5.26 %、5.32 %、5.35%、5.57%及 5.66%(圖 5-35 A-2)；對燃料油部分，土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg，從低劑量至高劑量，有機碳對應之值分別 5.12 %、5.14 %、5.31 %、5.53 %及 6.03%(圖 5-35 B-2)。

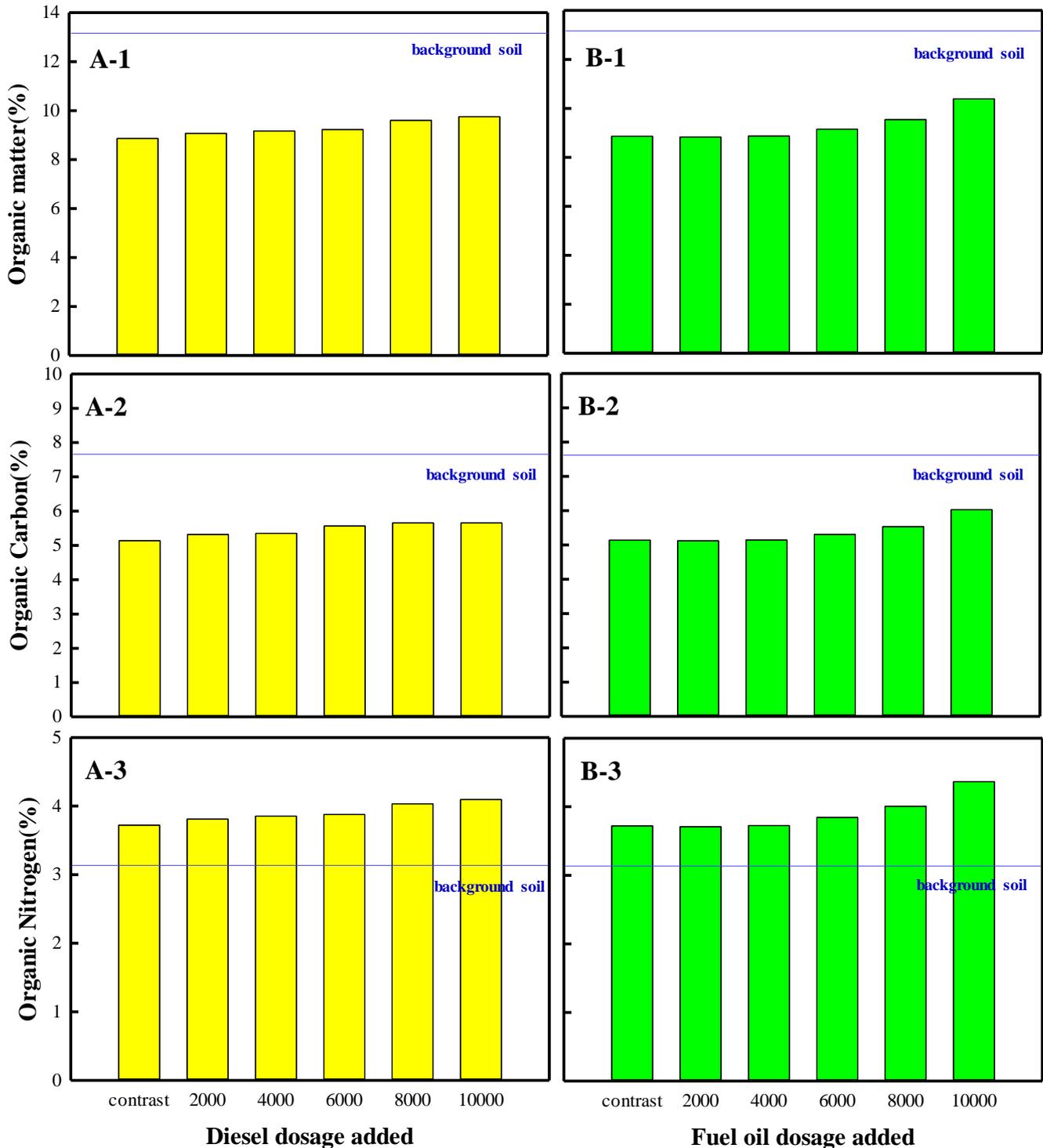


圖 5-35 BSFL 處理受不同(A)柴油(B)燃料油劑量污染土壤 28 天，土壤中有機質含量之變化



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

BSFL 蟲糞為一種新型的有機肥，不僅含有多種營養物質，還含有多種微生物、酶和活性物質。經黑水虻處理受油污染土壤，除測量有機物含量外，另氮、磷及鉀氧分含量，亦是觀測重點。依 AFS2110-1 方法，有機氮佔有機物含量比之 0.42，依此推算 BSFL 處理添加柴油之土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg，從低劑量至高劑量，有機氮含量對應之值分別 3.81 %、3.85 %、3.88 %、4.03 % 及 4.10 % (圖 5-35 A-3)；對燃料油部分，土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg，從低劑量至高劑量，有機氮對應之值分別 3.71 %、3.73 %、3.84 %、4.01 % 及 4.36 % (圖 5-35 B-3)。

關於 BSFL 處理受不同油品劑量污染土壤，28 天後，土壤中有效磷及有效鉀部分，整理如圖 5-36。在未添加柴油之土壤+米糠經 BSFL 處理後，對照組之有效磷值為 394 mg/kg，當添加柴油之土壤劑量在 2,000 - 10,000 mg/kg (圖 5-36 A-1)，則落於 552 - 602 mg/kg，均高於對照組，有效性磷值相較於對照組約增加 29 ~ 35 %。當添加燃料油土壤之劑量在 2,00-10,000 mg/kg (圖 36-B1)，則落於 426 ~ 519 mg/kg，均高於對照組，增加 6 %-24 %。在未添加柴油之土壤+米糠經 BSFL 處理後，對照組之有效性鉀值為 1,749 mg/kg，當添加柴油之土壤劑量在 2,000-10,000 mg/kg (圖 36 A-2)，則落於 1825 ~ 1973 mg/kg，均高於對照組，有效性鉀值相較於對照組約增加 5 ~ 11 %。當添加燃料油土壤之劑量在 2,00-10,000 mg/kg (圖 36 B-2)，則落於 1,311 ~ 1,726 mg/kg，除 10,000 mg/kg 均低於對照組，並減少 1 ~ 33 %。此結果呈現有趣的現象，BSFL 在處理含燃料油土壤時，BSFL 對有效磷之利用，不若 BSFL 處理柴油之表現。

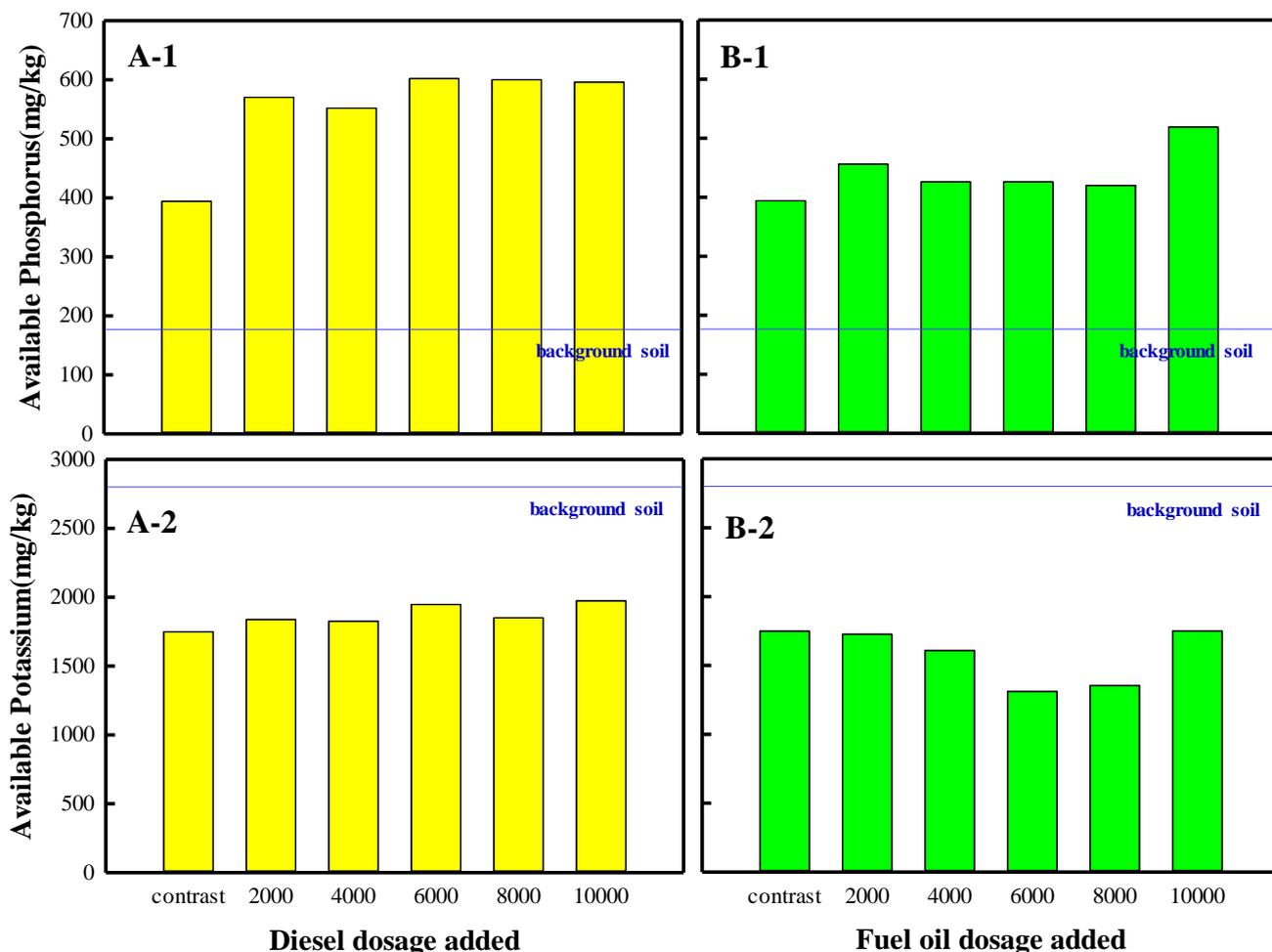


圖 5-36 BSFL 處理受不同(A)柴油(B)燃料油劑量污染土壤 28 天，土壤中(1)有效性磷(2)有效性鉀含量

BSFL 蟲糞肥的施用提高了土壤有機質、速效氮、速效磷、速效鉀養分含量和土壤酶活性，合理的施用量能促進當季和後茬水稻生長，提高水稻產量。經 BSFL 處理受不同油品劑量污染土壤，除土壤中殘留低 TPH 劑量外，亦含有機物量、氮、磷及鉀，為增加其後續之利用性，本研究以處理後土壤(28 天)萃取液進行小麥、玉米及水稻發芽狀況(第三天)，相關圖生長相關相片檢附於附錄 X~X。三種禾本科植物發芽率，整理如圖 5-37，圖 5-37 A-1 中呈現，小麥對照組發芽率為 36%，經 BSFL 處理含不同柴油劑量土壤之萃取液，從低劑量至高劑量，對應發芽率依序為 56%、68%、60%、52%及 52 %，均高於對照組。經 BSFL 處理含不同燃料油劑量土壤之萃取液(圖 5-37 B-1)，從低劑量至高劑量，對應發芽率依序為 52%、72%、72%、72%及 80 %，高於對照組，整體上，小麥於含燃料油土壤萃出液之表現優於柴油土壤萃出液。

圖 5-37 A-2 為 BSFL 處理不同柴油劑量土壤萃取液，對玉米發芽率之影響。圖 5-37 A-2 中顯示玉米對照組發芽率為 64 %，從低劑量至高劑量，對應發芽率依序為 40%、64%、60%、24%及 48%，其呈現較不規則變化。BSFL 處理不同燃料油濃度土壤萃取液對玉米發芽率(圖



#### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

5-37 B-2)，從低劑量至高劑量，其值依序為 84%、68%、52%、44% 及 40 %，2,000-4,000 mg/kg，明顯優於對照組。圖 5-37 A-3 為 BSFL 處理不同柴油劑量土壤萃取液對水稻發芽率之影響。水稻對照組發芽率為 24 %，從低劑量至高劑量，對應發芽率依序為 32%、36%、24%、4% 及 0%，不同燃料油濃度土壤萃取液(圖 5-37 B-3)，水稻發芽率，從低劑量至高劑量，依序為 28%、16%、32%、16% 及 0 %。在 2,000 mg/kg 油品污染土壤，經 BSFL 處理後土壤萃出液可提昇水稻發芽率之效果，但劑量超過 4,000 mg/kg 油品污染土壤，柴油顯示提昇之效果，但燃料油部分，未能呈現效益。

根據種子發芽狀態選擇發芽率較高的玉米及小麥進行種植，實驗後(28 天)之土壤樣本受限於土壤樣本量，每盆固定添加 100 g 土壤(未添加其它有機質材料)進行二重複，在對照組土中，第 7 天兩種作物生長狀況，分別為 10.7 及 3.4 公分，第 14 天時，分別為 12.4 及 3.5 公分，葉片均呈現黑黃色，第 21 天時，植株均死亡。實驗土壤樣本隨種植時間推移，越來越密實且硬化，推測植株死亡與此土壤性質未進行調整，粉粒或粘粒過高，需添加固定比之泥碳，增加透水性相關。相關植株相片詳見附錄 18 - 30。

根據上述實驗，為證明植株死亡與柴油及燃料油殘留劑量較無直接關係，本研究以 BSFL 處理後土壤(28 天)萃取液進行觀察，選用上述三種死亡率較低的小麥，將種子放入培養皿加入萃取液培養(三重複)七天後(圖 5-38)，對照組全株長為 24 公分，根長 14 公分；BSFL 處理柴油劑量 2,000 mg/kg，全株長為 25 公分，根長 15 公分；柴油濃度 4,000 mg/kg，全株長為 21 公分，根長 12 公分；柴油濃度 6,000 mg/kg 全株長為 23 公分，根長 13 公分；柴油濃度 8,000 mg/kg，全株長為 17 公分，根長 10 公分；柴油濃度 10,000 mg/kg，全株長為 19 公分，根長 10 公分；BSFL 處理燃料油劑量 2,000 mg/kg，全株長為 25 公分，根長 15 公分；燃料濃度 4,000 mg/kg，全株長為 25 公分，根長 15 公分；燃料濃度 6,000 mg/kg 全株長為 24 公分，根長 14 公分；燃料劑量 8,000 mg/kg 全株長為 26 公分，根長 16 公分；燃料劑量 10,000 mg/kg，全株長為 20 公分，根長 12 公分。柴油部分明顯在劑量 8,000 mg/kg 及 10,000 mg/kg 下成長明顯低於其他濃度試驗，顯示高劑量柴油經 BSFL 處理後之萃取液對小麥生長明略劣於燃料油，但均可穩定讓小麥生長，相關照片於附件 31 - 33。



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

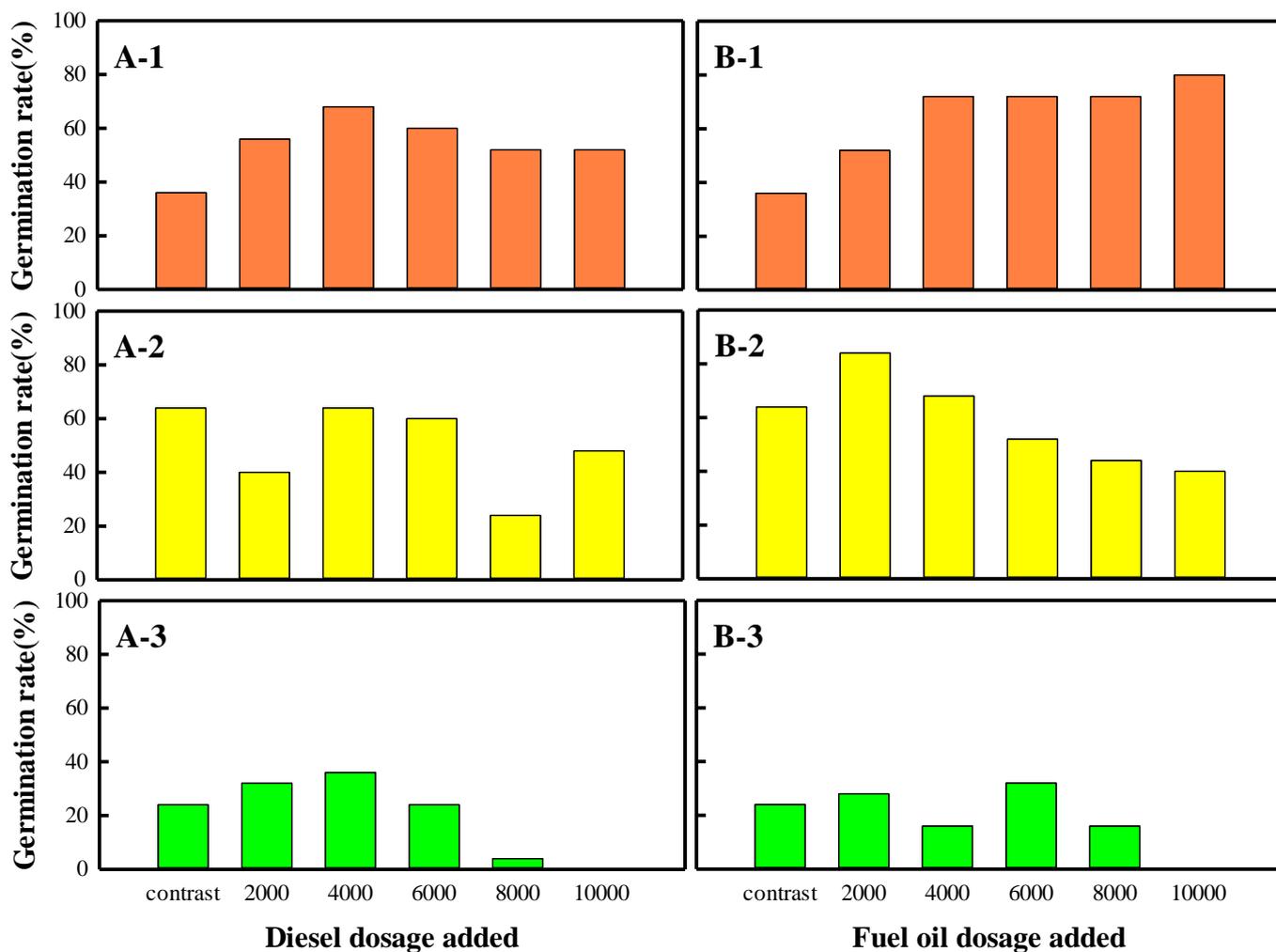


圖 5-37 BSFL 處理受(A)柴油(B)燃料油污染土壤(28 天)後，土壤萃取液對(1)小麥(2)玉米(3)水稻發芽率之影響(N=25)



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

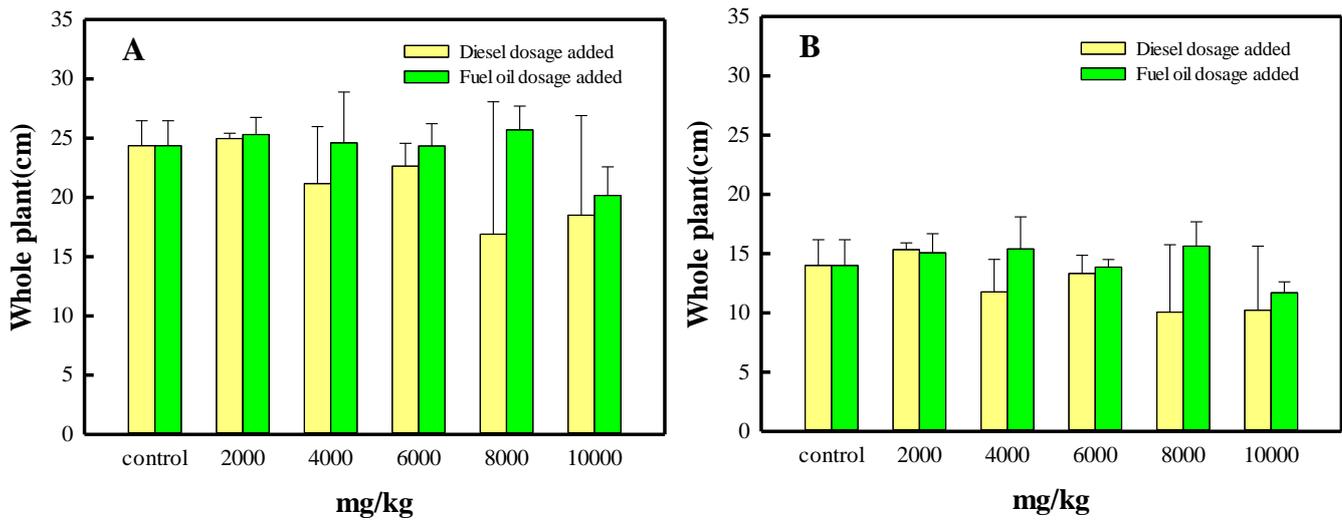


圖 5-38 BSFL 處理受油品污染土壤(28 天)之萃取液對小麥生長 7 天(A)全株長(B)根長 之變化

### 5.1.6 土壤中有機物 BIX、HIX 及 Amino<sub>(I+II+VI)</sub> acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比值

關於對照組(未添加油品)土壤添加 10% 米糠經 BSFL 處理後之有機物性質變化，本研究取適量土壤經純水萃取分析 FEEM 圖，進行 7 天、14 天、21 天及 28 天之 BIX 值、HIX 值及 Amino<sub>(I+II+VI)</sub> acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比値之量測，整理如圖 5-39。另處理柴油及燃料油之 BIX、HIX 及 Amino<sub>(I+II+VI)</sub> acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比値之變動，整理圖圖 5-40、圖 5-41 及圖 5-42。關於對照組 BIX 值之變化(圖 5-39 A)，經 7 天、14 天、21 天及 28 天之值，分別為 0.6、0.5、0.7 及 0.7，後期之 BIX 值較前期之 BIX 值高，代表 BSFL 體內菌相處理有機物及排泄物菌相之持續作用代謝能力變多相關。在添加不同柴油及燃料油劑量經 BSFL 處理後不同時間之 BIX 值變化，(圖 5-40)，當劑量為 2,000 mg/kg，柴油介於 0.6~0.8，燃料油介於 0.7~1.2；在 4,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 0.6~1.0，燃料油介於 0.9~1.5；在 6,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 0.8~1.1，燃料油介於 1.3~1.7；在 8,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 0.8~1.1，燃料油介於 0.9~1.6；在 10,000 mg/kg 劑量，柴油介於 0.8~1.0，燃料油介於 1.2~1.6。綜合以上說明，BSFL 處理時間愈長，BIX 值隨之增加；同一油品劑量而言，燃料油之 BIX 值反而愈高，代表 BSFL 在燃料油之生物作用能力似乎比柴油為佳。

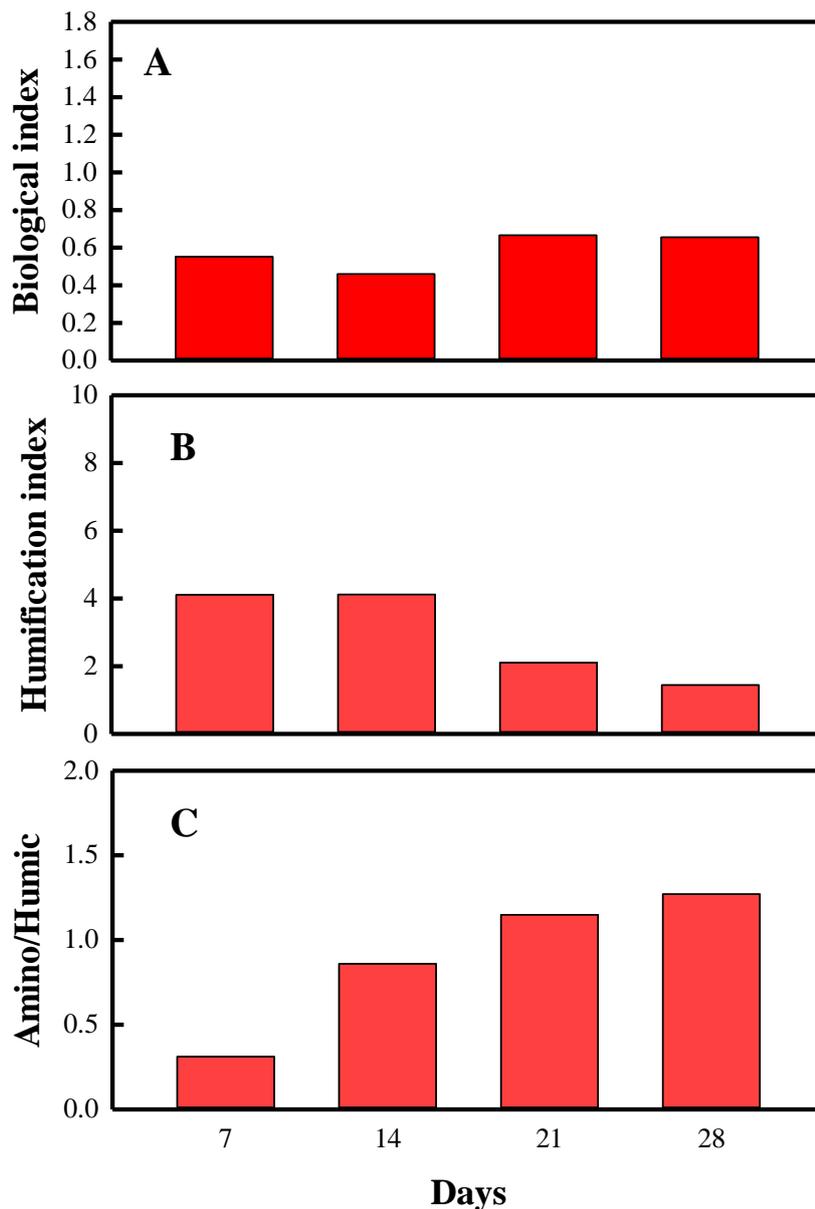


圖 5-39 三齡 BSFL 對照組樣本之(A)BIX (B)HIX (C)Amino/Humic 之變化

關於對照組 HIX 值之變化(圖 5-39 B)，經 7 天、14 天、21 天及 28 天之值，分別為 4.11、4.12、2.11 及 1.44，後期之值低於前期之值，代表 BSFL 體內菌相處理有機物及排泄物中腐植化性質較低，意謂 BSFL 處理土壤中土壤原有有機物與米糠品時間較短，有機物性質以生物性代謝之螢光有機物為主。在添加不同柴油及燃料劑量經 BSFL 處理後不同時間之 HIX 值變化(圖 5-41)，當劑量為 2,000 mg/kg，柴油介於 1.49 ~ 3.14，燃料油介於 1.79 ~ 4.15；在 4,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 1.24 ~ 3.28，燃料油介於 1.97 ~ 2.94；在 6,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 1.49 ~ 1.83，燃料油介於 2.18 - 2.69；在 8,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 1.33 ~ 3.39，燃料油介於 1.89 ~ 8.15；在 10,000 mg/kg 劑量，柴油介於 1.24 ~ 7.19，燃料油介於 1.98 ~ 4.11。



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

綜合以上說明，大部分油品劑量之 HIX 值低於對照值，HIX 值隨油品劑量之增加，不若 BIX 有明顯增加現象。

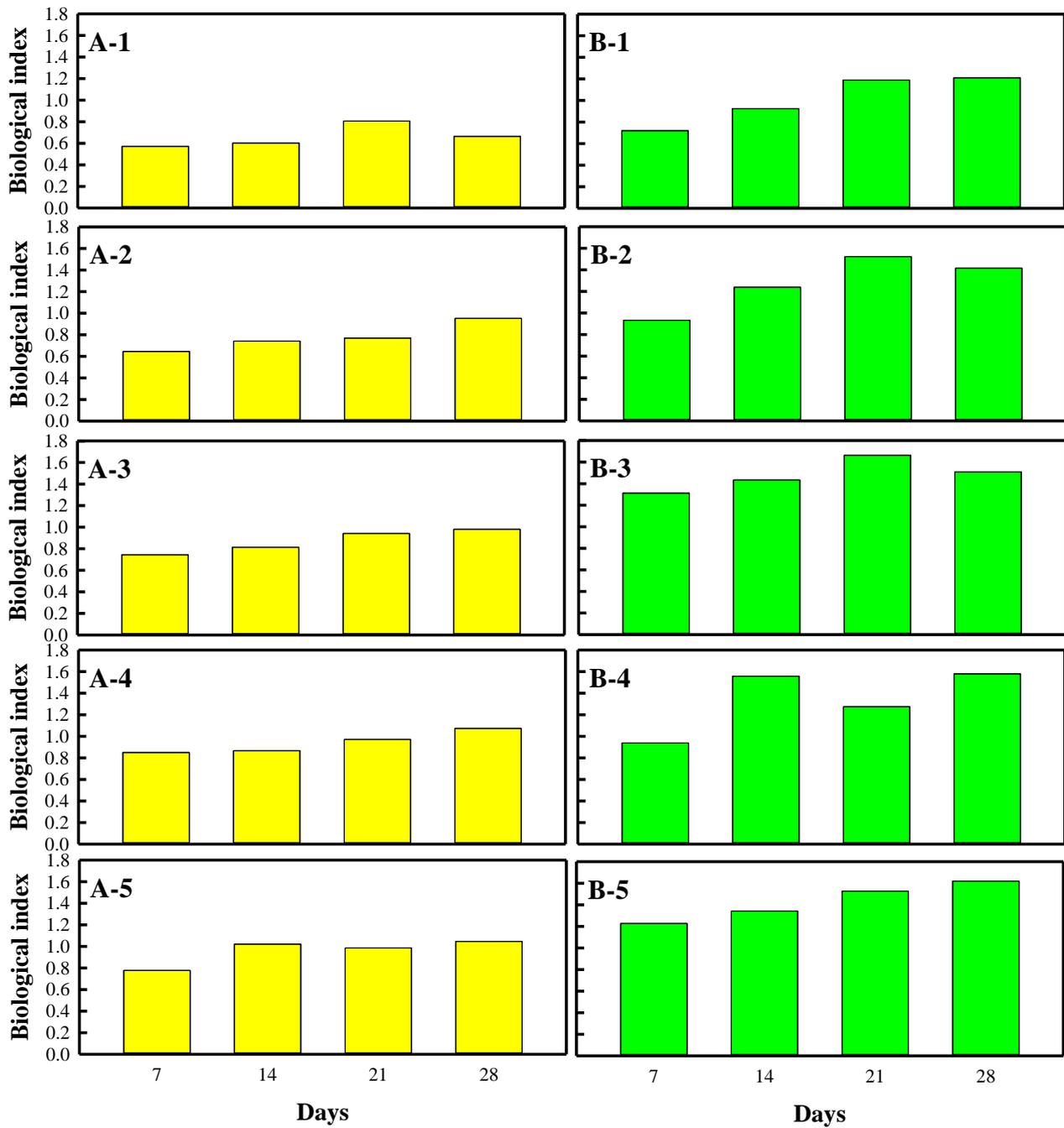


圖 5-40 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油於(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 BIX 變化



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

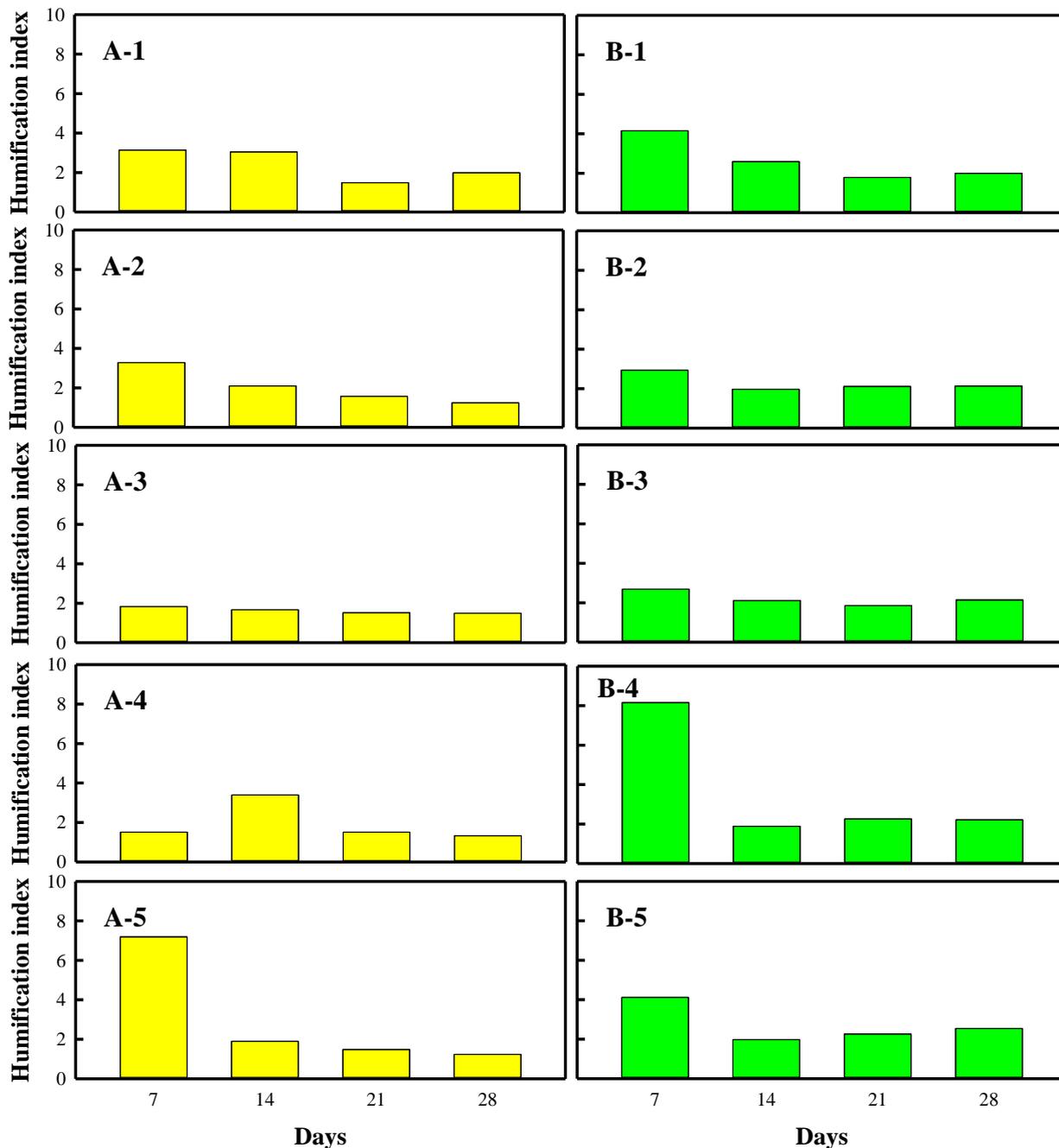


圖 5-41 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油劑量(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 HIX 變化

關於對照組  $\text{Amino}_{(I+II+VI)} \text{ acid}/\text{Humic}_{(III+V)}$  螢光強度比值之變化(圖 5-39 C)，經 7 天、14 天、21 天及 28 天之值，分別為 0.31、0.86、1.15 及 1.27，此值隨 BSFL 處理時間之增加而增加，代表含氮之螢光有機物，屬微生物分解代謝有機物增加相關。在添加不同柴油及燃料劑量經 BSFL 處理後不同時間之  $\text{Amino}_{(I+II+VI)} \text{ acid}/\text{Humic}_{(III+V)}$  螢光強度比值變化(圖 5-42)，當劑量為 2,000 mg/kg，柴油介於 0.38 ~ 1.04，燃料油介於 0.33~ 1.10；在 4,000 mg/kg 劑量，柴油介於



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

落在 0.37 ~ 1.44，燃料油介於 0.53 ~ 1.10；在 6,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 0.55 ~ 1.18，燃料油介於 0.55~ 1.05；在 8,000 mg/kg 劑量，柴油介於落在 0.50 ~ 1.26，燃料油介於 0.33~ 0.95；在 10,000 mg/kg 劑量，柴油介於 0.38~1.20，燃料油介於 0.45 – 0.89。綜合以上說明，受兩種油品污染土壤經 BSFL 處理後，土壤中 Amino<sub>(I+II+VI)</sub> acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比值，隨處理時間之增加而增加，兩油品呈現一致趨勢。

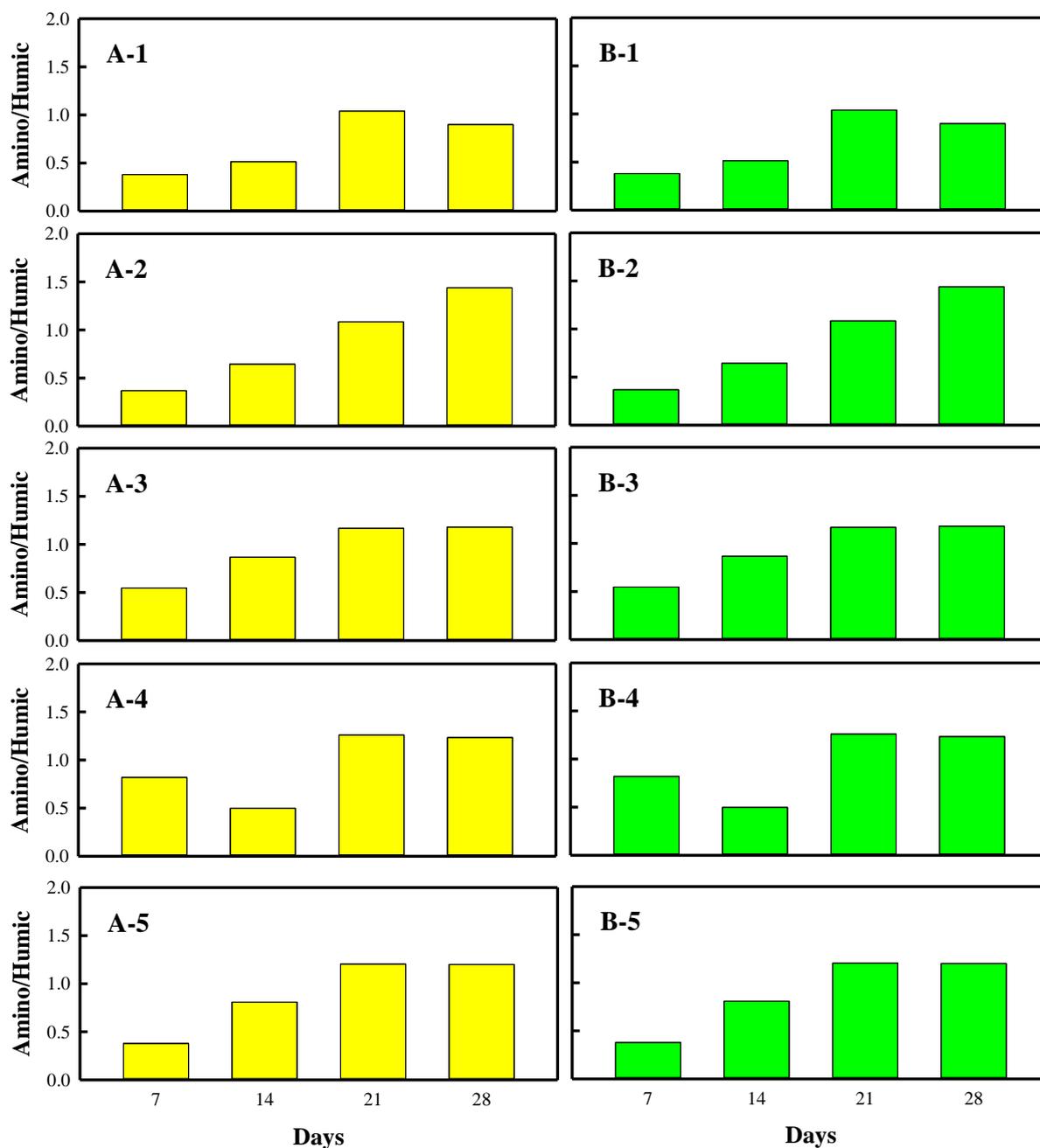


圖 5-42 三齡 BSFL 處理含(A)柴油(B)燃料油於(1) 2,000 mg/kg(2) 4,000 mg/kg(3) 6,000 mg/kg(4) 8,000 mg/kg (5) 10,000 mg/kg，於不同時間下之 Amino/Humic 比值之變化



### 5.1.7 土樣及 BSFL 腸道菌相分析

#### (1) 染色體 DNA 的抽取

本次分析樣本中包含對照組土壤樣本、添加 2,000 與 10,000 mg/kg 柴油或燃料油的土壤樣本，樣本經由 BSFL 處理 21 天後，取出 10 g 土壤樣本冰存於  $-20^{\circ}\text{C}$  數天後，樣品冷凍寄送至源資生物科技股份有限公司。土壤樣品細菌染色體 DNA 係利用 DNeasy Power Soil Kit (Qiagen) 抽取，腸道菌的 DNA 利用 Bacteria Genomic DNA Kit 抽取，染色體 DNA 以 1.2% Agarose 進行電泳檢測其 DNA 品質如圖 5-43，土壤 5 個樣品(A 圖)與 BSFL 腸道菌 7 個樣本(B 圖)都有抽取到細菌的染色體 DNA，並明顯呈現於膠片大於 10 kb 條帶 (band)，條帶下方呈現抽取染色體 DNA 常發生的拖尾 (smear) 現象。

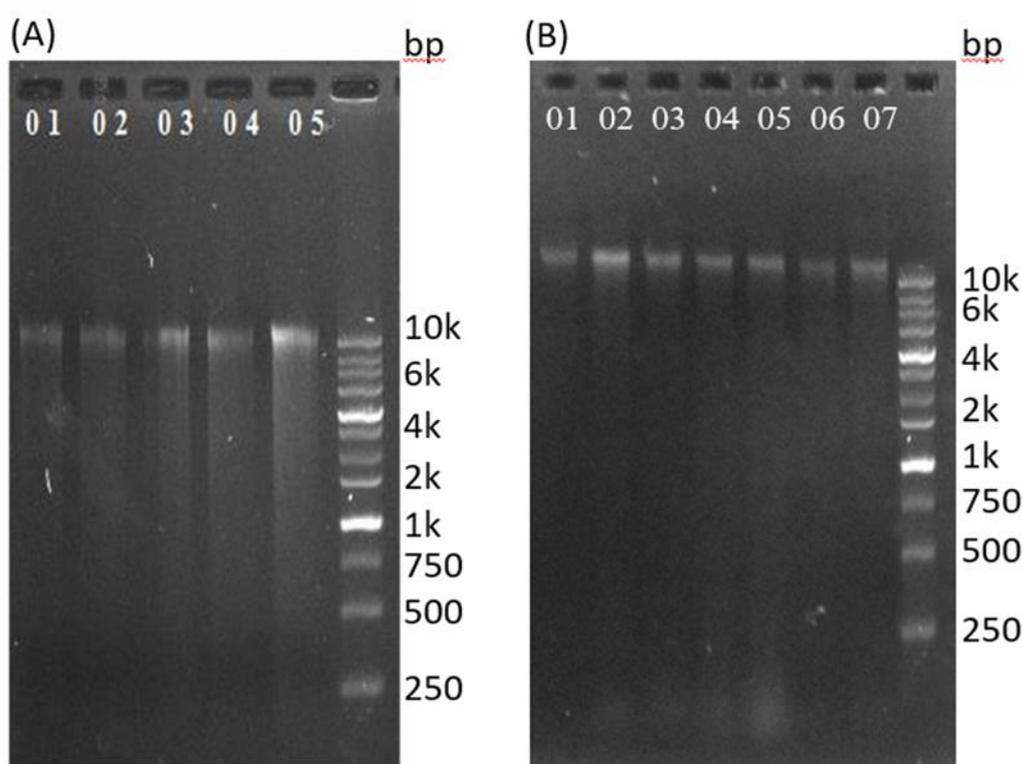


圖 5-43 3 以 1.2% Agarose 進行電泳檢測(A)土壤 (B)BSFL 腸道菌 樣本染色體 DNA 品質。

A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油/kg;A-03:10,000 mg 柴油/kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg;A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組; B-02:2,000 mg/kg 柴油;B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg 燃料油

#### (2) 土壤與 BSFL 腸道菌菌相 PCR 樣本 DNA 品質檢測

使用引子 (Primer) 341 F (341 F''CCTACGGGNGGCWGCAG) 及 805 R (805 R :GACTACHVGGGTATCTAATCC)進行 16S rDNA V3-V4 區域的擴增(大小約為 465 bp)，染



### 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

色體 DNA 使用量為 2ng，PCR 條件為 95°C 3 min；98°C 20 sec、57.5°C 20 sec、72°C 20 sec 共 25 循環；72°C 3 min。將所增幅 PCR 產物，取 3  $\mu$ l 以 2% Agarose 進行電泳，檢測樣品 DNA 品質，所得結果如圖 5-44 所示，5 個土壤樣本(圖 5-44 A)與 7 個 BSFL 腸道菌樣本(圖 5-44 B)所抽取的 DNA 經由 PCR 增幅 16S rDNA V3-V4 區域，皆可觀察到正對照組差不多大小的條帶 (465 bp)，但也增幅出非專一性較大片段的 DNA。

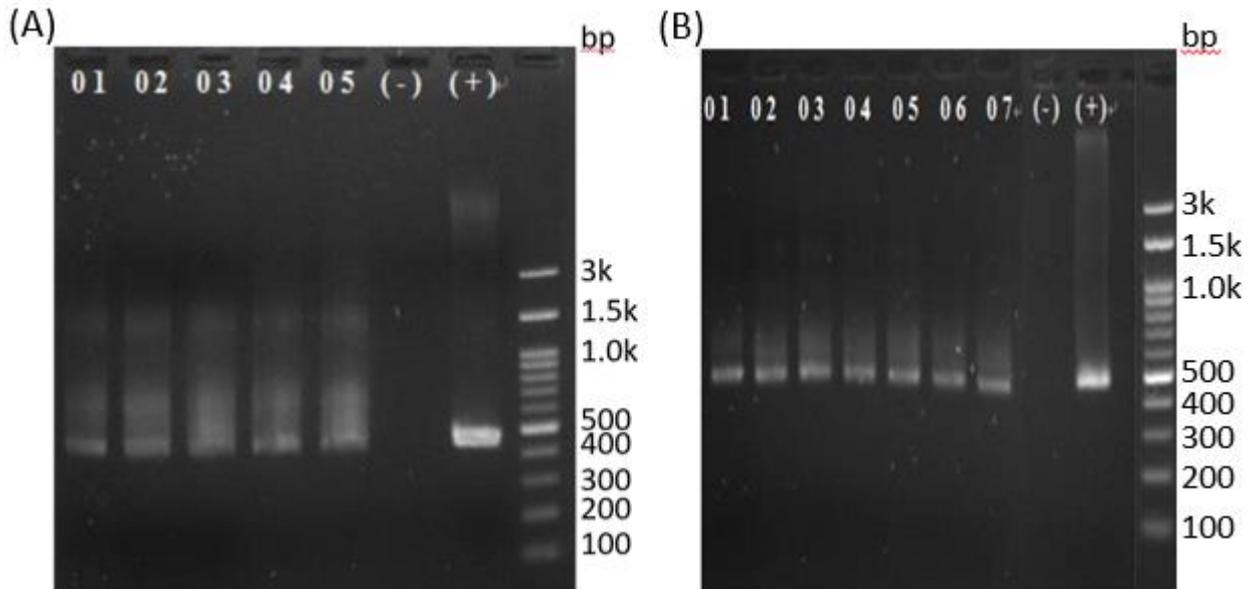


圖 5-44 圖以 2% Agarose 進行電泳檢測(A)土壤 (B)BSFL 腸道菌 樣本染色體 DNA 品質。  
 A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油/kg;A-03:10,000 mg 柴油/kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg；A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組；B-02:2,000 mg/kg 柴油；B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg 燃料油

### (3) PCR 產物的純化

利用 PCR 增幅 16S rDNA V3-V4 區域結果中顯示很多非專一性的增幅結果，大於 465 bp 的產物，尚需要利用割膠回收的方法，自 2% Agarose 切下~500 bp 位置的條帶，以 QIAquick PCR Purification Kit 進行純化，樣本以 2% Agarose 進行電泳，切取目標條帶 (400-600 bp) 後，以 MinEluteGel Extraction Kit (QIAGEN)純化，結果整理如圖 5-45 所示。圖 5-45 呈現 5 個土壤樣本與 7 個 BSFL 腸道菌樣本所增幅 16S rDNA V3-V4 區域的 16S rDNA，經過 PCR 純化套組純化後，得到大小約 500 bp 的 16S rDNA V3-V4 區域 DNA。

### (4) 土壤樣本菌相分析

在添加柴油或燃料油與無添加的 5 個土壤樣本中，總共得到約 1,231 個擴增子序列變體 (Amplicon sequence variant,ASV)，分類結果可鑑別出 28 門，65 綱，137 目，211 科，305 屬，190 種，及部分未分類(unclassified)。在分類中分析中，各檢體在不同分類階層(門 Phylum, 綱



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

Class, 目 Order, 科 Family, 屬 Genus and 種 Species) 的菌相分布柱狀圖，整理如圖 5-46；土壤樣品菌相豐富度排名前 30 名整理於表 5-1。表 5-1 顯示 BSFL 在不含油品之對照組中，經 21 天後土壤中主要菌相豐富度(>5%)，包括 *Dysgonomonas* (營醱酵單胞菌屬)(9.86%)、*Bacteroides* (擬桿菌屬細菌)(7.65%)、*Sphingobacterium* (鞘氨醇桿菌屬) (7.40%)、*Sphingopyxis* (鞘脂單胞菌屬) (7.31%)及 *Acinetobacter* (不動桿菌屬)(5.96%)。主要的菌群是 *Dysgonomonas* (營醱酵單胞菌屬)，屬革蘭氏陰性菌，主要存在於土壤中或是動物腸道中菌群之一 (Klammsteiner *et al.*, 2020；Lai *et al.*, 2024; Tanga *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2023)。 *Bacteroides* (擬桿菌屬)細菌可能存在於自然環境中，包括分佈於動植物體內(Hemapriya *et al.*, 2024；Peng *et al.*, 2024)，*B. reticulotermis* (擬桿菌)是昆蟲中腸道的常見的菌群(Yuki *et al.*, 2014)。 *Sphingobacterium* (鞘氨醇桿菌屬主要包含菌種有 *S. hotanense*、*S. mizutaii*、*S. daejeonense*) 是在土壤中常見的菌群(Xiao *et al.*, 2013；Choi and Lee, 2012)；*Acinetobacter guillouiae* (不動桿菌)是一種在水體與土壤常見的菌群，為黑水虻腸道的主要菌群之一(Cifuentes *et al.*, 2022)。

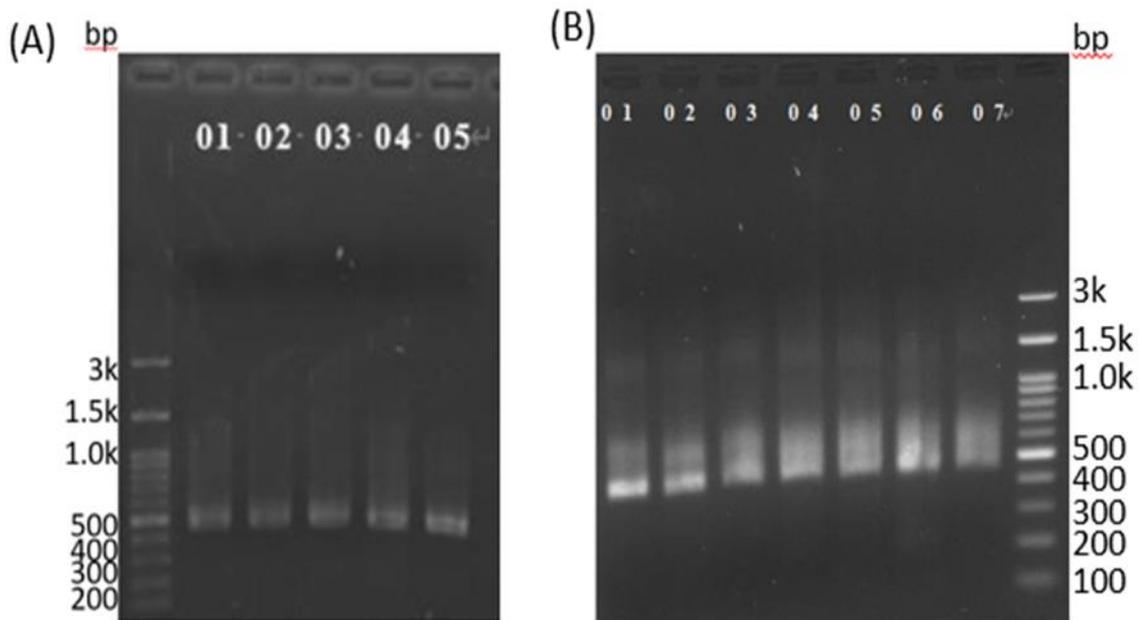


圖 5-45 圖以 2% Agarose 進行電泳檢測割膠回收檢測(A)土壤(B)腸道菌 樣本之 PCR 產物。  
A-01 :對照組；A-02: 2,000 mg 柴油/kg;A-03:10,000 mg 柴油/kg;A-04:2,000 mg 燃料油/kg;A-05:10,000 mg 燃料油/kg。B-01:對照組; B-02:2,000 mg/kg 柴油;B-03:6,000 mg/kg 柴油 B-04:10,000 mg/kg 柴油;B-05:2,000 mg/kg 燃料油；B-06: 6,000 mg/kg 燃料油；B-07:10,000 mg/kg 燃料油

土壤中添加柴油部分，經 BSFL 處理後，原對照組土壤中菌相豐富度，*Dysgonomonas* 為 9.86%，於 2,000 mg/kg 劑量，菌相豐富度微升至 10.08%；10,000 mg/kg 劑量，菌相豐富度降至 9.42%，代表 *Dysgonomonas* 對於高低劑量柴油之耐受力高。原對照組土壤中 *Bacteroides*



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

菌相豐富度 7.65%，於 2,000 mg/kg 劑量，明顯降至 4.60%，在 10,000 mg/kg 劑量，則持續降至 4.08%，代表 *Bacteroides* 在低劑量柴油土壤，即會影響其存在。原對照組土壤中 *Sphingobacterium* 菌相豐富度 7.40%，於 2,000 mg/kg 劑量，微降至 7.21%，在 10,000 mg/kg 劑量，則明顯降至 4.77%，代表 *Sphingobacterium* 在高劑量柴油土壤會影響其存在。原對照組土壤中，*Sphingopyxis* 菌相豐富度為 7.31%，於 2,000 mg/kg 劑量，明顯降至 0.30%，在 10,000 mg/kg 劑量，則持續降至 0.25%，代表 *Sphingobacterium* 對柴油存在於土壤，其受到的抑制相當明顯。原對照組土壤中 *Acinetobacter* 菌相豐富度，5.96%，於 2,000 mg/kg 劑量，微降至 5.35%，但在 10,000 mg/kg 油品劑量則明顯升至 11.46%，且高於對照組之菌相豐富度，代表 *Acinetobacter* 對柴油在高濃度油品劑量存在之耐受力高。

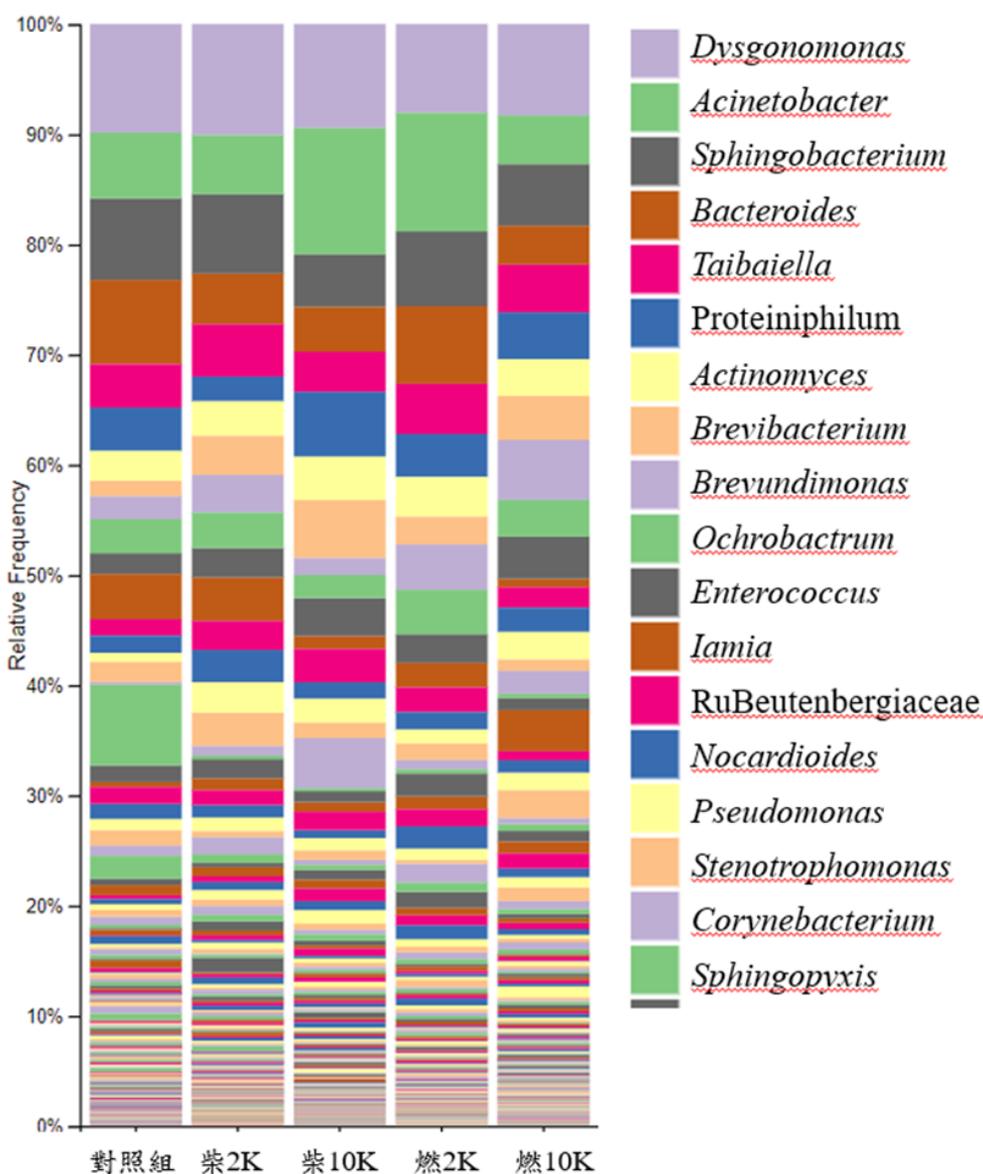


圖 5-46 不同土壤樣本菌種分類比例柱狀圖



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

表 5-1 BSFL 於土壤對照組、柴油或燃料油添加 2,000 及 10,000 mg/kg 經處理 21 天後，土壤樣品菌相豐富度排名前 20 名之比較

門	綱	目	科	屬	對照組	柴2K	柴10K	燃2K	燃10K
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Dysgonomonas	9.86%	10.08%	9.42%	8.05%	8.29%
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	7.65%	4.60%	4.08%	7.05%	3.54%
Bacteroidota	Bacteroidia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	7.40%	7.21%	4.77%	6.79%	5.59%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	7.31%	0.30%	0.25%	0.39%	0.39%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	5.96%	5.35%	11.46%	10.76%	4.42%
Actinobacteriota	Acidimicrobia	Microtrichales	Iamiaeceae	Iamia	4.11%	3.96%	1.19%	2.22%	0.77%
Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Taibaiella	3.94%	4.75%	3.63%	4.54%	4.31%
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Proteiniphilum	3.91%	2.21%	5.88%	3.89%	4.26%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Ochrobactrum	3.09%	3.23%	2.09%	4.02%	3.33%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	2.74%	3.18%	3.97%	3.63%	3.34%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ottowia	2.08%	0.79%	0.46%	0.84%	0.60%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	2.07%	3.39%	1.53%	4.13%	5.46%
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	1.88%	2.66%	3.44%	2.61%	3.82%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	1.81%	3.00%	1.39%	1.48%	1.01%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	1.52%	1.34%	1.66%	1.55%	0.82%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Crocinitomicaceae	Fluviicola	1.51%	1.75%	1.00%	2.06%	1.08%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	1.41%	3.55%	5.26%	2.50%	3.99%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Moheibacter	1.37%	0.52%	0.84%	0.32%	2.49%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Empedobacter	0.93%	1.58%	0.46%	1.72%	0.57%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.83%	2.78%	2.17%	1.27%	2.50%

土壤中添加燃料油部分，經 BSFL 處理後，原對照組土壤中 *Dysgonomonas* 菌相豐富度，9.86%，於 2,000 mg/kg 油品劑量，微降至 8.05%，在 10,000 mg/kg 油品劑量則微升至 8.29%，代表 *Dysgonomonas* 對於高低劑量燃料之耐受力高，此現象亦發生於柴油部分。原對照組土壤中 *Bacteroides* 菌相豐富度，7.65%，於 2,000 mg/kg 劑量，微降至 7.05%，在 10,000 mg/kg 劑量，明顯降至 3.58%，代表 *Bacteroides* 在高劑量燃料油土壤之耐受力低。原對照組土壤中 *Sphingobacterium* 主要菌相豐富度，7.4%，於 2,000 mg/kg 油品劑量則微升至 6.79%，在 10,000 mg/kg 油品劑量，微降至 5.59%，但仍高於照組，代表 *Sphingobacterium* 在高低劑量柴燃料油之耐受力高。原對照組土壤中 *Sphingopyxis* 菌相豐富度，7.31%，於 2,000 mg/kg 劑量，明顯降至 0.39%，在 10,000 mg/kg 油品劑量則保持為 0.39%，代表 *Sphingobacterium* 對於低劑量燃料油之耐受力不佳，此現象亦發生於含柴油之土壤。原對照組土壤中 *Acinetobacter* 菌相豐富度，5.96%，2,000 mg/kg 劑量，明顯升至 10.76%，但在 10,000 mg/kg 油品劑量，降至 4.42%，低於對照組之豐富度，代表 *Acinetobacter* 對柴油之耐受力在高低劑量表現不同，此現象與含柴油土壤之表現呈現相反的趨勢。

另原對照組土壤中菌相屬低豐富度，在受柴油或燃料油添加後，是否有增加之現象，甚至轉換至高於 5% 豐富度，亦是可關注的對象，*Brevibacterium* 菌屬，原在對照組為 1.41%，於 2,000 mg/kg 柴油劑量微升至 3.55%，在 10,000 mg/kg 油品劑量則持續升至 5.26%；於 2,000 mg/kg 燃料油劑量微升至 2.55%，在 10,000 mg/kg 油品劑量則持續升至 3.99%，代表兩種油品



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

對 *Brevibacterium* 菌屬之耐受力提昇有所助益。

### (5) BSFL 腸道菌相分析

黑水虻腸道菌的次世代定序 DNA 抽取時可能腸道中干擾物較多，定序品質較差，部分菌相分析無法確認到屬，僅能分類到科別。黑水虻腸道 7 個樣本菌相分析，總共有 906 個 ASV，分類結果可鑑別出 13 門，23 綱，60 目，102 科，155 屬，不同樣本的菌相分布柱狀圖，整理如圖 5-47；相對於培養黑水虻的土壤 5 個樣本中 1,231 個 ASV，分類結果可鑑別出 28 門，65 綱，137 目，211 科，305 屬，可能是因定序品質讓腸道菌相種類的豐富度較土壤樣本低。與對照組菌相對比，土壤樣本中豐富度達 1% 以上的菌達 18 屬(表 5-1)，然而，腸道菌的對照組，豐富度達 1% 以上的菌僅有 10 屬(表 5-2)。

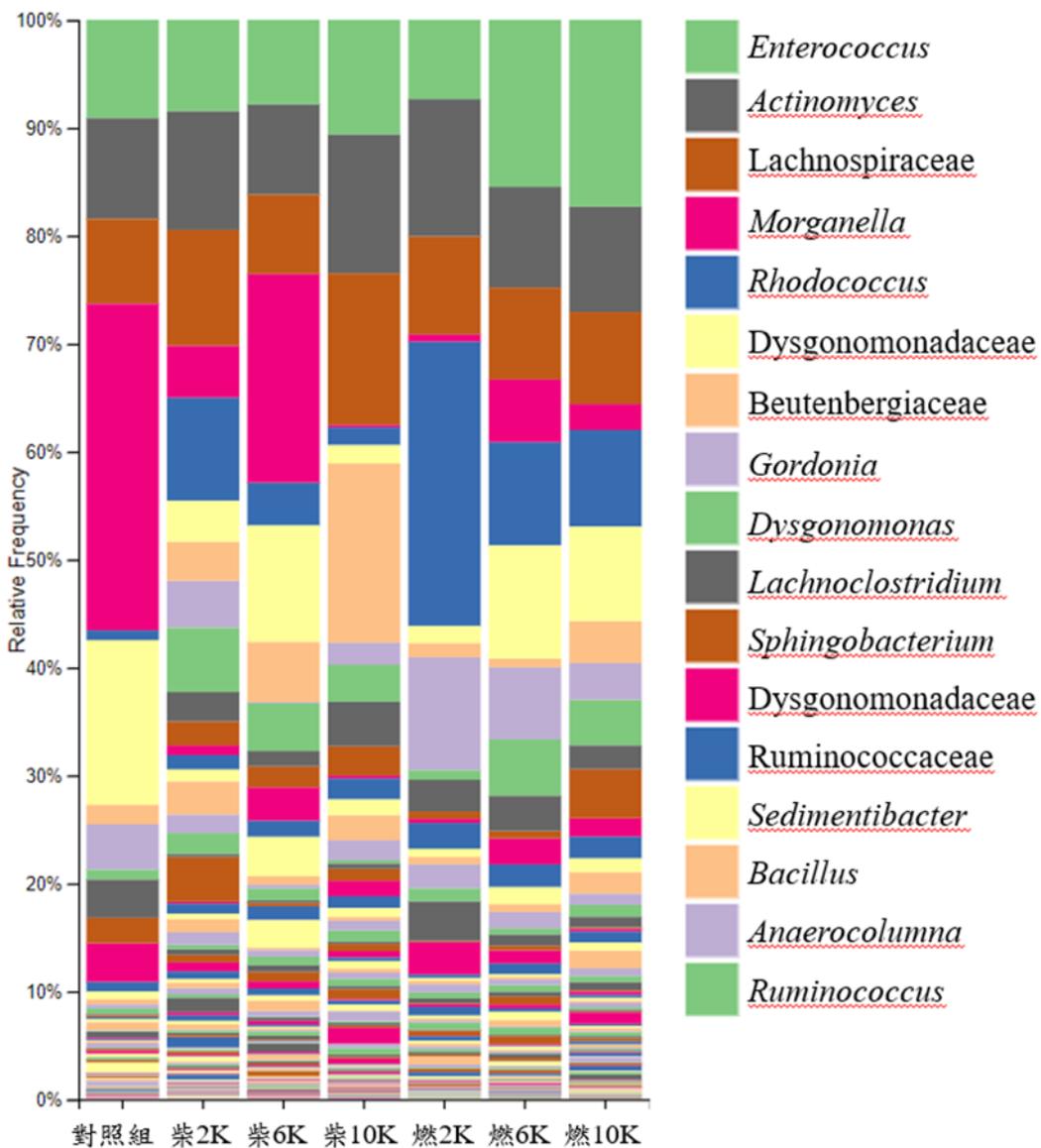


圖 5-47 不同 BSFL 腸道菌相分類比例柱狀圖



第五章 結果與討論 (含結論與建議)

表 5-2 BSFL 腸道對照組、柴油或燃料油添加 2,000、6000 及 10,000 mg/kg 經處理 21 天後，腸道樣品菌相豐富度排名前 20 名之比較

門	綱	目	科	屬	對照組	柴油 2K	柴油 6K	柴油 10K	燃油 2K	燃油 6K	燃油 10K
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	Morganella	30.23%	4.78%	19.30%	0.20%	0.64%	5.79%	2.39%
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	unclassified	15.24%	3.77%	10.78%	1.67%	1.58%	10.47%	8.75%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	9.35%	11.01%	8.38%	12.89%	12.73%	9.34%	9.76%
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	9.10%	8.45%	7.82%	10.60%	7.35%	15.48%	17.31%
Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unclassified	7.86%	10.74%	7.37%	14.06%	9.09%	8.50%	8.54%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Gordonia	4.21%	4.36%	0.12%	2.03%	10.47%	6.68%	3.42%
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	uncultured	3.60%	0.91%	3.11%	0.28%	0.39%	2.43%	1.72%
Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	3.52%	2.72%	1.41%	4.10%	2.93%	3.25%	2.17%
Bacteroidota	Bacteroidia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	2.37%	2.22%	1.95%	2.72%	0.68%	0.67%	4.55%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Beutenbergiaceae	unclassified	1.83%	3.62%	5.57%	16.63%	1.30%	0.81%	3.89%
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	Dysgonomonas	0.92%	5.95%	4.43%	3.45%	0.88%	5.25%	4.22%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	0.92%	9.58%	3.99%	1.66%	26.36%	9.59%	8.95%
Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales	Peptostreptococcaceae	Clostridioides	0.91%	0.03%	0.03%	0.01%	0.00%	0.34%	0.02%
Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Incertae Sedis	0.88%	1.32%	1.49%	1.93%	2.38%	2.10%	2.01%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Chryseobacterium	0.76%	1.25%	0.26%	0.36%	0.37%	0.22%	1.67%
Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales	Sedimentibacteraceae	Sedimentibacter	0.68%	1.11%	3.64%	1.45%	0.72%	1.55%	1.26%
Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Leucobacter	0.53%	0.54%	0.65%	0.24%	0.45%	0.46%	0.76%
Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	0.53%	1.97%	1.11%	0.33%	1.22%	0.60%	1.11%
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0.52%	3.09%	0.81%	2.34%	0.73%	0.75%	2.02%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.42%	0.01%	0.03%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%

表 5-2 顯示黑水虻腸道菌的菌相對照組中較豐富的 5 種菌相為 *Morganella* (摩根氏菌屬) 30.23%，*Dysgonomonadaceae* (營醱酵單胞菌科) 三屬豐富度佔有 19.76% (表 5-O2 排名第 2 豐富度佔比 15.24%+排名第 7 豐富度佔比 3.6%+排名第 11 豐富度佔比 0.92%)，*Actinomyces* (放線菌屬) 豐富度為 9.35%，*Enterococcus* (腸球菌屬) 豐富度為 9.10%，*Lachnospiraceae* (毛梭菌科) 二屬豐富度佔比為 11.38% (表 5-2 排名第 5 豐富度佔比 7.86%+排名第 8 豐富度佔比 3.52%)。其中 *Dysgonomonadaceae*(營醱酵單胞菌科) 菌相豐富度，在 BSFL 腸道豐富度為 19.76% 及土壤樣本中豐富度為 13.83% (表 5-1 排名第 1 豐富度佔比 9.86%+排名第 8 豐富度佔比 3.91%)，分居第 2 及第 1，其它菌相的豐富度，兩種油品樣品之差異性較大。其中毛梭菌科為厭氧菌，土壤樣本中豐富度僅為 0.39%，應與存在於大氣中的土壤樣本中，此類厭氧菌株並不易存活。

*Morganella* (摩根氏菌屬) 是革蘭氏陰性菌，屬於腸道菌科。此類細菌通常存在於人體和動物的消化道中，也可以在土壤和水中找到，在黑水虻腸道中也常見(Cifuentes *et. al.*, 2022; Ijdema *et. al.*, 2022; Lai *et. al.*, 2024; Tanga *et. al.*, 2021)。*Actinomyces* (放線菌屬) 是革蘭氏陽性菌，也是黑水虻腸道中常見的菌相(Lai *et. al.*, 2024; Tanga *et. al.*, 2021)。*Enterococcus* (腸球菌屬) 是革蘭氏陽性菌，常存在於人體和動物的消化道中，在黑水虻腸道中也常見(Cifuentes *et. al.*, 2022; Ijdema *et. al.*, 2022; Lai *et. al.*, 2024; Tanga *et. al.*, 2021)。*Lachnospiraceae* (毛梭菌科) 豐富度佔比為 11.38%，其中 *Lachnoclostridium* (毛梭菌屬) 為革蘭氏陽性厭氧菌，早年歸屬於



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

*Clostridium* (梭狀桿菌屬)，常存在於人體和動物的消化道中，在餵食黑水虻幼蟲的狗糞便中也可以檢測到(Jian *et. al.*, 2022)。

*Morganella* (摩根士菌屬)添加柴油或燃料油後，土樣柴油劑量 2,000 mg/kg、6,000 mg/kg、10,000 mg/kg 的豐富度為 4.78%、19.30%、0.20%；土樣燃料油劑量 2,000 mg/kg、6,000 mg/kg、10,000 mg/kg 的豐富度，對應值為 0.64%、5.79%、2.39%，菌相豐富度明顯較對照組 (30.23%) 為低，顯示 *Morganella* (摩根士菌屬) 之活性會受到柴油或燃料油抑制。*Enterococcus* (腸球菌屬) 對照組豐富度為 9.10%，三種柴油劑量對應之豐富度分別為 8.45%、7.82% 與 10.60%，各組間差異不大；三種燃油組劑量對應之豐富度分別為 7.35%、15.48% 與 17.31%，腸球菌對柴油有一定的耐受力，甚至此菌株在燃料油劑量提高時，菌相豐富度則是增加。*Lachnospiraceae* (毛梭菌科) 對照組 BSFL 腸道的豐富度為 7.86% (第 5)，三種柴油組劑量對應之豐富度，分別為 10.74%、7.37%、14.06%；，三種燃油組劑量對應之豐富度分別為 9.09%、8.50%、8.54%，各組間菌相豐富度差異不大，但仍些微高於對照組。但因豐富度第 2 與第 7 多的 *Dysgonomonadaceae* (營醱酵單胞菌科)，並未鑑定出屬，各組間要比對 *Dysgonomonas* (營醱酵單胞菌屬) 菌相豐富度會有其侷限性。

*Rhodococcus* (紅球菌屬) 具有分解 TPH 的能力(Elgazali *et. al.*, 2023；Wojtowicz *et. al.*, 2023；Van *et. al.*, 2018)，對照組 BSFL 腸道中的豐富度僅有 0.92%，當柴油劑量分別為 2000 mg/kg、6000 mg/kg、10000 mg/kg，對應菌相豐富度為 9.58%、3.99%、1.66%；含燃料油 2000 mg/kg、6000 mg/kg、10000 mg/kg，對應菌相豐富度為 26.36%、9.59%、8.95%。顯示低濃度的柴油可大幅增加 *Rhodococcus* 菌群豐富度 10 倍左右，燃料油低中高濃度的菌群豐富度的增幅則介於 30-10 倍之間，低濃度柴油或是燃料油可明顯增加 *Rhodococcus* 菌群豐富度。與 *Rhodococcus* 同屬於 *Nocardiaceae* (諾卡氏菌科) 的 *Gordonia* (戈登氏菌屬) 對照組豐富度為 4.21%，三種柴油劑量對應之豐富度分別為 4.36%、0.12% 與 2.03%；三種燃油組劑量對應之豐富度為 10.47%、6.68%、3.42%，低濃度燃油組的菌相豐富度也有增加的現象，但增加的幅度沒有 *Rhodococcus* 那般明顯，而 *Gordonia* 也被證實其具有分解 TPH 能力(Wojtowicz *et. al.*, 2022, 2023)。而在土壤樣本中 *Rhodococcus* 豐富度，並沒有明顯變化，對照組豐富度為 0.72%，實驗組菌相豐富度也都低於 05% 以下；*Gordonia* 則是土壤對照組豐富度為 0.45%，柴油組為 1.09% 與 0.87%，燃料油組為 1.17% 與 3.73%，土壤對照組的 *Gordonia* 豐富度明顯較腸道菌對照組低於 10 倍以上。

部分在腸道中偵測到的菌株，於土壤樣本中也有被偵測出，在表 5-1 與表 5-2 對照組中豐富度佔比前 20 名的菌株中重複出現的科別大概 6 種。其中比較特別的是 BSFL 腸道中 *Rhodococcus* 菌相豐富度，在添加柴油或是燃料油，豐富度會有明顯的增加，此類菌株被認為與分解 TPH 相關。

#### (6) 腸道菌株的分離與分解 TPH 試驗



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

由於不同細菌生長需要不同組合的營養物質，所需物質的濃度和形式是有所差異，設計不同細菌生長所需培養基，現在仍是一項困難的挑戰。所以不管使用任何生長培養基，從自然環境所能篩選到的細菌類型、多樣性和數量都有有所限制，這種現象被稱為大平板計數異常(great plate count anomaly) (Staley and Konopka, 1985)。實驗室培養基能培養出的菌落數與自然環境中菌數存在數量級的差異，使用傳統培養基只能培養出自然界中微生物菌群的一小部分(Amann *et al.*, 1995)，一般標準平板技術培養的培養效率估計在 0.1% 到 1% 之間(Kogure *et al.*, 1979; Staley and Konopka, 1985; Amann *et al.*, 1995)，培養出的細菌，並不能直接反應出自然棲息地內的功能性與系統多樣性。

因每隻黑水虻的腸道不易秤重，在計算菌落數(CFU, colony forming unit)，本研究採(CFU/隻)作為單位，每一個樣品為單獨三隻蟲的腸道實驗結果。對照組腸道菌落數約為  $3.2 \pm 0.2 \times 10^5$  (CFU/隻)，柴油劑量為 2,000 mg/kg、6,000 mg/kg、10,000 mg/kg，腸道菌落數分別為  $7.8 \pm 0.8 \times 10^5$  (CFU/隻)、 $5.2 \pm 0.7 \times 10^5$  (CFU/隻)、 $3.1 \pm 0.3 \times 10^5$  (CFU/隻)；燃料油劑量對應值分別為  $3.6 \pm 0.5 \times 10^5$  (CFU/隻)、 $3.1 \pm 0.3 \times 10^5$  (CFU/隻)、 $8.5 \pm 0.7 \times 10^5$  (CFU/隻)，各組間的菌落數差異性，不到一個數量級，由可培養出的菌落的外觀(如大小、形態、顏色、光澤度、透明度、質地、隆起狀態、邊緣特徵)，顯示不同組別的黑水虻腸道間的菌相是有些差異性(圖 5-48)，雖從數據中比對可以觀察到菌相的變化，不過這些可培養出的菌落是否具有分解 TPH 的能力，需要進一步以其它培養基進行測試。

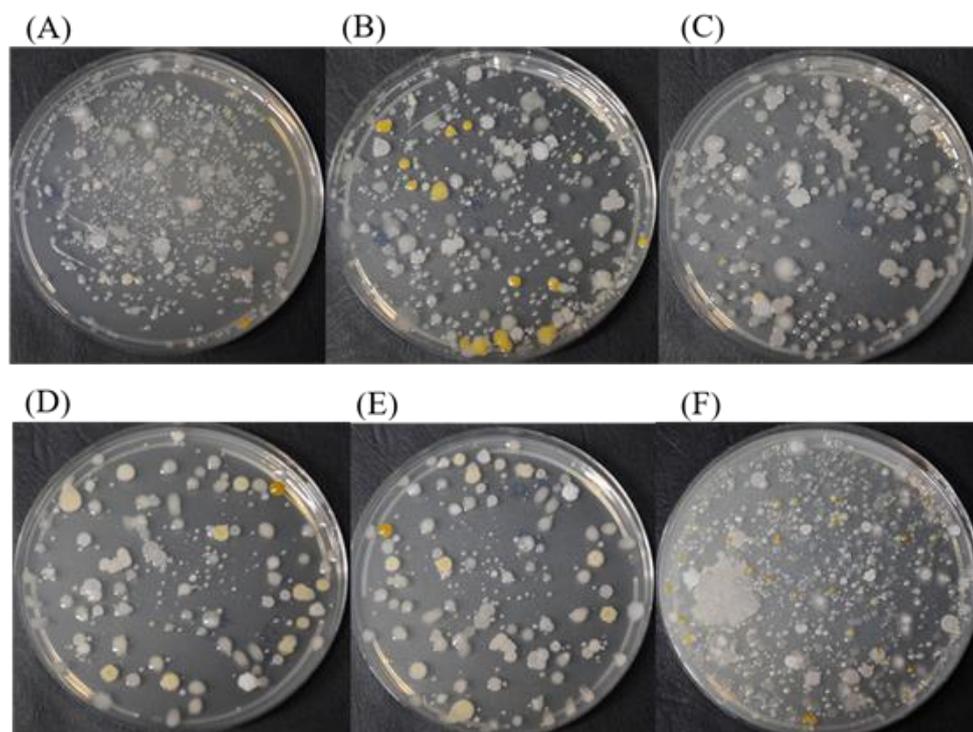


圖 5-48 BSFL 腸道菌於 1/2 營養培養基 25°C 培養 3 天生長狀況。(A)柴油 2,000 mg/kg (B)柴油 6,000 mg/kg (C) 柴油 10,000 mg/kg (D)燃料油 2,000 mg/kg (E)燃料油 6,000 mg/kg (F) 燃料油 10,000 mg/kg



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

燃料油 10,000 mg/kg

利用 QIIME 中的 Sorensen dice index analysis 統計方法進行土壤菌相與 BSFL 腸道菌相在不同油品劑量之差異分析，整理如圖 5-49 所示。圖 5-49 顯示樣品間顏色愈偏紅色，則相似度越低，在圖 5-49 A 與圖 5-49 B 中可以觀察到對照組與含柴油或是燃料油之土相或 BSFL 腸道菌相色塊顏色比較偏紅，代表菌相組成是有差異性。柴油與燃料油各組間菌相色塊顏色比較偏紫或藍，代表不同油品間之菌相差異較小。

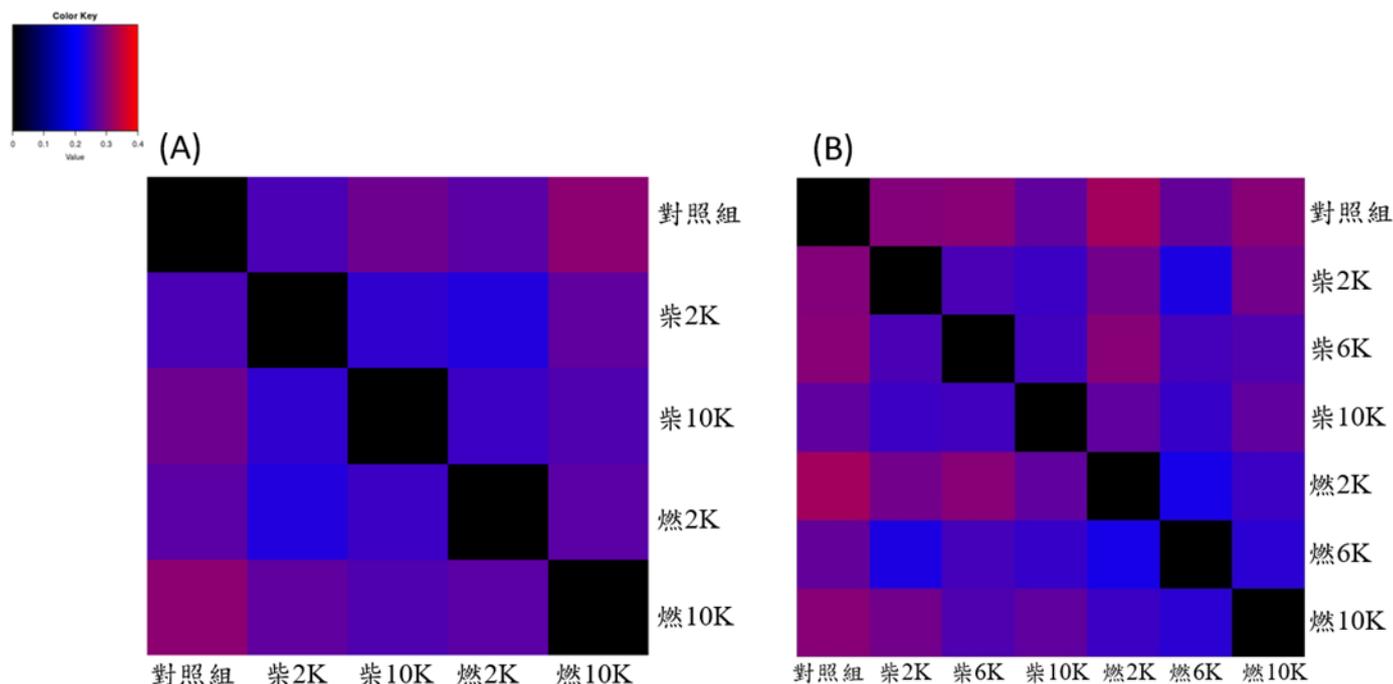


圖 5-49 利用 QIIME 中的 Sorensen dice index analysis 統計方法進行(A)土壤(B)BSFL 腸道菌相樣本相似度比對(色塊顏色越黑 代表相似越高，越紅代表相似度越低)

利用稀釋法於人工培養基培養菌落時，腸道中相對營養物較多，所以在篩選菌株時，選用一般細菌常用的營養培養基(nutrient medium)，而營養培養基相對於環境中養分較高，故初次篩選菌株時時添加建議劑量的 1/2，不過這方法只能篩選到可以於人工培養基生長的優勢菌種，在族群中豐富度較低或是不能生長於人工培養基的菌種則是無法觀察到。圖 5-50 為菌種利用滅過菌的牙籤轉點於含柴油(10,000 mg/kg)或燃料油(10,000 mg/kg)的 1/5 營養培養基中，配置 1/5 營養培養基先提供較充足的養分給細菌生長，之後細菌生長進入穩定期產生些可分解 TPH 的酶，則有機會在培養基中觀察到因 TPH 被分解而在菌落周圍出現澄清環。透過次世代定序可得知 BSFL 腸道菌相豐富度佔比超過 1% 菌僅大概 10 屬，觀察每個培養基所長出的菌落外觀，大概可觀察到十幾種不同的菌落，所以先將樣品中所觀察的不同菌落先用油性簽字筆做記號，將每個樣品大約轉點 20 顆菌落於新培養基中，大致可以涵蓋到大部分可以長於營養培養基中的不同菌落。圖 50 顯示，於 25°C 培養 2 週後，甚至培養到 4 週後，並無法在任何一個菌落周圍觀察到澄清環，不同的菌株培養兩週後，菌落大小有顯著差異，部分菌株



## 第五章 結果與討論 (含結論與建議)

在此種培養基中可以持續生長，部分菌株菌落並無持續變大，轉點於 1/5 營養培養基的菌落，並無法直接觀察到具有分解柴油或是燃料油的能力。

依前章節，含油品污染土壤經 BSFL 處理，TPH 之含量有明顯下降，BSFL 蟲體降解 TPH 的能力，腸道部分菌相豐富度隨之變化，兩者間應存在某種程度之相關性。然而，本研究使用營養培養基篩選出 BSFL 蟲體的腸道菌種，並不具有分解柴油與燃料油的能力，未來可以調整不同配方的培養基，篩選出不同種類的菌株，試圖篩選出具有分解柴油或是燃料油的菌株。例如，可設計逐漸馴化的法，將黑水虻腸道菌培養於最低營養培養基(Minimal medium)中，其中僅添加柴油或是燃料油作為唯一碳源，經過幾代的馴化培養，將可逐漸放大出具有分解柴油或是燃料油的菌株，可篩選 BSFL 腸道中具可分解 TPH 菌種，有利於日後的進一步應用。

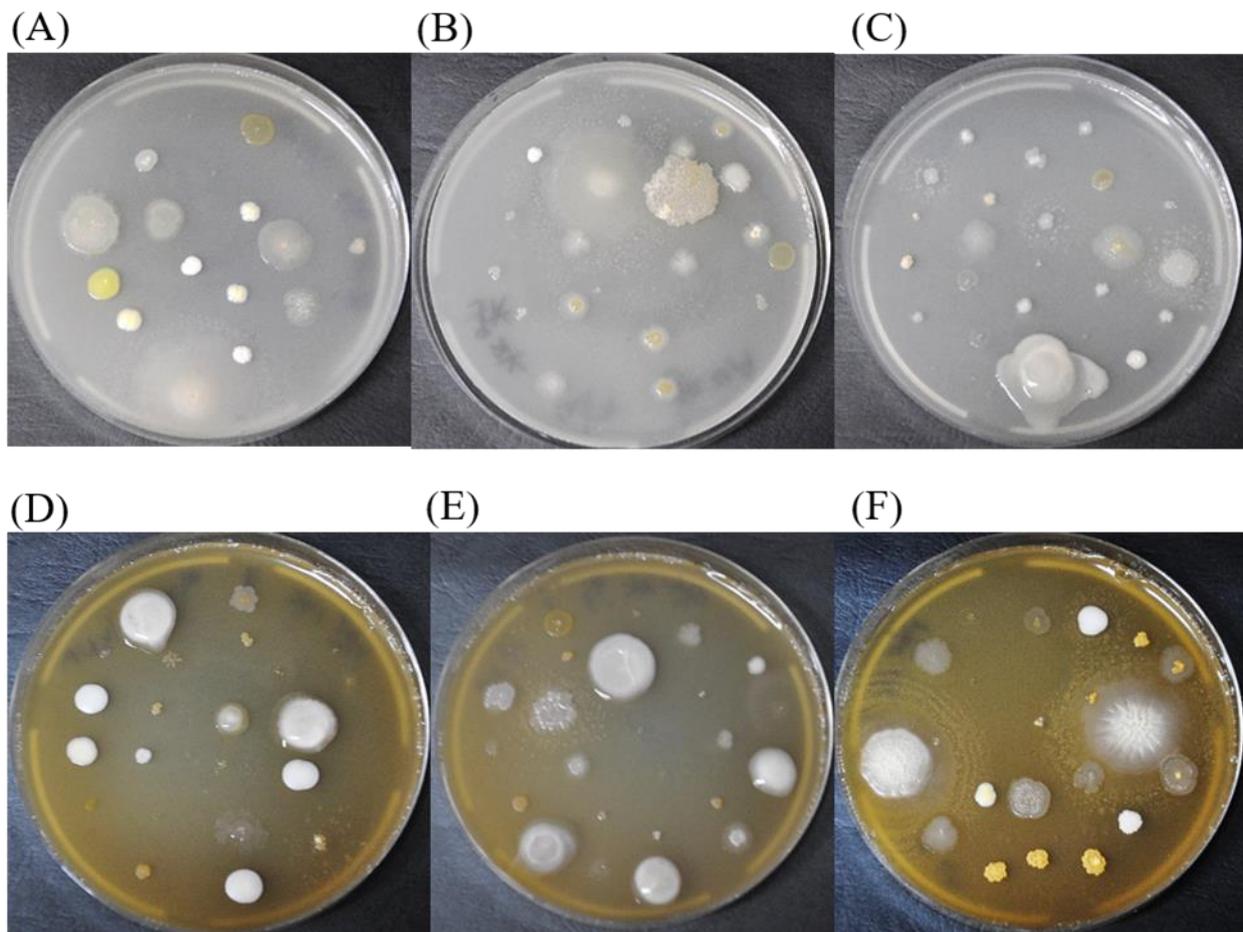


圖 5-50 BSFL 腸道菌於含柴油(A、B、C)或燃料油(D、E、F) 10,000 mg/kg 的 1/5 營養培養基，25°C 培養 14 天生長狀況。(A)柴油 2,000 mg/kg 所篩選菌株 (B)柴油 6,000 mg/kg 所篩選菌株 (C)柴油 10,000 mg/kg 所篩選菌株 (D)燃料油 2,000 mg/kg 所篩選菌株 (E)燃料油 6,000 mg/kg 所篩選菌株 (F)燃料油 10,000 mg/kg 所篩選菌株



## 5.2 結論

本研究以 3 齡 BSFL 進行 TPH 劑量控制在 2,000-10,000 mg/kg 受污染土壤，進行 21 天之實驗，完成研究目的，並說明如下：

### (1) 蟲體耐受性及安全性：

BSFL 對油品之耐受程度相當高。不同劑量柴油，部分預蛹亦可產生羽化。BSFL 處理柴油及燃料油後，蟲體內並無檢測到油品中高低碳數 TPH 成份之累積，另蟲體目前無檢測到原油品中低碳及高碳數 TPH 之殘留，代表其後續利用之可行性高，但如同委員之建議，相關安全標準進行重金屬與有害成分測試，仍需關注，以確保其環保性與安全性。

### (2) 減量評估：

BSFL 在兩種油品劑量之生長速率均高於對照組。在低碳數 TPH，前後柴油之劑量均低於 600 mg/kg，無法計算去除速率，但 BSFL 對土壤中燃料油之移除速率落於 200-400 mg/kg  $\pm$ day<sup>-1</sup>。BSFL 對高低碳數 TPH 之生物質轉換速率，在低碳數部分，燃料油高於柴油，然而在高碳數部分，柴油高於燃料油。BSFL 對柴油中 TPH<sub>low-carbon</sub> 去除應可有效控制，但對燃料油部分，高劑量 TPH<sub>low-carbon</sub> 去除也是不錯，但低劑量部分，去除效能不佳，應與 BSFL 釋出與油品相同之物質相關。BSFL 對燃料油中 TPH<sub>high-carbon</sub> 去除率，燃料油優於柴油。

### (3) 減污土壤肥力測試

加不同油品劑量土壤經 BSFL 處理後之 pH 值、導電度、有機質、有效氮含量，均較對照組有明顯提升。但在有效磷含量部分，不同柴油劑量表現優於對照組，不同燃料油劑量則表現低於對照組。受兩種油品污染土壤經 BSFL 處理後，土壤中 Amino<sub>(I+II+VI)</sub> acid/Humic<sub>(III+V)</sub> 螢光強度比值，隨處理時間之增加而增加；另各劑量燃料油土壤 BIX 值高於同劑量柴油之 BIX 值，代表土壤中菌相活性隨反應時間而強化。BSFL 處理油品後萃出液對小麥發芽率之影響，含燃料油者表現優於含柴油者，兩種油品對小麥發芽率均優於對照組，但對玉米及水稻發芽率，兩種油品則低於對照組。

### (4) 菌種鑑定，尋找優勢菌種：

土壤中菌相分析中，對照組與實驗組雖有所變化，可觀察 *Dysgonomonas* 對兩種油品高低劑量燃料之耐受力高；*Brevibacterium* 菌屬，在兩種油品劑量增加，其菌相豐富度隨之增加，BSFL 腸道中菌相 *Rhodococcus* (紅球菌屬) 實驗組(添加柴油或是燃料油)豐富度比對照組多出 10 倍以上。利用 QIIME 中的 Sorensen dice index analysis 統計方法，對照組與含柴油或是燃料油之土相或 BSFL 腸道菌相具有差異性。

## 5.3 建議

(1) 進行純化放大培育以 SFS 圖譜，柴油標準品之特徵波峰 Ex=340 nm( $\Delta\lambda=40$  nm)，燃料油標



準品之特徵波峰  $\lambda_{\text{ex}}=410 \text{ nm}$  ( $\Delta\lambda=40 \text{ nm}$ )，兩者在 TPH 濃度 2,000-10,000 mg/kg 均有高迴歸係數， $R>0.97$ 。可作為 BSFL 處理含油品污染土壤中 TPH 效能初判之工具。受限 SFS 以最大特徵螢光強度，無法區別原油品與濃度之差異性，但以積分面積進行或採多點螢光特徵波峰強度值或導入 peak-fit 分解圖譜，強化劑量感度差異化，低劑量濃度可以進行判別，將是未來可持續進行方式。

- (2) 本計畫屬初期性之探勘，依固定 BSFL 數目、土樣量、固定米糠量、固定溫度及 2,000-10,000 mg/kg 之柴油與燃料油，進行 BSFL 各項功能評估，雖獲初步研究成果，但各參數間之作用，如何透過實驗設計，進行各參數或各參數間對油品高低碳數 TPH 劑量去除之影響，應是值得進行的主題。
- (3) 關於 BSFL 腸道菌實驗，調配不同培養基進行具分解 TPH 能力的菌株篩選與純化，若篩選到具分解 TPH 能力菌株，可利用複合式的生物工法，增加其對高碳及低數 TPH 之降解效率。另不同時間點與優勢菌種或油品濃度變化的演替，可進行更深入的探討。
- (4) 透過 BSFL 蟲數調控及其它相關物化環境調整至最佳化，強化高碳數柴油減量至符合法令標準，而 BSFL 蟲體未累積標準油品之高低碳數之 TPH 物質，意謂以 BSFL 整治污染土壤及配合蟲體高有機物土壤之再應用，仍是值得進一步在處理量能放大思考。
- (5) 蟲糞和蟲體的再利用途徑，如作為有機肥料或土壤改質劑，並需依循相關安全標準進行重金屬與有害成分測試，以確保其環保性與安全性。

## 5.4 後續工作說明

- (1) 關於國內外研討會與期刊發表工作，會依期末報告完成，隨之進行。
- (2) 關於 BSFL 之培育術技術轉移及重建中，可分二部分說明：

1. 專利申請：目前在培育技術部分，已與專利公司規劃新型及發明專利申請，分別為「循環培育系統」及「重油處理方法」，預計送件日期為 113 年 12 月 31 日。
2. 重建：有關後續執行方向，整合委員所提有用的建議，並回應於期末報告 5-3 建議(2)，然而，若要進行相關研究，仍需要 BSFL 培育之重建規劃，除與友校合力建置場域外，校內場域重建規劃，並採共同合作支援模式，但發展主題，屏科大則以農業副資材處理為主，本校則以土壤油品及重金屬處理為主之研究方向，可降低計畫執行工推動風險。



## 參考文獻

- Abduh, M. Y., Nadia, M. H., Manurung, R., & Putra, R. E. (2018). Factors affecting the bioconversion of Philippine tung seed by black soldier fly larvae for the production of protein and oil-rich biomass. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(3), 836-842.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169.
- Antizar-Ladislao, B., Beck, A. J., Spanova, K., Lopez-Real, J., and Russell, N. J. (2007). The influence of different temperature programs on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *Journal of Hazardous Materials*. 144:340~347
- Balba, M., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*, 32(2), 155-164.
- Baldal, E., van der Linde, K., Van Alphen, J., Brakefield, P., & Zwaan, B. (2005). The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(3), 407-416.
- Banks, I. J., Gibson, W. T., & Cameron, M. M. (2014). Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Tropical Medicine & International Health*, 19(1), 14-22.
- Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M., & van Loon, J. J. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed—a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2), 105-120.
- Bilal, M., Jaffrezic, A., Dudal, Y., Le Guillou, C., Menasseri, S. and Walter, C. (2010) Discrimination of Farm Waste Contamination by Fluorescence Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis During a Biodegradation Study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5): 3093-3100.
- Chen, L., Hu, X., Cai, T., Yang, Y., Zhao, R., Liu, C., Li, A., & Jiang, C. (2019). Degradation of Triclosan in soils by thermally activated persulfate under conditions representative of in situ chemical oxidation (ISCO). *Chemical Engineering Journal*, 369, 344-352.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A. & Booksh, K. (2003). Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental scienc*



- Cheng, J. Y., Chiu, S. L., & Lo, I. M. (2017). Effects of moisture content of food waste on residue separation, larval growth and larval survival in black soldier fly bioconversion. *Waste management*, 67, 315-323.
- Chia, S. Y., Tanga, C. M., Khamis, F. M., Mohamed, S. A., Salifu, D., Sevgan, S., Booth, D. C., & Sheppard, C. (1984). Oviposition of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): eggs, masses, timing, and site characteristics. *Environmental entomology*, 13(2), 421-423.
- Chia, S. Y., Tanga, C. M., Osuga, I. M., Mohamed, S. A., Khamis, F. M., Salifu, D., Sevgan, S., Fiaboe, K. K. M., Niassy, S., van Loon, J. J. A., Dicke, M., & Ekesi, S. (2018). Effects of waste stream combinations from brewing industry on performance of Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *PeerJ*, 6, e5885.
- Chiam, Z., Lee, J. T. E., Tan, J. K. N., Song, S., Arora, S., Tong, Y. W., & Tan, H. T. W. (2021). Evaluating the potential of okara-derived black soldier fly larval frass as a soil amendment. *J Environ Manage*, 286, 112163.
- Cho, S., Kim, C.-H., Kim, M.-J., & Chung, H. (2020). Effects of microplastics and salinity on food waste processing by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of Ecology and Environment*, 44, 1-9.
- Choi HA, Lee SS. (2012). *Sphingobacterium kyonggiense* sp. nov., isolated from chloroethene-contaminated soil, and emended descriptions of *Sphingobacterium daejeonense* and *Sphingobacterium mizutaii*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62, 2559-2564.
- Cifuentes Y, Vilcinskis A, Kämpfer P, Glaeser SP. (2022). Isolation of *Hermetia illucens* larvae core gut microbiota by two different cultivation strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 115, 821-837.
- Cifuentes Y, Vilcinskis A, Kämpfer P, Glaeser SP. 2022. Isolation of *Hermetia illucens* larvae core gut microbiota by two different cultivation strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 115:821-837.
- Curiel-Alegre, S., Velasco-Arroyo, B., Rumbo, C., Khan, A. H. A., Tamayo-Ramos, J. A., Rad, C., Gallego, J. L. R., & Barros, R. (2022). Evaluation of biostimulation, bioaugmentation, and organic amendments application on the bioremediation of recalcitrant hydrocarbons of soil. *Chemosphere*, 307(Pt 1), 135638.
- De Filippis F, M. Bonelli, D. Bruno, G. Sequino, A. Montali, M. Reguzzoni, E. Pasolli, D. Savy, S. Cangemi, V. Cozzolino, G. Tettamanti, D. Ercolini, M. Casartelli, S. Caccia. 2023. Plastics shape the black soldier fly larvae gut microbiome and select for biodegrading functions.



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

Microbiome. PMID: 37705113

- Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste management & research*, 27(6), 603-610.
- Diener, S., Zurbrügg, C., Gutiérrez, F. R., Nguyen, D. H., Morel, A., Koottatep, T., & Tockner, K. (2011). Black soldier fly larvae for organic waste treatment-prospects and constraints. *Proceedings of the WasteSafe*, 2, 13-15.
- Eiroa, A.A., Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M. and Rodr'iguez, D.P.( 2000), 'Resolution of Benzo[a]pyrene in Complex Mixtures of other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Comparison of two Spectrofluorimetric Methods Applied to Water Samples', *Analyst* 125, 1321– 1326.
- Elgazali A, Althalb H, Elmusrati I, Ahmed HM, Banat IM. (2023). Remediation approaches to reduce hydrocarbon contamination in petroleum-polluted soil. *Microorganisms*. 11, 2577.
- Elise A. Asquith, Phillip M. Geary, Annette L. Nolan , & Craig A. Evans. (2012). Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 637-650.
- Fan, M., Liu, N., Wu, X., Zhang, J., & Cai, M. (2020). Tolerance and Removal of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds (PAHs) by Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Environ Entomol*, 49(3), 667-672.
- Fiaboe, K. K. M., Niassy, S., van Loon, J. J. A., Dicke, M., & Ekesi, S. (2018). Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. *PLoS One*, 13(11), e0206097.
- Firmansyah, M., & Abduh, M. Y. (2019). Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon*, 5(6).
- Gobbi, F. P. (2012). Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa.
- Gobbi, P., Martinez-Sanchez, A., & Rojo, S. (2013). The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *European Journal of Entomology*, 110(3), 461.
- Gold, M., Tomberlin, J. K., Diener, S., Zurbrugg, C., & Mathys, A. (2018). Decomposition of



- biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Manag*, 82, 302-318.
- Gómez, R. G., Pandiyan, T., Iris, V. A., Luna-Pabello, V., & de Bazúa, C. D. (2004). Spectroscopic determination of poly-aromatic compounds in petroleum contaminated soils. *Water, air, and soil pollution*, 158, 137-151.
- Gorrens E, Van Moll L, Frooninckx L, De Smet J, Van Campenhout L. (2021). Isolation and identification of dominant bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) envisaging practical applications. *Front Microbiol*. 12, 665546.
- Gorrens E, Van Moll L, Frooninckx L, De Smet J, Van Campenhout L. 2021. Isolation and identification of dominant bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) envisaging practical applications. *Front Microbiol*. 12:665546.
- Green, G.L. and O'Haver, T.C. (1974). Derivative Luminescence Spectrometry, *Anal. Chem.*, 46, 2191–2196.
- Hemapriya M, Nataraja KN, Suryanarayanan TS, Uma Shaanker R. (2024). Comparative metagenomic analysis of aed endobiome of domesticated and wild finger millet species (*Eleusine spp.*): unveiling microbial diversity and composition. *Curr Microbiol*. 81, 373.
- Holmes, L., VanLaerhoven, S., & Tomberlin, J. (2016). Lower temperature threshold of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) development. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2(4), 255-262.
- Huguet A., Vacher L., Relexans S., Saubusse S., Froidefond J. M., and Parlanti E. (2009). Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry*.40, 706-719.
- Ijdema F, De Smet J, Crauwels S, Lievens B, Van Campenhout L. (2022). Meta-analysis of larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) microbiota based on 16S rRNA gene amplicon sequencing. *FEMS Microbiol Ecol*. 98, fiac094.
- Ishak, S., & Kamari, A. (2019). Biodiesel from black soldier fly larvae grown on restaurant kitchen waste. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 1143-1150.
- Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S.-B., Choi, Y., & Lee, S.-J. (2011). The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Current microbiology*, 62, 1390-1399.
- Jian S, Zhang L, Ding N, Yang K, Xin Z, Hu M, Zhou Z, Zhao Z, Deng B, Deng J. (2022). Effects



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

of black soldier fly larvae as protein or fat sources on apparent nutrient digestibility, fecal microbiota, and metabolic profiles in beagle dogs. *Front Microbiol.* 13, 1044986.

Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., Thongrunkiat, S., Apiwathnasorn, C., Singhaniyom, S., Bellec, C., & Dujardin, J. P. (2007). Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine & International Health*, 12(11), 1354-1360.

Joseph, G. L. 1990. Microbial degradation of hydrocarbon in the environment. *Microbial Reviews.* 54(3):305-315

Julita, U., Fitri, L., Putra, R., & Permana, A. (2019). Survival and reproductive value of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on vegetable and fruits waste rearing substrate. *Journal of Physics: Conference Series*,

Julita, U., Fitri, L., Putra, R., & Permana, A. (2019). Survival and reproductive value of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on vegetable and fruits waste rearing substrate. *Journal of Physics: Conference Series*

Kalová, M., & Borkovcová, M. (2013). Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis*, 61(1), 77-83.

Kastolani, W. (2019). Utilization of BSF to reduce organic waste in order to restoration of the Citarum River Ecosystem. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*,

Kim, S., Jung, T., Ha, Y., Gal, S., Noh, C., Kim, I., Lee, J., & Yoo, J. (2019). Removal of fat from crushed black soldier fly larvae by carbon dioxide supercritical extraction. *J. Anim. Feed Sci.* 28, 83-88.

Kim, W., Bae, S., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., & Koh, Y. (2011). Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 11-14.

Kister, J., Pieri, N., Alvarez, R., Diez, M.A. and Pis, J.J. (1996). Effects of Preheating and Oxidation on two Bituminous Coals Assessed by Synchronous UV Fluorescence and FTIR Spectroscopy. *Energy and Fuels* 10, 948–957.

Klammsteiner T, Walter A, Bogataj T, Heussler CD, Stres B, Steiner FM, Schlick-Steiner BC, Arthofer W, Insam H. (2020). The core gut microbiome of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae raised on low-bioburden diets. *Front Microbiol.* 11, 993.

Klammsteiner T, Walter A, Bogataj T, Heussler CD, Stres B, Steiner FM, Schlick-Steiner BC,



- Arthofer W, Insam H. 2020. The core gut microbiome of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae raised on low-bioburden diets. *Front Microbiol.* 11:993.
- Klammsteiner, T., Turan, V., Fernández-Delgado Juárez, M., Oberegger, S., & Insam, H. (2020). Suitability of black soldier fly frass as soil amendment and implication for organic waste hygienization. *Agronomy*, 10(10), 1578.
- Kogure K, Simidu U, & Taga N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* 25, 415–420.
- Kwok, C.-K., & Loh, K.-C. (2003). Effects of Singapore soil type on bioavailability of nutrients in soil bioremediation. *Advances in Environmental Research*, 7(4), 889-900.
- Kwon, J., & Kim, J. (2016). Treatment efficiency of food waste by the black soldier fly (*Hermetia illucens*) depending on salinity and moisture contents. *J Korea Soc Waste Manag*, 33(6), 590-597.
- Lai L, Long Y, Luo M, Tu B, Wu Z, Liu J, Wan Z, Wang G, Wang X, Liu H. (2024). Degradation of edible mushroom waste by *Hermetia illucens* L. and consequent adaptation of its gut microbiota. *Sci Rep.* 14:9903.
- Lalander, C., Diener, S., Zurbrügg, C., & Vinnerås, B. (2019). Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of cleaner production*, 208, 211-219.
- Lardé, G. (1989). Investigation on some factors affecting larval growth in a coffee-pulp bed. *Biological Wastes*, 30(1), 11-19.
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews.* 54:305~315
- Liu, C., Yao, H., Chapman, S. J., Su, J., & Wang, C. (2020). Changes in gut bacterial communities and the incidence of antibiotic resistance genes during degradation of antibiotics by black soldier fly larvae. *Environ Int*, 142, 105834.
- Liu, J., Zhang, H., Yao, Z., Li, X., & Tang, J. (2019). Thermal desorption of PCBs contaminated soil with calcium hydroxide in a rotary kiln. *Chemosphere*, 220, 1041-1046.
- Liu, T., Awasthi, M. K., Awasthi, S. K., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). Impact of the addition of black soldier fly larvae on humification and speciation of trace elements during manure composting. *Industrial Crops and Products*, 154. 7



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

- Liu, Z., Minor, M., Morel, P. C., & Najjar-Rodriguez, A. J. (2018). Bioconversion of three organic wastes by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environmental entomology*, 47(6), 1609-1617.
- Lombardi, A.T. and Jardim, W.F. (1999). Fluorescence Spectroscopy of High Performance Liquid Chromatography Fractionated Marine and Terrestrial Organic Materials. *Wat. Res.* 33, 512–520.
- Lombardi, A.T. and Jardim, W.F. (1999). Fluorescence Spectroscopy of High Performance Liquid Chromatography Fractionated Marine and Terrestrial Organic Materials. *Wat. Res.* 33, 512–520.
- Mai, H. C., Dao, N. D., Lam, T. D., Nguyen, B. V., Nguyen, D. C., & Bach, L. G. (2019). Purification process, physicochemical properties, and fatty acid composition of black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) larvae oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(11), 1303-1311.
- McNally, D.L., Mihelcic, J. R. and Lueking, D.R. (1999). Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere*, 38, 1313-1321.
- Mohd-Noor, S.-N., Lim, J.-W., Mah-Hussin, M.-T.-A., Ramli, A., Chew, T.-L., Bashir, M. J., Tan, W.-N., & Beniers, J. (2018). Potential of protein and lipid productions from black soldier fly larvae fed with mixture of waste coconut endosperm and soybean curd residue. *AIP Conference Proceedings*,
- Moreau, J., Benrey, B., & Thiéry, D. (2006). Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology*, 20(4), 592-600.
- Nakamura, S., Ichiki, R. T., Shimoda, M., & Morioka, S. (2016). Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. *Applied entomology and zoology*, 51, 161-166.
- Nakashima, K., Yashuda, S., Ozaki, Y. and Noda, I. (2000). Two-Dimensional Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Cyclohexane. *J. Phys. Chem. A*. 104, 9113–9120.
- Newton, L., Sheppard, C., Watson, D. W., Burtle, G., & Dove, R. (2005b). Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. *Animal and Poultry Waste Management Center, North Carolina State University, Raleigh, NC*, 17(2005), 18.



- Nguyen, H. C., Liang, S.-H., Li, S.-Y., Su, C.-H., Chien, C.-C., Chen, Y.-J., & Huong, D. T. M. (2018). Direct transesterification of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for biodiesel production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 85, 165-169.
- Nguyen, T. T., Tomberlin, J. K., & Vanlaerhoven, S. (2013). Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development. *Journal of medical entomology*, 50(4), 898-906.
- Nguyen, T. T., Tomberlin, J. K., & Vanlaerhoven, S. (2015). Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environmental entomology*, 44(2), 406-410.
- Noor, S. N. M., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., Chew, T. L., Ho, Y. C., & Mohamad, M. (2018). Lipid and Protein from Black Soldier Fly Larvae Fed with SelfFermented Coconut Waste Medium. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 46(1), 88-95.
- Noor, S. N. M., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., Chew, T. L., Ho, Y. C., & Mohamad, M. (2018). Lipid and Protein from Black Soldier Fly Larvae Fed with SelfFermented Coconut Waste Medium. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 46(1), 88-95.
- Okparanma, R. N., & Mouazen, A. M. (2013). Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: a review of spectroscopic and nonspectroscopic techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(6), 458-486.
- Palanisamy et al. 2014. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil., *J. Environ. Health Sci. Eng* Vol.,12, 142-150
- Pang, W., Hou, D., Chen, J., Nowar, E. E., Li, Z., Hu, R., Tomberlin, J. K., Yu, Z., Li, Q., & Wang, S. (2020). Reducing greenhouse gas emissions and enhancing carbon and nitrogen conversion in food wastes by the black soldier fly. *Journal of environmental management*, 260, 110066.
- Park, S. I., & Yoe, S. M. (2017a). A novel cecropin-like peptide from black soldier fly, *Hermetia illucens*: Isolation, structural and functional characterization. *Entomological Research*, 47(2), 115-124.
- Park, S. I., & Yoe, S. M. (2017b). Defensin-like peptide<sup>3</sup> from black soldier fly: Identification, characterization, and key amino acids for anti-Gram-negative bacteria. *Entomological Research*, 47(1), 41-47.



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

- Parodi, A., Yao, Q., Gerrits, W. J. J., Mishyna, M., Lakemond, C. M. M., Oonincx, D. G. A. B., & Van Loon, J. J. A. (2022). Upgrading ammonia-nitrogen from manure into body proteins in black soldier fly larvae. *Resources, Conservation and Recycling*, 182.
- Pastor, B., Velasquez, Y., Gobbi, P., & Rojo, S. (2015). Conversion of organic wastes into fly larval biomass: bottlenecks and challenges. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(3), 179-193.
- Peng Y, Du Y, Zhang Y, Wang Z, Hu T, Mai Y, Song H, Pan W, Cai Q, Ge F, Fan Y, Kim HY, Liu D, Guan X. (2024). Gegen Qinlian decoction alleviates depression-like behavior by modulating the gut microenvironment in CUMS rats. *BMC Complement Med Ther*. 24, 339.
- Qun Li, Y., Huang, X.Z., Gou Xu, J. and Chen, G.Z. (1992). Derivative Constant-Energy Synchronous Fluorescence for Simultaneous Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Mixtures. *Anal. Chim. Acta*, 256, 285–291.
- Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., Merhaby, D., & Ouddane, B. (2019). Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *Journal of environmental management*, 232, 1-7.
- Sabry, S.M. (1997). Application of Computerized Compensation Method to Derivative Synchronous Spectrofluorimetry. Analysis of Floctafenine and Floctafenic Acid in Plasma. *Anal. Chim. Acta*, 351, 211–221.
- Salam, M., Shahzadi, A., Zheng, H., Alam, F., Nabi, G., Dezhi, S., Ullah, W., Ammara, S., Ali, N., & Bilal, M. (2022). Effect of different environmental conditions on the growth and development of Black Soldier Fly Larvae and its utilization in solid waste management and pollution mitigation. *Environmental Technology & Innovation*, 28.
- Schjønning, P., Thomsen, I. K., Petersen, S. O., Kristensen, K., & Christensen, B. T. (2011). Relating soil microbial activity to water content and tillage-induced differences in soil structure. *Geoderma*, 163(3-4), 256-264.
- Seyedalmoosavi, M. M., Mielenz, M., Schleifer, K., Gors, S., Wolf, P., Tranckner, J., Huther, L., Danicke, S., Das, G., & Metges, C. C. (2023). Upcycling of recycled minerals from sewage sludge through black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*): Impact on growth and mineral accumulation. *J Environ Manage*, 344, 118695.
- Sheppard, D. C., & Tomberlin, J. K. (2002). Factors Influencing Mating and Oviposition of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Colony. *Journal of Entomological Science*, 37(4), 345-352. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.4.345>.
- Sheppard, D. C., & Tomberlin, J. K. (2002). Factors Influencing Mating and Oviposition of Black



- Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Colony. *Journal of Entomological Science*, 37(4), 345-352. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.4.345>
- Sheppard, D. C., Tomberlin, J. K., Joyce, J. A., Kiser, B. C., & Sumner, S. M. (2002). Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of medical entomology*, 39(4), 695-698.
- Shumo M, Khamis F. M., Ombura F. L., Tanga C. M., Fiaboe K. K. M., Subramanian S, Ekesi S, Schlüter O. K., van Huis A, Borgemeister C. (2021). A molecular survey of bacterial species in the guts of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on two urban organic waste streams in Kenya. *Front Microbiol.* 12, 687103.
- Shumo M, Khamis FM, Ombura FL, Tanga CM, Fiaboe KKM, Subramanian S, Ekesi S, Schlüter OK, van Huis A, Borgemeister C. 2021. A molecular survey of bacterial species in the guts of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on two urban organic waste streams in Kenya. *Front Microbiol.* 12:687103.
- Shumo, M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. K., Subramanian, S., Ekesi, S., Van Huis, A., & Borgemeister, C. (2019). Influence of temperature on selected life-history traits of black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared on two common urban organic waste streams in Kenya. *Animals*, 9(3), 79.
- Sivaram, A. K., Logeshwaran, P., Lockington, R., Naidu, R., & Megharaj, M. (2019). Phytoremediation efficacy assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils using garden pea (*Pisum sativum*) and earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 229, 227-235.
- Song, S., Ee, A. W. L., Tan, J. K. N., Cheong, J. C., Chiam, Z., Arora, S., Lam, W. N., & Tan, H. T. W. (2021). Upcycling food waste using black soldier fly larvae: Effects of further composting on frass quality, fertilising effect and its global warming potential. *Journal of Cleaner Production*, 288.
- Staley J. T, and Konopka A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39, 321–346
- Stott, D., & Martin, J. (1990). Synthesis and degradation of natural and synthetic humic material in soils. *Humic substances in soil and crop sciences: Selected readings*, 37-63.
- Su, C.-H., Nguyen, H. C., Bui, T. L., & Huang, D.-L. (2019). Enzyme-assisted extraction of insect fat for biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, 223, 436-444.



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

- Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Venkidusamy, K., Palanisami, T., Naidu, R., & Megharaj, M. (2019). Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal–bacterial synergy of *Chlorella* sp. MM3 and *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 in slurry phase. *Science of the Total Environment*, 659, 724-731.
- Supriyatna, A., & Ukit, U. (2016). Screening and isolation of cellulolytic bacteria from gut of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) feeding with rice straw. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(3), 314-320.
- Surendra, K. C., Tomberlin, J. K., van Huis, A., Cammack, J. A., Heckmann, L. L., & Khanal, S. K. (2020). Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Manag*, 117, 58-80.
- Tanga C. M., Waweru J. W., Tola Y. H., Onyoni A. A., Khamis F. M., Ekesi S., Paredes J. C. (2021). Organic waste substrates induce important shifts in gut microbiota of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.): coexistence of conserved, variable, and potential pathogenic microbes. *Front Microbiol*. 12:635881.
- Tiehm, A., Stieber, M., Werner, P. and Frimmel, F.H. (1997). Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil, *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3649-3656.
- Tomberlin, J. K., & Sheppard, D. C. (2002). Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science*, 37(4), 345-352.
- Tomberlin, J. K., & Sheppard, D. C. (2002). Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science*, 37(4), 345-352.
- Tomberlin, J. K., Adler, P. H., & Myers, H. M. (2009). Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environmental entomology*, 38(3), 930-934.
- Troquet, J., Laroche, C., and Dussap, C. G. (2003). Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid- state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13(3):103~1121
- Van Hong Thi Pham, Chaudhary D. K., Jeong S. W., Kim J. (2018). Oil-degrading properties of a psychrotolerant bacterial strain, *Rhodococcus* sp. Y2-2, in liquid and soil media. *World J Microbiol Biotechnol*. 34, 33.



- Vo-Dinh, T. (1978). Multicomponent Analysis by Synchronous Luminescence Spectroscopy. *Anal. Chem.* 50, 396–401.
- Von Wedel, R. J., Mosquera, J. F., Goldsmith, C. D., Hater G. R., Wong, A., Fox, T. A., Hunt, W. T., Paules, M. S., Quiros, J. M., and Wiegand, J. W. 1988. Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater : in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California, *Water Science and Technology.* 20:501~503
- Wang, S. Y., Kuo, Y. C., Hong, A., Chang, Y. M., & Kao, C. M. (2016). Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere*, 164, 558-567.
- Wojtowicz K, Steliga T, Kapusta P, Brzeszcz J, Skalski T. (2022). Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer  $\gamma$ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials (Basel).* 15, 400.
- Wojtowicz K, Steliga T, Kapusta P, Brzeszcz J. (2023). Oil-contaminated soil remediation with biodegradation by autochthonous microorganisms and phytoremediation by maize (*Zea mays*). *Molecules.* 28, 6104.
- Wong, C.-Y., Lim, J.-W., Uemura, Y., Chong, F.-K., Yeong, Y.-F., Mohamad, M., & Hermansyah, H. (2018). Insect-based lipid for biodiesel production. *AIP conference proceedings*,
- Wong, C.-Y., Lim, J.-W., Uemura, Y., Chong, F.-K., Yeong, Y.-F., Mohamad, M., & Hermansyah, H. (2018). Insect-based lipid for biodiesel production. *AIP conference proceedings*
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., & Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.
- Wu, M., Li, W., Dick, W. A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., & Chen, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, 169, 124-130.
- Wu, N., Wang, X., Yan, Z., Xu, X., Xie, S., & Liang, J. (2021). Transformation of pig manure by passage through the gut of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*): Metal speciation, potential pathogens and metal-related functional profiling. *Ecotoxicol Environ Saf*, 211, 111925.
- Xiang, F., Zhang, Q., Xu, X., & Zhang, Z. (2023). Black soldier fly larvae recruit functional



新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

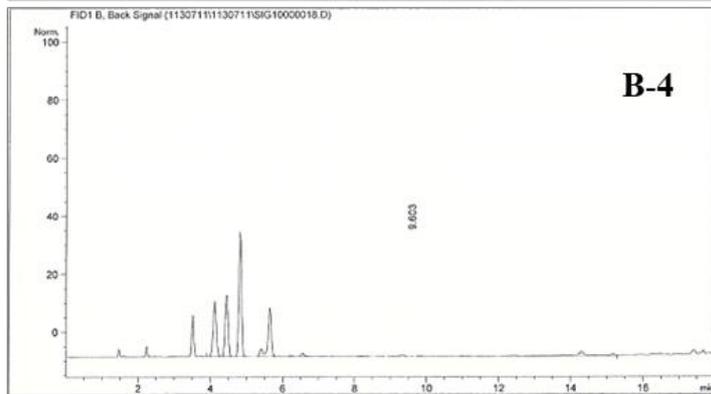
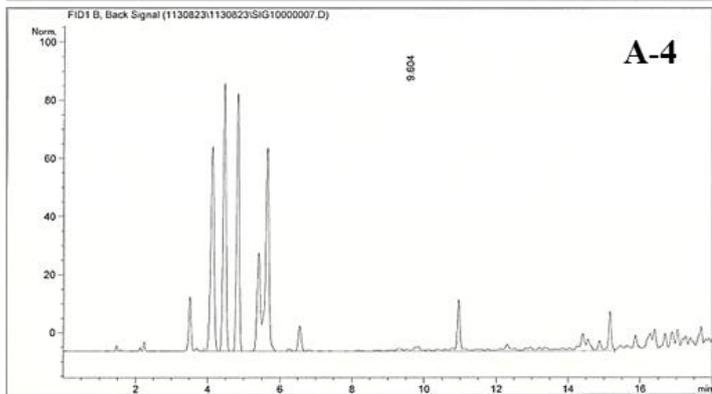
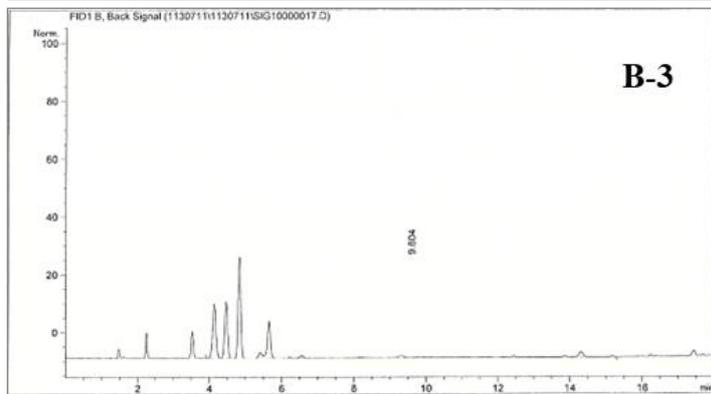
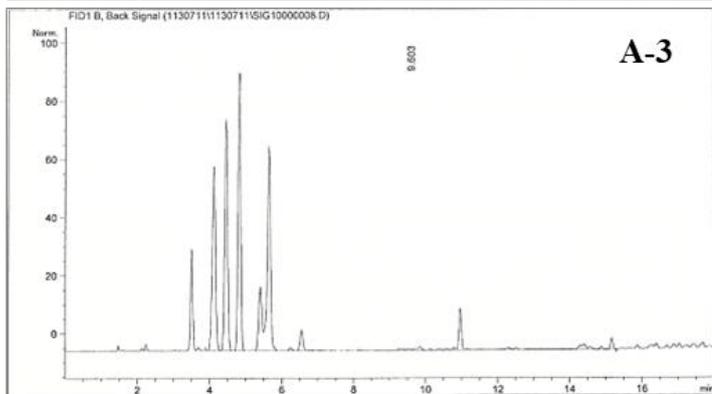
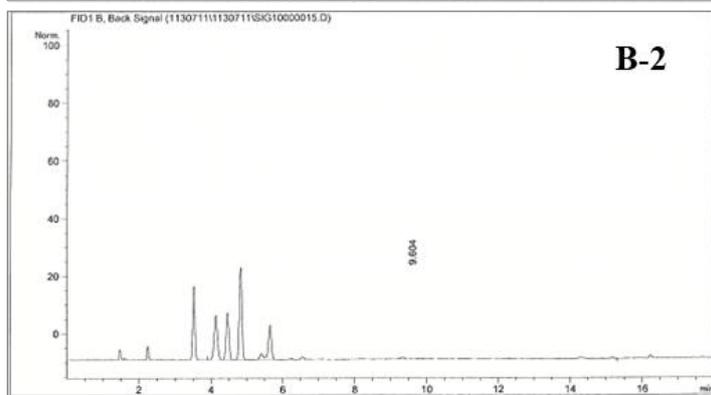
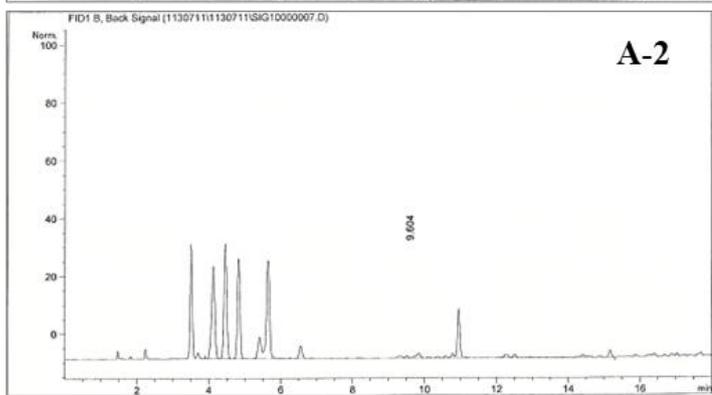
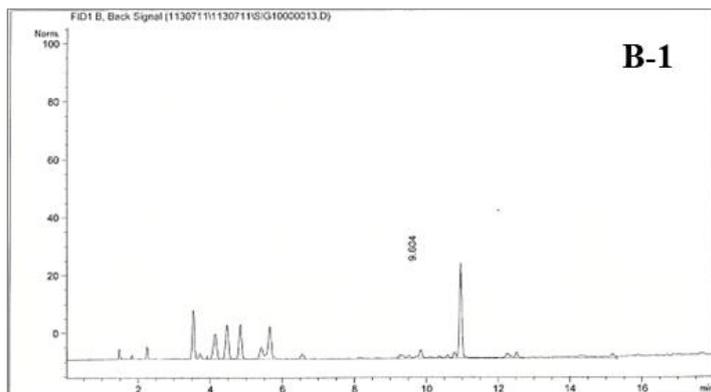
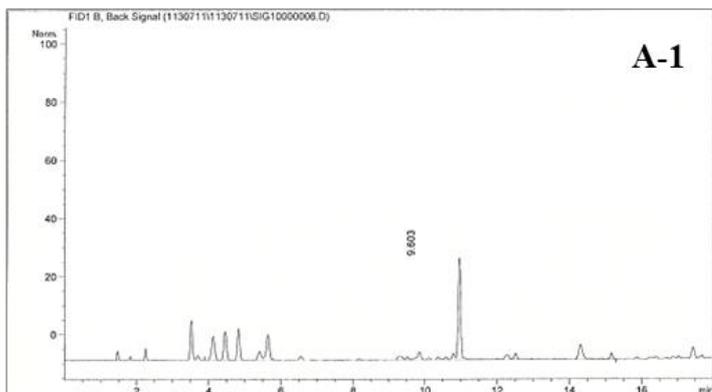
microbiota into the intestines and residues to promote lignocellulosic degradation in domestic biodegradable waste. *Environ Pollut*, 122676.

- Xiao T, He X, Cheng G, Kuang H, Ma X, Yusup K, Hamdun M, Gulsimay A, Fang C, Rahman E. (2013). *Sphingobacterium hotanense* sp. nov., isolated from soil of a *Populus euphratica* forest, and emended descriptions of *Sphingobacterium daejeonense* and *Sphingobacterium shayense*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 815-820.
- Yl, G.H., Niu, C.Y., He, G.B., Zhou, L., Xia, Q., & Cheng, P. (2010). Isolation and identification of bacteria producing enzymes from gut and skin of black soldier fly (*Hermetia illulens*) larvae. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(5), 889-894.
- Young, L.Y. and Cerniglia, C. E. (1995). Microbial transformations and degradation of toxic organic chemicals, Wiley-Liss, New York., U.S.A.
- Yu Y, Zhang J, Zhu F, Fan M, Zheng J, Cai M, Zheng L, Huang F, Yu Z, Zhang J. 2023. Enhanced protein degradation by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its gut microbes. *Front Microbiol*. 13:1095025.
- Yu, H., Xiao, H., & Wang, D. (2014). Effects of soil properties and biosurfactant on the behavior of PAHs in soil-water systems. *Environmental Systems Research*, 3, 1-11.
- Yuki M, Oshima K, Suda W, Sakamoto M, Iida T, Hattori M, Ohkuma M. 2014. Draft Genome Sequence of *Bacteroides reticulotermitis* Strain JCM 10512T, Isolated from the Gut of a Termite. *Genome Announc*. 2:e00072-14.
- Zhang, J., Huang, L., He, J., Tomberlin, J. K., Li, J., Lei, C., Sun, M., Liu, Z., & Yu, Z. (2010). An artificial light source influences mating and oviposition of black soldier flies, *Hermetia illucens*. *Journal of Insect Science*, 10(1), 202.
- Zheng, L., Crippen, T. L., Singh, B., Tarone, A. M., Dowd, S., Yu, Z., Wood, T. K., & Tomberlin, J. K. (2013). A survey of bacterial diversity from successive life stages of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) by using 16S rDNA pyrosequencing. *Journal of medical entomology*, 50(3), 647-658.
- 王誌偉(2018)利用土壤微生物相分析技術找尋作物根圈益菌-以洛神葵為例。台農區農業專訊 105期 20-21。
- 薛爽、梁雷、趙慶良、魏亮亮、馬溪平& 侯偉 (2010) 二級處理出水中溶解性有機物的螢光特性。環境科學與技術。第七期, p.178 - 182。



# 附錄

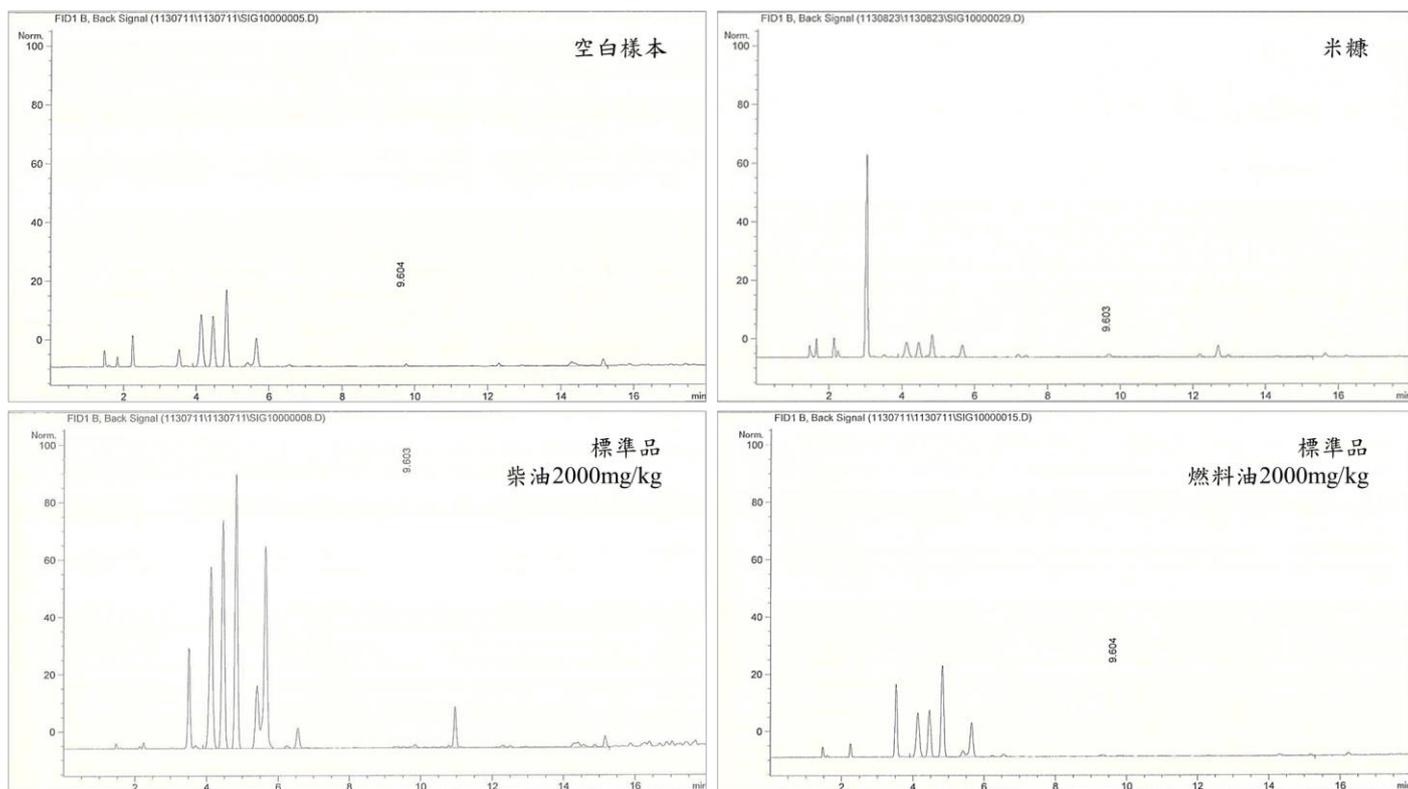
附錄 1 GC-FID (A)低碳數(C6 ~ C9)(B)高碳數(C10 ~ 50))檢量線分析圖譜



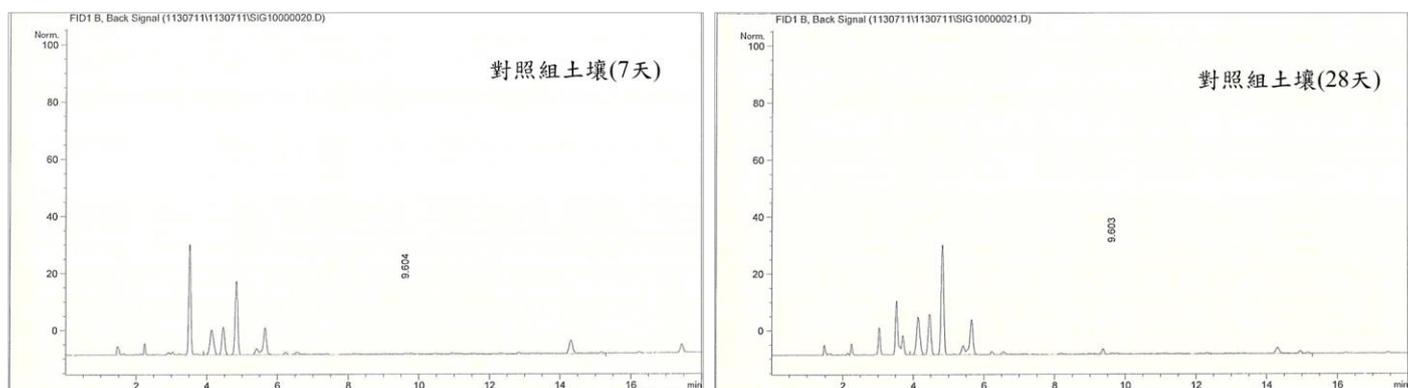


新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 2 GC-FID 低碳數(C6~C9)分析圖譜-1

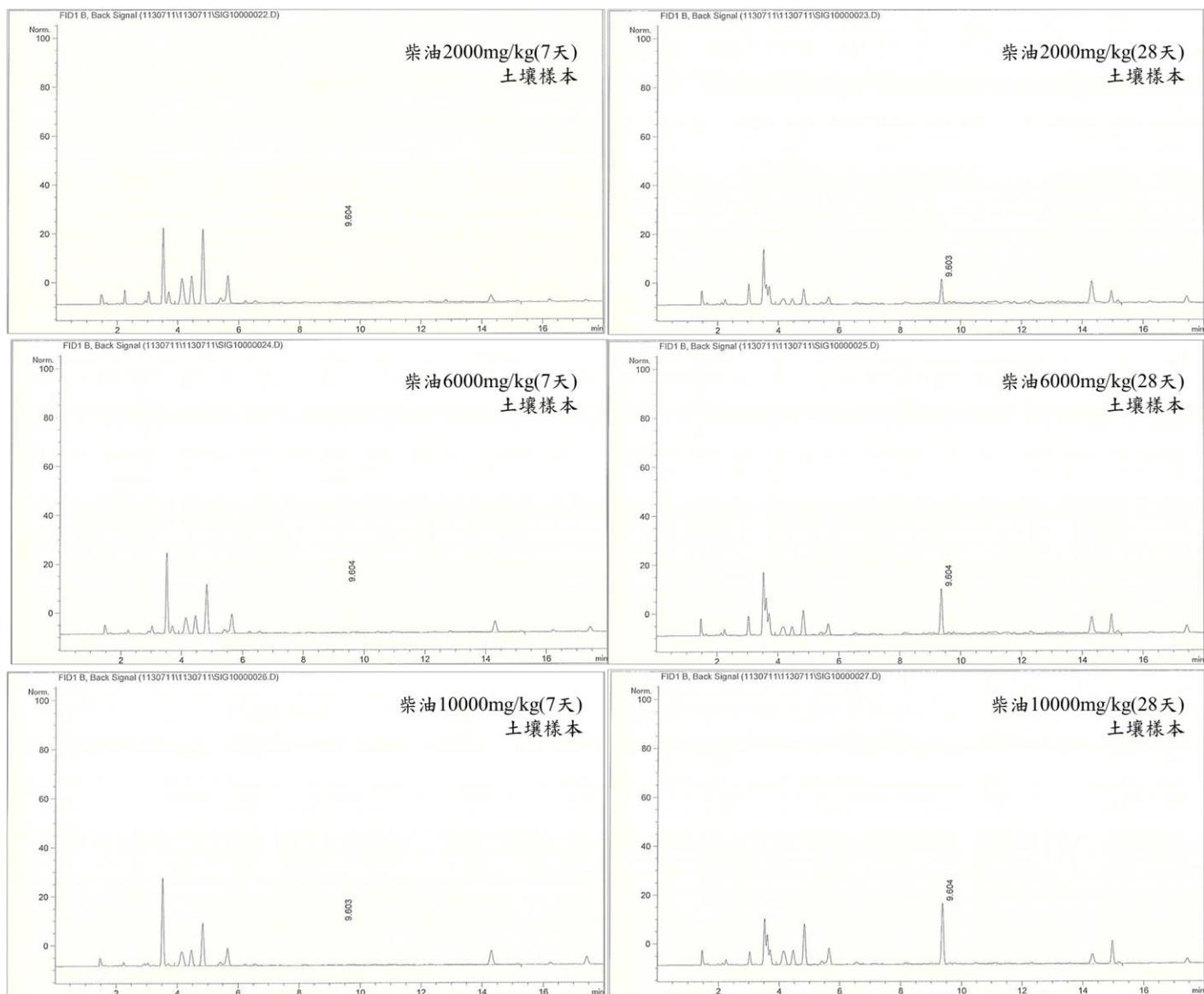


附錄 3 GC-FID 低碳數(C6~C9)分析圖譜-2





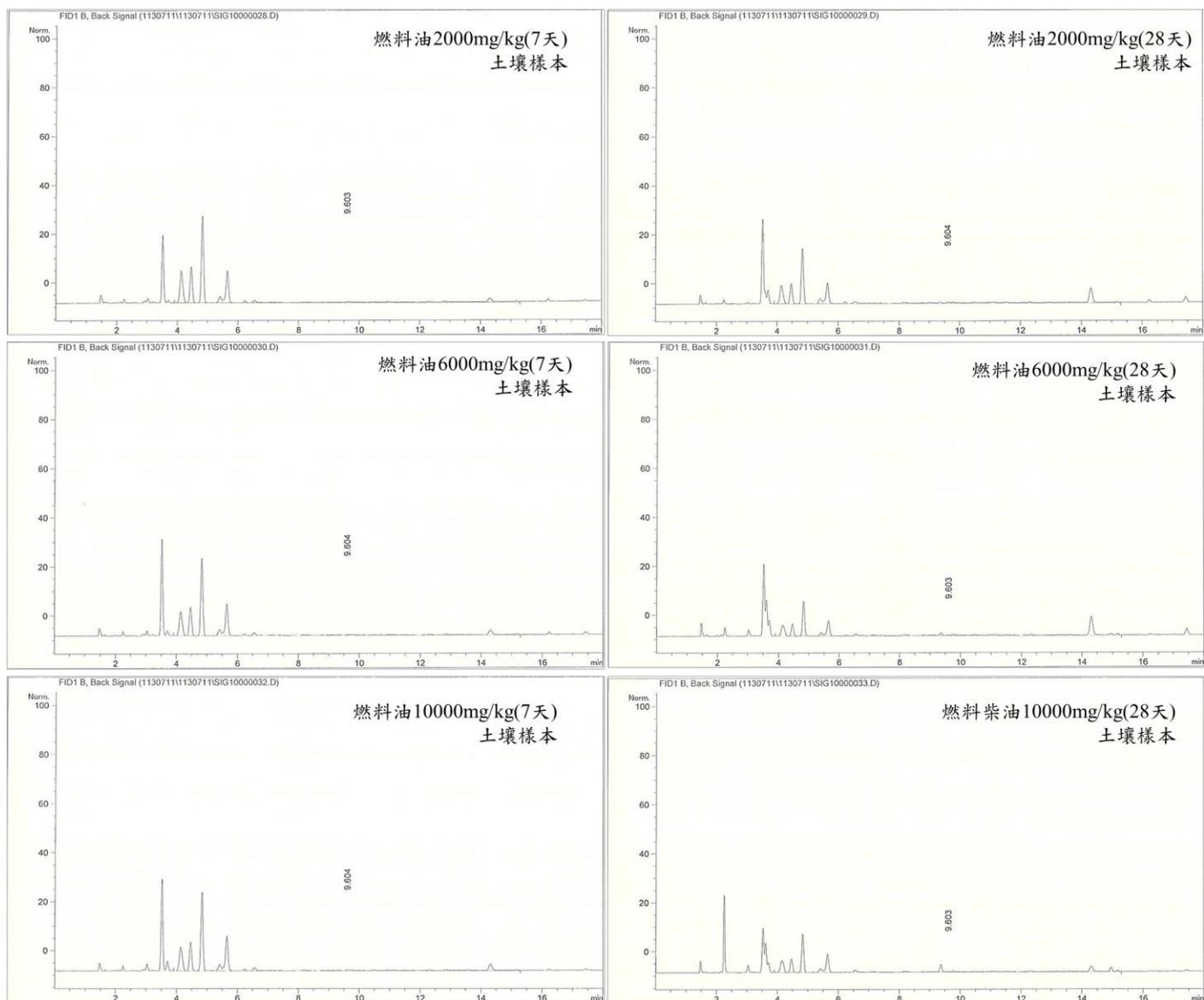
附錄 4 GC-FID 低碳數(C6~C9)分析圖譜-3





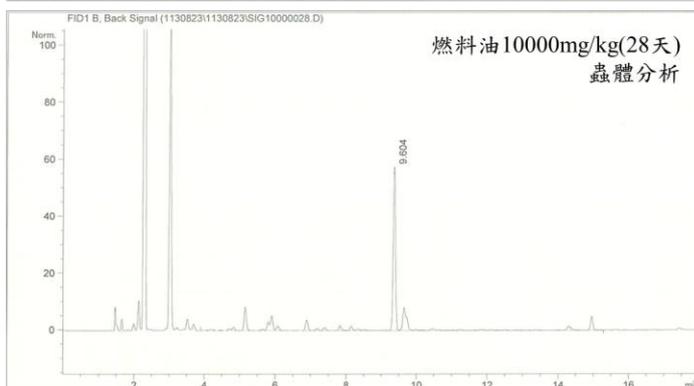
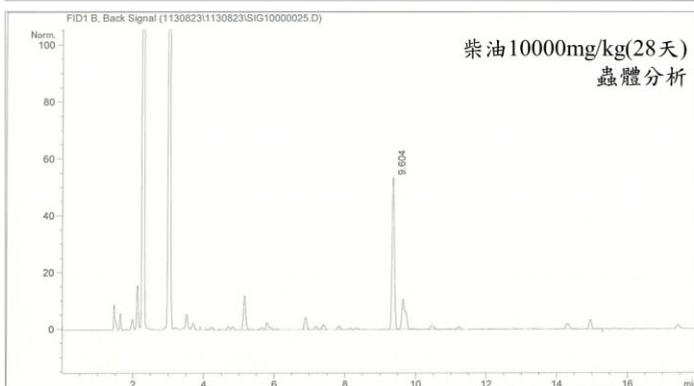
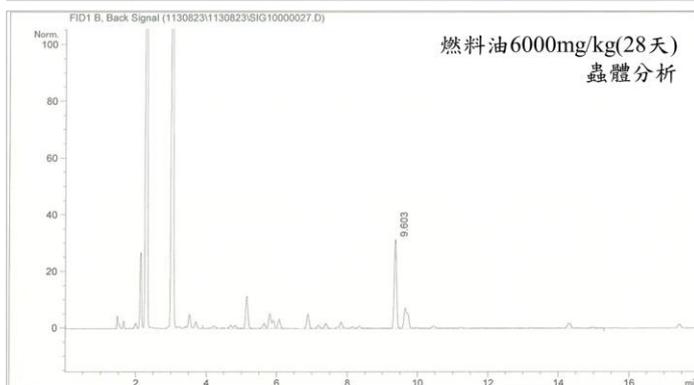
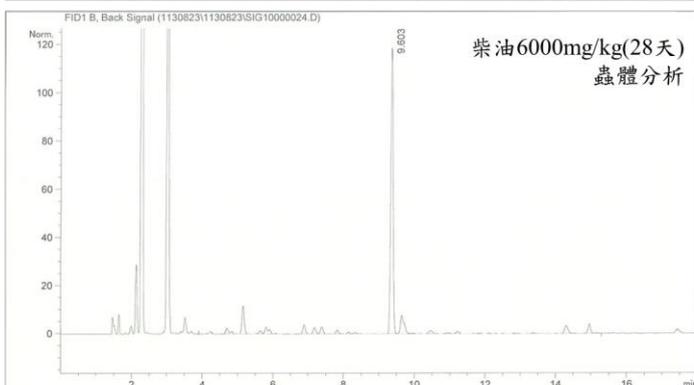
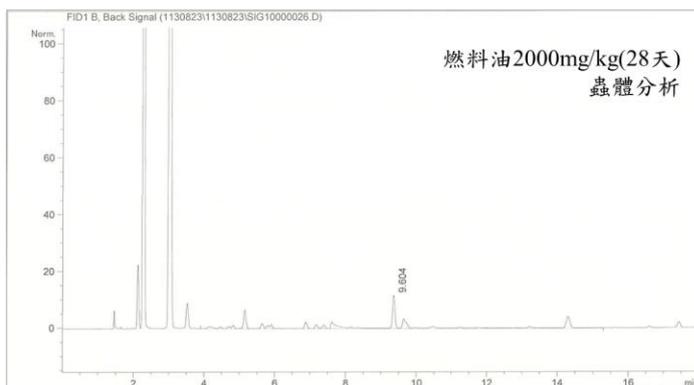
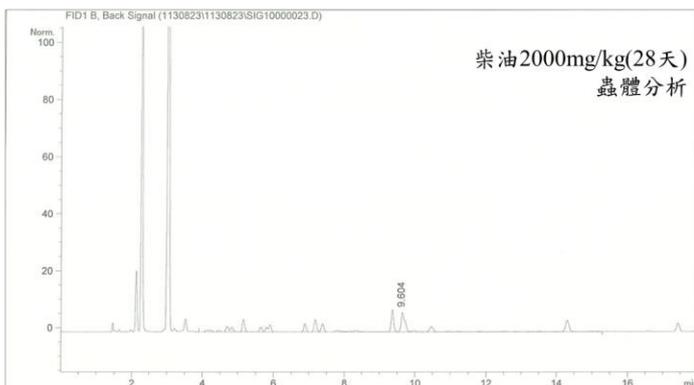
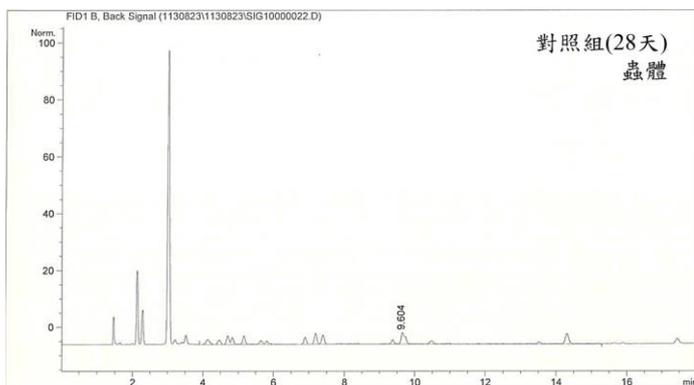
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 5 GC-FID 低碳數(C6~C9)分析圖譜-4





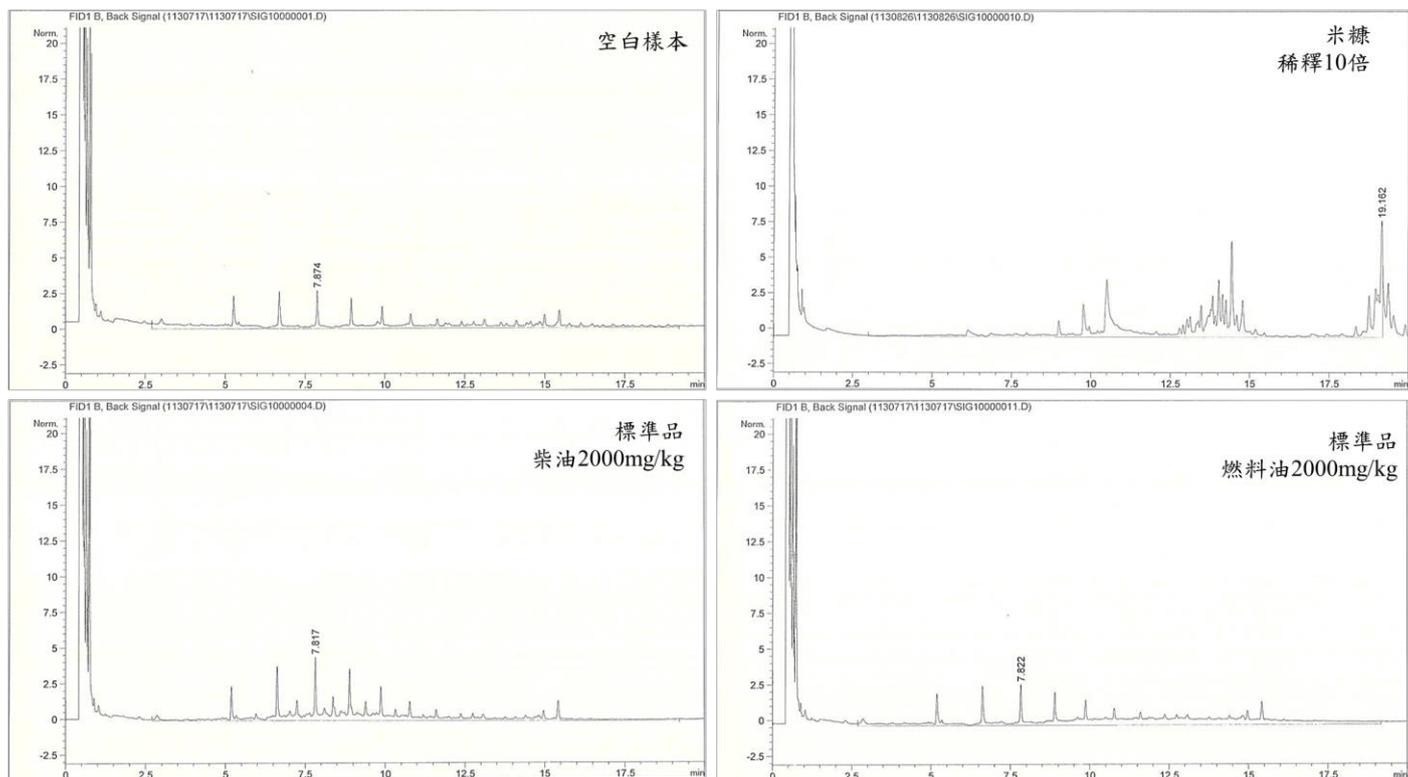
### 附錄 6 GC-FID 低碳數(C6~C9)分析圖譜-5



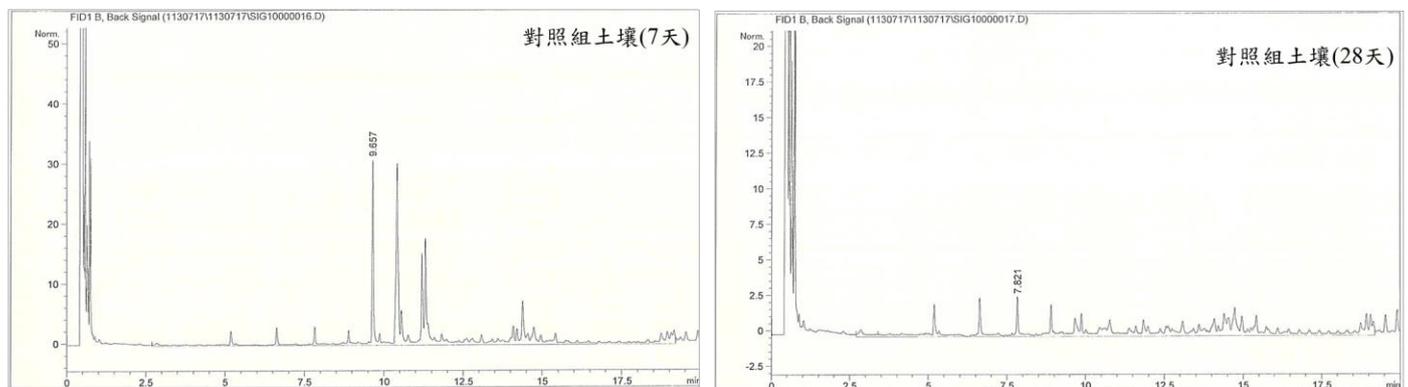


新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 7 GC-FID 高碳數(C10~C50)分析圖譜-1

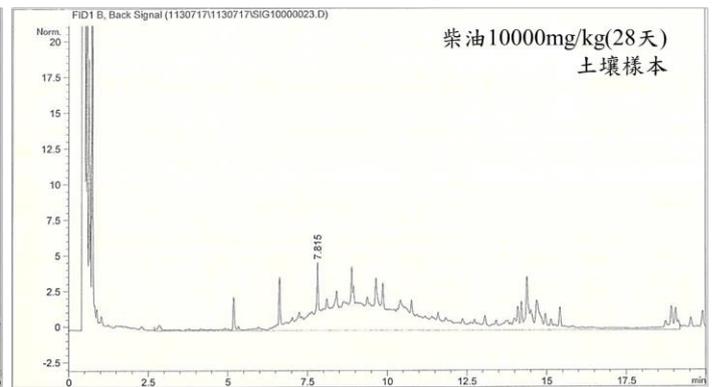
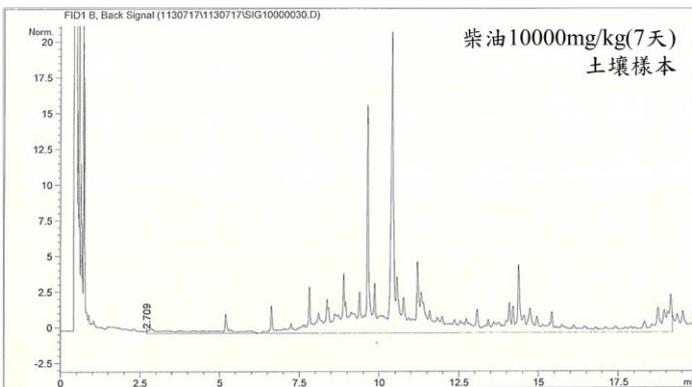
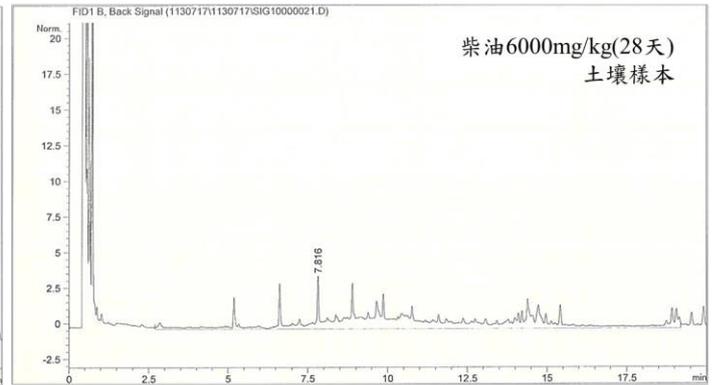
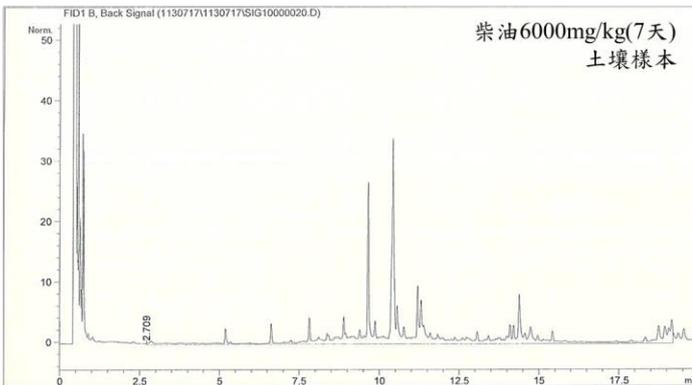
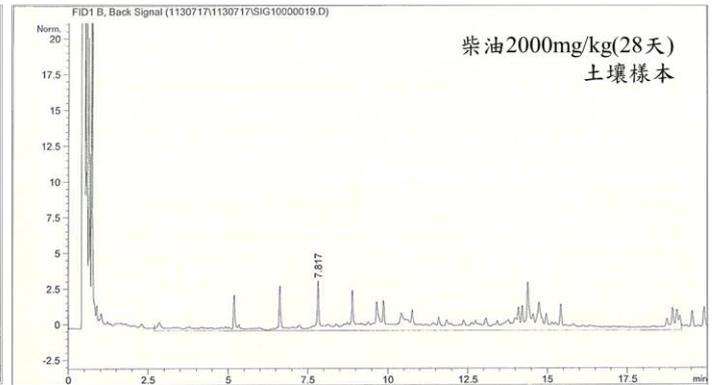
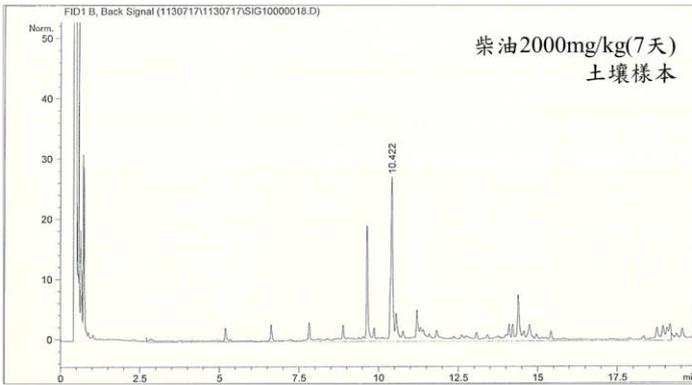


附錄 8 GC-FID 高碳數(C10~C50)分析圖譜-2





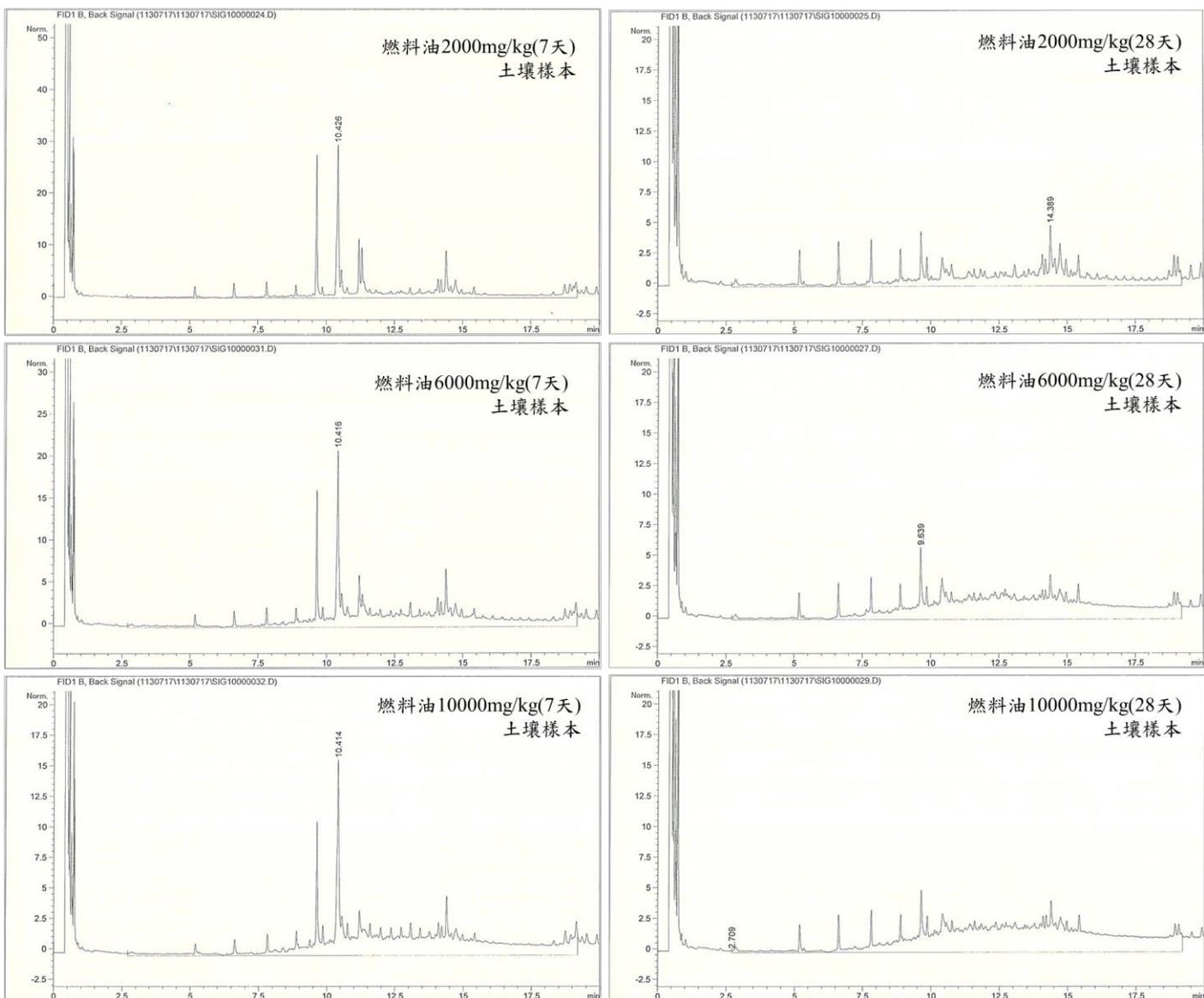
### 附錄 9 GC-FID 高碳數(C10~C50)分析圖譜-3





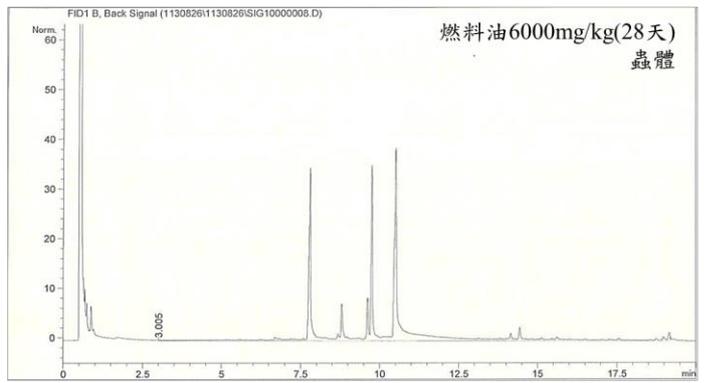
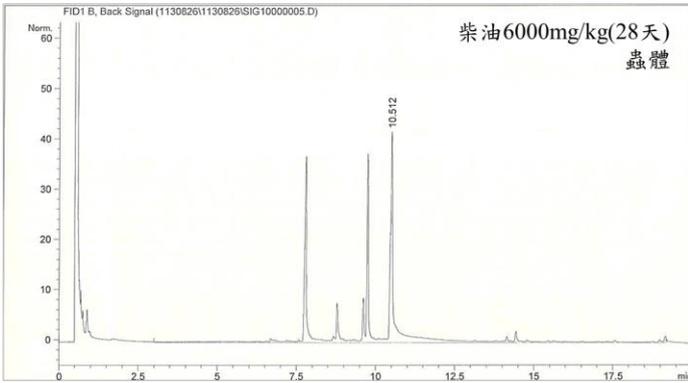
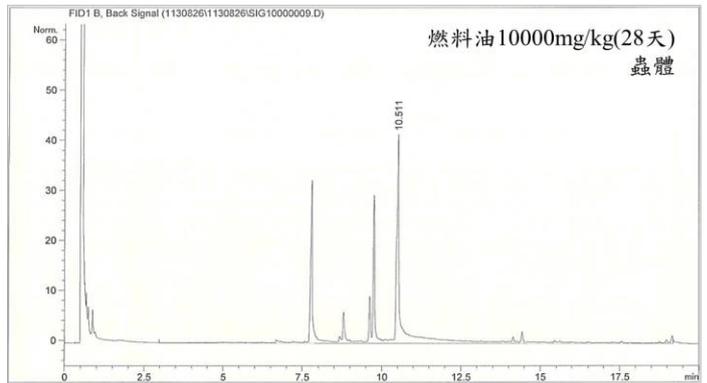
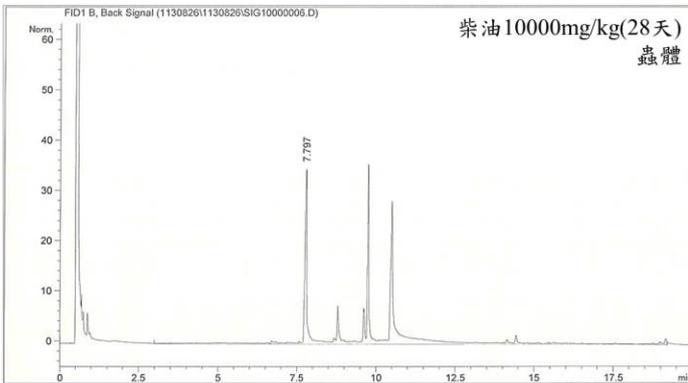
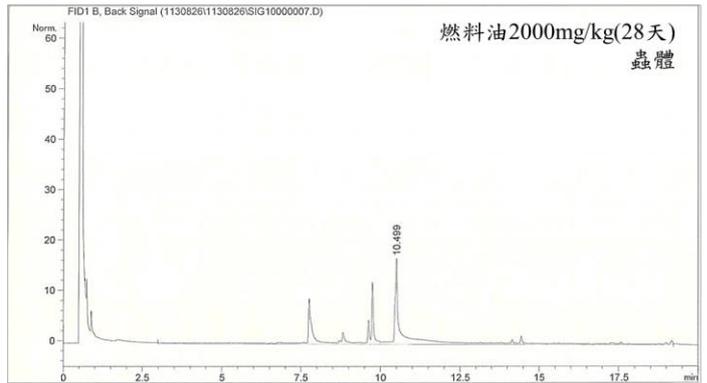
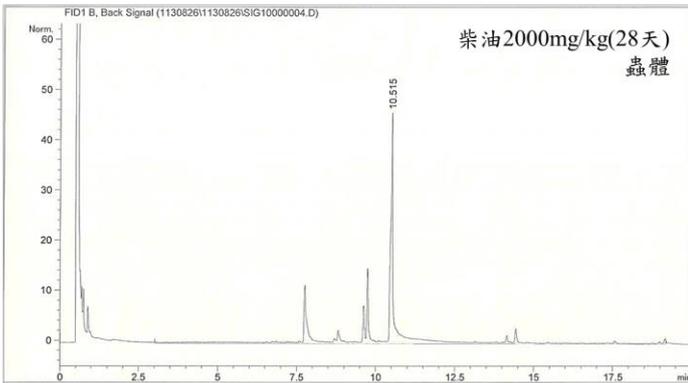
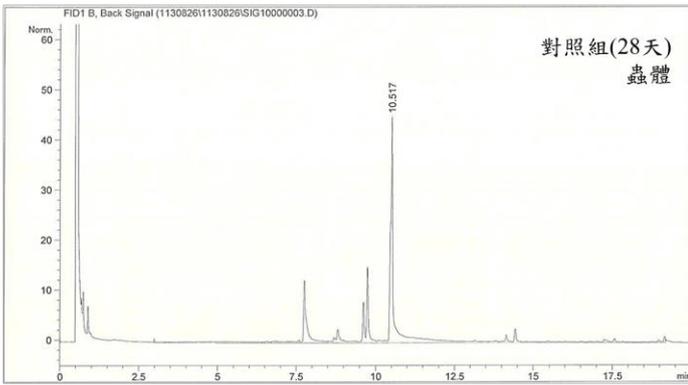
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 10 GC-FID 高碳數(C10~C50)分析圖譜-4





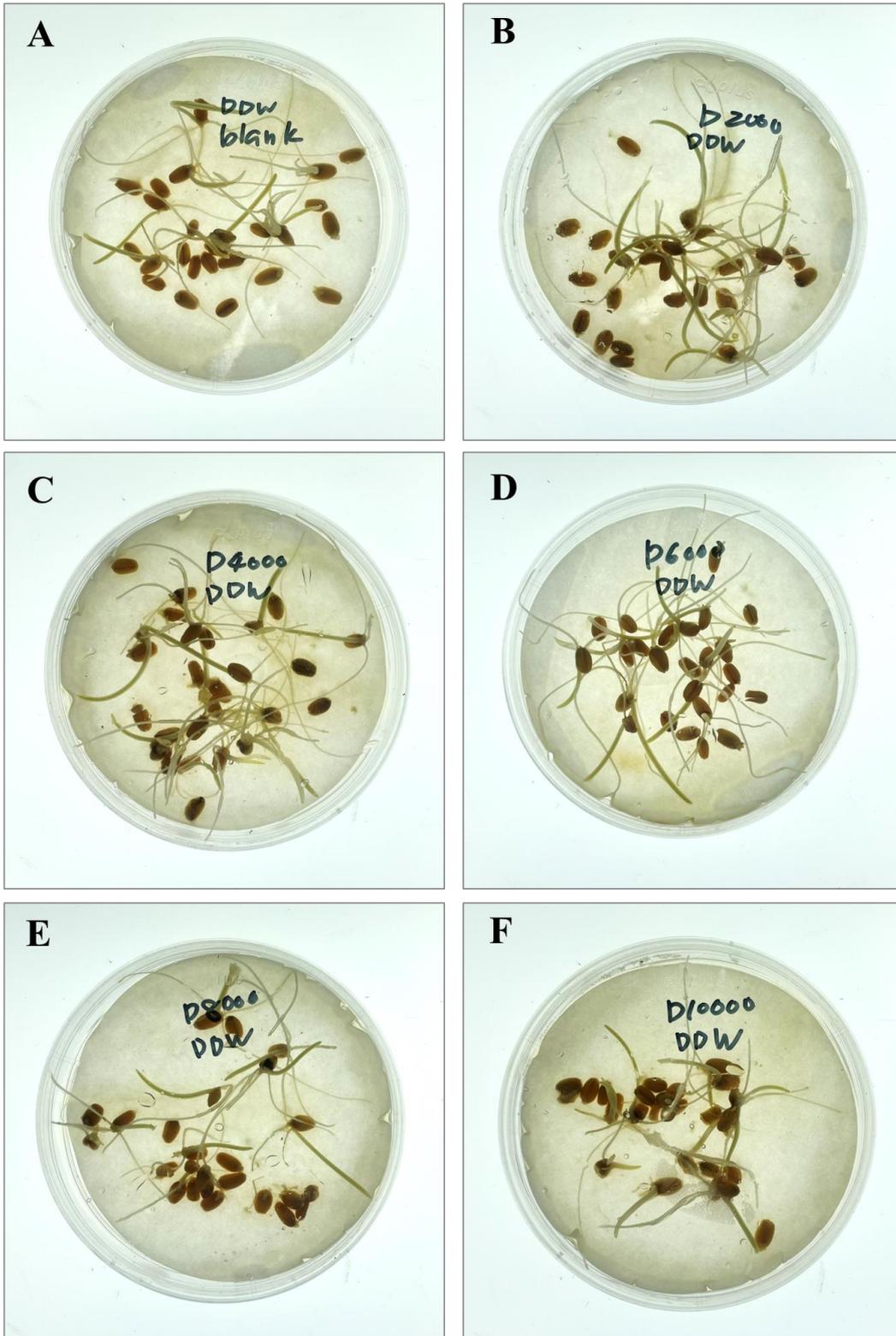
### 附錄 11 GC-FID 高碳數(C10~C50)分析圖譜-5





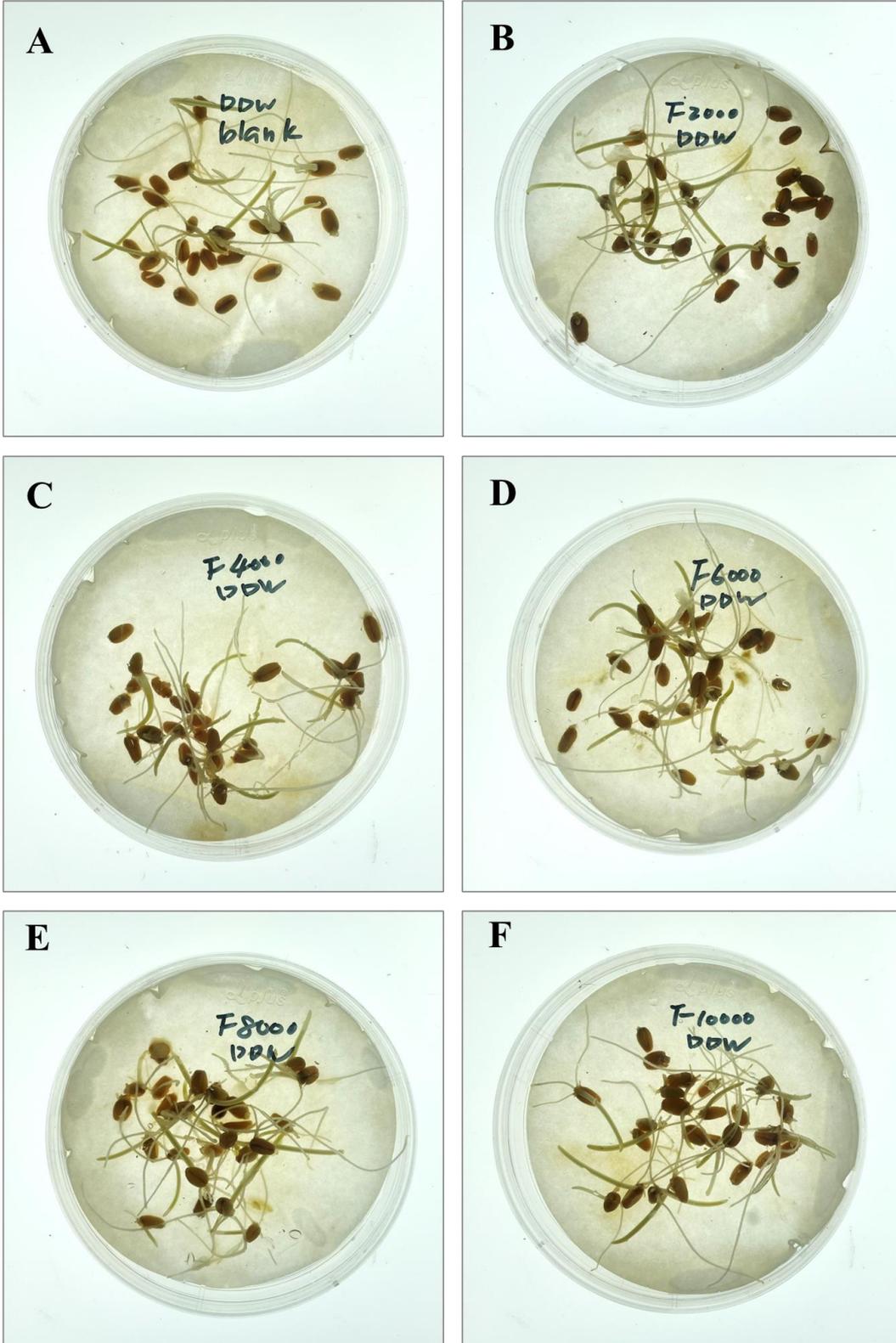
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 12 BSFL 處理柴油(第 28 天)之土壤萃取液對小麥發芽狀況(第三天)/(A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





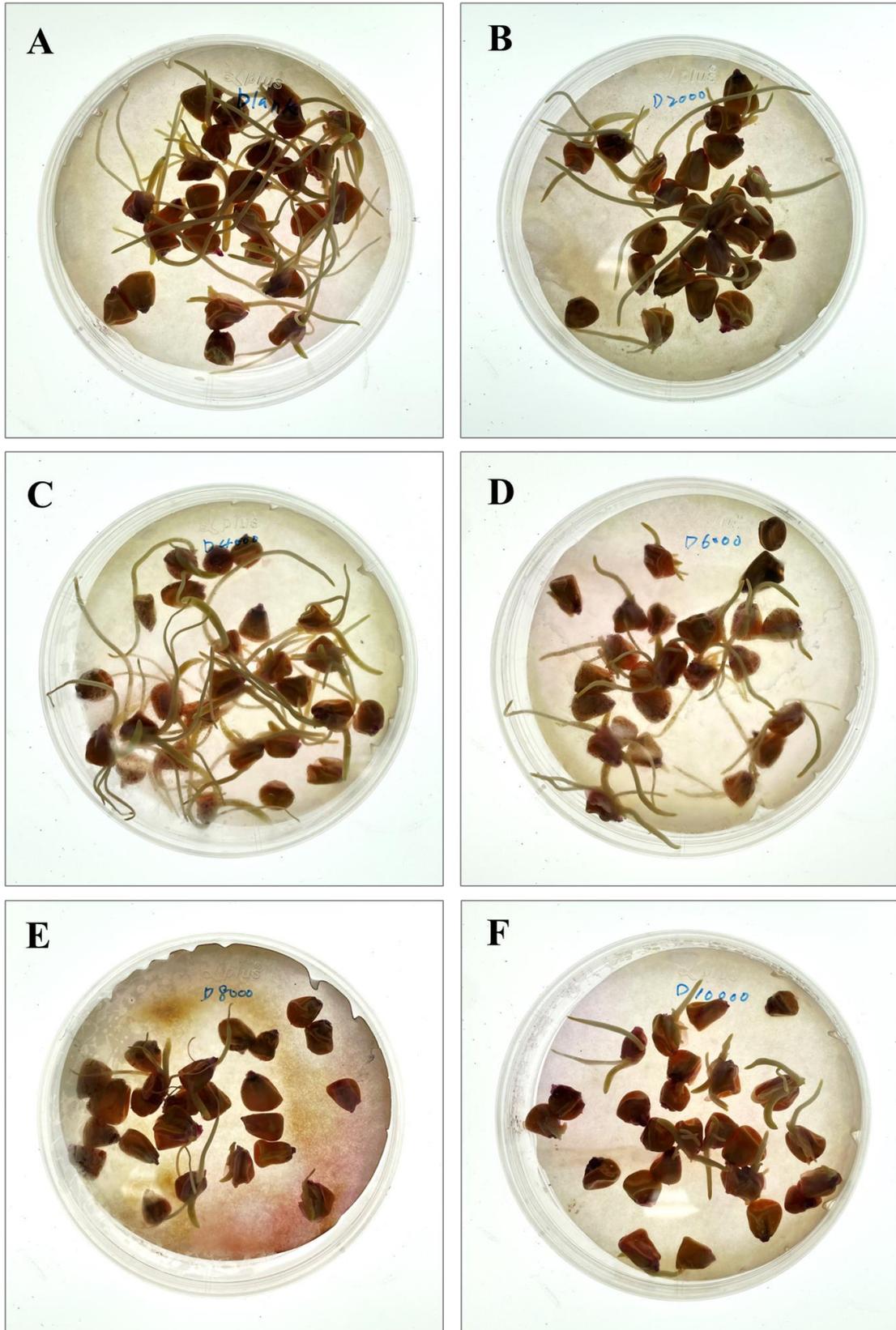
附錄 13 BSFL 處理燃料油(第 28 天)之土壤萃取液對小麥發芽狀況(第三天) / (A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





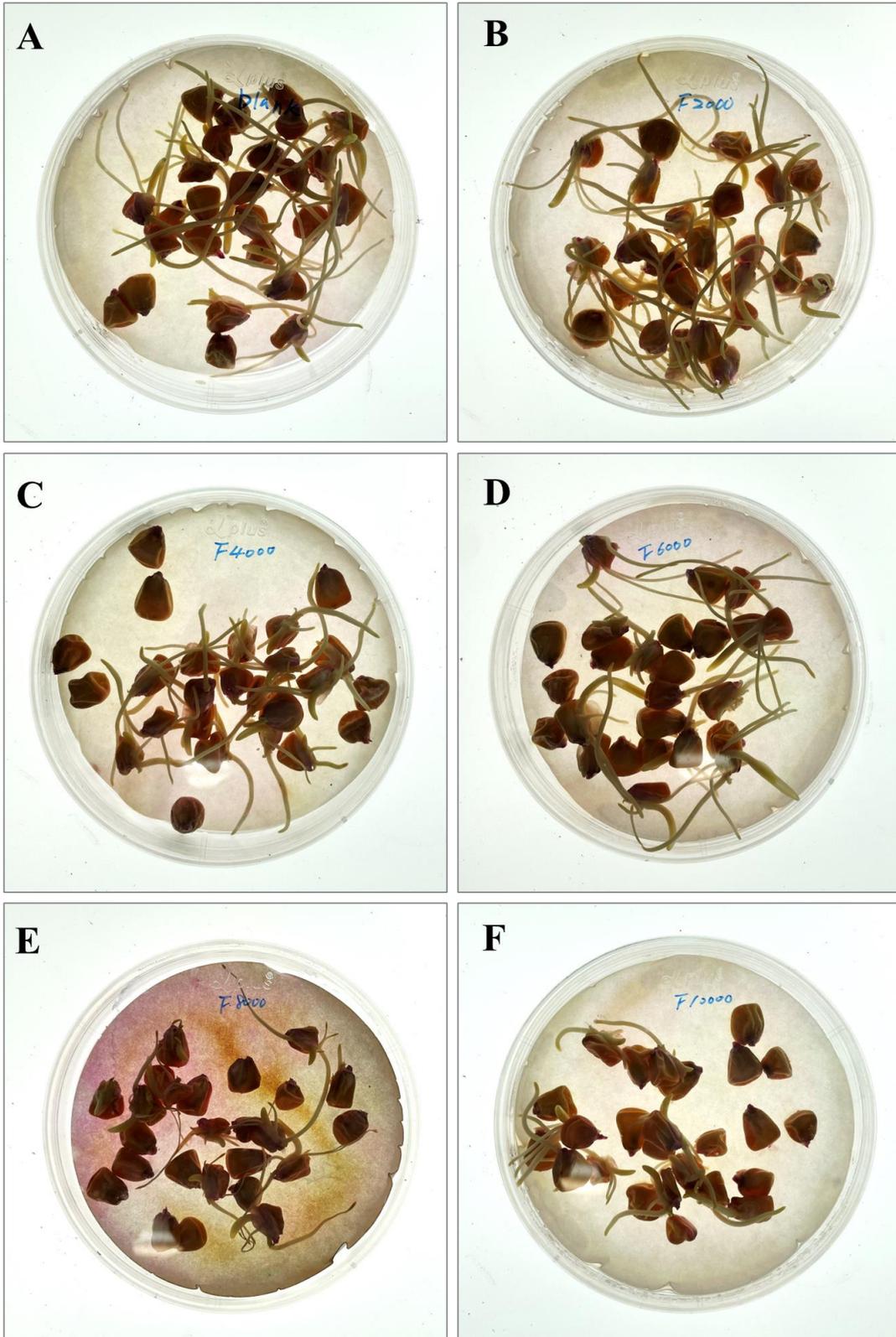
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 14 BSFL 處理柴油(第 28 天)之土壤萃取液對玉米發芽狀況(第三天)/(A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





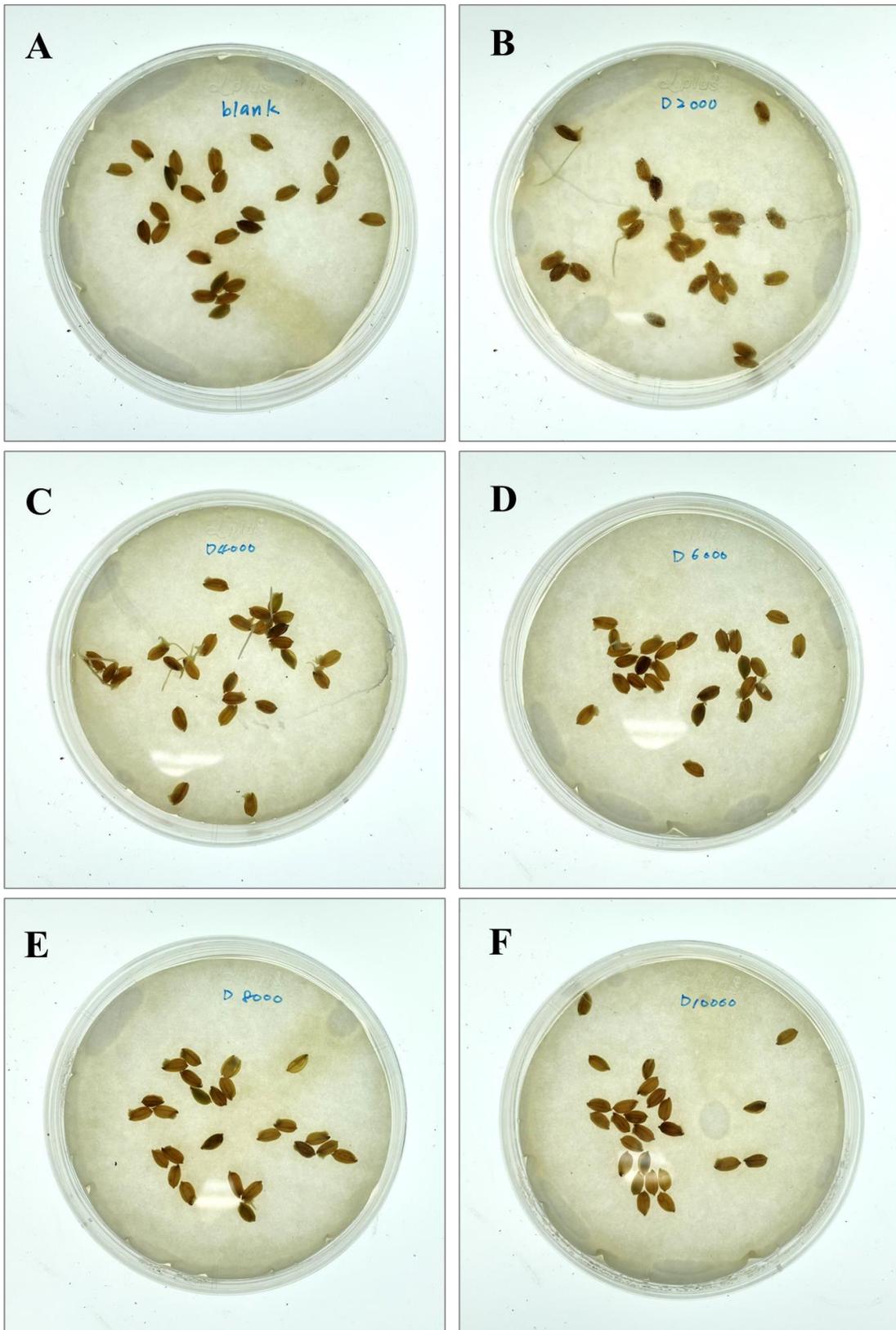
附錄 15 BSFL 處理燃料油(第 28 天)之土壤萃取液對玉米發芽狀況(第三天) / (A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





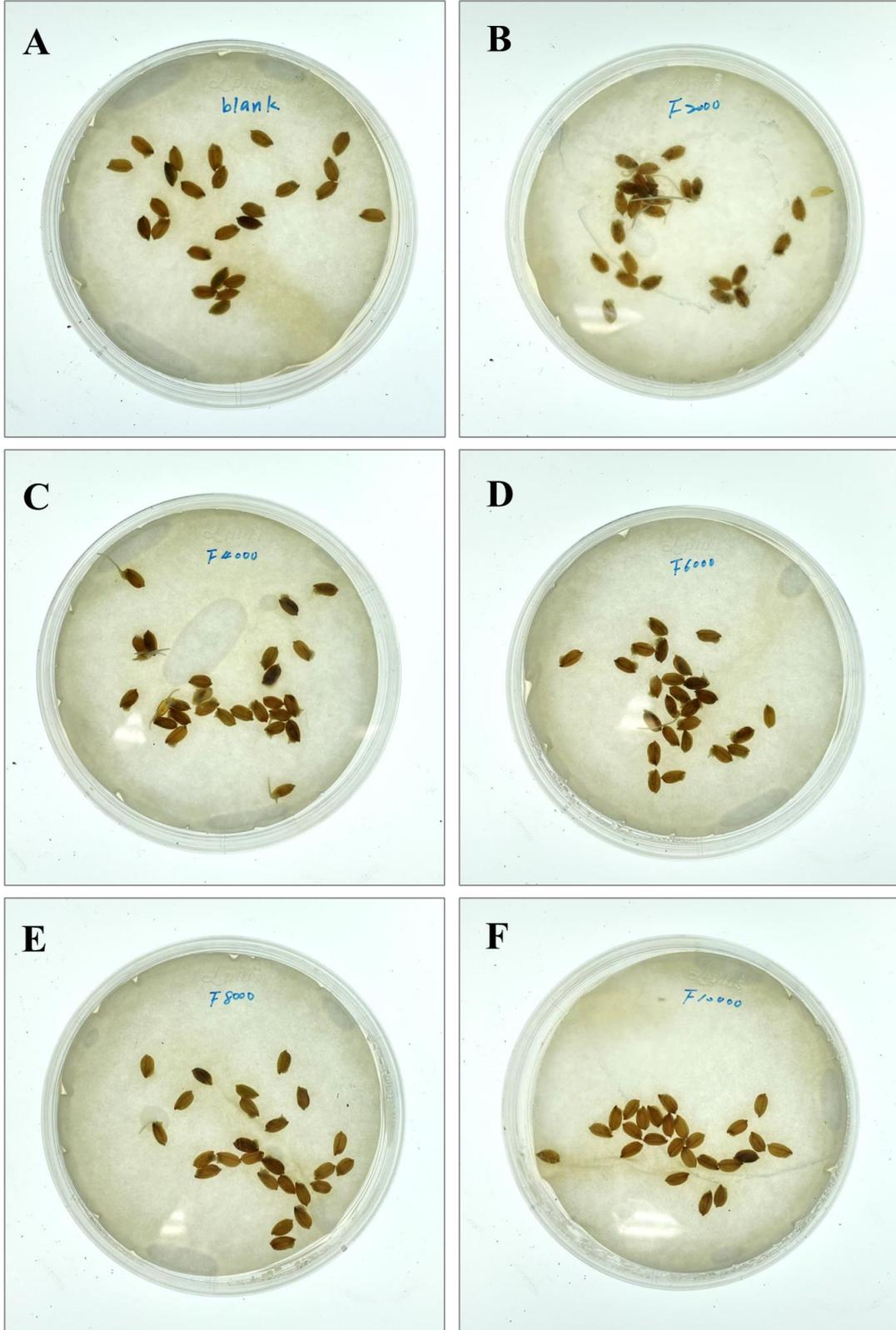
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 16 BSFL 處理柴油(第 4 週)之土壤萃取液對水稻發芽狀況(第三天) / (A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





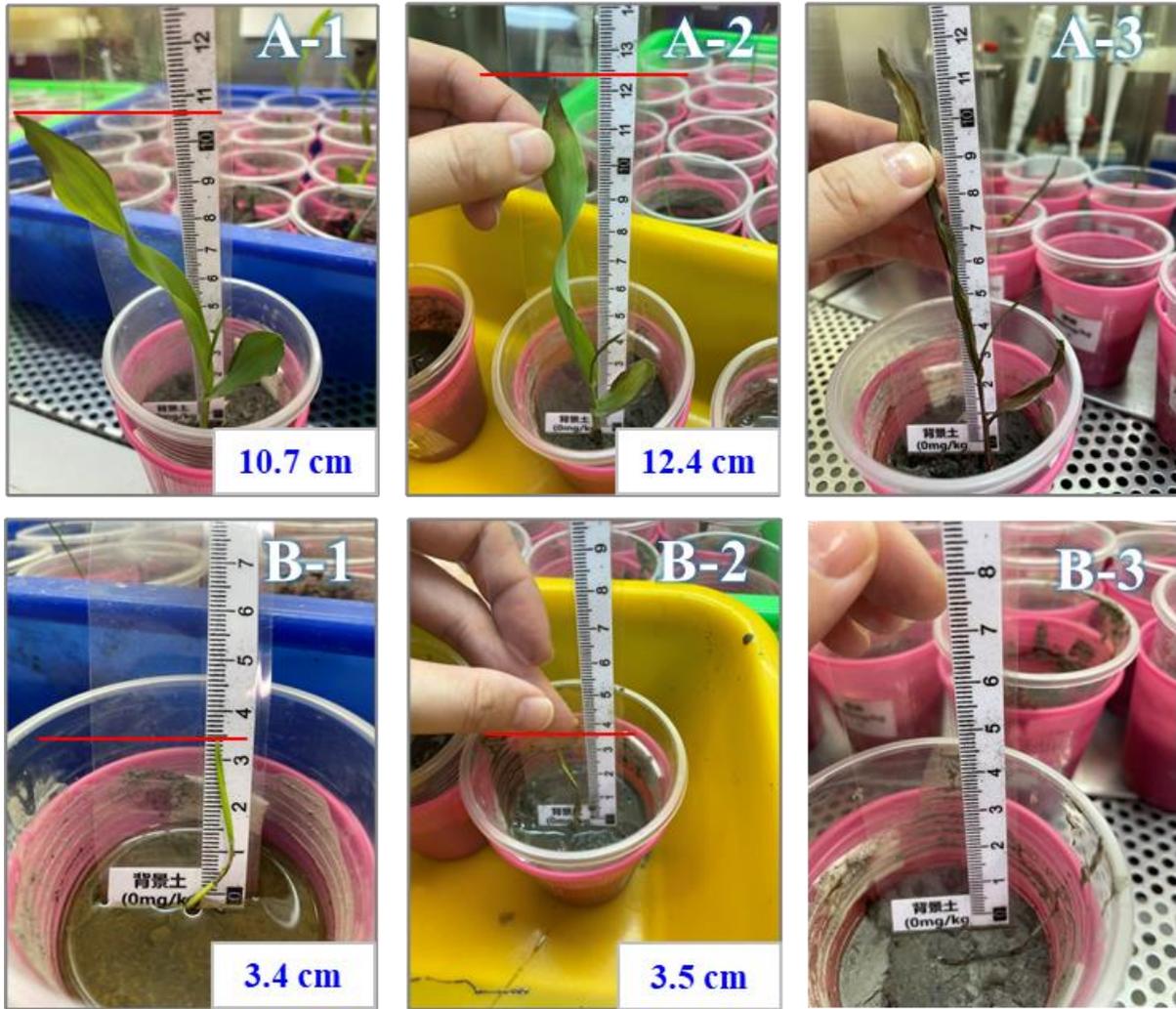
附錄 17 BSFL 處理燃料油(第 28 天)之土壤萃取液對水稻發芽狀況(第三天) / (A)對照組 (B) 2,000 mg/kg (C) 4,000 mg/kg (D) 6,000 mg/kg (E) 8,000 mg/kg (F) 10,000 mg/kg





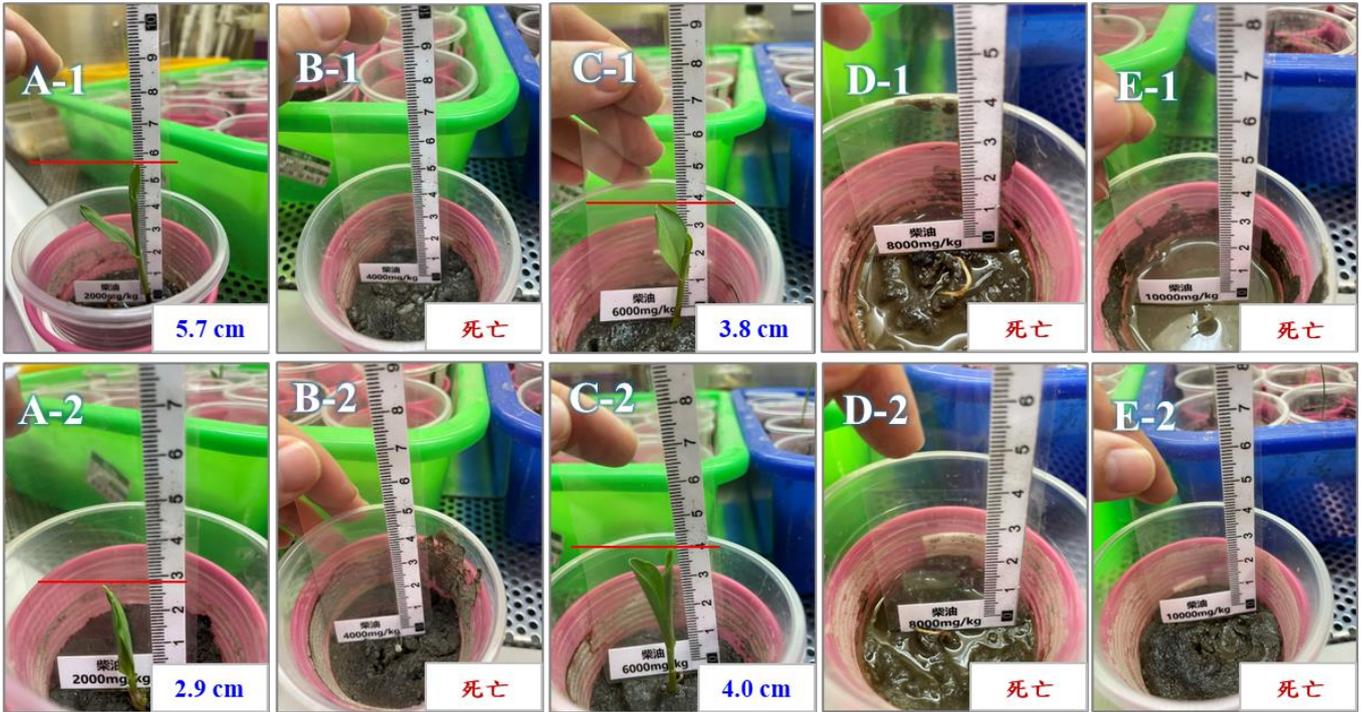
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 18 (A)玉米 (B)小麥 於(1)7天 (2)14天 (3)21天 對照組植物之生長狀況

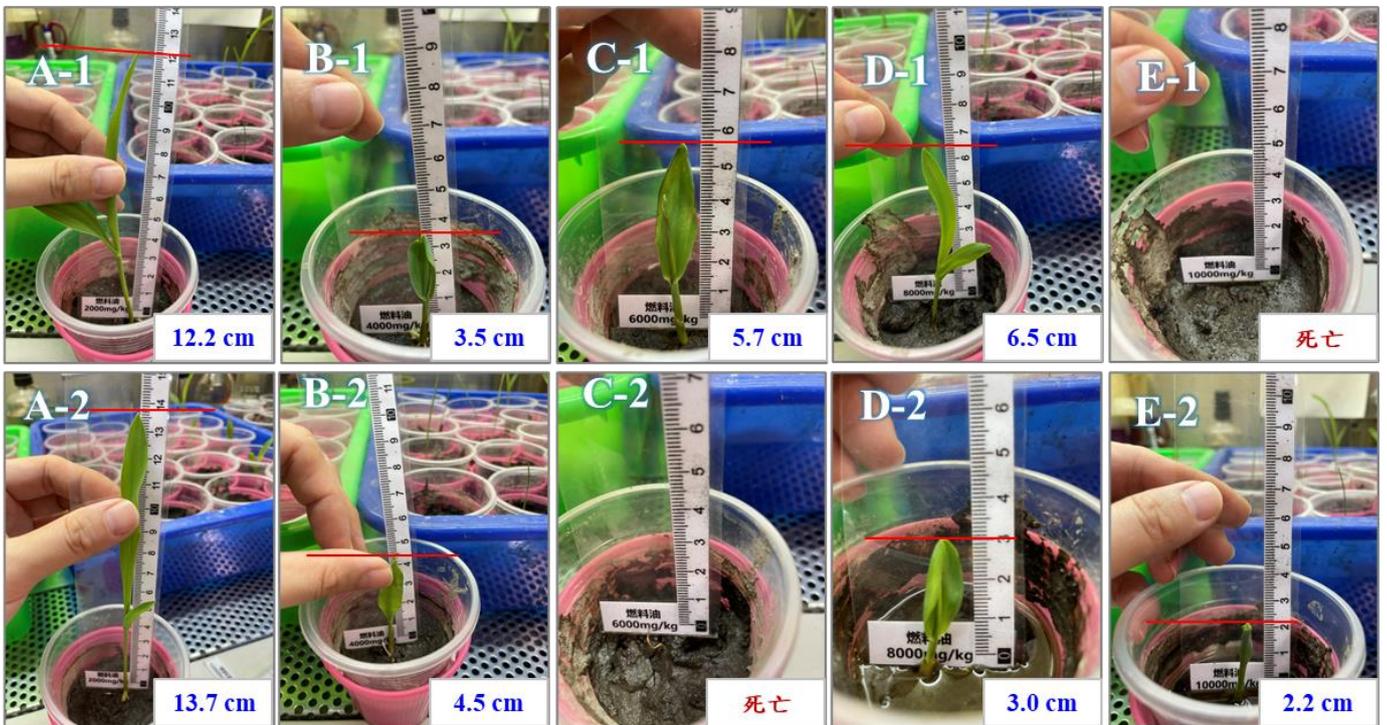




附錄 19 玉米種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 7 天之生長狀況/二重複試驗



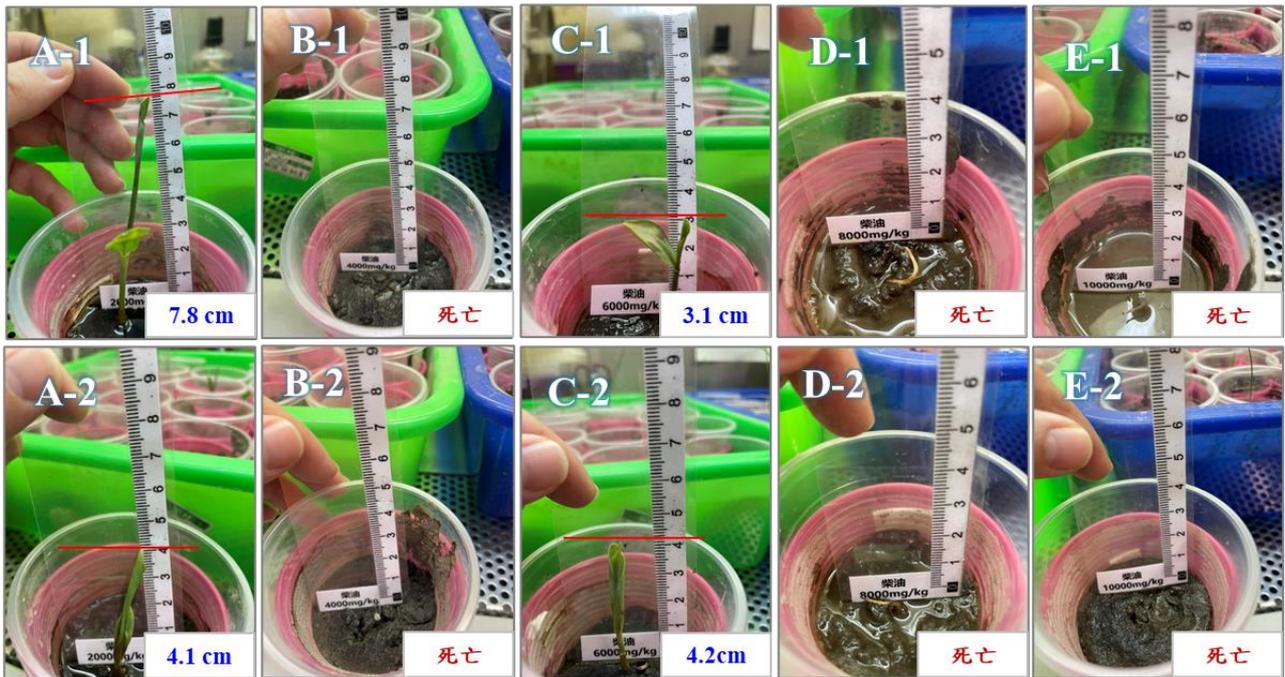
附錄 20 玉米種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 7 天之生長狀況/二重複試驗



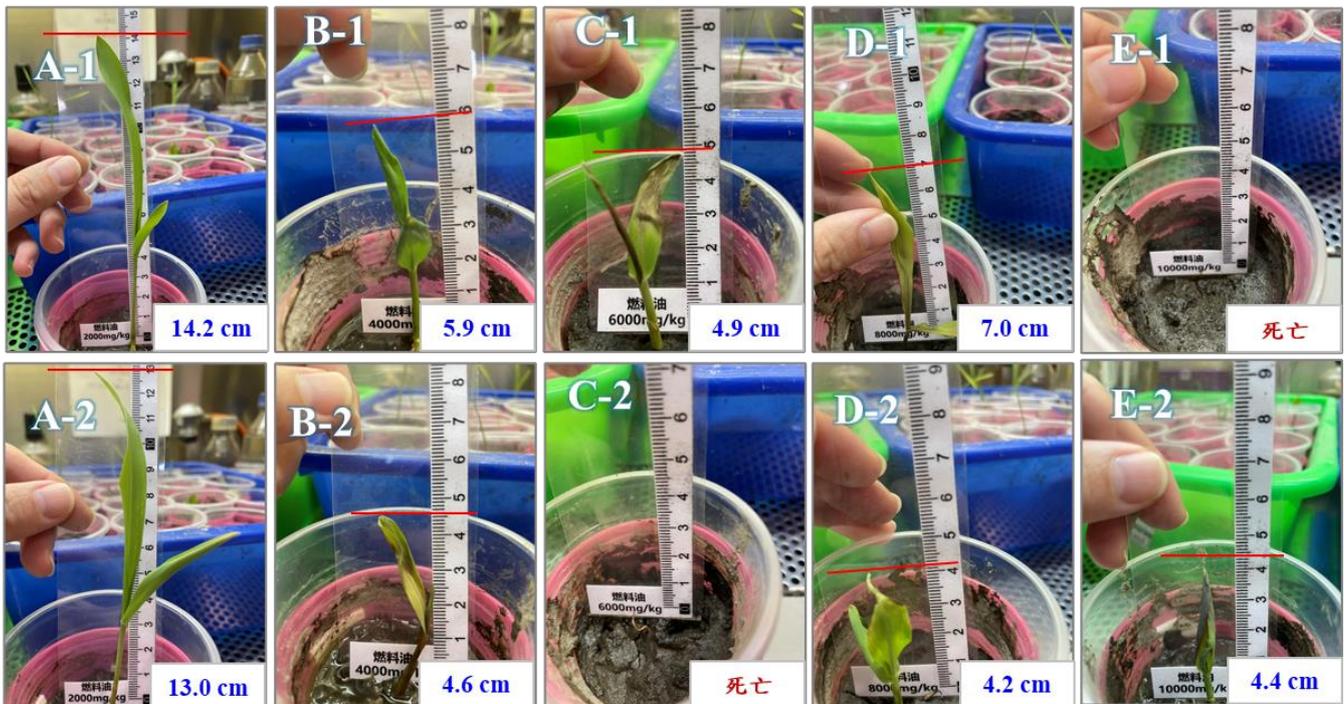


新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 21 玉米種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 14 天之生長狀況/二重複試驗

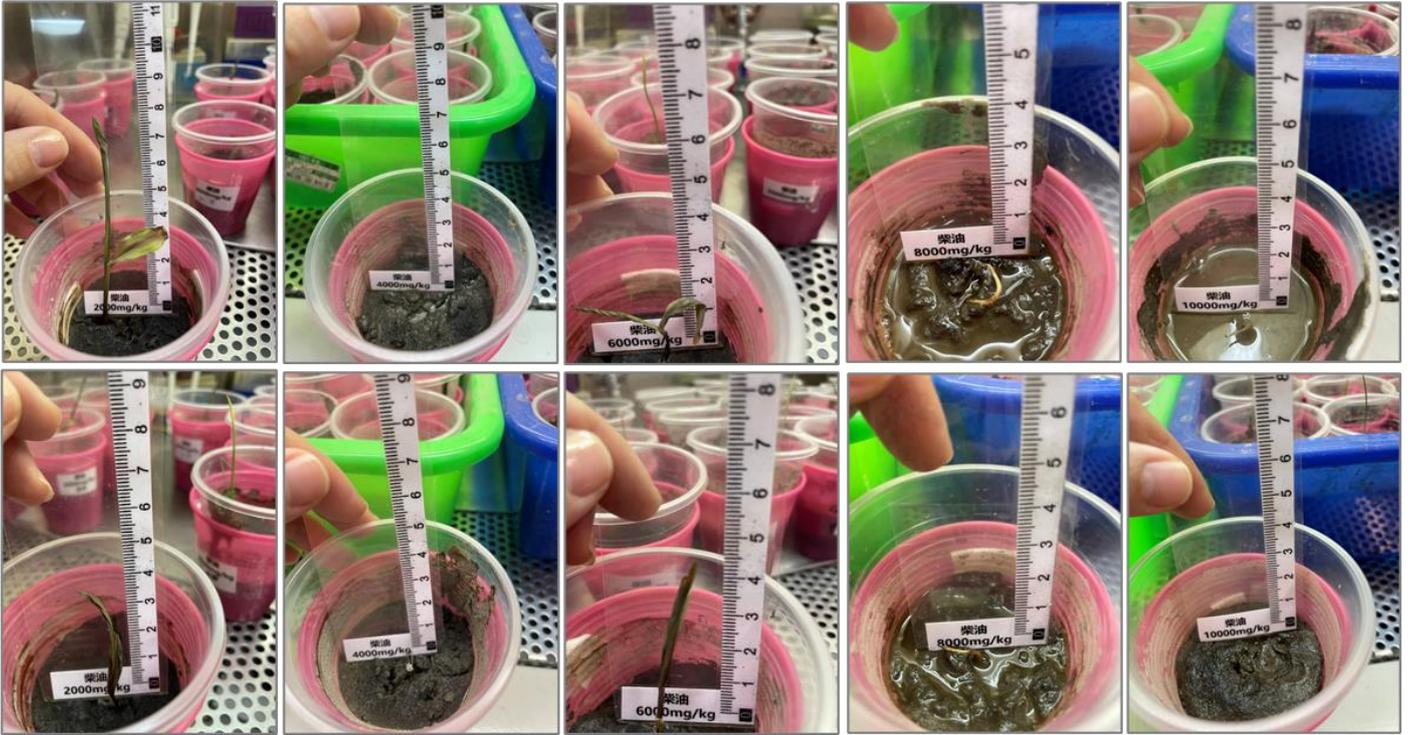


附錄 22 玉米種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 14 天之生長狀況/二重複試驗

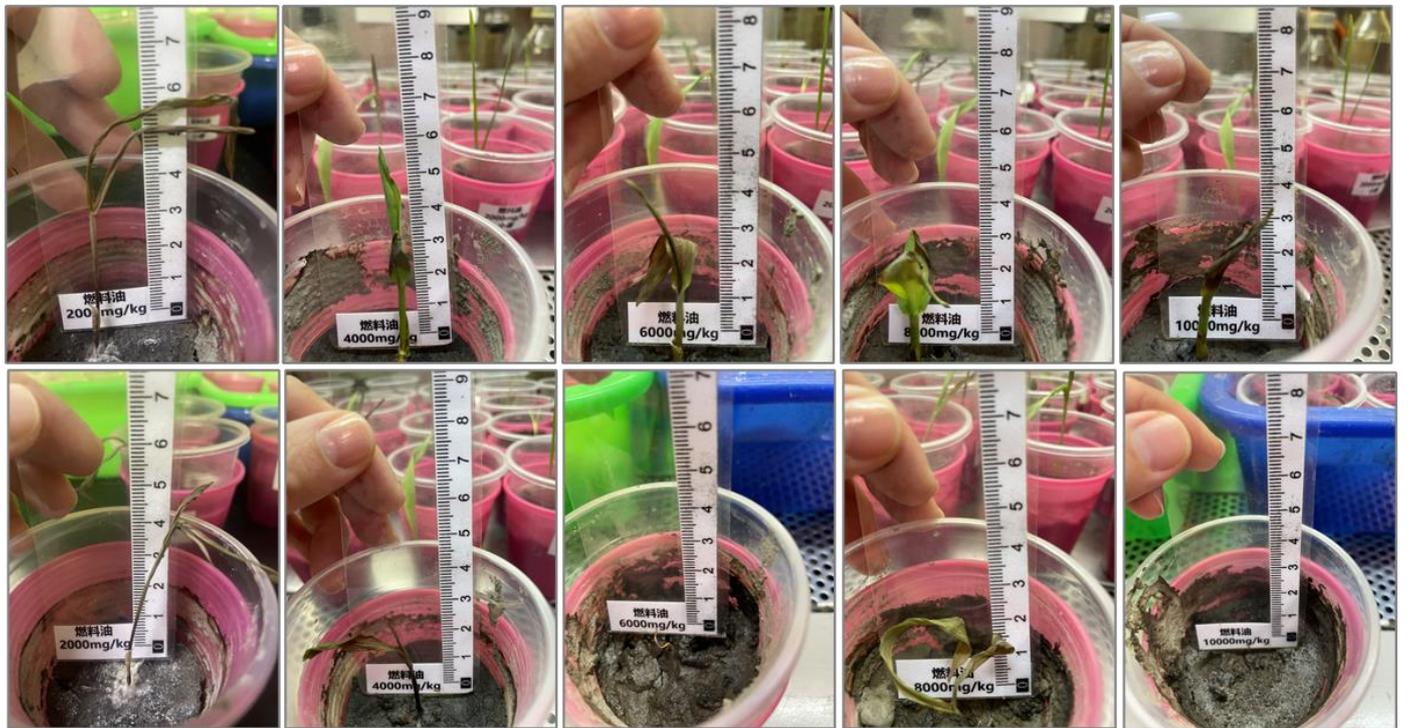




附錄 23 玉米種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 21 天之生長狀況/二重複試驗



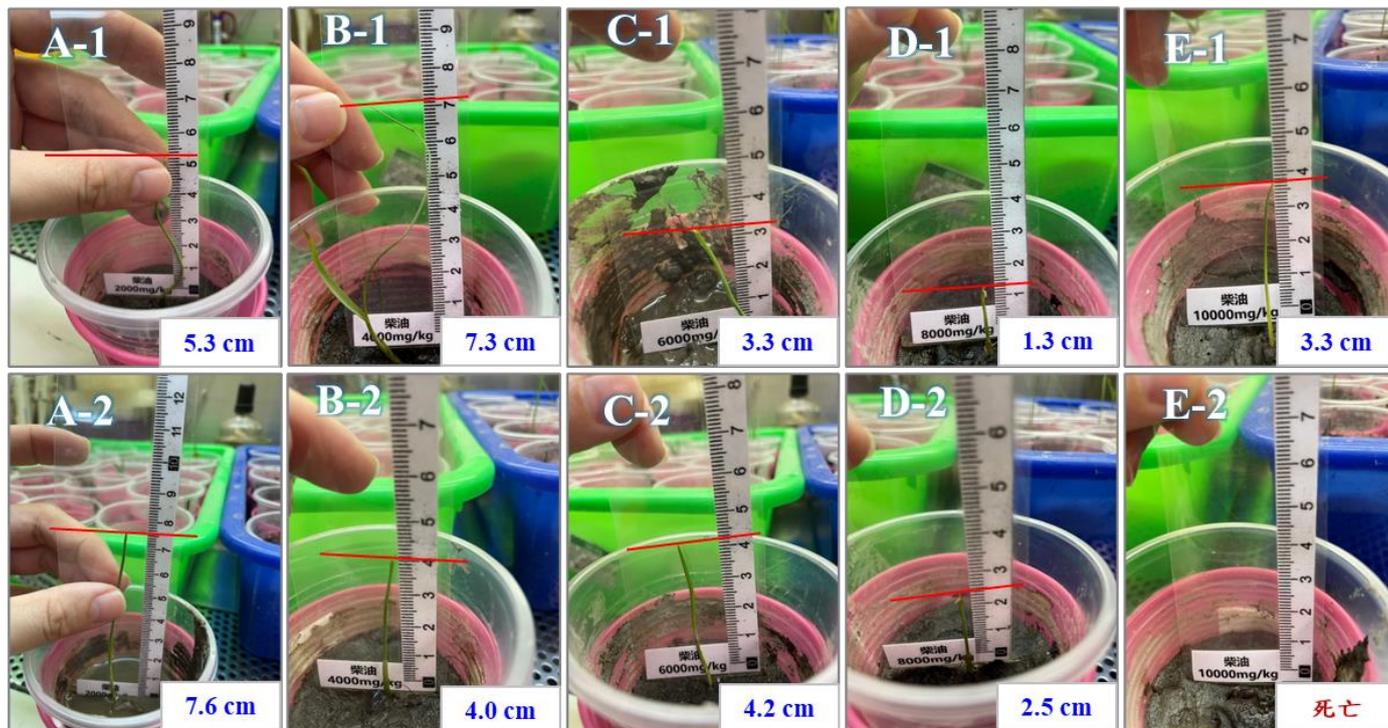
附錄 24 玉米種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 21 天之生長狀況/二重複試驗



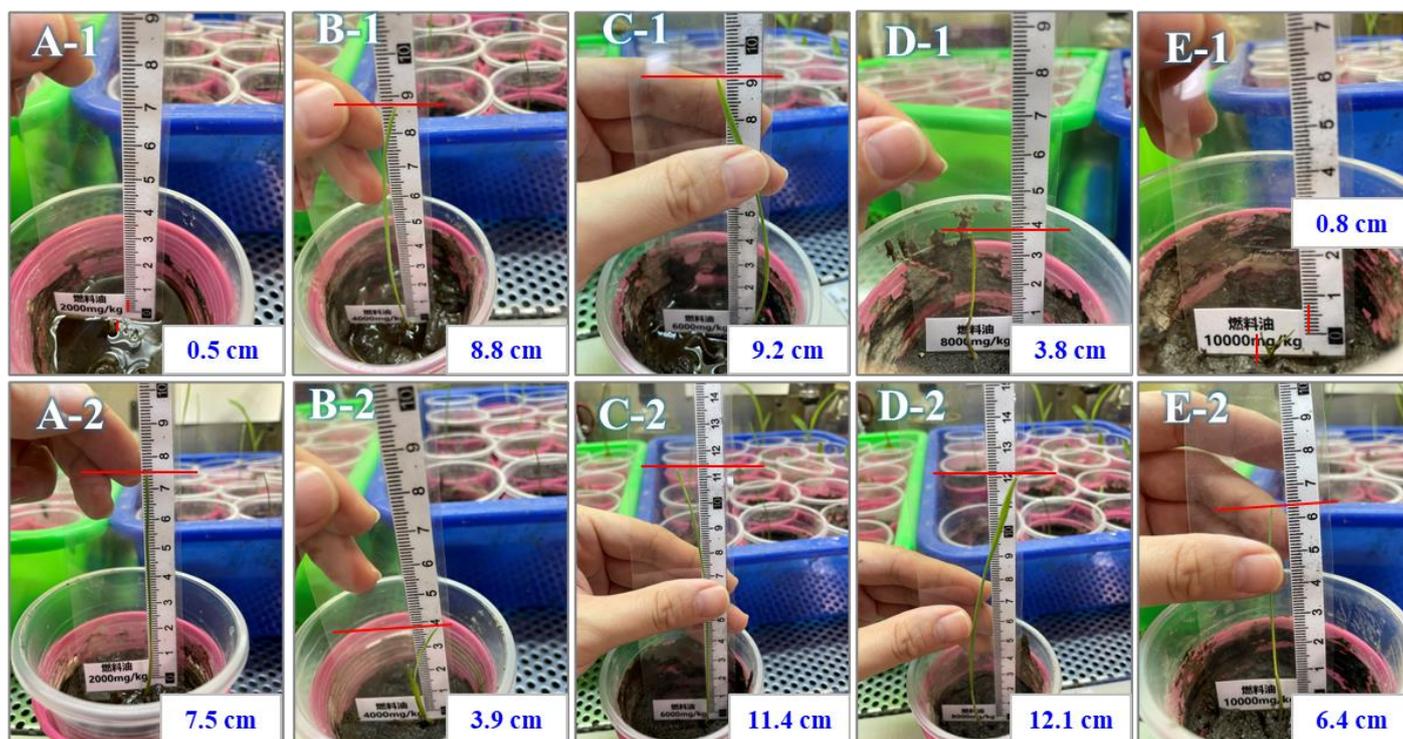


新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 25 小麥種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 7 天之生長狀況/二重複試驗

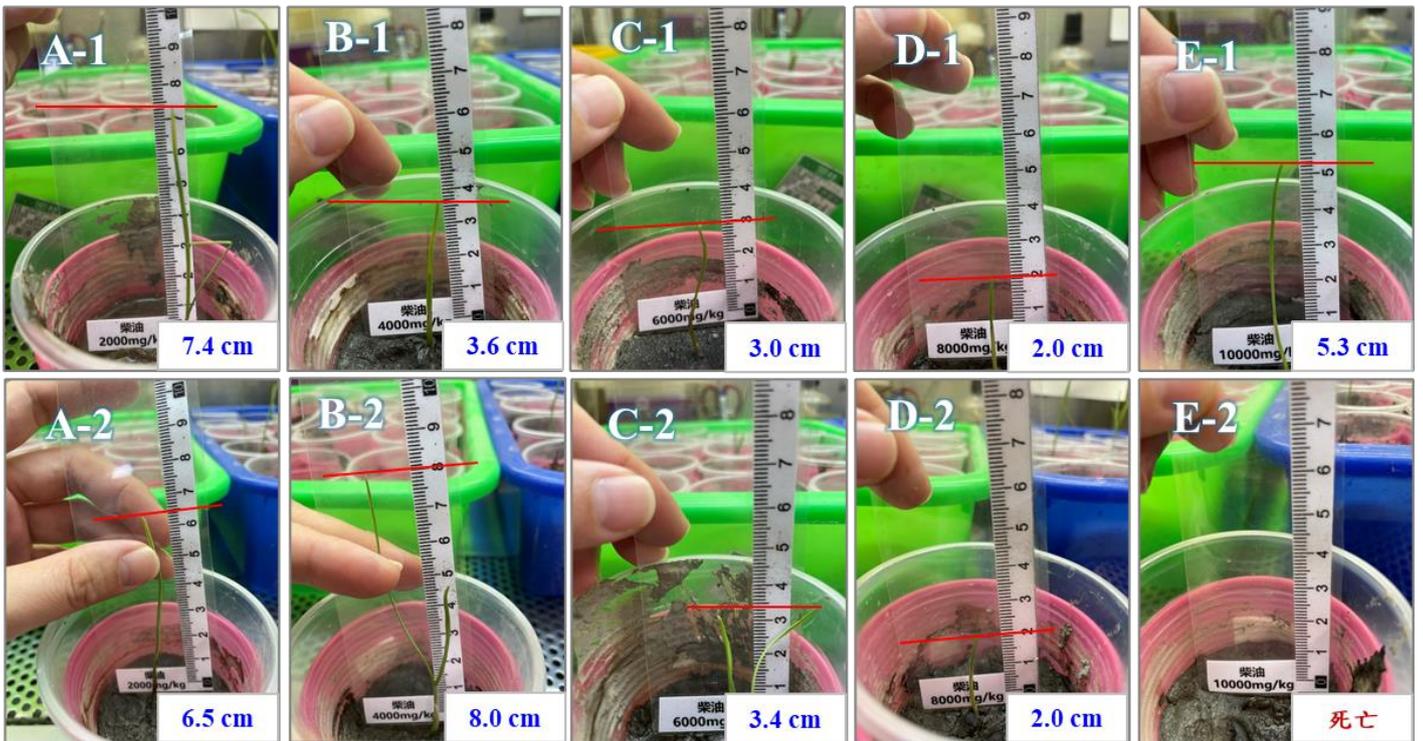


附錄 26 小麥種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 7 天之生長狀況/二重複試驗

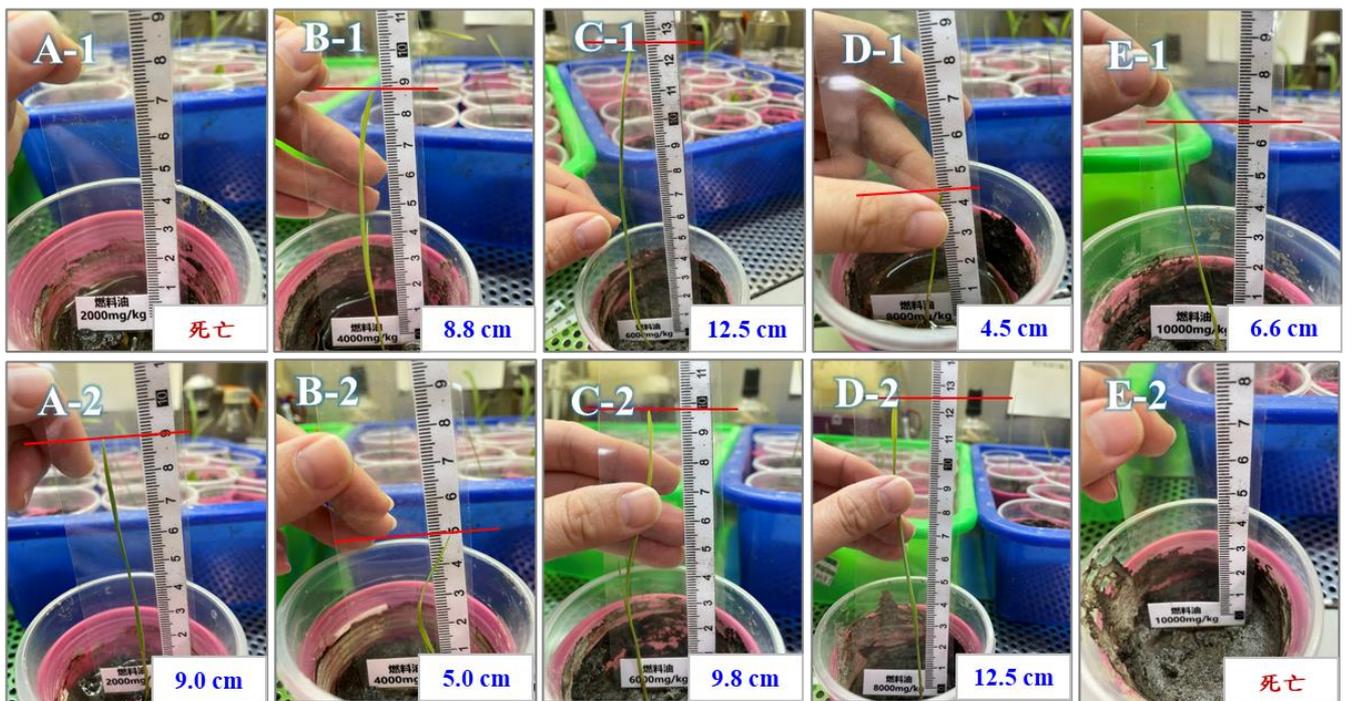




附錄 27 小麥種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 14 天之生長狀況/二重複試驗



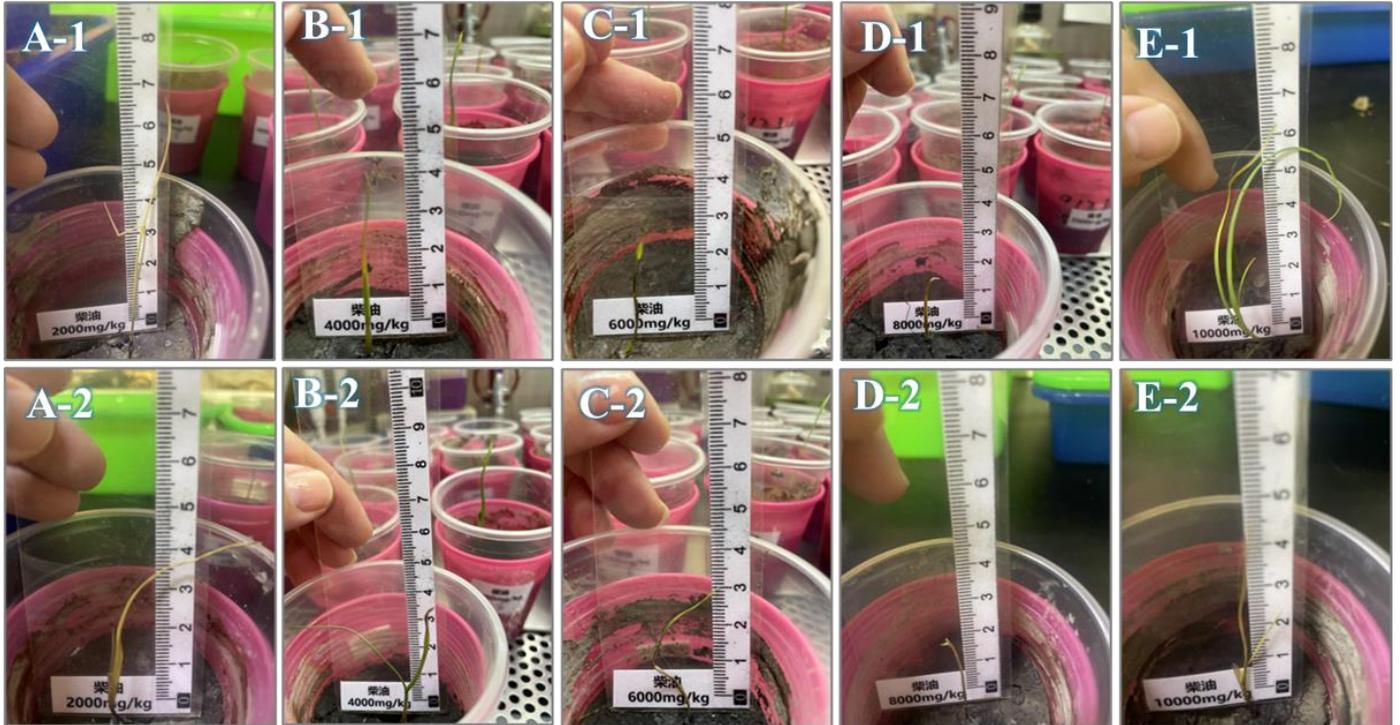
附錄 28 小麥種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 14 天之生長狀況/二重複試驗



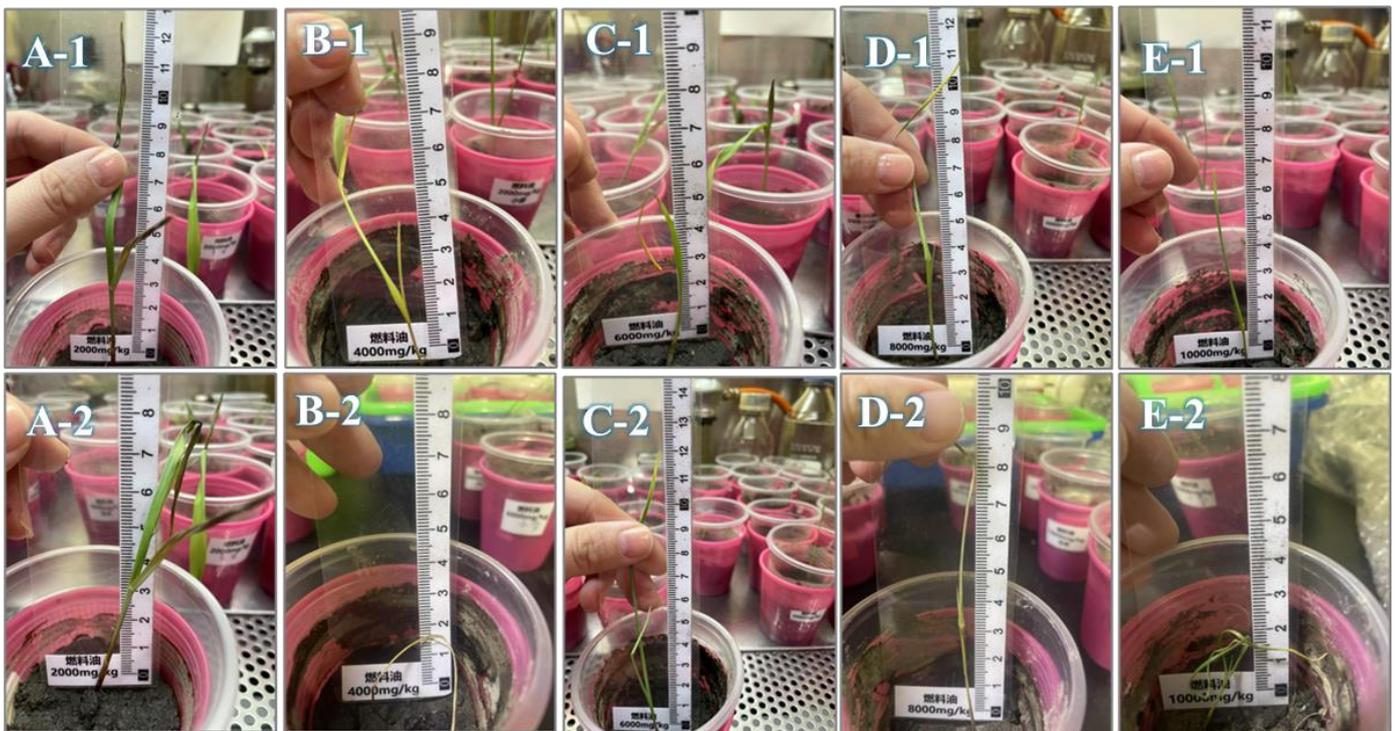


新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 29 小麥種植於柴油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 21 天之生長狀況/二重複試驗

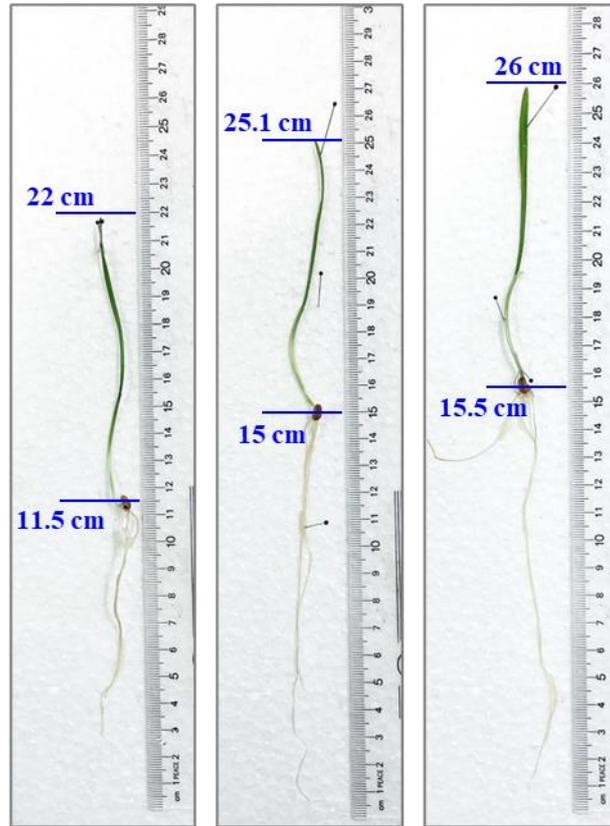


附錄 30 小麥種植於燃料油污染(A)2,000 (B)4,000 (C)6,000(D)8,000(E)10,000 於第 21 天之生長狀況/二重複試驗





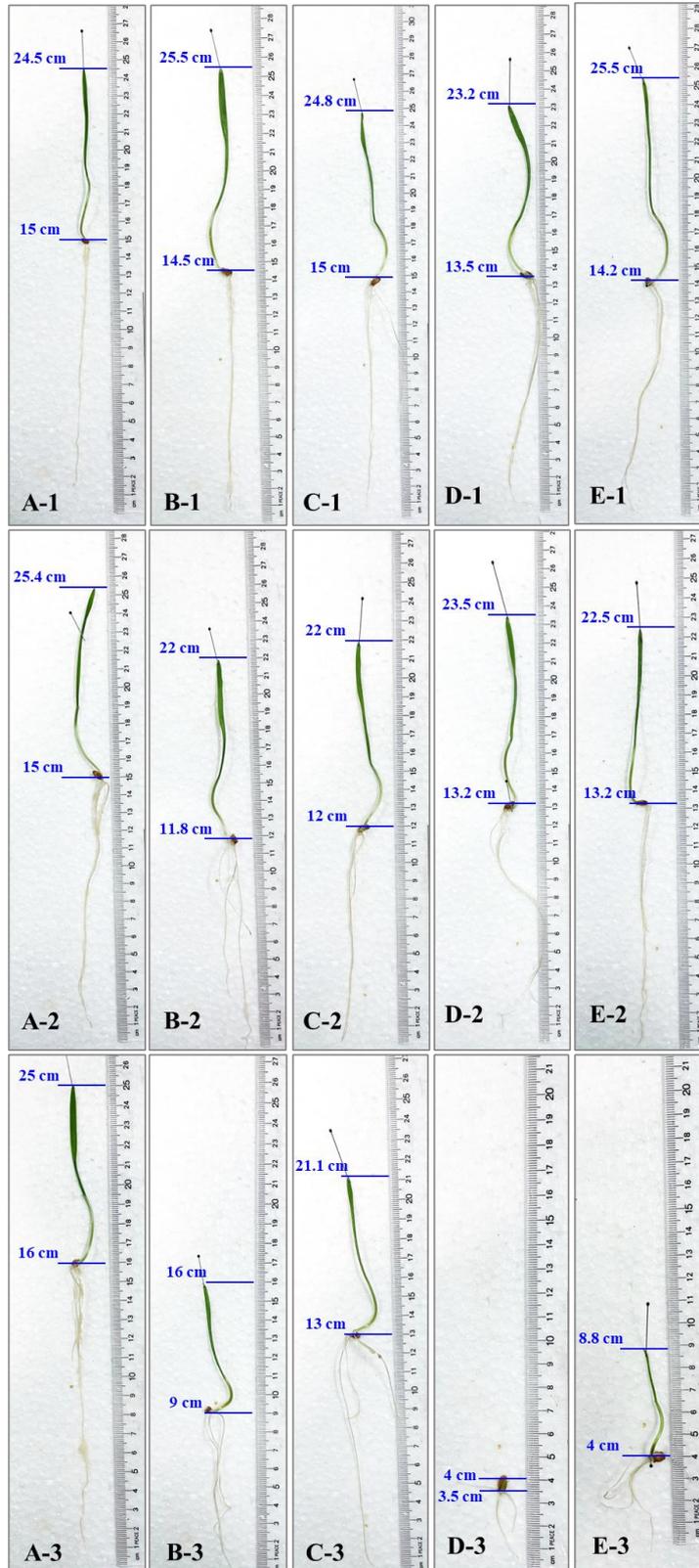
附錄 31 使用對照組土壤萃取液培養小麥種子發芽(7天)/三重複





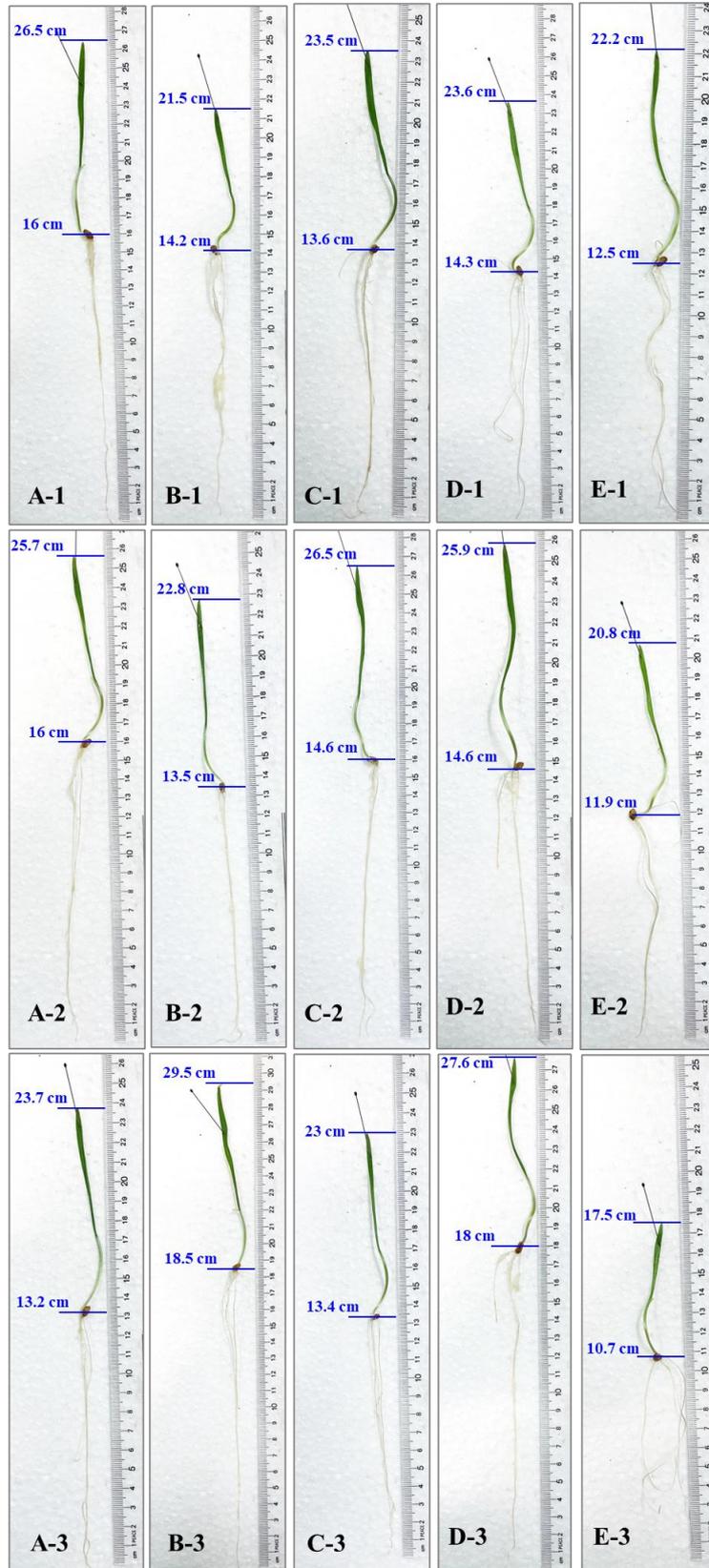
新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 32 使用柴油(A) 2,000 (B) 4,000 (C) 6,000 (D)8,000 (E) 10,000 mg/kg 土壤(20 天)萃取液培  
養小麥種子發芽(7 天)/三重複





附錄 33 使用柴油(A) 2,000 (B) 4,000 (C) 6,000 (D)8,000 (E) 10,000 mg/kg 土壤(20 天)萃取液培養小麥種子發芽(7 天)/三重複





新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

附錄 34 國外研討會論文發表接受函



**SciKnowledge**<sup>TM</sup>  
European Education Scientific Conferences  
**SciKnowledge Education**  
<https://sciknowledge-conferences.com/>  
E-mail: info@sciknowledge-conferences.com  
Phone: +34 924 10 56 97 +34 644 78 20 00



**GEET**  
International Conference  
Green Energy and Environmental  
Technology  
**2024 International Conference on Green  
Energy and Environmental Technology**  
Lisbon 29-31 July 2024  
<https://greenenergy-europe.eu/>  
E-mail: info@greenchem-europe.eu

**INVITATION LETTER - ACCEPTANCE LETTER**  
**3rd International Conference on Green Energy and Environmental Technology**  
**29-31 July 2024**  
**ISEL – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (Portugal)**

Dear Mr(s) WEN-LIANG LAI

On behalf of the Organizing Committee, I am delighted to inform you that your work have been **Accepted** in this Conference as

Poster Presentation

Abstract Reference and Title:	<b>ID 52</b> Approach of Specific Fluorescent Peak in Synchronus Fluorescent to Measure TPH Content Contaminated by Dissel
Presenting Author:	WEN-LIANG LAI Tajen University Graduate Institute of Environmental Management No.20, YanPu Township, Pingtung County Taiwan

3rd International Conference on Green Energy and Environmental Technology will be held at the ISEL – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro, 11959-007 Lisboa, during 29-31 July 2024. More details on the event can be found here: <https://greenenergy-europe.eu/> It is a condition of abstract acceptance that you or a nominated presenting co-author registers for the conference. You must enter in <https://greenenergy-europe.eu/registration> and pay the fees until **May 30th, 2024**, via instructions posted on website. The abstracts of all unregistered presenters will be removed from the Programme after this date.

All the accepted Abstracts (until May 30th) will be published in the **Abstract E-book** of the Conference (registered with ISBN). Submission of Extended Abstracts is OPTIONAL. If you wish to submit your paper to the Conference Journals (with a peer review), you should not send this extended abstract for Copyright reasons. You can send the paper to the Journal after the Congress (September 2024). Otherwise, you must submit until May 30<sup>th</sup> the Extended Abstract to [info@greenenergy-europe.eu](mailto:info@greenenergy-europe.eu). using this template [https://greenenergy-europe.eu/wp-content/uploads/2023/11/Template\\_General\\_GEET\\_2024.doc](https://greenenergy-europe.eu/wp-content/uploads/2023/11/Template_General_GEET_2024.doc) It must have a minimum of 4 and a maximum of 6 A4 pages

The organization recommends not making reservations for accommodation and flight until 30 days before the date of the congress. All authors will be responsible for their own travel and accommodation expenses. If you wish, you can use the conference site to book your hotel <https://greenenergy-europe.eu/1160-2/>.

Again, congratulations and I look forward to seeing you in Lisbon!

With kind regards

Prof. Luis Miguel Minhalma  
Conference Chair  
Instituto Superior de Engenharia de Lisboa  
Instituto Politécnico de Lisboa.  
Portugal, EU  
[mminhalma@deq.isel.ipl.pt](mailto:mminhalma@deq.isel.ipl.pt)





## 附錄 35 環境工程年會/發明專利申請證明

中華民國環境工程學會 2024 土壤與地下水研討會

黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異

### 黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異

陳上權<sup>1</sup>，張耀聰<sup>2</sup>，賴文亮<sup>3</sup>

大仁科技大學環境管理研究所助理教授<sup>1</sup>，教授<sup>3,\*</sup>，通訊作者

農業部高雄區農業改良場副研究員<sup>2</sup>

計畫編號：112 年環境部環境管理署土基會 113C001691

#### 一、前言

人類活動的增加和全球人口增長，不斷增加固體廢物的產生。基於生物的解決方案越來越受歡迎，特別是昆蟲進行有機廢物轉化是視為綠色整治工法，其中黑水虻(Black soldier fly larvae, BSFL)於不同有機廢物的生長和發育，近年有許多研究者進行測試和改進。Cai *et al.* (2018)研究 BSFL 對富含重金屬及都市污水廠污泥處理，發現高濃度的鉛、鎳、硼和汞可能會干擾 BSFL 幼蟲體重增加，而鋅、銅、鉻、鎘和汞會略微降低幼蟲的存活率。添加雞糞和麥麩作為共基質可改善轉化過程。Hu *et al.* (2023)探討 BSFL 對廚餘和湖泊底泥混合物中存在的重金屬轉化，結果證明，BSFL 在湖泊底泥中存活率為 84.76%，BSFL 可積累 70-90% 的鋅 (Zn)、鉻 (Cr)、銅 (Cu) 和 20-40% 的鎘 (Cd) 和鉛 (Pb)。實驗組 2：3，湖泊底泥 40%，餐廳垃圾 60%，轉化 15 d 後效果最好，BSFL 存活率為 95.24%，BSFL 平均重量為 82.20 mg，BSFL 平均長度為 8.92 mm，Cu(43.22 mg/kg)、Zn (193.31 mg/kg)、Cd(1.58 mg/kg)、Cr(25.30 mg/kg)、Cr 和 Pb (38.59 mg/kg)，此意謂 BSFL 可以提高湖泊底泥的資源利用率，特別是低含量的重金屬劑量。

Biancarosa *et al.* (2018)以富含重金屬的海藻餵食 BSFL，發現幼蟲積累鎘、鉛、汞和砷；當在攝食介質中加入更多的海藻時，幼蟲中這些元素的濃度累積量會增加。鎘的保留率最高達 93%；總砷的保留率最低達 22%。本研究證實，當 BSFL 存在於攝食介質中時，可以積累重金屬和砷，故評估以 BSFL 作為飼料和食品安全，需要更廣泛地瞭解加工幼蟲產品組成成份。Bulak *et al.* (2018)本研究調查 BSFL 作為創新現地生物整治(Entomoremediation)的新物種使用。經 36 d 後，BSFL 可以去除受 Cd 和 Zn(50mg/kg)玉米葉片污染的 49%，優於其它植物提取(phytoextraction)污染的方法，如堆肥。重金屬的存在對 BSFL 利用植物效率，沒有顯著影響。基於此，作者提出 BSFL 可作為植物提取污染生物質收穫後的新方法，鎘主要積聚於在蛹中，鋅則積聚在成蟲中。蛹中的高鎘含量創造金屬回收過程中的可能性。

基於上述研究分析，以 BSFL 同時進行有機物及重金屬之研究應是可行，但少有文獻以 BSFL 於燃料油進行相關之生物實驗。本研究以人工配製高濃度燃料油 2,000-10,000 mg/kg 之受污染土壤，並投入三齡 BSFL 進行四週觀察，除進行 BSFL 於不同油品劑量之存活率外，另探討 BSFL 對土壤中必要金屬元素之利用，及八大重金屬元素去除之變化，其中必要金屬，包括 K、Ca、Mg、Na、Fe 及 Mn；八大重金屬則包括 Cu、Zn、Cd、Cr、Ni、Pb、Hg 及 As。

#### 二、研究方法

##### 2-1 土樣選擇、前處理及基本性質

模擬一系列受污染土壤樣本，本研究取自校園未受污染的土壤，先去除大顆粒雜質以篩網 (10 mesh, 2 mm, 台製)過篩後備存，依 AFS 方式進行各項參數量測，pH((AFS2904-1)；1:1)6.38、導電度(AFS2905-1；1:5)0.16 mS/cm、有機質有(%)((AFS2101-1)6.59、有效性磷(AFS1120-1) 177 mg/kg、鈉(AFS1302-1) 29 mg/kg、

中華民國 113 年 11 月 15 至 11 月 16 日

國立中興大學



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

中華民國環境工程學會 2024 土壤與地下水研討會

### 黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異

效性鉀(AFS1130-1) 183 mg/kg、有效性鈣(AFS1140-1) 2,770 mg/kg、有效性鎂(AFS1150-1) 237 mg/kg、鐵 519 mg/kg、錳 86 mg/kg；八大重金屬(NIEAS321.61C)，銅 5.3 mg/kg、鋅 27 mg/kg、鎘 0.16 mg/kg、鉻 0.54 mg/kg、鎳 3.4 mg/kg、鉛 4.1 mg/kg、汞 0.11 mg/kg 及砷 2.1 mg/kg。各參數對應之方法偵測極值(MDL 值)，分別為銅 0.02 mg/kg、鋅 0.03 mg/kg、鎘 0.009 mg/kg、鉻 0.01mg/kg、鎳 0.02mg/kg、鉛 0.027 mg/kg、汞 0.01 mg/kg 及砷 0.01 mg/kg。

### 2-2 燃料油之配製

將甲種燃料油 1%(高雄礦油行)分別溶於正己烷中，倒入含未受污染土壤(乾土)之 20 L 玻璃容器，再使用玻璃攪拌棒將其均勻攪拌等待至乾燥狀態(溶劑完全揮發)，濃度控制在 2,000 ~ 10,000 mg/kg 以模擬現地環境污染狀況進行 BSFL 減量效能評估。

### 2-3 幼蟲培育、觀察及存活率

使用 18 cm (L) × 25.5 cm (W) × 10.3 (H) 之塑膠盆飼養，取 0.1 g 黑水虻蟲卵進行孵化，根據實驗室前期試驗 0.1 g 蟲卵可孵化約 4,000 隻幼蟲，投入配製之受污土壤量為 1 kg，每實驗進行三重複試驗。BSFL 蟲卵孵化後，使用米糠營養源(於屏東碾米廠購得)餵養 7 天至 3 齡後(蟲重約 385±15 g)，開始進行所規劃之試程。實驗飼養期，投入受不同濃度污染之土壤，及添加小於 10% 之營養源(如米糠)作為蟲體之基質，此階段定期紀錄蟲體之變化，飼養期間盆內固定濕度為 60~80%，四週後，將蟲體挑出後，紀錄蟲體之變化，將土樣及蟲體進行處理，再依相關參數方法分析。BSFL 存活率=(投入幼蟲數-化蛹-死亡數)/投入幼蟲數。

## 三、結果與討論

### 3-1 黑水虻幼蟲對必要金屬利用及八大重金屬移除之差異

非必要金屬是指曝露於低含量，會強烈造成生物及人體健康負面效應(Jan et al., 2015)及對存在於生物無任何有利效應者(Singh et al., 2011)，包括 Cd、Pb、As 及 Hg。圖 1 為未添加燃料油之背景土+10%米糠，投入 3 齡 BSFL 進行培育，土相中必要及八大重金屬含量之變化。圖 1 顯示，在必要金屬部分，除鈣元素，從 2,770 mg/kg 降至 1,313 mg/kg，BSFL 利用鈣去除率為 52.6%，其餘必要金屬含量，背景土+10%米糠經 BSFL 處理後，均較背景土值為高，此意謂米糠中存在必要金屬含量，雖 BSFL 可能對這些金屬有移除能力，但移除效果，不若對鈣的效果佳，而米糠可能含較高鈣含量，故 BSFL 實際對鈣利用移除能力應是更高。

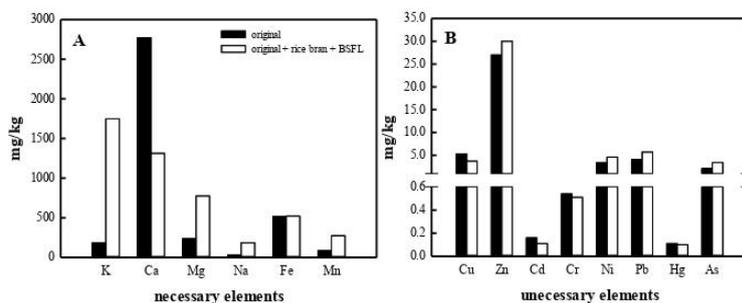


圖 1 黑水虻幼蟲對(A)必要金屬利用量及(B)八大重金屬移除量之差異

在八大重金屬部分，背景土相較 BSFL 於背景土+10%米糠之樣本，銅、鎘、鉻及汞元素部分，分別從 5.3 mg/kg 降至 3.7 mg/kg、0.16mg/kg 降至 0.11 mg/kg、



中華民國環境工程學會 2024 土壤與地下水研討會

黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異

0.54 mg/kg 降至 0.51 mg/kg 及 0.11mg/kg 降至 0.10 mg/kg，代表 BSFL 對此類重金屬有去除能力，並累積於 BSFL 蟲體，去除量依序為銅、鎘、鉻及汞。另 4 項重金屬含量，背景土均低於 BSFL 於背景土+10%米糠，代表鋅、鎳、鉛及砷於 BSFL 之累積能力較前四種非必要金屬為低。

3-2 高燃料油對 BSFL 利用必要金屬及八大重金屬移除之差異

為 BSFL 未添加燃料油之背景土+10%米糠及添加燃料油之背景土+10%米糠，分別投入 3 齡 BSFL 進行培育，土相中必要金屬利用及八大重金屬之變化。由圖 2 得知，在必要金屬部分，鉀、鈣、鎂及鈉，在燃料油劑量為 2,000-8,000 mg/kg，隨著燃料油濃度之增加，此類金屬之濃度隨之減少，至 10,000 mg/kg，BSFL 對必要金屬之利用能力明顯減弱，此可能與 BSFL 在高燃料油劑量之耐受能力降低或失去活力，進而影響其對必要金屬之利用。在錳部分，在燃料油劑量為 2,000-6,000 mg/kg 隨著燃料油濃度之增加，此類必要金屬濃度隨之減少，至 8,000 mg/kg，BSFL 對此類必要金屬之利用能力明顯減弱。關於鐵部分，在燃料油劑量為 2,000-10,000 mg/kg，鐵濃度則隨燃料油濃度增加而增加，意謂 BSFL 對鐵元素利用能力不佳。

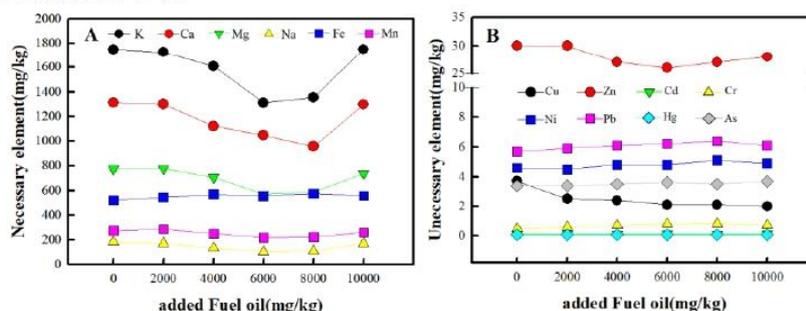


圖 2 高燃料油對 BSFL 利用(A)必要金屬量(B)八大重金屬量移除之差異

在八大重金屬部分，BSFL 於背景土僅添加 10%米糠之樣本，銅、鎘、鉻及汞部分，在燃料油劑量為 2,000-8,000 mg/kg，除銅及鋅外，隨燃料油劑量之增加而降低外，其餘金屬未見減少及反見增加；在燃料油劑量為 10,000 mg/kg，銅持續下降，而鋅則些微增加，其它八大重金屬則仍較背景土僅添加 10%米糠之樣本之值為高，代表高燃料油存在時，BSFL 對銅及鋅有一定的蓄積能力，但其餘重金屬，則未見於 BSFL 累積效應。

3-3 BSFL 於高燃料油污染土壤中之死亡率及蟲體平均重

圖 3 為 BSFL 於受燃料油污染土壤濃度介於 2,000 -10,000 mg/kg 之死亡率比較。由圖 3 得知，BSFL 未添加燃料油之背景土+10%米糠死亡率為 0.05 %，在燃料油劑量為 2,000-8,000 mg/kg 死亡率為 0.08-0.20 %，燃料油劑量為 10,000 mg/kg 死亡率為 0.32%，顯然 BSFL 在本研究燃料油濃度介於 2,000 -10,000 mg/kg，有相當高耐受力。未添加燃料油之背景土+10%米糠，BSFL 平均蟲重為 0.88 g，在燃料油劑量為 2,000-10,000 mg/kg 每隻平均蟲重為 0.95-1.31 g，代表 BSFL 似乎有將土壤中燃料油、米糠及土壤攝入腸道，但其對燃料油之利用及生物轉化能力，除需量測 BSFL 之 TPH 含量，及土壤中 TPH 之含量，方能進一步確認。



## 新穎蟲生整治技術處理受重質石油碳氫化合物污染土壤

中華民國環境工程學會 2024 土壤與地下水研討會

黑水虻幼蟲對受油品污染土壤中無機金屬移除之差異

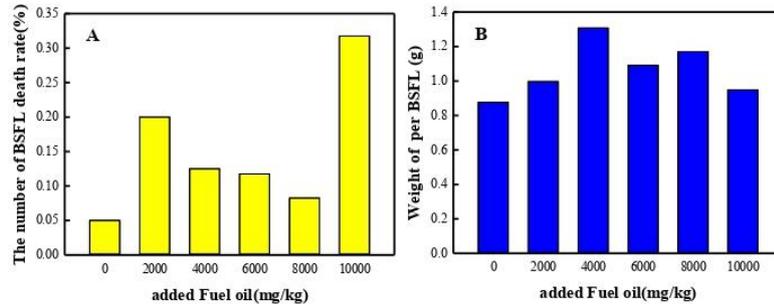


圖 3 BSFL 於高燃料油污染土壤中之死亡率及蟲體平均重

### 四、結論

依上述結果說明，可得如下結論：

1. BSFL 在本研究燃料油濃度介於 2,000 -10,000 mg/kg，有相當高的耐受力。
2. 未受污染之土壤，BSFL 對必要金屬之利用能力以鈣最佳。在八大重金屬部分，移除量依序為銅、鎘、鉻及汞，但對鋅、鎳、鉛及砷之蓄積能力，在此並不明顯。
3. 受高濃度燃料油污染土壤，BSFL 對必要金屬，包括鉀、鈣、鎂及鈉有一定的累積能力，但 10,000 mg/kg 燃料油，失去活性之 BSFL 對上述金屬之蓄積能力亦隨之消失。在八大重金屬部分，BSFL 僅對銅及鋅有一定的累積能力，其餘八大重金屬，則未見於 BSFL 進行蓄積。

### 參考文獻

- Biancarosa, I., Liland, N. S., Biemans, D., Araujo, P., Bruckner, C. G., Waagbø, R., Torstensen, B. E., Lock, E. J., & Amlund, H. (2018). Uptake of heavy metals and arsenic in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae grown on seaweed-enriched media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2176-2183.
- Bulak, P., Polakowski, C., Nowak, K., Waśko, A., Wiącek, D., & Bieganowski, A. (2018). *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Science of The Total Environment*, 633, 912-919.
- Cai, M., Hu, R., Zhang, K., Ma, S., Zheng, L., Yu, Z., & Zhang, J. (2018). Resistance of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to combined heavy metals and potential application in municipal sewage sludge treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1559-1567.
- Hu, C., Yang, L., Wang, H., Xiao, X., Wang, Z., Gong, X., Liu, X., & Li, W. (2023). Analysis of heavy metals in the conversion of lake sediment and restaurant waste by black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1163057.
- Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., & Haq, Q. M. R. (2015). Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29592-29630. <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/12/26183>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246-253. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>