

行政院環境保護署

103 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

利用微生物呼吸試驗探討生物通氣法對柴油污染土壤復育之 成效 期末報告

主 辦 單 位：  行政院環境保護署

計 畫 執 行 單 位： 朝陽科技大學／環境工程與管理系所

計 畫 主 持 人： 劉敏信 副教授

計 畫 執 行 期 間： 102年11月25日起至

103年11月24日

中 華 民 國 103 年 11 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

- ☒ 達成目標
- ☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）
- ☐ 實驗失敗
- ☐ 因故實驗中斷
- ☐ 其他原因

說明：

本計畫已於計畫期程內完成所有工作進度，並於生物通氣土壤模場中添加適量營養鹽及柴油降解菌，可觀察到污染濃度降低之趨勢；搭配氣泡式呼吸儀進行呼吸試驗後，亦能藉由統計每批次試驗中固定時間之微生物攝氧率，繪製出降解期程內的微生物活性曲線，故操作人員能以具科學性的研究數據，評估執行生物通氣法時，添加營養鹽的最佳時機與土壤微生物對柴油濃度降解的貢獻程度等。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：■已發表 4 篇； ■未發表之文稿 2 篇； ■撰寫中 2 篇； □無

專利：□已獲得 0 件； ■申請中 1 件； □無

技轉：□已技轉； □洽談中； ■無

其他：(100 字為限)

本計畫已在 103 年 11 月間，於「中華民國環境工程學會 2014 土壤與地下水研討會」與「第十六屆海峽兩岸環境保護研討會」中發表 4 篇研究論文，並已進行投稿國際期刊 (SCI) 之論文 2 篇與撰寫碩士論文 2 篇。

本計畫以「風力驅動式生物通氣設備」進行專利申請，感謝行政院環保署及朝陽科技大學於計畫期程內提供之一切協助，目前專利申請資料文件已經備妥，並且專利已獲校方補助申請與維護經費，正委由專利事務所進行後續申請事宜。

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

本計畫設計之風力驅動式生物通氣設備，不需使用機械動力，即能將外界風力導入地下土壤層營造好氧環境，且具備能防止揮發性氣體溢散之逆止設計，運作過程中亦不會產生噪音，而設置成本低、設備零件能單獨更換、不需 24 小時專人監控等優點，為生物通氣整治法中極具潛力的操作設備。另由本計畫中氣泡式呼吸儀搭配泥漿法所進行之呼吸試驗相關成果顯示，利用活性趨勢圖，可觀察微生物在 24 小時內可能的活性變化及降解趨勢，從攝氧累積曲線中，可用以評估土壤微生物的族群生存情形，皆較總菌落數分析精準且變異性低，供操作人員在判讀柴油污染土壤中微生物活性時，能有更具科學根據的表達方式。

研究成果中文摘要

本計畫於實驗室建立高濃度(約 20,000 mg/kg)柴油污染土壤風力驅動式生物通氣(Wind-driven Bioventing) 模場,使用之土壤經質地分析為砂質壤土,適合以生物通氣設備進行污染整治,試驗中同時使用氣泡式呼吸儀 (Bubble Respirometer)搭配生物泥漿法進行土壤中微生物活性監測,探討生物通氣法整治柴油污染土壤的成效與微生物活性之關係。經模場添加具柴油降解能力之三種微生物及適量營養鹽後,各通氣組皆呈現降解趨勢。*Bacillus subtilis* 菌 (BC)及 *Pseudomonas putida* 菌 (PS)於試驗 3 日後之污染物濃度殘餘率 (C/C_0) 約為 0.65, 而 *Achromobacter xylosoxidans* 菌 (F3B)僅約為 0.80。經過試驗 30 日後,三種微生物混菌組 (ALL)促使污染物濃度大幅降低,污染物濃度殘餘率可達 0.30,相較其餘組別有最佳的降解趨勢。以氣泡式呼吸儀於降解期間對各組別進行呼吸試驗及監測,將每批次試驗開始 24 小時間攝氧率統計作圖可得一活性曲線,藉由曲線變化能協助操作人員評估微生物活性趨勢。由呼吸試驗結果顯示,生物通氣模場自營養鹽添加後,BC 組及 PS 組的微生物活性可連續提高 2 週、F3B 組活性可連續提高 3 週、ALL 組活性則能連續提高 4 週後才逐漸降低。對照攝氧率活性曲線與柴油濃度變化圖後可發現,兩者在曲線中能呈現一定程度的相關性,顯示攝氧率活性曲線應能作為微生物降解柴油污染物過程中成效的評估方式。

關鍵詞：被動式生物通氣法、柴油污染土壤、柴油降解微生物、氣泡式呼吸儀、生物泥漿法

研究成果英文摘要

In this study, a wind-driven bioventing pilot for the high-concentration (about 20,000 mg/kg) diesel contaminated soil was established in the laboratory. According to the analysis, the soil adopted belongs to the sandy loam, which is suitable for the contamination remediation by using the bioventing equipment. During the experiment, a bubble respirometer complete with the bioslurry method was used to monitor the microbial activity in soil, in order to explore the relationship between the effectiveness of the diesel contaminated soil remediation with the bioventing method and the microbial activity. All venting groups presented the degradation tendency after three kinds of microorganisms having the diesel degradation ability and appropriate amount of nutrient sources were added in the pilot. The remaining ratio of diesel concentration (C/C_0) of *Bacillus subtilis* (BC) and *Pseudomonas putida* (PS) was about 0.65 after 3 days of experiment and that of *Achromobacter xylosoxidans* (F3B) was only about 0.80. After 30 days of experiment, the mixed of the three kinds of microorganisms (ALL) resulted in the significant reduction of the contaminant concentration and the remaining ratio of contaminant concentration able to reach 0.30, which is the optimal degradation tendency compared with the rest of individual microorganism. The monitoring of microorganisms respiration were carried out with a bubble respirometer on each microorganism during the diesel degradation. An activity curve was plotted by summarizing and mapping the oxygen uptake rates during the first 24 hours of each batch of experiments. Using the curve variance, the microbial activity tendency can be assessed. The respiration tests showed that after the addition of the nutrient sources in the bioventing pilot, the microbial activity of BC and PS increased continuously for two weeks; the activity of F3B increased continuously for three weeks; and the activity of ALL only decreased gradually after four weeks of continuous increase. Comparison of the oxygen uptake rate activity curve and the diesel degradation tendency showed that both can present a certain degree of correlation in the curves, and it is shown that the oxygen uptake rate activity curve can be used as the effectiveness assessment method in the process of diesel contaminant degradation by the microorganisms.

Keywords: Passive bioventing, Diesel contaminated soil, Diesel degraded microorganisms, Bubble respirometer, Bioslurry method

一、前言

在受到油品污染的場址中，多是因為地下儲油槽或埋設的油管線因老舊、破損等原因導致洩油發生。因此藉由生物通氣法（bioventing）供給氧氣及營養鹽，將原本處於厭氧狀態的污染土層，轉變為通氣環境，刺激以分解油品污染物為主的好氧微生物生長。生物通氣法被廣泛運用在油品污染的場址整治，雖然整治期通常需要 6 個月至 2 年，無法立即有明顯成效，但是因為整治費用較為便宜，對於非急迫性的場址來說，仍是整治方法中較容易執行的技術。而在一般整治過程中，通常每隔一段時間會使用氣相層析儀/火焰離子化偵測器（GC/FID）分析土壤中油品污染的殘留濃度，從污染物濃度的降解變化評估生物通氣法的整治成效。但是生物通氣法因為注入空氣的關係，使地下土層處在通氣的環境，油品也能以揮發的方式自然分解，因此就污染物濃度高低來評估土壤中微生物族群生長是否良好、是否盡到降解污染物之成效，對生物通氣法來說恐不夠恰當的。因此可藉由量測微生物進行呼吸反應時會消耗氧氣並產生二氧化碳的現象，來評估微生物生長情形。而此微小的氣體變化通常是難以測量的，因此一般使用氣泡式呼吸儀其計數氣泡的方式來測量，可提供極高的精確度和準確度。

二、研究目的

由於生物通氣法是藉由額外提供氧氣及營養鹽，讓原本處於厭氧環境下的油品污染土壤轉變為通氣好氧環境，促進具有降解油品能力的好氧微生物能大量的增殖，使污染濃度降低。因此本計畫將於實驗室設置厭氧環境的土壤生物通氣模場，模擬柴油類儲油槽洩漏，導致周圍土壤受柴油污染之情形，並從五組污染土壤中進行生物通氣法的整治，從通氣強度試驗與營養鹽添加兩大項目中，分別監測高濃度柴油污染土壤中微生物的攝氧狀況，作為活性之指標，亦嘗試說明以 GC/FID 分析整治初期污染物濃度曲線呈現不穩定下降之原因，作為以微生物為主的污染物降解參考之依據。整治過程中主要利用氣泡式呼吸儀搭配泥漿法進行批次式的土壤呼吸試驗，屏除其自然揮發之可能，單純探討生物通氣法中微生物面臨柴油污染時，整治期中所提供之貢獻。試著從通氣強度試驗提出最適合微生物生長的通氣量，並給予土壤充足的養分營造微生物最佳降解污染物環境，再輔以具有柴油降解能力之菌種提高對柴油的降解效率。

利用氣泡式呼吸儀搭配泥漿法進行 5 天的批次性土壤呼吸試驗，可收集不同條件下微生物攝氧曲線，分析各時間內微生物呼吸反應，並將添加營養鹽前、後在通氣階段初期的柴油濃度變化進行比較，推估最適合添加營養鹽之時程與評估生物通氣法中微生物的活性，達到善用資源的整治目的。

三、文獻探討

3.1 總石油碳氫化合物

總石油碳氫化合物 (Total Petroleum Hydrocarbons, TPHs)，其涵蓋範圍為含碳數 C_6 到 C_{40} 等之石油碳氫化合物，舉凡日常生活上所使用的汽油、柴油、燃料油、潤滑油、機油等皆是屬於總石油碳氫化合物 (環保署，2003)。總石油碳氫化合物主要分為兩種：汽油類石油碳氫化合物 (Total Petroleum Hydrocarbon as Gasoline, TPH-g) 和柴油類石油碳氫化合物 (Total Petroleum Hydrocarbon as Diesel, TPH-d)；汽油類石油碳氫化合物泛指含碳數為 C_6 到 C_9 之低碳數石油碳氫化合物；柴油類石油碳氫化合物泛指含碳數為 C_{10} 到 C_{40} 之高碳數石油碳氫化合物，兩者總和稱為總石油碳氫化合物【環保署，2007】。

造成環境中油品污染的途徑主要有以下三個：(一) 煉油廠油槽、輸送管線外洩或排放含油廢水與廢油；(二) 加油站油槽槽齡過久，因腐蝕現象或管線施工不良等而產生洩油現象；(三) 油輪排出壓艙水或清洗船艙。這些油品造成之污染，頻受各界重視及舉發。油品污染物在環境中之宿命主要有土壤吸附作用、擴散作用、揮發作用、生物降解及化學分解等現象【史，2001；車，1993；林，1999】。

(一) 土壤吸附作用

油品在土壤中之吸附行為有離子交換、配位基交換、凡得瓦力作用、疏水性結合及氫鍵結合等作用機制。這些作用係取決於油品和土壤顆粒物之化學結構與本身之性質，上述五種之作用方式在土壤表面的吸附上均可單獨或是結合進行。

(二) 擴散作用

油品污染物於土壤環境中會因重力作用在土壤顆粒孔隙間往下滲，並由高濃度向低濃度處移動；亦可藉由毛細現象向上或側面擴散。

(三) 揮發作用

油品進入土壤後可直接或經由土壤孔隙揮發至大氣中，影響揮發之因子有土壤總體密度及含水率。油品組成分以直鏈烷類最易揮發，其次為支鏈烷類及環烷類，芳香族類最慢，而同類成分當碳鏈數越高時其沸點越高較不易揮發。土壤含水時，水分可帶動油品有機污染物共同揮發速率較乾土狀態迅速，且土壤溫度越高，揮發速率越快。

(四) 生物降解

油品在微生物代謝過程中，油品污染物質可以被當作碳源和能源進行代謝作用，經由微生物體內之酵素，可分解污染物質之主要反應包括： β -oxidation 作用、開環作用、還原作用及水解作用等。亦即可以經由上述作用而產生變質 (Transformation)。此種變質乃指油品之環烷類或是芳香族碳氫化合物等其化學分子形式由原來之污染物質轉變成另一種化合物或進一步經由礦化作用而消失。其中油品的直鏈烷類最易被微生物降解，次為支鏈烷類 (碳鏈含有甲基側鏈會阻礙 β 氧化作用)，其次為稀類及環烷類，最難為芳香族化合物。有機污染物在經過微生物逐漸分解後，會生成二氧化碳、水及一些簡單的無機化合物，生物分解污染物質之速度取決於其生物活性。

(五) 化學分解

油品在土壤中之化學分解作用主要有水解、氧化、異構化、離子化等作用，其中以水解及氧化作用最重要，這些分解作用，係將有機污染物質經過一步或多步的化學變化反應，將複雜的化學結構逐步變為簡單的無機化合物，而有些污染物質可能因為和土壤接觸才會加速分解，沒有土壤反而不易分解，該作用即非屬於微生物分解作用。

3.2 TPHs 對土壤與水體之影響

土壤遭受油品污染後具有吸持的特殊機制，進而累積於土壤環境中，土壤團粒構造可能會受到破壞，致使土壤物理及化學性質發生改變，對微生物的活性也會產生不利的影響。若受輕質油品（汽油、燃料油）污染土壤時，會因碳數較低易形成揮發性有機氣體（VOCs）而影響，此氣體不僅在土壤孔隙中傳播，甚至浮出地表經光分解後形成有毒性之水溶性苯或二甲苯等；若

受重質油品（柴油、原油）污染土壤時，會因重力而滲入土壤，而被吸附於土壤顆粒表面，且隨吸附時間越長，油品污染物之重量大於土壤吸附能力時，油品則會脫附而流入地下水中，造成地下水污染【史，2001】。因油脂為疏水性，會附著於土壤孔隙中，阻隔水分及養分之傳輸，使土壤變成還原狀態，進而影響土壤好氧微生物的呼吸作用。土壤一旦變成還原狀態後，所產生的硫化物，不但會毒害植物，並造成土壤中有機碳、全氮、可交換性鐵、錳、鉀等增加外，硝酸態氮及可交換性鈣則有減少之趨勢，而 C/N 值及微生物群數則比正常土壤為高【Pamukcu, 1997】。

油品污染對水體的影響主要包括地表水及地下水兩部分。在地表水方面，當油品洩漏進入地表水後，會產生擴散、蒸發、溶解、氧化、乳化及降解等過程，油的密度比水小，會在水體表面形成一層浮油，降低水體中氧氣的傳輸及光線的穿透能力，阻礙藻類及水生植物之光合作用與魚貝類等水中生物生長。而地下水影響方面，地下飽和含水層中油品的主要來源為存在土壤孔隙中之油品，經由重力及毛細管作用，沿地下水流向經由垂直或水平傳輸到達至地下水面【King, 1978】。

3.3 生物通氣法（Bioventing）

生物通氣法是將新鮮空氣引導入通氣層及地下含水層製造出好氧環境，並注入營養鹽供微生物分解有機污染物【Brown *et al.*, 1993；Leeson and Hinchee, 1997】。具有設備取得、安裝容易，處理時間約 6 個月至 2 年間，具有比起化學整治法費用較為便宜等優點，其優缺點如表 3-1 所示。由於地下地層通常是處於厭氧環境，降解過程較為緩慢，因此生物通氣提供空氣中的氧氣刺激好氧菌，從而也增加了生物降解過程的效益。土壤層中添加了營養鹽（Nutrient）的成份，更能夠以增加土壤的生物分解為目的，加速土壤層中污染物質降解速率。一個典型的生物通氣方法中涉及注入用供氣泵或鼓風機的空氣進入通氣層，示意圖如圖 3-1 所示。

文獻中指出，分離相中總石油碳氫化合物（TPHs）的濃度若高達 50,000 mg/kg 時，對微生物將產生毒化現象，其生長將會受到抑制，而合適的濃度則可以加速微生物的降解作用【黃等人，2008】。因此在環保署土水整治手冊的整治方法建議中，生物通氣法適用於 TPHs 濃度低於 25,000 mg/kg，若超出建議濃度範圍則另外進行生物毒性試驗，或是必須延長預估的整治時間期程【環

保署，1996】。

表 3-1 生物通氣法優缺點比較表

優點	缺點
1. 設備取得容易，易於安裝。 2. 處理時間較短，在最適條件下，平均約6個月至2年間可完成整治工作。 3. 每頓土壤處理費約45~140美元，耗費成本較低。 4. 容易與其他技術結合運用。(空氣注入法、抽出處理法等) 5. 可能不需要昂貴的尾氣處理費用。	1. 初始污染物濃度太高，可能對微生物造成毒性。 2. 低透水性、黏土質高的土壤層、地質條件不明確的情況下較不適用。 3. 無法達到太低的污染物濃度處理目標。 4. 需注入營養鹽，通常需要取得許可。

*資料來源：USEPA, 2004

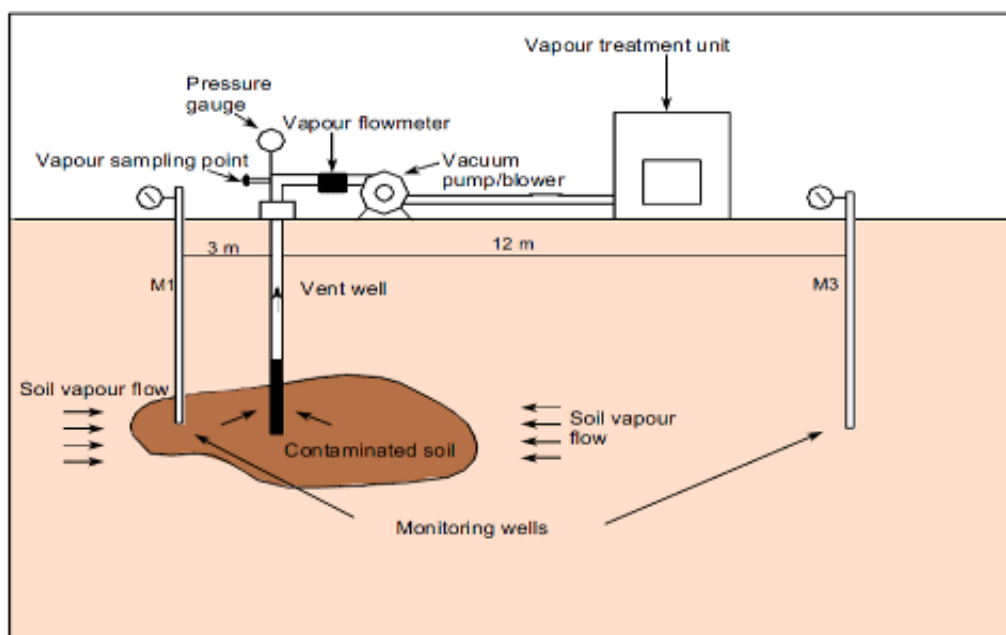


圖 3-1 生物通氣系統示意圖

3.4 Mann Kendall Test 趨勢判斷

由於實驗數據眾多需藉由統計分析輔助判斷降解趨勢，Mann-Kendall Test 能夠針對時間序列數據資料做趨勢檢定，並且可以改善資料缺值和低於偵測值的問題，是目前最常被使用的趨勢判斷統計方式。當 $\alpha = 5\%$ 、 $Z_{\alpha/2} = 1.96$ 時，若 Z_{well} 小於 -1.96 將判斷為有降解趨勢， Z_{well} 大於 1.96 則判斷為趨勢成長， Z_{well} 未超出 ± 1.96 範圍則判斷無明顯趨勢【許，2009】。

3.5 土壤微生物呼吸作用

土壤微生物呼吸是土壤中產生二氧化碳的過程，牽涉到土壤中動物呼吸、植物根呼吸、土壤微生物呼吸與有機質的化學氧化作用等【Rastogi *et al.*, 2002】。然而污染場址中植物及動物不易存活，土壤微生物為了降解有機污染物而產生的呼吸作用，也就佔了土壤呼吸總量的大部分，因此也可將其視為微生物活性的一種測試方法。而測定土壤微生物活性的一項指標為呼吸速率，此一指標會受到微生物所處環境而有變化，包含土壤溫度、土壤 pH 值、含水率、污染物濃度及土壤養分含量等因素的影響。Bossert 發現碳氫化合物的代謝速率會隨溫度增加而增加，最適溫度為 30~40°C，超過此溫度則其毒性將會傷害細胞膜。因此建立一個穩定的操作環境，可有效觀察到微生物在固定時程下呼吸速率的變化【Bossert, 1984】。

呼吸測試的目的在確定目標區域是否能提供空氣刺激好氧微生物降解，及好氧微生物降解氧氣的消耗速度【Dominguez *et al.*, 2012】。若假設以污染物為唯一碳源時，在相同的微生物生長條件下，累積攝氧量與污染物的降解將有成正比的關係。1 克碳氫化合物轉換變成 1 生物質量需要 150 mg 的氮和 30 mg 的磷，但若降解速率較快時，則所需碳的比例將增加【Rosenberg and Ron, 1996; Liebeg and Cutright, 1999】

微生物在有氧碳氫化合物的降解過程中，不斷消耗氧氣，產生二氧化碳。因此，可透過土壤氣體中氧氣濃度和二氧化碳含量的變化來了解土壤中微生物的活性。因此以受總石油碳氫化合物污染的土壤進行定量呼吸測量測定，先將土壤充分曝氣使氧氣濃度提升，再將該曝氣區域密封並觀察其氧氣濃度與二氧化碳濃度變化，以濃度變化推估微生物活性。在進行生物通氣法時也可藉由二氧化碳濃度變化了解微生物降解情況(Hinchee and Ong, 1992)。

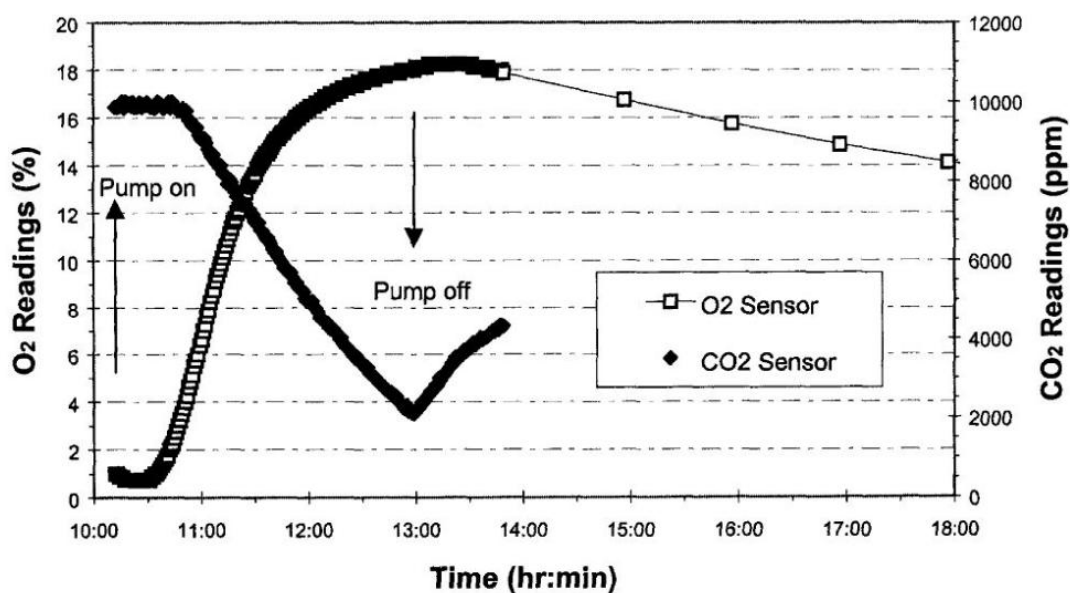


圖 3-2 現地呼吸測試氣體濃度變化圖【Hinchee and Ong, 1992】

3.6 具柴油降解能力之菌種

在受污染場址進行生物通氣法整治時，土壤中原有微生物雖能適應其污染環境，但有時仍無法藉由供給充足的通氣及適量營養鹽環境下即可大量降解污染物，故可透過植入具有降解能力之菌種來輔助污染場址中的原生菌【Mariano *et al.*, 2008; Colla *et al.*, 2013; Szulc *et al.*, 2014; Cyplik *et al.*, 2011】，以下為污染場址中常見且具柴油降解能力之菌種：

Pseudomonas putida 為一種熒光假單胞菌，具有惡臭，研究指出在現場進行 365 天研究測試，以 4 種(自然衰減法、添加鼠李醣脂、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas putida* 和添加鼠李醣脂)方式進行整治，結果顯示此菌種有助於提昇柴油生物降解的效率，而僅添加鼠李醣脂沒有顯著影響降解效果。

Achromobacter xylosoxidans 為一種木糖氧化無色桿菌，可藉由適當營養鹽添加來對微生物種群促進活性的作用。以生物刺激和生物強化的連續處理對 TPH 降解有良好成效。

Bacillus cereus 為一種蠟樣芽胞桿菌，可從市面上購買、未受污染土壤中獲得、或受 TPH 污染之地下水中以及污染整治場址中接種。以土壤中之原生菌的降解加油站柴油污染實驗中顯示，*Bacillus cereus* 能夠在 48 天降解已風化柴油，即使是從一個未受污染的土壤中接種的 *Bacillus cereus* 菌。

3.7 生物泥漿法

生物泥漿法可用於處理高濃度溶解性之有機污染物，是一種固液混合系統。主要是以添加大量水分使欲處理之污泥或土壤呈泥漿狀態，並利用混合攪拌幫助自然微生物（Resident microorganisms）與污染物在反應槽中接觸，並以曝氣、添加無機營養鹽、界面活性劑、控制 pH 及溫度等方式進一步促進微生物對有機污染物的分解效果【環保署，2009】。生物泥漿的原理為有機污染物從固相傳輸到液相中，並於液相中被微生物所分解利用後，固液相中有機物的分配重新達到平衡，此反應會不斷進行。然而，泥漿法的限制因子之一是有機物在固液相間的質傳速率，可藉由攪拌方式改善，另一個限制因子則為液相中有機物之生物降解，操作上會以曝氣、營養鹽添加及 pH 的調整來增加微生物的活性，通常泥漿法中土壤之重量百分比約 10~30%【車，1999】。

3.8 氣泡式呼吸儀

氣泡式呼吸儀是一微量氣體偵測設備，可根據使用需求進行好氧及厭氧之氣量監測，其好氧模式下最小氣泡偵測量為 0.08 mg/bubble，最大偵測速率為 600 mg/hr。本研究相關組件分為氣泡計數元件、呼吸儀介面組、數據接受處理機、恆溫水域震盪器及反應瓶組，如圖 3-3 至圖 3-5 所示。氣泡式呼吸儀原理是利用一機制將氣體轉換為相同體積大小的氣泡，並以一控制電路計數紀錄，藉由固定時間內通過氣泡偵測器之氣泡，可換算成氣體之流量或體積。上述的機制是指，在一裝有某液體之管件中，利用該液體某定量水頭壓力來控制氣體，使氣體產生相同體積大小的單一氣泡，而通過管件之某處【江，2001】。

呼吸儀在進行好氧試驗時，反應瓶內因為生物分解有機物時產生的二氧化碳可被 KOH 所吸收，瓶內即產生負壓，壓差累積至一個氣泡時，氣體會通過呼吸儀的氣泡產生器，形成體積相同的氣泡，經由通過紅外線氣泡計數器後，再由呼吸儀介面組及電腦進行數據接收與處理，並繪製出攝氧圖【陳，2003】。在某種情況下，特別是測試污泥之好氣消化時，應特別避免反應受限於供氧之質傳限制（Mass Transfer），例如可藉由加強攪拌或避免使用太濃之污泥。由於氣泡式呼吸儀藉由氣泡偵測器，測定微生物之產氣量，但反應瓶攪拌的氧傳限制與壓力及溫度的變化則會導致誤差，這些缺失必須倚靠高靈

敏度的逆止閥或控制組來避免【江，2001】。

表 3-2 氣泡式呼吸儀 (Bubble Respirometer) 資料

儀器名稱	氣泡式呼吸儀 (Bubble Respirometer)	
廠商資料	Challenge Environmental System, Inc. (CES)	
操作效能	AER-200 (好氧)	ANR-100 (厭氧)
最小偵測氣泡量 (IDL)	<0.08 mg/bubble	<0.10 mL/bubble
最大偵測速率	600 mg/hr	1500 mL/hr
校正精度	<1% Cv	<2% Cv
測量精度	<3% Cv	<3% Cv

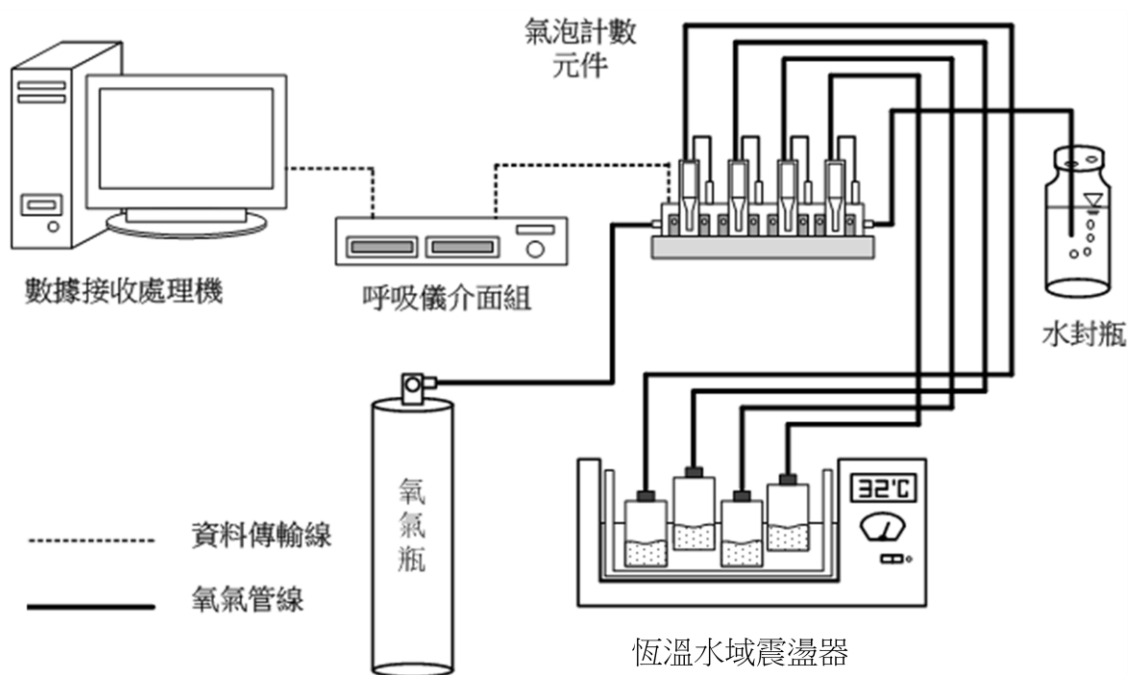




圖 3-4 氣泡式呼吸儀實景照片

表 3-3 往復式震盪恆溫水域槽 WBS-L 資料

儀器名稱	往復式震盪恆溫水域槽WBS-L
轉速	0~400 (rpm)
溫度控制	0 °C~60 °C
電壓電流	220 V/10 A



圖 3-5 往復式震盪恆溫水域

3.9 國內外相關執行情形

文獻研究指出利用 250 mL 生物分解瓶 (Biometer flask) 進行呼吸試驗，如圖 3-6 所示。以柴油配置 0%、1%、5%、10%、20%、50% (w/w) 污染土壤在 pH 7.5、含水率 60%、已添加營養鹽條件下，定期取出 KOH 溶液作酸鹼滴定，以檢測 CO_2 產生量。結果顯示，5%、10% 於 15 天至 50 天後 CO_2 累積釋出量趨勢漸緩，20% 之 CO_2 量則穩定累加，顯示活性較好，而 50% 則因毒性抑制， CO_2 釋出量皆低於 20%，結果如圖 3-7 所示【倪，2011】。

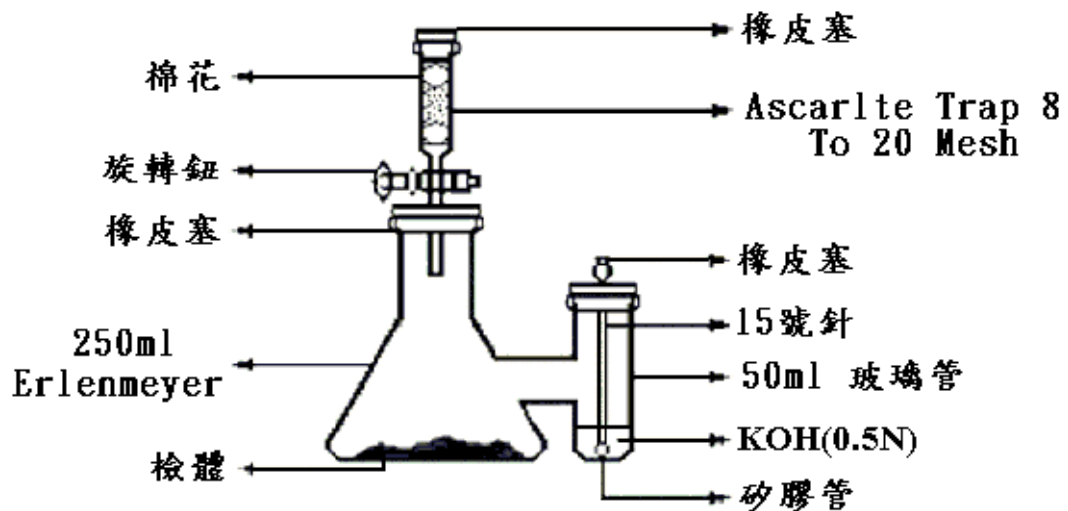


圖 3-6 生物分解瓶 (Biometer flask) 【Bartha and Pramer, 1965】

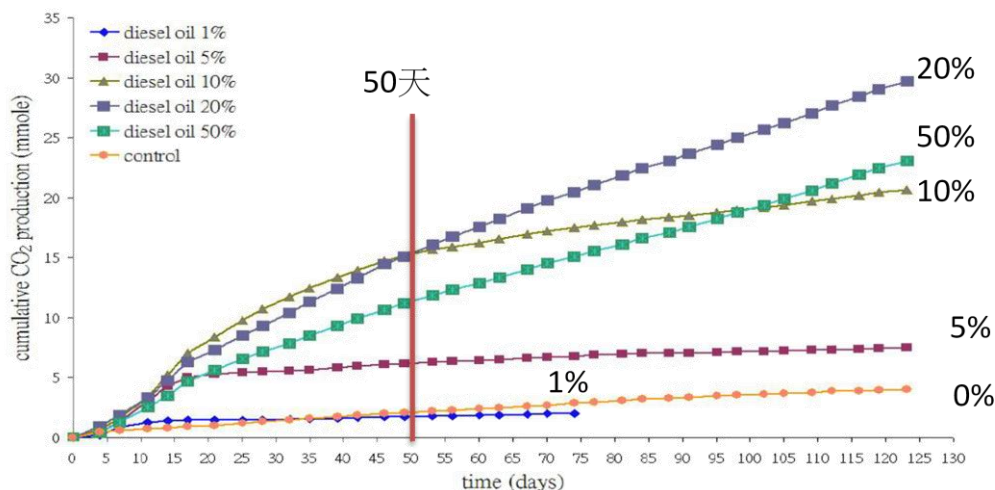


圖 3-7 生物分解瓶呼吸試驗累積攝氧圖【倪，2011】

文獻研究以廢機車機油為微生物生長之主要碳源，來模擬受機油污染土壤之微生物分解狀況。首先將土壤調整為中性後，取土壤乾重 20 g，配置 1%、5%、10%、20%、50% (w/w) 機油濃度污染土壤，並調整含水率為 60%，以生物分解瓶進行 120 天土壤呼吸試驗。結果顯示，在 20% 的濃度下，其二氧化碳產生量呈現較高值，50% 濃度則因初始濃度較高使微生物先受到抑制，待適應期過後才有第二次較為明顯之二氧化碳產生，結果如圖 3-8 所示【劉，2006】。

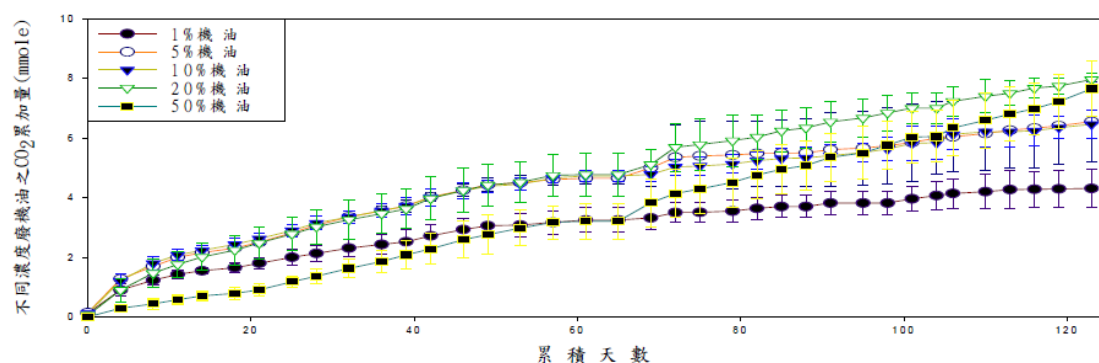


圖 3-8 不同濃度受機油污染土壤之生物呼吸試驗【劉，2006】

文獻研究利用氣泡式呼吸儀監測活性污泥中經馴化的微生物，在進行煉焦廢水硫氰化物毒性試驗時，其活性是否受到抑制。從累積攝氧圖（圖 3-9）中可知，微生物初期並沒有明顯受到毒性的抑制作用，顯示工業廢水中特定的毒性物質，對馴化後的微生物有可能是其基質能量來源，且有較高的毒性忍受度，或不具有毒性效應，因此在初始暴露毒性劑量雖高，但累積攝氧量亦越大【洪，2003】。

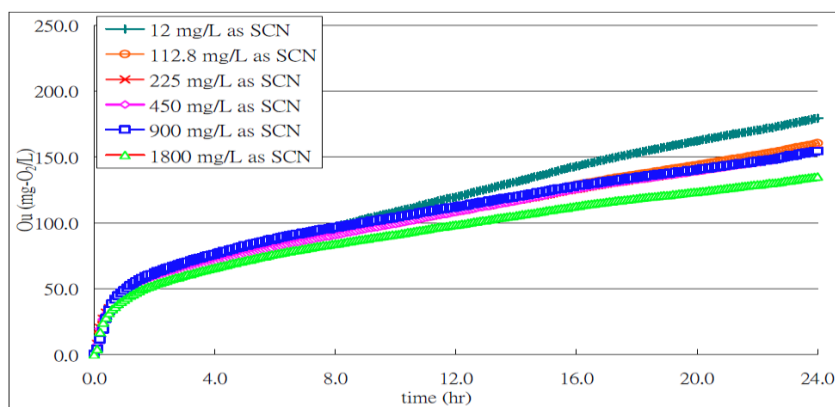


圖 3-9 活性污泥中經馴化的微生物累積攝氧圖【洪，2003】

文獻研究以不同茶濃度（50、100、200、300、500 $\mu\text{g/g-soil}$ ）的污染土，在相同操作環境（土壤 50 g、含水率 60%、兩倍營養鹽、已植菌、無攪拌）下，使用氣泡式呼吸儀進行生物分解攝氧批次試驗。結果如圖 3-10 所示，經過 135 小時後茶濃度 50、100、200 $\mu\text{g/g-soil}$ ，攝氧最高僅達到 16.5 mg-O_2 。由於未對土壤進行攪拌且二氧化碳量產生較少，氣體需在土壤中累積至一定量後，才足以通過土壤表層，於氣相中被 KOH 所吸收，因此攝氧累積圖呈階梯狀上升；300、500 $\mu\text{g/g-soil}$ 則因累積攝氧量約有 45-73 mg-O_2 ，微生物分解作用較為旺盛，持續有二氧化碳被 KOH 溶液所吸收，因此氣泡偵測器易測量到氧氣的供給，而無階梯狀現象【邱，2000】。註：500 $\mu\text{g/g-soil}$ 圖中，藍線及黃線表示植菌組，紫線表示植菌控制組，黑線表示空白組。其餘濃度圖中藍、紫線皆為植菌組，黃線植菌控制組，黑線為空白組。

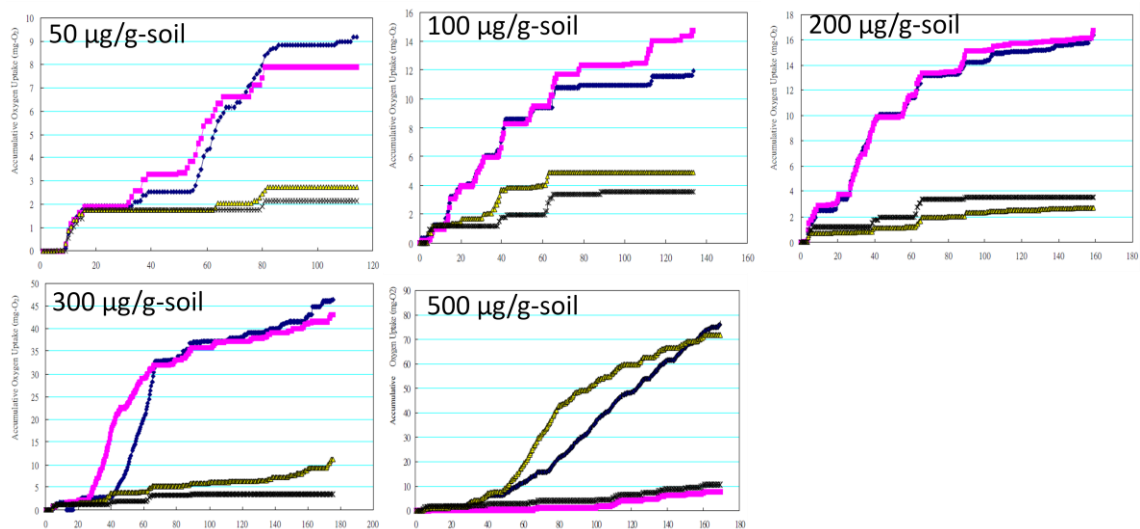


圖 3-10 不同茶濃度之呼吸試驗累積攝氧圖【邱，2000】

文獻研究中指出，以呼吸儀進行呼吸試驗時，於正常操作程序下觀察到系統啟動初期，反應瓶內有異常攝氧狀況產生。故以反應瓶內添加蒸餾水，在無基質、營養鹽、二氧化碳吸收管條件下，進行非生物性攝氧測試。結果顯示，40 分鐘後累積攝氧介於 7.1~8.3 mg/L ，平均為 7.8 mg/L （如圖 3-11）。起始攝氧率介於 24.1~29.7 mg/L-hr ，平均為 27.4 mg/L-hr ，經 40 分鐘後降為 0 mg/L-hr （如圖 3-12）。因此為了避免反應瓶內測試溶液初期溶氧尚未達飽和，導致試驗開始後造成生物性攝氧之誤判，應先將測試溶液經充分供氧及強力攪拌後使溶氧達到飽和，排除非生物攝氧情形【陳，2003】。

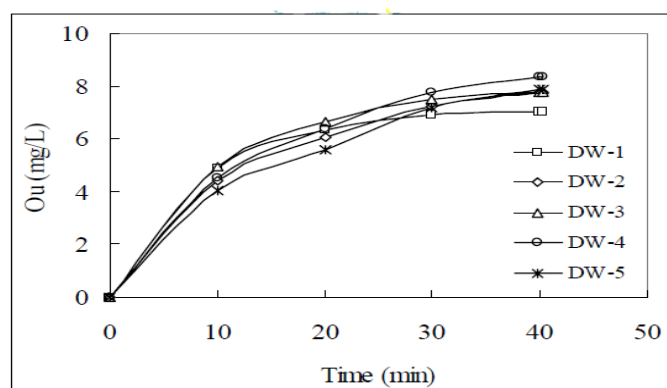


圖 3-11 非生物性攝氧測試之累積攝氧曲線圖【陳，2003】

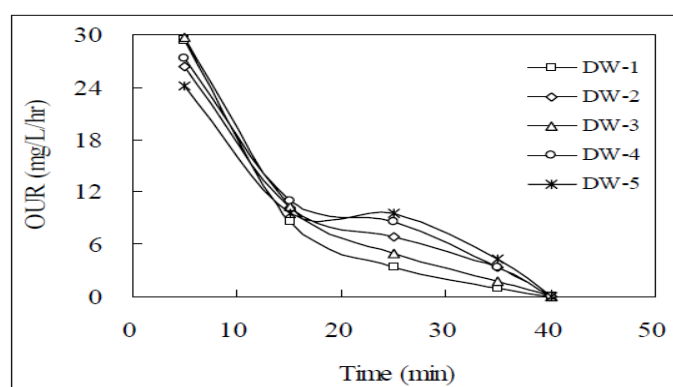


圖 3-12 非生物性攝氧試驗之攝氧率圖【陳，2003】

四、研究方法與過程

4.1 研究架構

研究初期分為兩部份：氣泡式呼吸儀環境建立與實驗室規模土壤生物通氣模場建立，架構圖如圖 4-1 所示。由於文獻中指出無攪拌的土壤在進行微生物呼吸試驗時，表層的土壤未經擾動會顯得較為密實，微生物進行反應所產生之 CO_2 需累積至一定體積後，才足以突破表層而釋出，因此導致氧傳效率的限制，並有階梯狀攝氧情況產生。因此為了提高監測之準確度，將會使用泥漿法來改善此情形，藉由攪拌使攝氧及產氣不受阻礙，並依照文獻中泥漿之重量百分比建議配比，於攪拌基座以適當轉速及不同土水比例進行測試，找尋最佳操作模式，以利氣泡式呼吸儀監測各時間下土壤中微生物累積攝氧量。

第二部份為土壤生物通氣模場環境建立，本研究自台中太平土資場採集之試驗土壤先進行土壤質地分析、土壤元素分析、總菌落數分析與自行配置之污染土壤濃度分析。完成高柴油污染之土壤模場背景調查後，首先進行密封，待氧氣濃度降低後始能進行生物通氣法之通氣強度試驗、營養鹽添加試驗，並採集土壤同時以氣泡式呼吸儀進行 5 天呼吸試驗，其數據作為探討生物通氣法整治後，高柴油污染濃度下土壤微生物活性及其對柴油濃度降解之貢獻、評估生物通氣法成效之依據。

4.2 氣泡式呼吸儀環境建立

氣泡式呼吸儀系統的重點皆圍繞在呼吸儀本身對氣體偵測的敏感程度，因此在進行試驗前需對儀器進行校正。一般會使用電解瓶校正法或氣體置換校正法，其原理為藉由給予定量氣體或液體，使等量體積的氣體通過氣泡產生器與紅外線偵測器，可檢測所通過之氣體總量是否正確、偵測器有無發揮計數紀錄作用並將數據傳送至系統軟體中，若各項功能皆正常即完成校正。

第二步需建立系統的操作環境，由於使用泥漿法進行土壤呼吸批次試驗，因此在試驗中以往復式震盪水域槽作為攪拌基座，250 mL 反應瓶為土壤樣品盛裝容器，進行泥漿法之土水比例參配及攪拌強度測試。由於文獻建議碳氫化合物的代謝速率應維持在 $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 較佳，故水溫設置在較室溫微高之 32°C 恆溫，減低日夜溫差變化幅度。反應瓶內根據土壤元素分析結果，添加

足量的營養鹽，補充至 C：N：P 比為 100：10：1，pH 調為 7~8 間，營造適合微生物生長之環境，藉以統計每批次間微生物攝氧之數據變化。

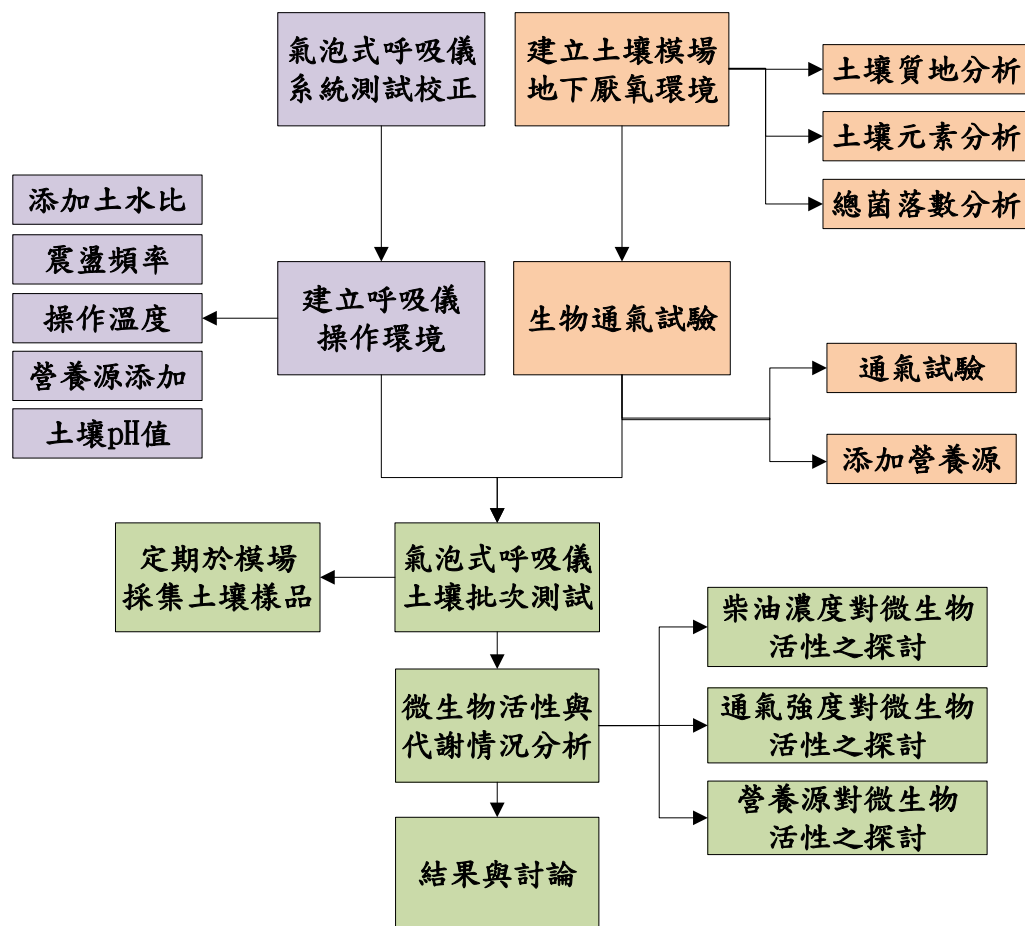


圖 4-1 本研究架構圖

4.3 土壤生物通氣模場建立

本計畫之土壤生物通氣模場是為了模擬加油站柴油類儲油槽因長年埋設於地底中，管線或其本身受到腐蝕與破損等原因造成柴油洩漏，導致周圍土壤受到污染之情形。為此將設置實驗室規模厭氧環境的土壤模場，進行以生物通氣法灌注空氣後，其土壤中污染濃度之變化與微生物活性探討。土壤來源取自台中市太平地區土資源回收場，質地分析結果（圖 4-2）可知，砂粒 68%、粉粒 18%、黏粒 14%，屬於砂質壤土，通氣度較佳。模場製作時，在桶中心置入管篩，免去未來需重新開挖土壤才能置入通氣管件，有破壞厭氧環境之疑慮。土壤及柴油以逐層方式添加，管篩周圍鋪設 1-2 mm 石英砂，避免土壤阻塞篩縫且仍能保有良好通氣性，最後以無污染土壤覆蓋污染土層並

加蓋密封，即完成模場之製作。模場地點設置於朝陽科技大學校區內，共完成五桶柴油污染濃度配置皆為 20,000 mg/kg 土壤模場建置，總量約 700 kg，模場設計如圖 4-3，完成圖如 4-4 所示。

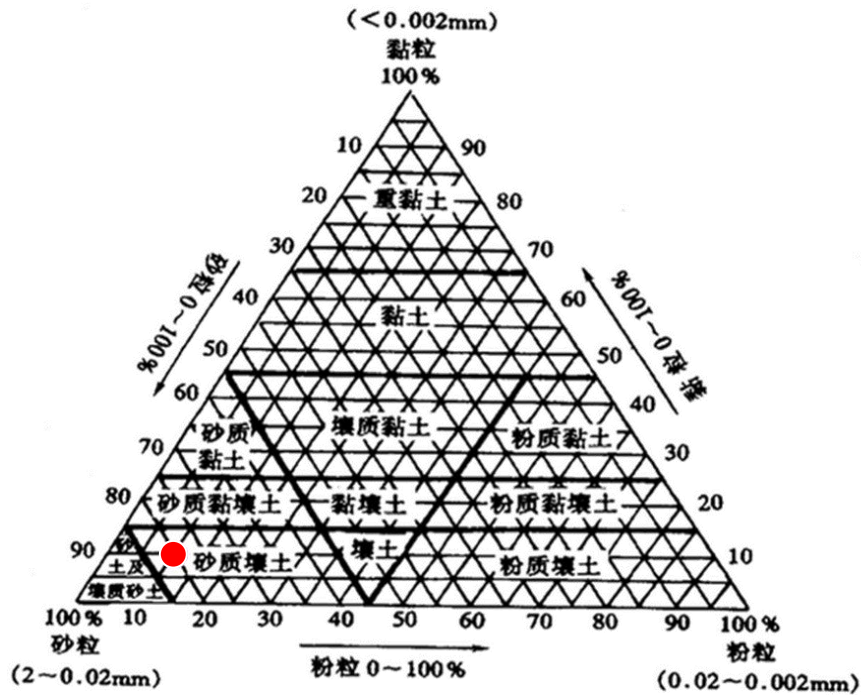


圖 4-2 土壤質地分析圖

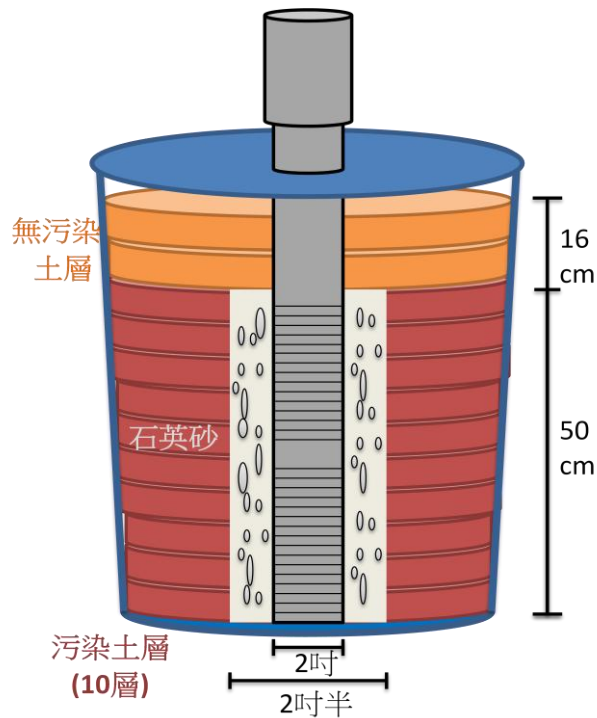


圖 4-3 土壤生物通氣模場設計圖



圖 4-4 土壤生物通氣模場實景圖

在本計畫期中，模場以生物通氣設備進行每三個月一批次的生物通氣整治，分為通氣強度與添加營養鹽兩大試驗。並於每批次中以監測土壤微生物呼吸作用為目的，探討高柴油濃度、通氣強度與營養鹽添加等條件之改變對微生物活性的影響，其生物通氣系統如圖 4-5 所示。通氣強度試驗以可調式電風扇設置人造風場，讓生物通氣設備由喇叭狀進風口收集空氣，當氣體進入三通接頭後，會碰觸到管徑較小的尾管，因此氣體大多轉向朝中心通氣管下方沈降，少部份則通過尾管排出，使氣體流動保持順暢。進入通氣管後即有一逆止閥設計，為軟性塑膠薄片，可於氣體通過時如簾幕般微微吹起，形成氣流通路，無氣體流過時自然垂下密閉，防止土壤模場內柴油類揮發性氣體溢散。風速風量採樣口則為方便測量通過之氣體流量、流速而設置，平時以管蓋封閉。土壤模場採樣則無需將通氣設備卸下，可開啟模場封蓋後以採樣器取出定量特定深度之污染土壤，再於實驗室中進行 GC/FID 柴油濃度分析與土壤微生物呼吸試驗。

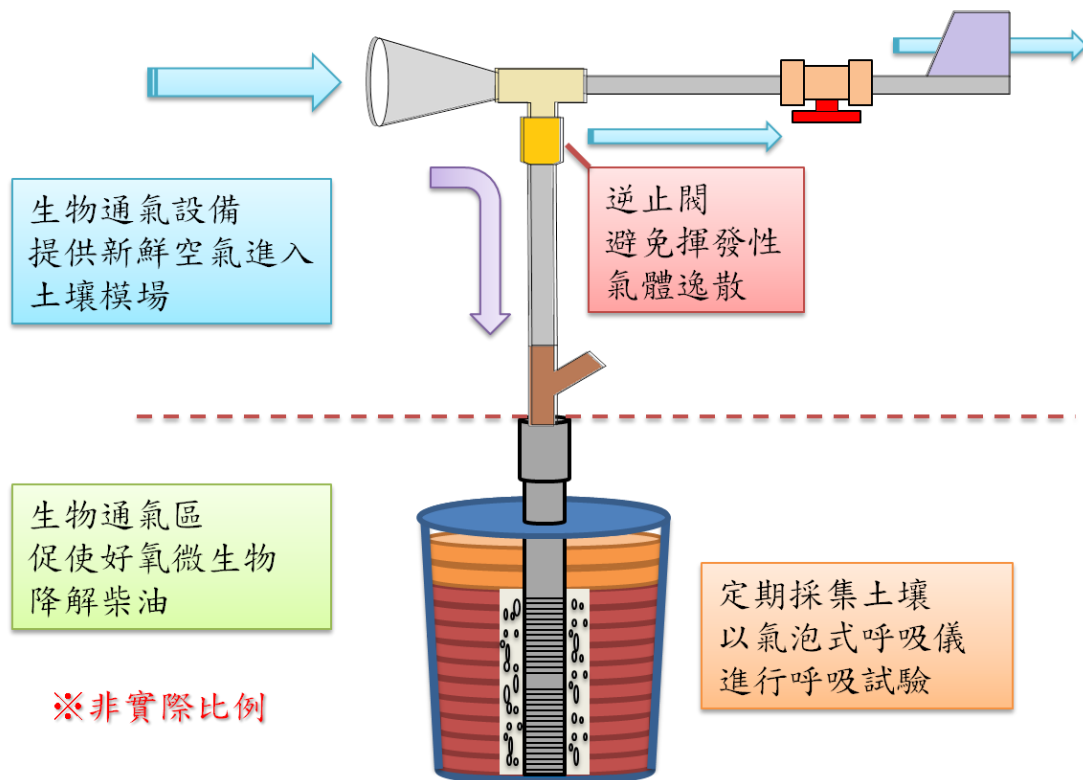


圖 4-5 生物通氣系統示意圖

4.4 研究步驟說明

以下就實際操作方式，說明各步驟之功能性及目的。

1. 啟動呼吸儀介面軟體，利用一塑膠針筒對氣泡產生器注入定量空氣使氣泡產生，並檢查紅外線偵測器能確實計數氣泡。開啟氧氣鋼瓶並設定壓力為 2.2-2.5 psi，確認呼吸儀各管線皆有氣體通過後，於軟體中進行反應瓶命名、運行時間及攝氧上限設定、資料紀錄間隔長度、畫面顯示模式等參數設定，完成呼吸儀軟體事前準備。而在適當的操作壓力下，可使以壓差產生氣泡之機制的呼吸儀更易於監測微生物呼吸作用。一般呼吸儀校正為一年一次，於第一次使用前進行校正即可，後續可於每批次土壤模場試驗或每季進行手動校正。

2. 此步驟將分析土壤各階段污染物濃度並立即進行土壤呼吸測試，進行數據收集。故每週於各模場中取出適量土樣，一部份進行微生物呼吸試驗，另一部份則以 GC/FID 分析污染濃度，作為土壤污染之背景對照。在呼吸試驗前先去土中小石塊、植物根及雜物後，依序取出 15 g 柴油污染土壤置入 250

mL 反應瓶內，共計五支，第六支僅添加去離子水，作為背景耗氧測試。依文獻中泥漿法建議之重量百分比配置以土水比例為 1:3 之用量（添加去離子水 45 mL），以手搖方式使瓶內泥漿混合均勻後，依照土壤中元素分析碳、氮、磷的比例，添加由小善存及尿素等配製之適量營養鹽，並將泥漿 pH 值調整為 6.5-7.5 之間。最後將已添加 3 mL 濃度為 6N 之 KOH 溶液的吸收管置入瓶中，並旋緊含有墊片之瓶蓋後，即完成土壤樣品批次試驗之準備。

3. 攪拌基座將影響泥漿中微生物呼吸作用在兩相間移動的氧傳限制，故需有適當的攪拌強度。將上一步驟完成的六支反應瓶固定於往復式震盪水槽中，恆溫控制為 32°C，依序將針頭以斜針方式插入瓶蓋墊片，使針頭周圍有較大的阻隔面積且不會因為搖晃導致針頭擴大周圍孔隙而漏氣。確認針頭無阻塞情形即可以轉速 100 rpm 進行漏氣測試及各管線的固定，確保各環節無漏氣產生後，將轉速提高為 130~140 rpm，並隨時注意泥漿有無濺入吸收管內，即可開始 5 天的土壤微生物呼吸試驗。

4. 當 5 天試驗結束後，再次紀錄泥漿 pH 值，並從攝氧曲線中觀察是否有固液相間氧傳限制，導致階梯狀攝氧情形產生。若發生階梯攝氧情形，則需嘗試增加泥漿攪拌之強度或改變管線間壓力，並紀錄發生時間與柴油背景濃度。持續收集每次試驗之攝氧數據，用以了解並探討微生物生長過程中是否有受到限制，評估生物通氣法在柴油污染土壤整治之成效。

4.5 GC/FID 分析方法

柴油濃度測試將使用環檢所公告的土壤中總石油碳氫化合物檢測方法（NIEA S706.61B）與超音波萃取法（NIEA 167.00C）進行檢測。超音波萃取將使用丙酮/正己烷（1:1，v/v）進行萃取並利用 GC/FID 進行濃度分析，觀察柴油污染物各成分之降解情形。

柴油萃取方法如下：

1. 取 5 g 土壤，置入棕色瓶中。
2. 加入約 5 g 無水硫酸鈉去除水份。
3. 加入 25 mL 正己烷與丙酮 1:1（v:v）混和配置萃取液。
4. 使用探針式超音波萃取儀以 75% 功率萃取 6 分鐘。

5. 利用低速離心機將萃取液固液分離。
6. 視樣品濃度進行稀釋。
7. 取萃取液上澄液置入樣品瓶中。
8. 上機，使用 GC/FID 進行分析。

GC/FID 分析條件：

層析管柱：VELOCITY 1 30 m * 0.32 mm ID * 1.00 μ m

載流氣體（N₂）流速：30 mL/min

注射埠溫度：330°C

偵測器溫度：330°C

起始溫度：50°C，持續 5 分鐘

升溫速度：50°C 以每分鐘 10°C 升溫至 330°C

最終溫度：330 °C，持續 7 分鐘

氫氣流速：30 mL/min

空氣流速：300 mL/min

注射方式：split（2:1）

4.6 總菌落數檢測方法

總菌落數可用來評估土壤進行生物通氣法整治前後菌落數量變化，了解在柴油降解過程中，微生物之生長情形。檢測方法參考環檢所公告的水中總菌落數檢測-塗抹法（NIEA E203.55B），取 1 g 土樣放置於 100 mL 無菌稀釋水中，經充分震盪使微生物懸浮於液體中，再以無菌吸管稀釋成各種比例，分別取定量塗抹於固體培養基，倒置於 35 ± 1°C 恆溫箱內培養 48 ± 3 小時。以含 30 至 300 個菌落數之同一稀釋倍數的兩個培養皿計算，再由稀釋比例回推總菌落數。

$$\text{總菌落數 (菌落數 (CFU)/mL))} = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}} = \frac{X + Y}{(0.2/D) + (0.2/D)}$$

D：總菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度。

X、Y：為 D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數。

表 4-1 固體培養基配置材料

胰化蛋白腺葡萄糖培養基 (Tryptone glucose extract agar, TGE)	
葡萄糖 Glucose	1 g
Beef extract	3 g
Agar	15.0 g
試劑水	1 L

培養基以 121°C 滅菌 30 分鐘後，冷卻至約 50°C，於無菌操作台倒入無菌培養皿中，開啟紫外光 15 分鐘使其殺菌並於室溫下凝固後備用。

表 4-2 柴油降解培養基配置材料

柴油降解培養基 (modified from Gallego <i>et al.</i> , 2001)		添加順序
NH ₄ NO ₃	1.3 g	1
KH ₂ PO ₄	5.0 g	2
K ₂ HPO ₄	5.0 g	3
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.2 g	4
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g	5
Agar powder	15 g	6
試劑水	1 L	
Diesel (柴油)	2 g/L	7

藥品依照順序添加，前項藥品俟完全溶解後才可加入下一項藥品，培養基以 121°C 滅菌 30 分鐘後，冷卻至約 50°C，於無菌操作台倒入無菌培養皿中，開啟紫外光 15 分鐘使其殺菌並於室溫下凝固後備用。此培養基需於 35 ± 1°C 恆溫箱內培養 120 培養並小時方可計數。

4.7 呼吸儀校正方法

呼吸儀系統中的氣泡產生器是利用一穩定性質的礦物油，在連通管中藉由注入氣體使雙邊液面產生壓差，當壓差累積至一個氣泡體積則會產生氣泡，由紅外線計數器偵測有氣泡通過並紀錄。由於每個氣泡產生器之孔徑規格與礦物油注入量不完全相同，故可使用美國 CES 公司所提供之電解瓶校正法 (Electrolysis method) 或實驗室可自行設計液體置換法 (Liquid displacement method)，進行元件校正【陳，2003】，校正頻率約一年 1 次，示意圖可見圖 4-6。

1. 電解瓶校正法

電解瓶首先置入 100 mL 濃度為 1N 的 H_2SO_4 溶液，再將電解速率設在低率狀態，供氧速率為 $0.5 \text{ mg-O}_2/\text{min}$ 。此校正法是利用穩定電壓，將水電解成氧氣與氫氣，將氧氣通入氣泡產生器，並於設定時間內紀錄氣泡數，即可進行校正。電解產生之氫氣則由電解瓶溢散口自然排出。

2. 液體置換法

其概念為在等速的流速下，固定時間內注入液體於水封瓶內，即可將等量空氣排出。水封瓶排氣口則接管於氣泡產生器，紀錄產生之氣泡數來進行校正。

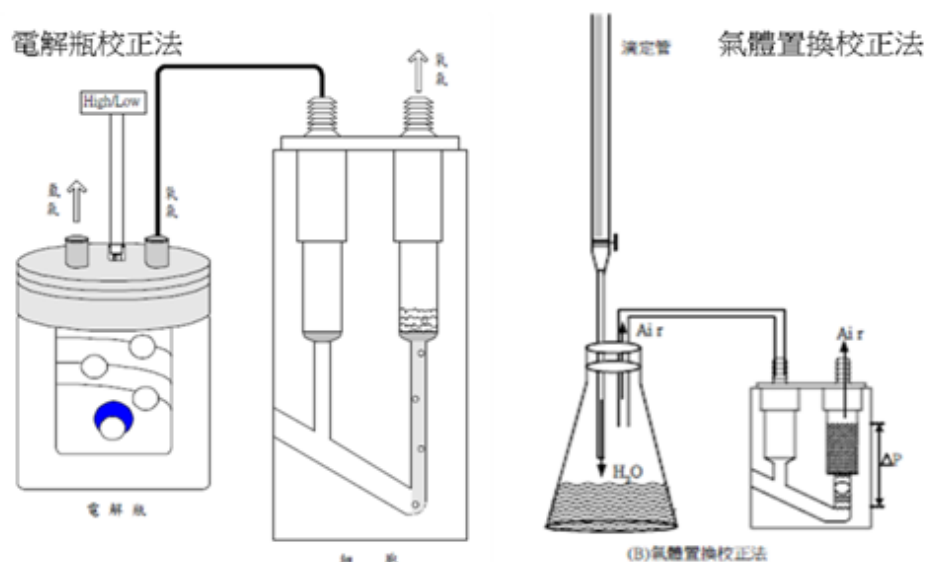


圖 4-6 氣泡式呼吸儀校正法示意圖【陳，2003】

4.8 微生物族群研究

為瞭解污染土壤中微生物生長情況，本計畫對污染土壤進行先期微生物的族群分析、菌種分析並進行 DNA 鑑定了解污染土壤中是否有能夠分解柴油污染的微生物存在，微生物鑑定部分則與中興大學合作分析。目前已有文獻指出 *Acinetobacter*、*Pseudomonas* 等微生物能夠在好氧環境下分解直鏈烷類，研究計畫在污染整治前先進行微生物鑑定，觀察微生物鑑定結果是否有這類微生物的存在，在生物通氣法整治過程中同時進行微生物試驗，包括總菌數計數、大腸桿菌數計數、微生物多樣性分析及微生物 DNA 定序及菌種鑑定。總菌落數分析方式經由前處理後再利用環檢所公告水中總菌落數檢測方法 - 塗抹法 (NIEA E203.55B) 進行分析。大腸桿菌群落菌數計數則經由前處理後再利用環檢所公告水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法 - 酵素呈色濾膜法 (NIEA E237.52B) 進行分析。微生物多樣性分析包括 PCR-DGGE 分析，則利用商業套組試劑 UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio, USA) 萃取得環境樣本之核酸，再以 PCR-DGGE 分析樣本微生物族群。而微生物 DNA 定序及菌種鑑定乃將 PCR-DGGE 分析之樣本，進行 DNA 回收及純化，待確認 DNA 成功回收並純化後，將樣本送請生物科技公司進行 DNA 定序分析，當成功獲得 DNA 定序分析後，再以 NCBI 資料庫進行微生物菌種比對。

在土壤受到污染，尤其是有機化合物之污染時，有機污染物在土壤環境中的行為，受到土壤微生物所影響。特別是當土壤微生物族群構成一個生化上的複雜系統，而有能力製造獨特的酵素，能分解大多數之有機污染物。目前各項研究中有許多可以降解碳氫化合物的菌種，已被分離出來。這些被分離出的微生物中，較常見的菌屬有 *Achromobacter*、*Acinetobacter*、*Alcaligenes*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Baeneckea*、*Corynebacterium*、*Flavobacterium*、*Nocardia*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Xanthomonas* 等，並可看到有許多種菌屬在受油品污染的水體中與土中都出現，如 *Achromobacter*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Nocardia*、*Pseudomonas* 等【曾，2005】。

可降解直鏈烷類的菌屬好氧類的有 *Acinetobacter*、*Pseudomonas*；厭氧類的有 *Pseudomonas*；支鏈烷類有 *Corynebacterium*、*Brevibacterium*、*Rhodococcus*、*Mycobacterium* 等；環烷類有 *Arthrobacter*、*Flavobacterium*、*Mycobacterium*、*Nocardia*、*Pseudomonas*、*Rhodococcus*、*Xanthomonas*；降解芳香烴族碳氫化合物的菌屬有 *Acinetobacter*、*Bacillus*、*Corynebacterium*、*Desulfovibrio*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas*。學者 Gibson 也提到在大部分研究中，作為降解

芳香碳氫化合物的菌種有 *Pseudomonas putida* 及一些 *Beijerinckia*、*Nocardia* 等菌屬。降解 PAHs 的菌屬有 *Alcaligenes*、*Beijerinckia*、*Pseudomonas*、*Rhodococcus*；可降解含氮硫氧樹酯類的菌屬有 *Brevibacterium*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Rhodococcus* 等。在這些石油化合物中皆有 *Pseudomonas*、*Rhodococcus* 等菌屬出現，所以在整體降解上這些菌屬所佔的比例常出現較多的情形【Gibson, 1971】。

4.9 營養鹽添加對微生物生長狀況分析

微生物生存所需的營養鹽，氮與磷的比例則需保持在生物量：氮：磷為 100：10：1 的比例，除氮磷外，微量元素如 K、Ca、Mg、Fe、Na、CO、Zn、Mo、Cu、Mn 等皆是微生物生長必需之微量元素。而此實驗將依微生物分析結果調整氮磷比例，並以柴油為碳源、尿素提供氮源、小善存溶液供給微量元素，觀察污染土壤中微生物生長情形與降解污染物狀況，嘗試最佳添加比例。文獻指出土壤 pH 值維持在 7 至 8 之間最適合微生物生存，因此需調查土壤鹼度成份與瞭解氧氣攝取量對微生物的生長影響【Dominguez *et al.*, 2012】。藉著實驗也能瞭解經 TPHs 污染的土壤 pH 變化，以及調整 pH 值對微生物降解影響，模擬整治場址受其他污染源導致 pH 改變，使微生物降解能力改變之差異。

4.10 生物通氣系統試驗方法

本計畫採用生物通氣土壤模場進行實場污染區的環境模擬，藉由改變模場的進氣風量、植種具柴油降解能力微生物、添加營養鹽等操作參數，以評估風力驅動生物通氣設備對柴油污染土壤的整治成效。在試驗第一階段，首先得了解該通氣設備是否能在無額外加壓的限制下，順利將外界含氧空氣注入土壤層中，以營造通氣效果。此階段將初步分為高風速 (3.2 m/s)、低風速 (m/s) 試驗條件，並使用氣體偵測器深入設備的風速採樣口，量測管內風速及氧氣濃度，另一方面也由中央通氣管向外選定不同距離的氧氣濃度採樣點，確保了解土壤層是否有良好通氣條件，以利後續相關試驗進行。

第二階段將確認具柴油降解能力微生物是否能存活於高濃度柴油污染土壤環境，故此階段為求謹慎將先於實驗室進行反應槽微生物降解柴油試驗，

反應槽規模為直徑 14 cm、高度 7 cm 圓柱容器，組別分為單菌組及複合菌種組，柴油濃度與土壤模場相同，皆約為 20,000 mg/kg。反應槽採用每日翻拌方式為土壤提供足量氧氣，且能提高微生物與污染物在槽中的接觸機會，更大幅縮短觀測柴油濃度變化趨勢所需時間。經由實驗室反應槽試驗的結果，再挑選可存活的柴油降解菌，投入土壤模場中以生物通氣法進行後續試驗。

第三階段將添加自行配置的營養鹽，使土壤中 C: N: P 比例符合 100: 10:1，營造合適的微生物生長條件，同時也評估柴油污染土壤中原生微生物與額外植種的柴油降解菌，在營養鹽添加前、後柴油的濃度變化趨勢。在此階段考量未來進行實場操作時，是否能藉由添加合適營養鹽即可有效使原生微生物降解柴油，而無須擔心因為添加柴油降解菌後，影響土壤中原有的微生物生態。

4.11 工作進度甘特圖

年月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
工作項目													
土壤模場設置		※											
設立呼吸試驗 操作環境		※											
土壤微生物 批次呼吸試驗						※					※		
呼吸試驗操作 環境修正						※							
污染物濃度對微 生物活性之探討						※							
通氣強度對微生 物活性之探討						※							
營養鹽添加對微 生物活性之探討											※		
成果報告撰寫												※	
工作進度 百分比 (累積數)	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %	
查核點	期 中	完成呼吸儀操作環境修正並進行土壤微生物呼吸試驗 進行柴油濃度與通氣強度對微生物活性之初步探討。											
	期 末	進行柴油濃度、通氣強度及營養鹽添加對微生物活性 之影響探討。 撰寫成果報告書。											

五、結果與討論

5.1 土壤模場背景調查

土壤來源取自台中太平土資源回收場，無柴油及其他油品污染情形，模場背景資料如表 5-1 所示。土壤質地分析結果，砂粒 68%、粉粒 18%、黏粒 14%，屬於砂質壤土，相較於粉質及黏質土壤，砂質土有較好的通氣狀況，適合本計畫進行生物通氣法整治，在模場完成建置後亦採集其樣品進行柴油濃度及元素分析，從結果得知，土壤中柴油濃度約 20,000 mg/kg，碳含量佔 2.14%，氮含量及磷含量分別為 0.03%與 0.002%，在後續進行營養鹽添加試驗前，模場將維持目前的 C：N：P，約為 1000：10：1。表 5-2 是 5 組土壤模場密閉 1 個月後的氣體偵測結果，從表中可知各模場內氧氣量已大幅減少（外界含氧量約為 20.9%），顯示各模場中原生的好氧微生物逐漸消耗模場內僅存的空氣，故二氧化碳濃度開始上升。然而氣體偵測過程中需將氣體偵測器伸入採樣口內，不免會有外界氧氣滲入模場內，惟採樣人員需特別注意及避免。

表 5-1 土壤模場背景資料

土壤來源	太平土資源回收場		
質地分析 (砂質壤土)	砂粒 68%	粉粒 18%	黏粒 14%
土壤元素分析	C：2.14%	N：0.03%	P：0.002%
土壤 pH 值	7.95		
土壤密度	1.4~1.5 g/cm ³		
添加油品	中油公司 – 柴油		
污染濃度	20,000 mg/kg		
實驗組別	5 組 (未通氣組×1、通氣組×4)		

表 5-2 土壤模場密閉 1 個月後氣體偵測數據

	模場 1	模場 2	模場 3	模場 4	模場 5
氧氣 (%)	8.9	9.0	11.3	12.1	13.3
二氧化碳 (%)	6.8	6.8	5.4	5.0	4.6

5.2 呼吸試驗之操作環境建立

呼吸試驗操作參數分為以下三部份：通氣壓力、水域溫度及震盪轉速。在本研究中，通氣壓力設為 2.2~2.5 psi，其目的為確保氧氣供給路徑皆由氧氣鋼瓶輸出，並以水封瓶阻擋外界氣體進入，其水封瓶每秒產生 3-5 顆氣泡即可。

文獻建議碳氫化合物降解最適合溫度為 30°C 至 40°C 間，超過此溫度恐會對微生物細胞產生毒性。但恆溫水域在實驗過程中無法完全覆蓋反應瓶，故日夜溫差恐會影響反應瓶內氣壓變化，因此本研究將恆溫水域控制在 32°C，其溫度較室溫高一點，在提高微生物反應效率的前提下，減少溫差對實驗結果之影響。

攪拌基座之震盪轉速直接影響反應瓶內泥漿攪拌幅度，震盪強度越高可帶動沉積於泥漿底部之顆粒，亦可提高微生物在泥漿中與污染物接觸機會，而進行微生物呼吸試驗監測過程中，也較不易出現階梯式攝氧情形。但需注意震盪過程中泥漿受慣性作用影響會沿著瓶壁濺起，其高度若過於接近二氧化碳吸收管恐會噴灑於管內，造成泥漿中所含微生物遭遇 KOH 強鹼而死亡。故經攪拌強度測試後，泥漿可獲得適當攪拌且不會濺入二氧化碳吸收管內之合適震盪轉速約 130~140 rpm 間。

5.3 呼吸試驗之營養鹽添加試驗

1. 試驗之氮源補充

根據土壤中元素分析結果得知，C 含量視為以柴油提供，而土壤中 N 含量僅 0.03%。若想達成 C : N : P 比為 100 : 10 : 1 之養分條件，需進行 N 源與 P 源補充。而一般 N 肥料有許多種類，在本試驗中則使用含氮量 46.4% 最高的尿素 (NH_2CONH_2) 來進行養分補充。試驗中配製濃度 200 mM 尿素溶液，在盡量避免影響土水比例前提之下，於每組反應瓶內酌量添加 5 mL 為限，供給足量 N 源，促使微生物於 5 天呼吸試驗中使用。

2. 試驗之磷源補充

小善存原是一種兒童食用的綜合維他命產品，但在土壤整治的應用上，由於產品中本身含有部份的磷以及許多微量元素，對於土壤微生物的養分供

給也有一定的助益。故在此階段將探討由小善存配製的營養液，於呼吸試驗環境中，取未通氣土壤 20 g，在土水比為 1:3、震盪轉速 140 rpm、恆溫 32°C 條件下，以全錠 (P 含量 50 mg) 配製濃度 8.06 mM 營養液，進行不同添加量試驗，找出最有效提高微生物攝氧之添加量。從圖 5-1 顯示，未添加小善存營養液的土壤累積攝氧量約為 25 mg-O₂，經添加 10 mL 營養液後，微生物累積攝氧量提昇至 4 倍，添加 20 mL 與 30 mL 營養液之累積攝氧量更高達 8-10 倍之多，故可知小善存營養液在提昇微生物攝氧方面有相當顯著的成效。然而營養液添加量越高，恐會影響土水比例與震盪時泥漿潑濺至裝有 KOH 溶液的 CO₂ 吸接管內，造成泥漿中微生物死亡而對實驗結果產生誤差，因此在兼顧顯著提昇累積攝氧量且酌量添加的考量下，選擇 10 mL 之營養液作為後續實驗之操作條件。

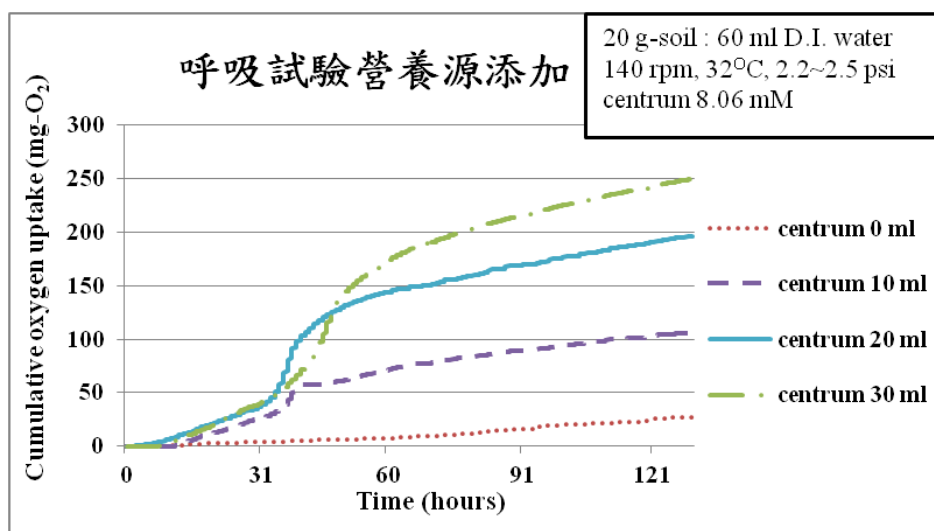


圖 5-1 營養液添加量對微生物呼吸累積攝氧量之影響

5.4 呼吸試驗之 KOH 添加試驗

文獻中指出，微生物進行攝氧所產生之 CO₂ 可藉由高濃度 KOH 溶液進行吸收，故實驗初期先以未通氣土壤於土水比為 1:3、已添加營養鹽條件下，將濃度 6N 之 KOH 分別添加 3、4、5 mL 於 CO₂ 吸接管，置入反應瓶內，並開啟震盪恆溫水域槽以 32°C、140 rpm 搖晃 5 天進行試驗。如圖 5-2 所示，累積攝氧量皆無顯著差異，故添加量 3 mL 足以吸收試驗產生之 CO₂，惟後續實驗若微生物攝氧量急速飆高，超出 KOH 吸收極限時，須酌予提高添加量。

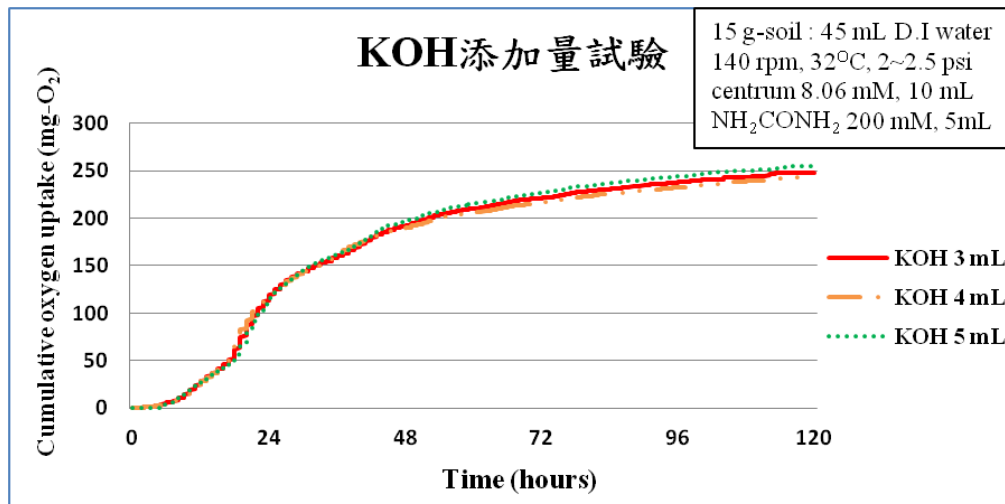


圖 5-2 KOH 添加量對生物呼吸累積攝氧量之影響

5.5 生物通氣系統通氣強度試驗

呼吸試驗操作環境經上述幾個步驟已建立完畢，後續將於生物通氣模場進行土壤樣品採集。在通氣強度試驗過程中，微生物活性及柴油濃度降解固然為首要指標之一，但本研究為了使土壤模場注入充足氧氣，所以自製一批風力驅動式生物通氣設備架設於模場上方，然而通氣成效仍未獲得驗證，故下列試驗過程中，暫不調整土壤模場水分及營養鹽比例，以減少實驗變數。

本研究中模場共分為 5 組，1 組未通氣組及 4 組通氣組，通氣組中又細分出高環境風速 (3.2 m/s) 及低環境風速 (1.6 m/s) 各 2 組。經通氣後 4 組通氣組氧氣濃度約為 20.9%，與外界空氣含量無異，二氧化碳含量則由於氧氣量的注入已完全被稀釋，數據皆為 0%。利用尾翼前控制閥調整管內之進氣量，以下根據生物通氣設備之風速採樣口量測環境風速與管內風速進行組別命名，分別為：環境低風速組-管內風速 0.2 m/s、環境低風速組-管內風速 0.6 m/s、環境高風速組-管內風速 0.4 m/s、環境高風速組-管內風速 0.8 m/s，如表 5-3 所示。

表 5-3 土壤模場通氣後氣體偵測數據與土壤總菌落數

	未通氣組	通氣組 1	通氣組 2	通氣組 3	通氣組 4
環境風速 (m/s)	-	1.6	1.6	3.2	3.2
管內風速 (m/s)	-	0.2	0.6	0.4	0.8
氧氣 (%)	8.9	20.9	20.9	20.8	20.9
二氧化碳 (%)	6.8	0	0	0	0
總菌落數(CFU/g)	4.9×10^5	4.3×10^5	4.9×10^5	4.6×10^5	4.9×10^5

持續觀測 4 週後，不同通氣強度的生物呼吸累積攝氧量結果如圖 5-3 所示。首週除了低環境風速-管內風速 0.2 m/s 組初始累積攝氧量略高，而高環境風速-管內風速 0.4 m/s 組偏低外，其餘組別皆有相似的累積攝氧量。而經由 4 週的數據彙整後發現，在低環境風速的組別，雖然管內有不同的進氣風速，但微生物的累積攝氧量皆無明顯變化；高環境風速-管內風速 0.8 m/s 組也可見到此現象，主要呈現於第 2 週至第 4 週，而高環境風速-管內風速 0.4 m/s 則是所有通氣組中累積攝氧量變化最大的，在與未通氣組進行比較時可發現第 2-3 週有相似的起伏情形，可能的原因為採樣點剛好處在土壤密度較大或孔隙較小之處，導致通入的氧氣較不易傳達；或當週氣溫較低導致吹入之冷空氣使微生物活性降低，致使微生物累積攝氧量下降。第 4 週累積攝氧量大幅上升，可能原因為採樣點處在土壤通氣較佳區域，微生物生長狀況良好，因此進行呼吸試驗時能充分利用營養液在控制環境下有較高的累積攝氧量。

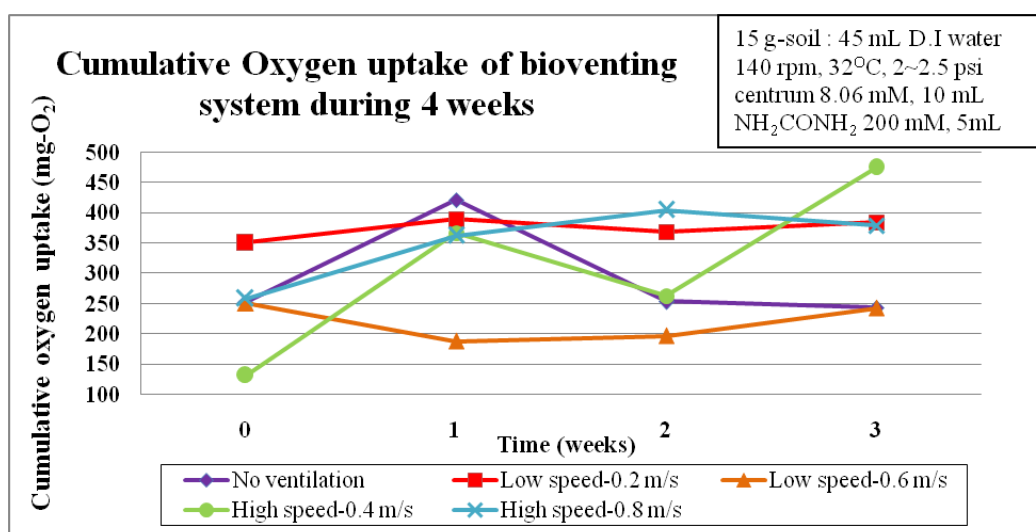


圖 5-3 生物通氣模場不同風速通氣 4 週之生物呼吸累積攝氧量圖

為瞭解微生物在呼吸試驗的攝氧情形，後續將探討各組別在 4 週中各週的微生物累積攝氧量曲線及平均攝氧率，藉以進行活性分析。本計畫中，以攝氧率 (Oxygen uptake rate, OUR) 表示微生物每單位時間所耗用的氧氣量，平均攝氧率則為呼吸試驗時間內攝氧率數據進行算術平均，初步以 8 小時，24 小時，48 小時，72 小時內進行表示，以利進行趨勢觀察。由圖 5-4 至 5-11 中可以發現，各個組別在各週所採集的土壤的累積攝氧量曲線在前 8 小時皆無明顯上升，推斷原因是微生物從土壤轉移至泥漿的環境時，需要一段時間進行適應；而在 48 小時內，可以發現未通氣組別的累積攝氧量曲線較為直順，顯示微生物在此時間內雖有穩定成長，但因為原本並未通氣，因此微生物族群在接受到環境的劇變時，生長較為平緩，無法如通氣組般大量增殖。

觀察其餘通氣組，在 48 小時內累積攝氧曲線皆有明顯起伏，表示通氣後微生物除了能較快適應呼吸試驗的好氧條件外，且有效的利用營養液維持 5 天的反應。72 小時後，各組累積攝氧量曲線趨於平緩，可能為反應瓶內柴油經生物降解後濃度已大幅減少，微生物生長速率也開始降低所致；部份組別於此時亦有穩定累積攝氧量之原因，恐為採樣點土壤所含柴油濃度較高，因此降解柴油反應仍能持續進行，也導致總累積攝氧量較高於其他組別，如第 1 週低環境風速-管內風速 0.2 m/s 及第 4 週高環境風速-管內風速 0.4 m/s 組。

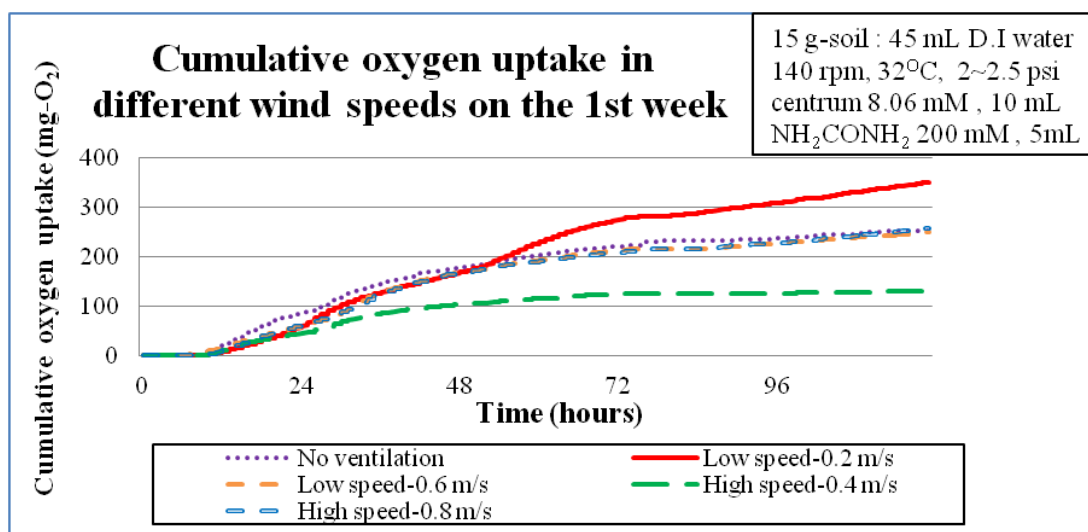


圖 5-4 不同風速下第 1 週土壤微生物呼吸累積攝氧量

系統通氣第 1 週時採集的土壤試驗中，初始 8 小時內微生物無明顯攝氧反應，48 小時內各組別累積攝氧量曲線皆有上升，未通氣組曲線較直，顯示微生物生長狀況穩定；通氣組曲線則有些微上揚，顯示微生物較能適應呼吸試驗所供給之好氧環境。低環境風速-管內風速 0.2 m/s 應為採樣時區域土壤污染物濃度較其他組高，故微生物反應時間較長而有較高之累積攝氧量。

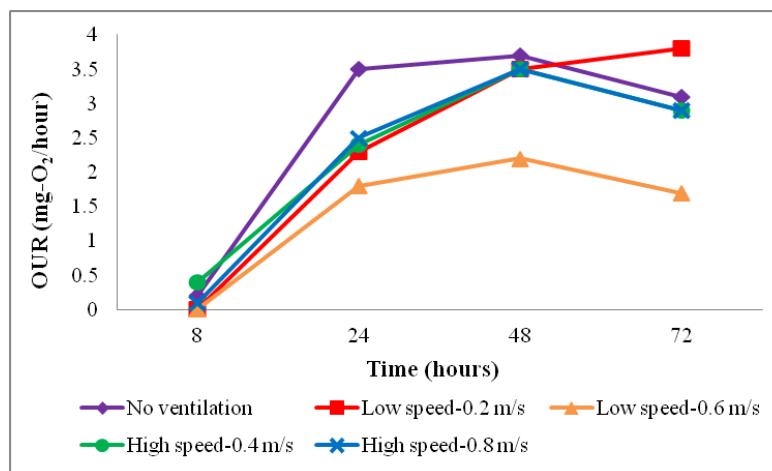


圖 5-5 不同風速下第 1 週土壤微生物呼吸平均攝氧率

由圖 5-5 可知系統通氣第 1 週後，微生物在 8 小時內平均攝氧率較低，24 小時內最高達到 3.5 mg-O₂/hour，於 48 小時內曲線趨緩，並於 72 小時內呈現下降趨勢。僅低環境風速-管內風速 0.2 m/s 組微生物呼吸仍有持續攝氧。

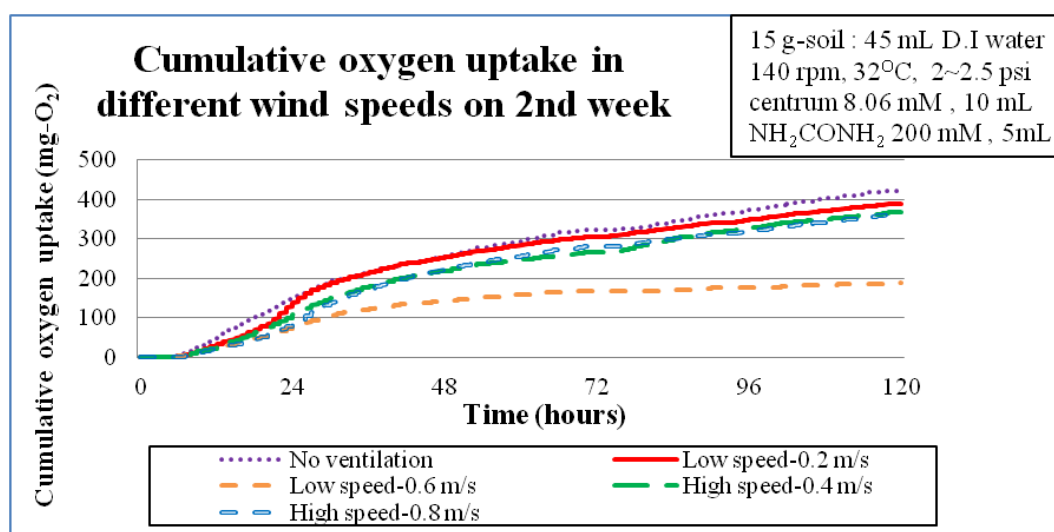


圖 5-6 不同風速下第 2 週土壤微生物呼吸累積攝氧量

系統通氣第 2 週時採集的土壤試驗中，初始 8 小時內微生物亦無明顯攝氧反應，48 小時內各組別累積攝氧量曲線皆有上升，未通氣組曲線較呈直線，顯示微生物生長狀況穩定；通氣組曲線則有明顯上揚，顯示微生物較能適應呼吸試驗所供給之好氧環境。低環境風速-管內風速 0.6 m/s 應為採樣時區域土壤柴油濃度較其他組低，或微生物菌落生長較少，故微生物反應時間較短且累積攝氧量低。

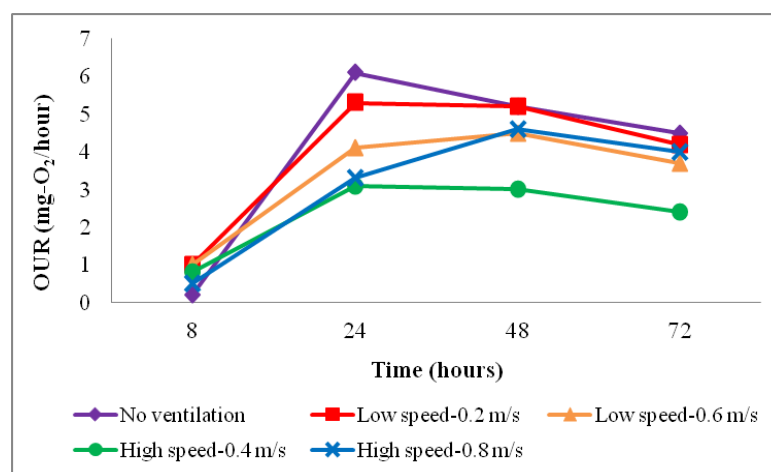


圖 5-7 不同風速下第 2 週土壤微生物呼吸平均攝氧率

由圖 5-7 可知系統通氣第 2 週後，微生物在 8 小時內平均攝氧率較低，24 小時內最高達到 6 mg-O₂/hour，然後於 48 小時內曲線趨緩，並於 72 小時內呈現下降趨勢。

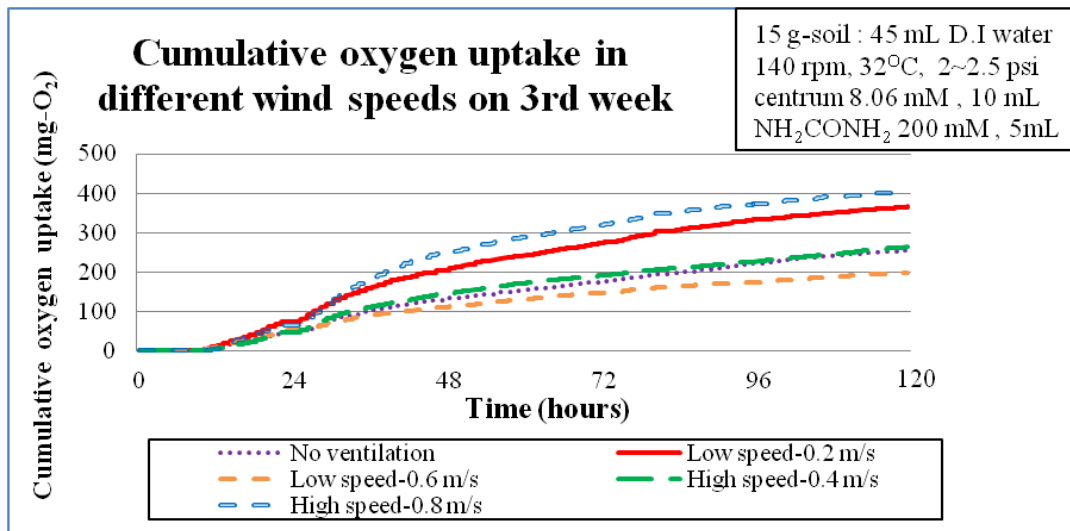


圖 5-8 不同風速下第 3 週土壤微生物呼吸累積攝氧量

系統通氣第 3 週時採集的土壤試驗中，初始 8 小時內微生物無明顯攝氧反應，48 小時內各組別攝氧曲線皆有上升，未通氣組曲線較呈直線，顯示微生物生長狀況穩定；通氣組曲線則有明顯上揚，顯示微生物較能適應呼吸試驗所供給之好氧環境。低環境風速-管內風速 0.2 m/s 及高環境風速 0.8 m/s 兩者有相似的攝氧曲線，顯示注入土壤之風速可能不是影響累積攝氧量之主因。

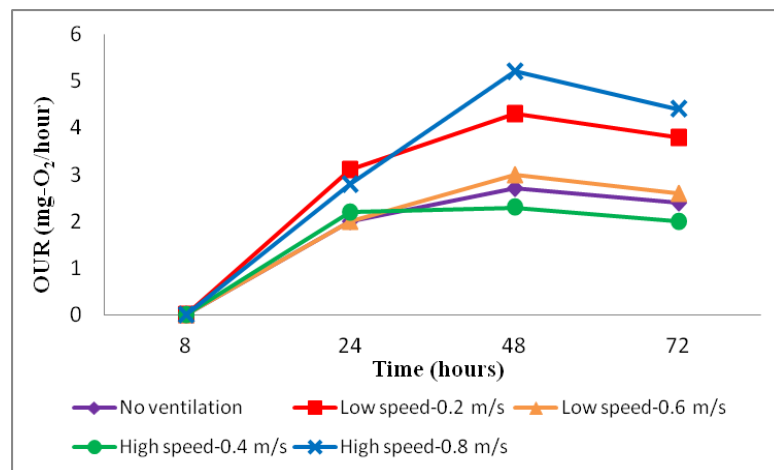


圖 5-9 不同風速下第 3 週土壤微生物呼吸平均攝氧率

由圖 5-9 可知系統通氣第 3 週後，微生物在 8 小時內平均攝氧率較低，24 小時內攝氧率持續上升，於 48 小時內最高達到 5.3 mg-O₂/hour，並於 72 小時內呈現下降趨勢。

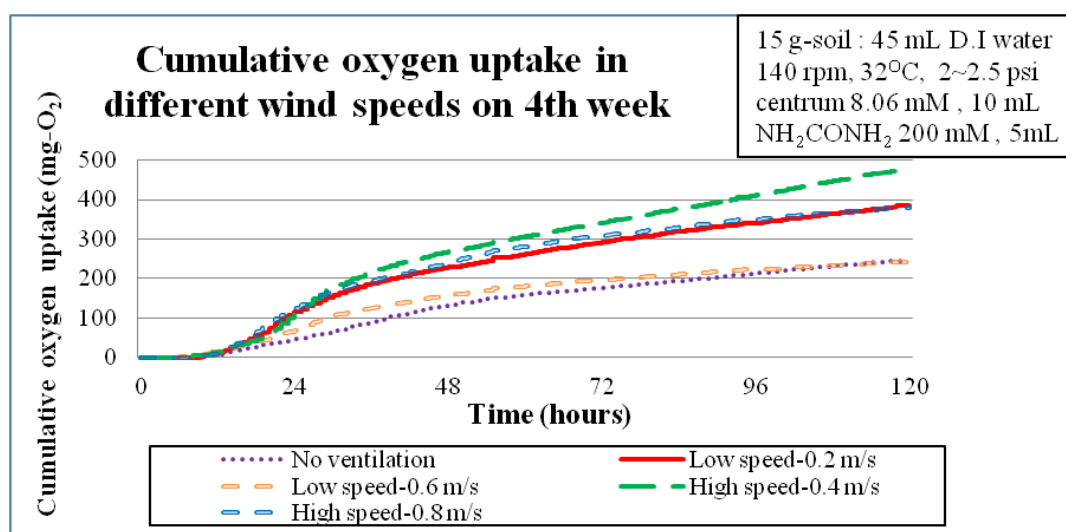


圖 5-10 不同風速下第 4 週土壤微生物呼吸累積攝氧量

系統通氣第 4 週時採集的土壤試驗中，初始 8 小時內微生物無明顯攝氧反應，48 小時內各組別攝氧曲線皆有上升，未通氣組曲線較呈直線，顯示微生物生長狀況穩定；通氣組曲線則有明顯上揚，顯示微生物較能適應呼吸試驗所供給之好氧環境。低環境風速-管內風速 0.2 m/s 及高環境風速 0.8 m/s 兩者有相似的攝氧曲線，3 週通氣結果相似，顯示注入土壤之風速可能不是影響累積攝氧量之主因。高環境風速-管內風速 0.4 m/s 應為採樣時區域土壤濃度較其他組高，故微生物反應時間較長而有較高之累積攝氧量。

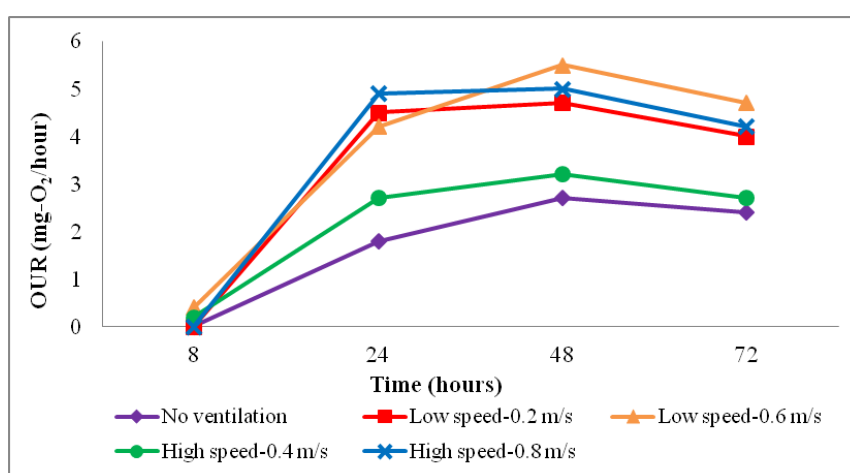


圖 5-11 不同風速下第 4 週土壤微生物呼吸平均攝氧率

由圖 5-11 可知系統通氣第 4 週後，微生物在 8 小時內平均攝氧量較低，24 小時內攝氧率持續上升，於 48 小時內最高達到 5.3 mg-O₂/hour，並於 72 小時內呈現下降趨勢。

5.6 通氣強度對微生物活性之探討

生物通氣模場經通氣 4 週後，由各週土壤微生物呼吸試驗之攝氧率結果得知，土壤微生物在前 8 小時內皆無明顯的攝氧，而從 24 至 72 小時間則可看出明顯活性變化，顯示此試驗方法具備一定程度之鑑別能力。連續通氣 4 週後，未通氣組攝氧率曲線有降低趨勢，而通氣組則有穩定或提高攝氧率的情形，顯示供給充足氧氣，對微生物活性有一定幫助。但從圖 5-3 通氣 4 週的各週累積攝氧量趨勢圖結果來看，提高管內風速對試驗結果無太大差異。由此可知，高濃度柴油污染環境下，單以風速變化無法成為協助微生物面對污染物時，提高活性的主要原因。

然而風速對土壤模場內氧氣的傳遞仍有一定程度的幫助，由於文獻中提到，現地進行呼吸測試可用來瞭解土壤經通氣後，氣體所能夠傳遞的距離，因此注入的風速越高也會使氧氣傳遞的距離越遠。故本階段對模場進行簡易的土壤微生物呼吸測試，試驗共分為高管內風速組及低管內風速組兩組，以氣體偵測器分別量測距離中央通氣管 5 cm、15 cm、25 cm 處土壤間氧氣濃度，以評估通氣所涵蓋影響之距離，並選擇一固定風速作為後續試驗之環境條件，土壤微生物呼吸測試採樣距離示意圖如圖 5-8。由於在前項土壤生物通氣模場的通氣強度試驗中發現風速 0.6 m/s 累積攝氧量明顯偏低，因此將其選為低管內風速組，量測土壤間氧氣濃度是否能夠涵蓋整個模場，並評估影響累積攝氧量低之原因；高管內風速組則選用人造風場可注入最大風力，量測結果為 3.0 m/s。表 5-4 為土壤模場進行不同風速在距離中央通氣管 3 種距離間，氧氣濃度變化數據。

表 5-4 生物通氣模場中土壤微生物呼吸測試氧氣濃度量測結果

	D5-O ₂ (%)	D15-O ₂ (%)	D25-O ₂ (%)
呼吸測試通氣前	17.6	15.5	17.3
低管內風速組-0.6 m/s	18.3	17.3	19.4
高管內風速組-3.0 m/s	20.2	17.8	18.3

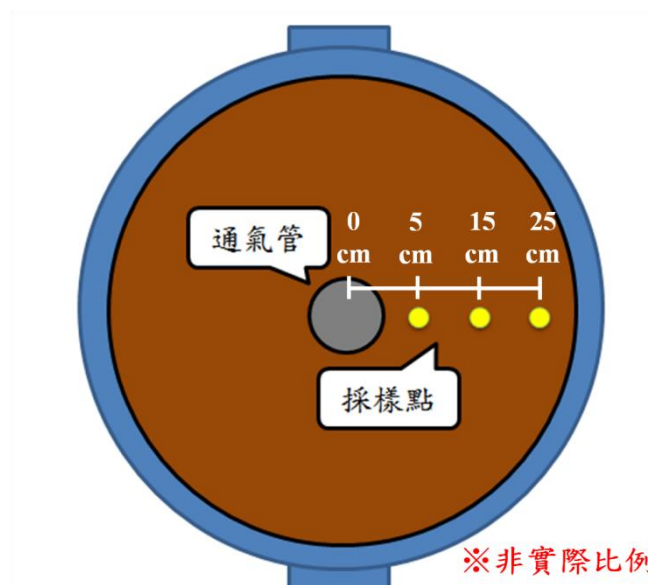


圖 5-12 模場試驗桶剖面測試氧氣濃度採樣距離示意圖

由量測結果可知，土壤模場未進行通氣前氧氣濃度約 15%-17%，經兩種不同風速通氣後，皆能對土壤模場中注入 17%以上之氧氣濃度。而比較上述氣泡是呼吸儀呼吸試驗結果，管內風速 0.6 m/s 雖然累積攝氧量較低，但仍能夠提供微生物適量氧氣。由結果亦可發現高管內風速 3.0 m/s 在 D5、D15 距離有較高氧氣濃度，顯示高風速與注入氧氣濃度有正比關係。但兩風速在距離中央通氣管 25 cm 處之量測點皆較 15 cm 處氧氣濃度高，其可能原因為，模場為一密閉桶槽容器，當氣體擴散至模場邊界時，氣體流動受到阻擋，為使氣體釋出而改變流向，因而導致遠處土壤累積較多氧氣，可作為模場通氣成效之未來修正方向。而經由土壤通氣試驗與土壤呼吸測試亦可證明本研究自製生物通氣設備具有風量收集與引導外界氧氣注入土壤層之效用，雖仍有改善空間，但已足夠為後續試驗提供穩定的風量與氧氣來源。

5.7 通氣強度對污染物濃度降解之探討

經由 GC/FID 結果分析後，生物通氣模場中土壤柴油污染濃度皆無明顯降解，仍維持在 20,000 mg/kg 左右，顯示高濃度柴油污染土壤雖能以通氣方式提供充足氧氣使微生物存活，但高濃度柴油對微生物恐早已帶來抑制成長或難以降解污染物的負面效果。而由於上述討論中已說明通氣試驗是為了確認

生物通氣設備能順利運作，故未對模場土壤中水分及營養源比例進行調整。此時土壤模場 C:N:P 中 N 含量與 P 含量仍不足，因此微生物雖然於呼吸試驗中有明顯的攝氧反應，但模場內微生物可能正因為營養源不足而活動力下降。而高柴油濃度下對於微生物生長情形也有所抑制。經總菌落數分析結果可發現，模場中各組土壤中菌落數約在 4.5×10^5 ，而經 4 週通氣試驗後，平均菌落數約提昇至 5.0×10^5 。顯示尚未添加營養鹽條件下，僅以生物通氣設備進行通氣對微生物生長較無顯著成效。而不同柴油污染濃度對微生物活性之影響，以目前的降解情形是無法觀察到其變化性，故後續立即對模場投入營養鹽或對柴油具有降解能力之菌種，以達到降解污染物濃度之整治目的。

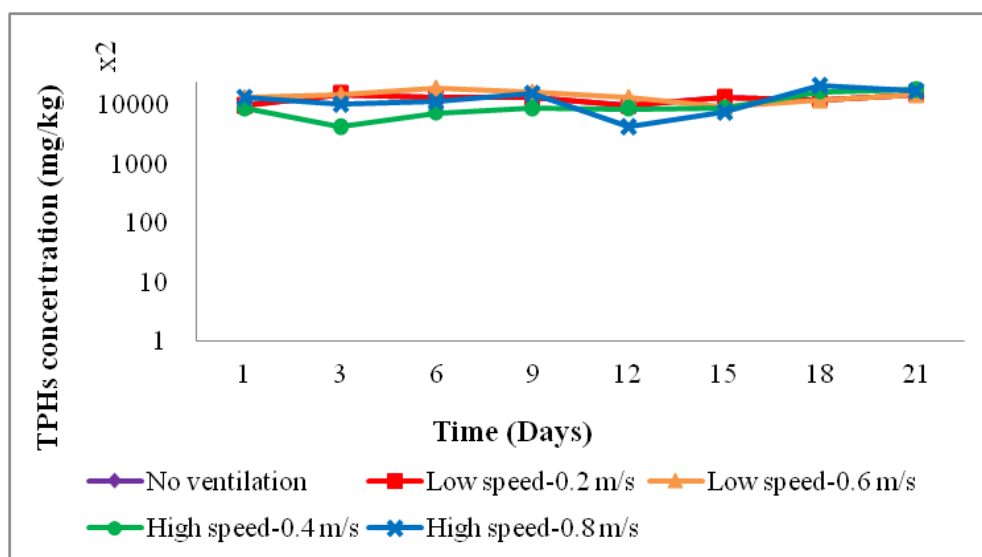


圖 5-13 生物通氣模場在僅供給氧氣下柴油殘餘濃度變化圖

5.8 反應槽微生物降解柴油試驗

由文獻中可得知，*Bacillus cereus* 菌(代號 BC)、*Achromobacter xylosoxidans* 菌(代號 F3B)、*Pseudomonas putida* 菌(代號 PS)等 3 株菌皆對柴油具有降解能力，因此本研究希望能在投入生物通氣模場前先對菌株進行簡易的柴油降解試驗，並從菌株生存狀況與柴油降解趨勢進行篩選，淘汰無法於高濃度柴油污染環境生存的菌株。故本研究於實驗室中設立微生物反應槽（反應槽規模：直徑 14 cm、高度 7 cm），試驗環境為約 20,000 mg/kg 的土壤，氧氣供應則採用翻拌方式進行，並且每日進行反應槽內氧氣濃度與柴油殘餘濃度分析，觀

察各菌株的降解能力。菌株培養方式以市售 LB (Luria Broth) 液態培養基於室溫環境下，利用磁石攪拌機攪拌 3 至 4 天，促使菌液大量增生之所需濃度。

試驗反應槽共有 5 組，Blank 組為未植菌未翻拌空白對照組，BC 組、F3B 組與 PS 組分別加入 10% (w/w) 菌液，ALL 組為三種菌液混合後加入污染土壤中，菌液添加量與其他植菌組相同，植菌組皆於每日進行翻拌提供氧氣。反應槽微生物降解實驗共進行 28 日，柴油初始濃度檢測為 22,428 mg/kg，降解結果如圖 5-14 所示。

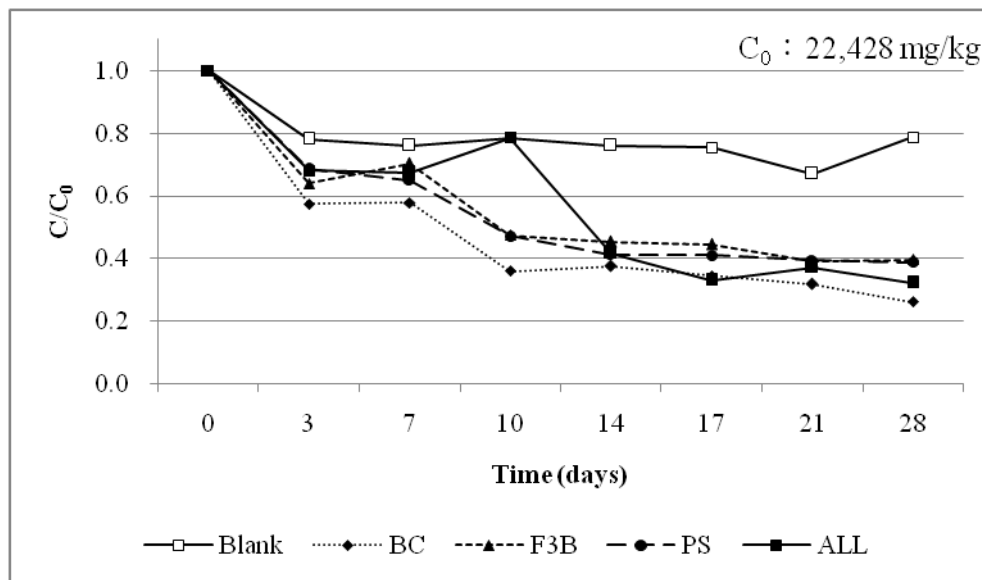


圖 5-14 反應槽微生物降解柴油濃度實驗結果

試驗開始 3 日後，各組皆出現第一次明顯降解，以 BC 組柴油殘餘濃度最低， C/C_0 達 0.57，而 Blank 組 C/C_0 僅為 0.78。推測此時微生物正將液態培養基中所提供之基質作為養分，促使柴油降解菌及土壤原生菌皆能對柴油污染物進行降解反應。試驗開始 10 日後出現第二次明顯降解，BC 組 C/C_0 為 0.36 殘餘濃度最低，F3B 組與 PS 組 C/C_0 皆為 0.47，殘餘率僅次於 BC 組，ALL 組則在 14 日後 C/C_0 達到 0.41，Blank 組 C/C_0 為 0.76。由結果可發現 Blank 組未能有效的降解柴油污染物，推測是土壤原生微生物已將易分解有機物分解完畢，但無法分解其餘較複雜的有機物，導致降解效果平緩，反觀其餘植菌組則能進行第二次降解，顯示高濃度柴油污染環境中，添加試驗中 3 株降解菌確實有助於分解柴油污染物。試驗至 28 日後，結果顯示以 BC 組殘餘率最低，柴油污染殘餘率可達 0.26。

由上述試驗可看出降解菌在反應槽中能有效分解柴油污染濃度，然而為了以較謹慎的方式判斷柴油降解的趨勢，後續皆採用 Mann Kendall Test 進行判斷。Mann Kendall Test 是目前最常被使用的趨勢判斷統計方式，可快速呈現本階段試驗的降解趨勢，其分析結果如表 5-5 所示。微生物反應槽使用翻拌曝氣法降解土壤中柴油污染物試驗中，以植入 PS 菌之柴油污染物降解趨勢最明顯，Z well 達-3.588，最終污染物殘餘率為 0.39，其次為 BC 菌（殘餘率為 0.26）與 F3B 菌（殘餘率為 0.40）Z well 均為-3.093，而 Blank 組的柴油污染物殘餘率為 0.79，Z well 為-1.485 判斷為無明顯趨勢。

表 5-5 反應槽微生物降解柴油濃度趨勢分析

組別	判斷趨勢	Z well
Blank	Stable/No Trend	-1.485
BC	Decreasing	-3.093
F3B	Decreasing	-3.093
PS	Decreasing	-3.588
ALL	Decreasing	-2.846

5.9 生物通氣系統植菌微生物試驗

1. 柴油濃度降解趨勢分析：由反應槽微生物降解試驗已證實，各菌株皆能有效降低土壤中高濃度柴油污染物，故在此階段正式添加降解菌於生物通氣模場中。試驗開始前，除了 Blank 組未進行通氣外，其餘 4 組皆已使用生物通氣設備以風速 0.6 m/s 通氣 4 週，使土壤層氧氣充足並穩定原有微生物生長狀況，再分別將 3 種個別微生物（BC 菌、F3B 菌與 PS 菌）與三種微生物混合菌液（ALL）加入生物通氣模場中，於未添加營養鹽之情形下，觀察生物通氣法在植菌後是否能直接以柴油污染物為基質進行降解。實驗組別分為 Blank、BC 組、F3B 組、PS 組與 ALL 組，當中 Blank 組為未植菌且未通氣空白試驗組，各組初始柴油污染濃度為 21,905 mg/kg。

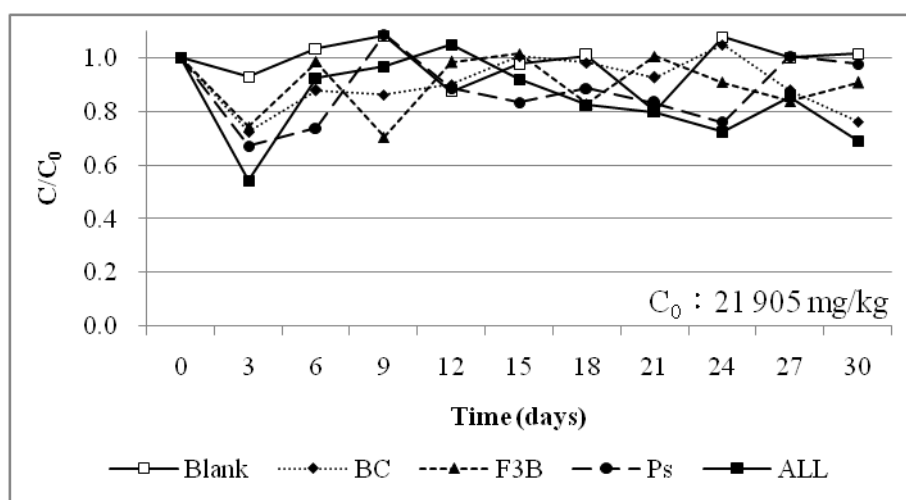


圖 5-15 生物通氣模場植種微生物降解柴油濃度試驗結果

試驗結果如圖 5-15 所示。本實驗進行 30 日後 Blank 組平均污染殘餘率 1.0，其餘組別污染殘餘率皆介於 0.8 至 0.9 之間，由實驗結果得知生物通氣系統在植菌後 30 日柴油濃度無明顯降解。從數據結果較難判斷各組降解趨勢，經由 Mann Kendall Test 輔助判斷後，統計結果如表 5-6 所示，除了 ALL 組判斷無明顯趨勢，其餘組別亦判斷為無明顯趨勢。由此可知本研究使用的三株菌雖具有柴油降解能力，但進入生物通氣系統後無法有效且快速的降解柴油，比起前項反應槽微生物降解試驗結果，顯然翻拌曝氣法具有接觸次數高與接觸面積大的優勢，使降解菌在未添加營養鹽環境下能有效分解柴油污染物，然而生物通氣模場之結果現階段無法呈現有效率的柴油降解趨勢，但若能提供合適的營養鹽濃度供微生物活動，其結果應能有所變化，故本研究後續以額外添加營養鹽於生物通氣系統中幫助微生物降解柴油污染物。

表 5-6 生物通氣模場植種微生物降解柴油濃度趨勢分析

組別	判斷趨勢	Z well
Blank	Stable/No Trend	0.311
BC	Stable/No Trend	0.311
F3B	Stable/No Trend	0.311
PS	Stable/No Trend	0.311
ALL	Stable/No Trend	-1.868

2. 微生物活性趨勢分析：本研究在生物通氣模場植菌前（第 0 週）便採集土樣以呼吸儀進行 5 天的批次試驗，作為模場微生物累積攝氧量背景資料，而第 1 週則為模場植菌當日，並依序進行 4 週次採樣。Blank 組未植菌且未通氣，植菌之土壤模場以菌株名代稱，如 BC 組、F3B 組、PS 組及三菌混合的 ALL 組。

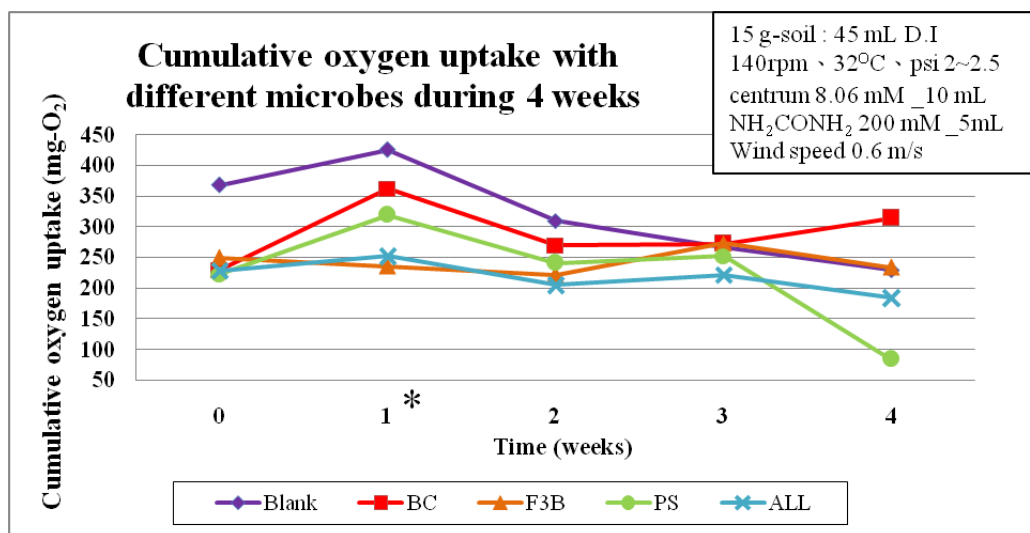


圖 5-16 生物通氣模場不同植菌後之 4 週次累積攝氧量變化趨勢

*：植菌及營養鹽添加時間點

圖 5-16 中，第 0 週為未植菌種背景資料，可發現此時 4 組通氣組微生物累積攝氧量差異不大，皆維持在 200 與 250 mg-O₂ 間，而 Blank 組則有較高之累積攝氧量；植菌種後第 1 週可發現通氣組中 BC 菌、PS 菌與 ALL 組累積攝氧量有些微提昇；第 2 週可發現微生物累積攝氧量開始下降；第 3 週時，植菌種後的通氣組累積攝氧量有持平或上升情形；至第 4 週時，BC 組仍有較佳的累積攝氧量，其餘組別則下降。

由上圖能夠看出微生物在呼吸試驗的最終總攝氧量，BC 組似乎有較佳的適應能力，於第 2 週持平後，自第 4 週累積攝氧量再度上升，反觀其餘植菌種組皆為持平後下降，顯示 BC 組在未添加營養鹽的高濃度柴油污染環境下，微生物活性較為突出。為了解試驗中各組別微生物實際的累積攝氧量變化，故後續以各週次累積攝氧量曲線進行檢視，初步分析微生物活性，其結果顯示於圖 5-17 至圖 5-21。

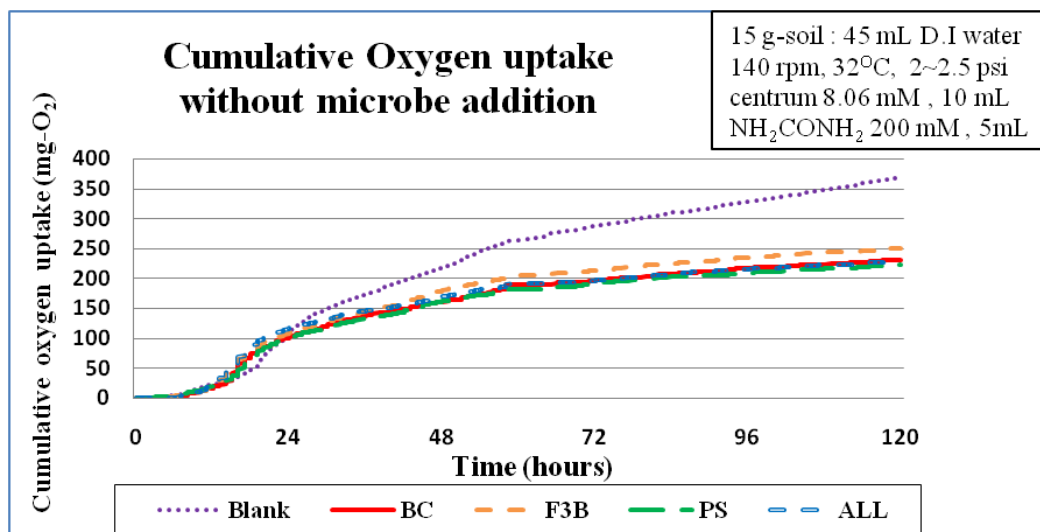


圖 5-17 植菌種前微生物累積攝氧量曲線

植菌種前可發現未通氣組於 24 hr 間攝氧曲線上升趨勢較通氣組緩慢，而 24 小時後可能因為土壤中微生物適應氧氣充足的環境，故累積攝氧量曲線有逐漸上升之趨勢。另外 4 組通氣組則因先前已連續通氣 4 週，故微生物適應呼吸試驗環境後，自 48 小時後累積攝氧量曲線趨於平緩。

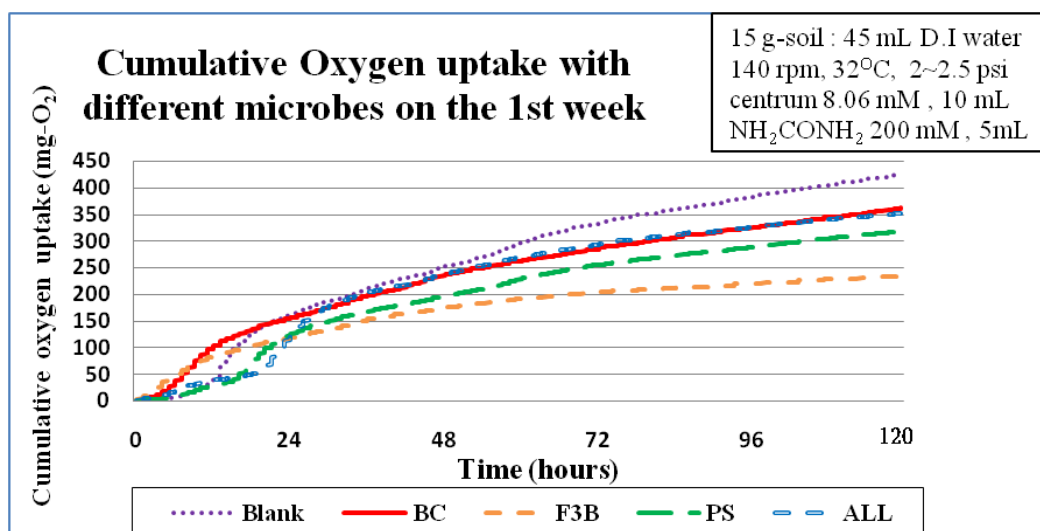


圖 5-18 植菌種後第 1 週微生物累積攝氧量曲線

植菌種後第 1 週可發現，由 Blank 組曲線為基準能劃分出 BC 組、F3B 組微生物對高濃度柴油環境有明顯反應，且試驗開始 8 小時內攝氧曲線上升，而 PS 組及 ALL 組則有可能受到抑制的現象，因此累積攝氧量甚至較 Blank 組低。

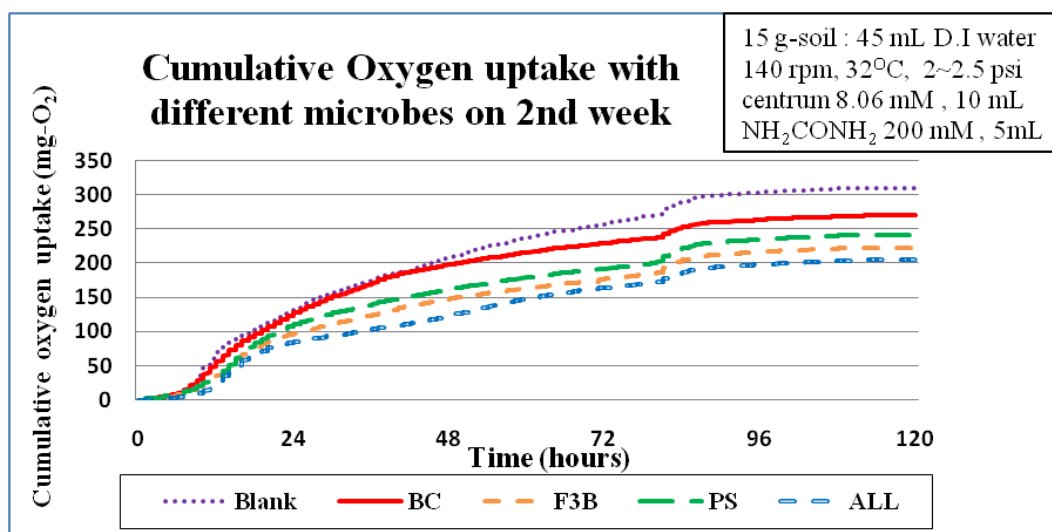


圖 5-19 植菌種後第 2 週微生物累積攝氧量曲線

植菌種後第 2 週可發現，各組別初期累積攝氧量皆有類似的趨勢，由 Blank 組曲線為基準，BC 組、F3B 組攝氧曲線已無第 1 週有顯著反應，PS 組及 ALL 組則在此週加快攝氧的趨勢，顯示模場中微生物應已開始適應高濃度柴油污染環境。

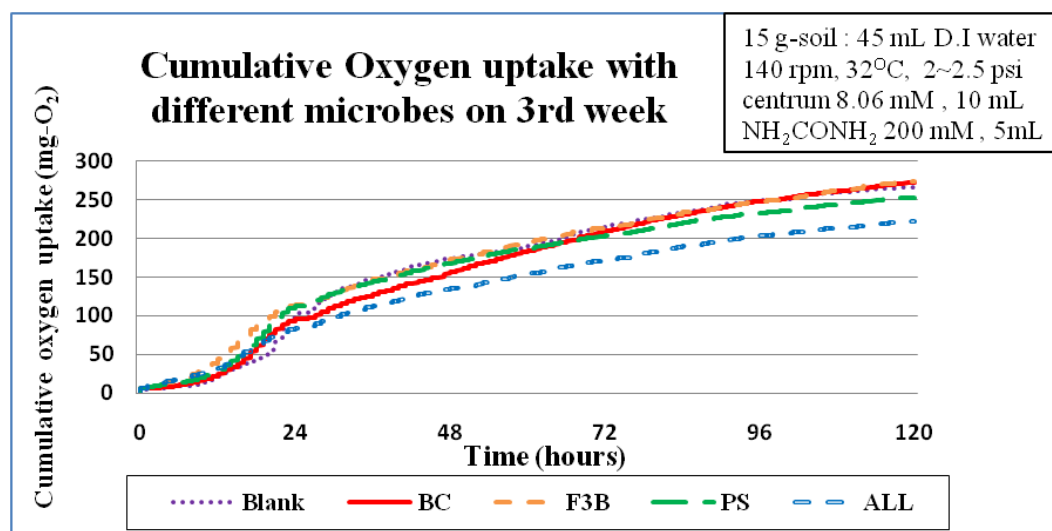


圖 5-20 植菌種後第 3 週微生物累積攝氧量曲線

植菌種後第 3 週可發現各組別初期攝氧趨勢皆有遲緩情形，並與未植菌種前相似，由植菌種方式推測，應為培養菌株的 LB 液態培養基內所能提供的營養鹽已被消耗殆盡，故微生物數量恐有下降或活動力降低之情形。

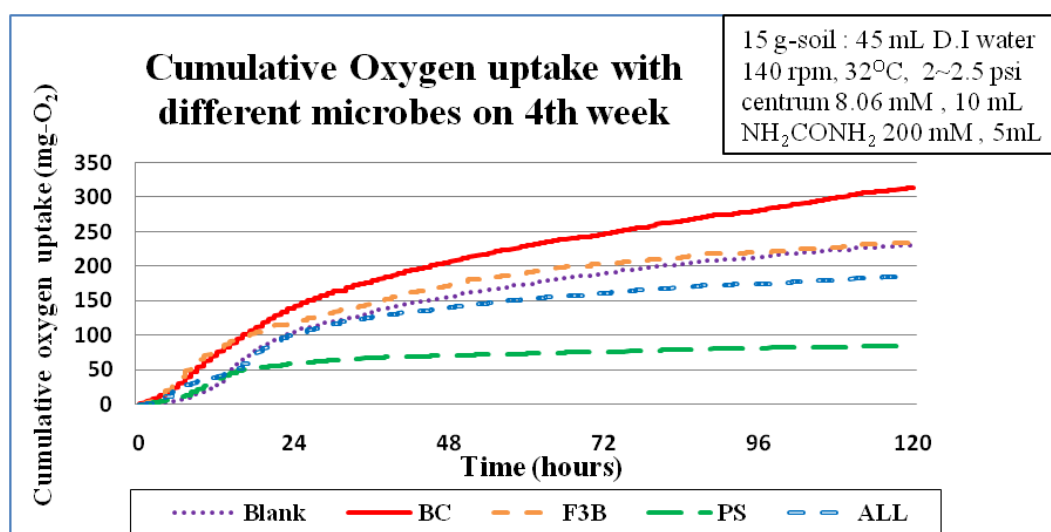


圖 5-21 植菌種後第 4 週微生物累積攝氧量曲線

菌液添加後第 4 週可發現 BC 組及 F3B 組攝氧曲線再度上升，顯示微生物在此週重新適應營養鹽缺乏的環境，雖然柴油濃度無明顯降低，但可能選擇其餘有機物作為活動基質所導致。PS 組在各組間累積攝氧量為最低，顯示該菌株於此週的存活數量恐已相對較少，故累積攝氧量曲線相當平緩。

由上述圖中可以發現，各個組別在添加菌液前，累積攝氧量曲線在 8 小時皆無明顯上升，而在各通氣組添加菌液後，第 1 週 BC 組及 F3B 組有明顯的攝氧反應，而 PS 及 ALL 組則較遲緩，可看出不同菌株的適應期亦有不同，第 2 週後各組別的累積攝氧量曲線皆有相似趨勢，植菌種後第 3 週各組別初期攝氧趨勢開始降低，顯示微生物活動力降低，使攝氧反應有下降的趨勢。累積攝氧量曲線雖能完整呈現呼吸試驗期間的數據，但對於現場應用時需要立即性的指標來判斷微生物當前活性，則 5 天的微生物呼吸試驗週期實在過久，且曲線的弧度亦不利於操作人員進行判斷，因此本研究為了找出較合適且具有立即性的微生物活性指標，將嘗試由攝氧率變化進行趨勢判斷，以評估是否可作為微生物活性指標之一。故此階段將從每批次呼吸儀試驗中挑選出微生物生長期至延滯期攝氧率最為旺盛的 3 個時段作為參考，初步從 5 天的試驗期間挑選出「試驗開始 24 小時內、48 小時內及 72 小時內」，其值以算術平均量化後，再由這 3 個時段中找出最可能作為微生物活性指標的時間點。

圖 5-22 為整理各組在 5 天的試驗期間不同時段攝氧率之對照圖，可發現在呼吸試驗開始 24 小時內，其攝氧率皆比 48 小時及 72 小時內相對較高，用以判讀攝氧率變化性亦較為明顯，故後續試驗結果將以此時段(24 hr)作為活性評估之指標。

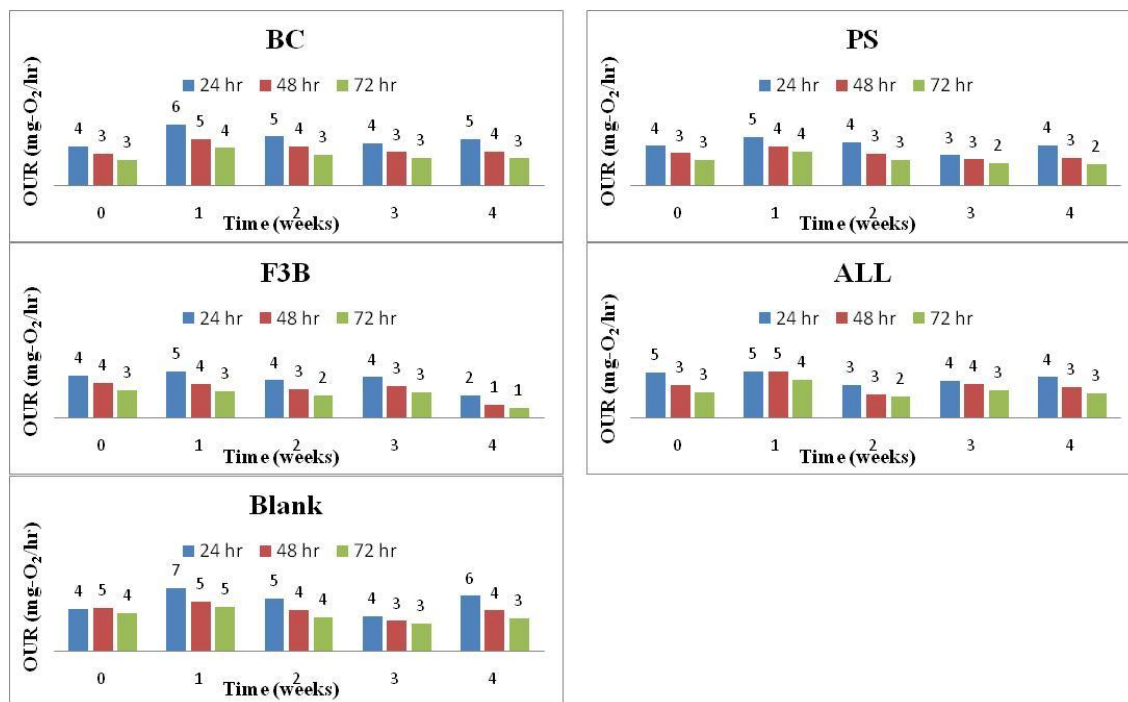


圖 5-22 呼吸試驗中微生物各時段攝氧率對照表

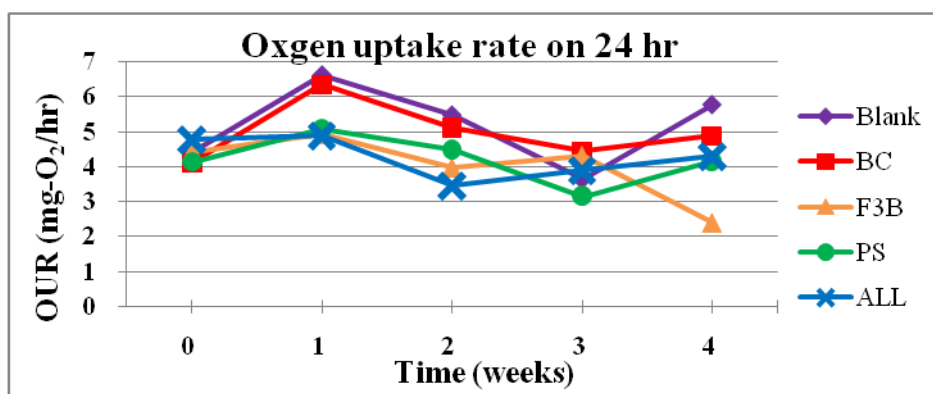


圖 5-23 各週次採集土壤之呼吸試驗 24 小時內微生物攝氧率趨勢圖

圖 5-23 為模場植菌種後各組採集土壤進行生物呼吸試驗在 24 小時內攝氧率的變化圖，可發現在第 1 週添加菌液後，各組微生物攝氧率在 24 小時內皆有明顯提昇，判斷應是微生物仍在利用投入時的液態培養基所含基質；第 2 週時基質應被耗盡，故攝氧率降低；第 3 週時可發現 F3B 菌及 ALL 組攝氧率

提昇至 4.3 及 3.9 mg-O₂/hr；第 4 週時 BC 菌、PS 菌及 ALL 組攝氧皆提昇至 4.9、4.2 及 4.3 mg-O₂/hr，顯示各組菌種在 3 週後活性才提高。

圖 5-24 為模場植菌種後各組柴油濃度殘餘率變化圖，對照上可發現第 1 週柴油濃度皆有下降，顯示微生物在此週利用液態培養基所含基質大量增長，亦對柴油濃度進行降解，但是當基質消耗完畢後，柴油濃度降解的趨勢也隨之停止。由於土壤中尚未添加足量的營養鹽供微生物持續降解柴油，因此第 3、4 週時，各組的柴油殘餘率仍高於 80%。

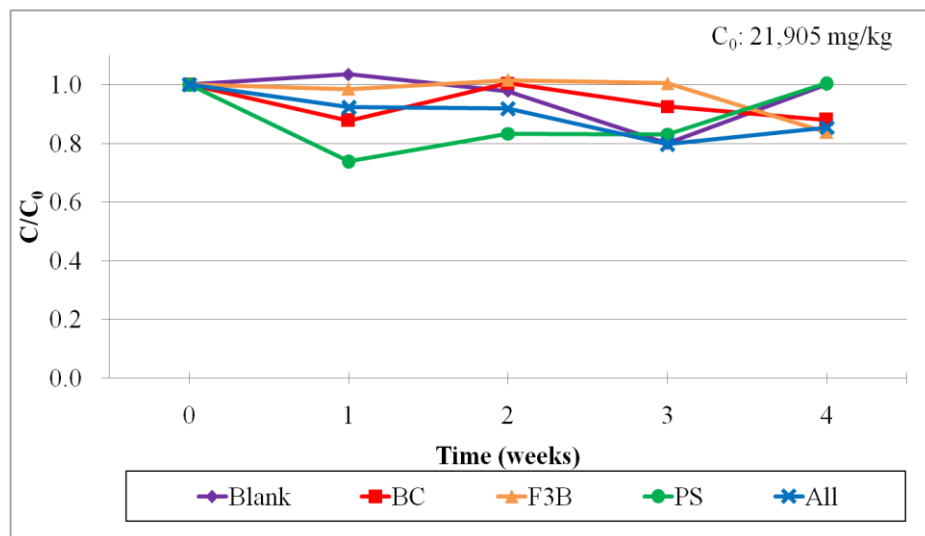


圖 5-24 生物通氣模場植菌後柴油濃度殘餘率變化圖

5.10 生物通氣系統營養源添加暨擴散半徑試驗

由上述試驗可得知微生物在營養源不足的環境下，無法有效且快速分解柴油污染物，而模場在經由 4 週生物通氣試驗後，顧慮降解菌恐因土壤中養分不足而導致實際生長數量減少，若此時直接添加營養鹽恐無法作為各降解菌代表性數據，故此階段將前項試驗所植種微生物，視為不足以形成優勢菌種的前提下，重新配置生物通氣模場，於添加足量營養鹽環境下，探討土壤中原生微生物對柴油降解速率。模場配置方法為原污染土壤經適當曝曬及充分攪拌後，使土壤中原有微生物重新分佈於模場土壤中，並添加由尿素與市售磷肥配置的營養液及新鮮柴油後回填，營養鹽濃度則依照模場土壤中元素分析結果，同步進行水分調整，以作為添加營養鹽對土壤原生微生物降解柴油之對比數據。

柴油濃度降解趨勢判斷：在本項試驗中，為了確實得知模場中離通氣管篩不同區域微生物降解情形，故在採樣過程中以距離中央通氣管 5 cm、15 cm 與 25 cm 三點土壤樣品 (樣品代號 D5、D15、D25)進行表示，並將 4 組通氣組同日柴油濃度依與通氣管篩不同距離進行平均，於濃度變化圖中呈現。

試驗結果如圖 5-25 所示。本次試驗共進行 33 日，分為 D5、D15、D25 三組採樣，Blank 組為未添加營養鹽及通氣的空白實驗組，初始濃度為 23,044 mg/kg。試驗後第 15 日，發現柴油殘餘濃度稍微降低，最低點為 D25 (C/C_0 : 0.67)，但幅度不明顯，後續試驗中柴油殘餘率也無明顯降低。從數據結果較難判斷各點降解趨勢，經 Mann Kendall Test 輔助判斷後，統計結果如表 5-7 所示，在本試驗條件下，降解趨勢隨著距離中央通氣管越遠而降低，其中 D5 降解趨勢明顯 Z well 為-2.400，D25 的 Z well 為-1.577 與 Blank 相同判斷為無降解趨勢或降解趨勢不明顯，顯示模場有效通氣半徑可達 15 cm，而 25 cm 恐因距離中央通氣管過遠，營養鹽不易在土壤間以擴散作用方式讓微生物使用，故降解趨勢不明顯。

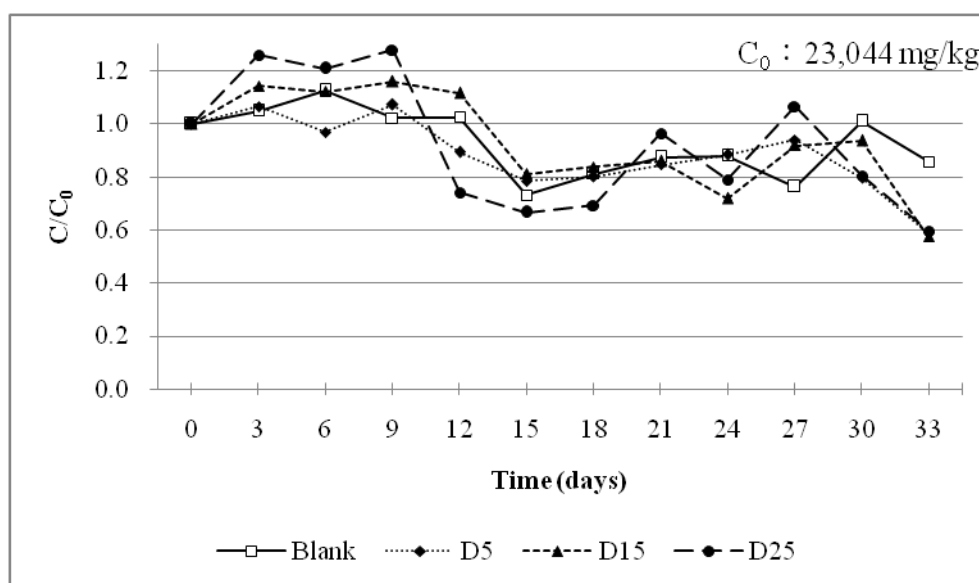


圖 5-25 生物通氣設備不同距離之柴油濃度殘餘率

表 5-7 生物通氣設備不同距離之柴油濃度降解趨勢分析結果

組別	判斷趨勢	Z Well
Blank	Stable/No Trend	-1.577
D5	Decreasing	-2.400
D15	Decreasing	-1.989
D25	Stable/No Trend	-1.577

5.11 生物通氣系統植菌微生物及營養鹽添加試驗

由前項試驗中可得知營養鹽添加能提高土壤中原生微生物降解趨勢，而為了有效且快速的降解生物通氣模場中柴油污染物，本階段亦於試驗進行前 1 週重新配置生物通氣模場，並且同時添加柴油降解菌與足量營養源後回填。實驗組別分為 Blank 組、BC 組、F3B 組、PS 組與三種微生物混合菌 (ALL 組)，Blank 組為未植菌且未通氣空白試驗組，初始柴油污染濃度為 21,905 mg/kg，土壤中營養源比例調整為碳、氮、磷比 100:10:1，採樣點固定為距中央通氣管 15 cm 處，試驗期程共 46 日，試驗結果如圖 5-26 所示。

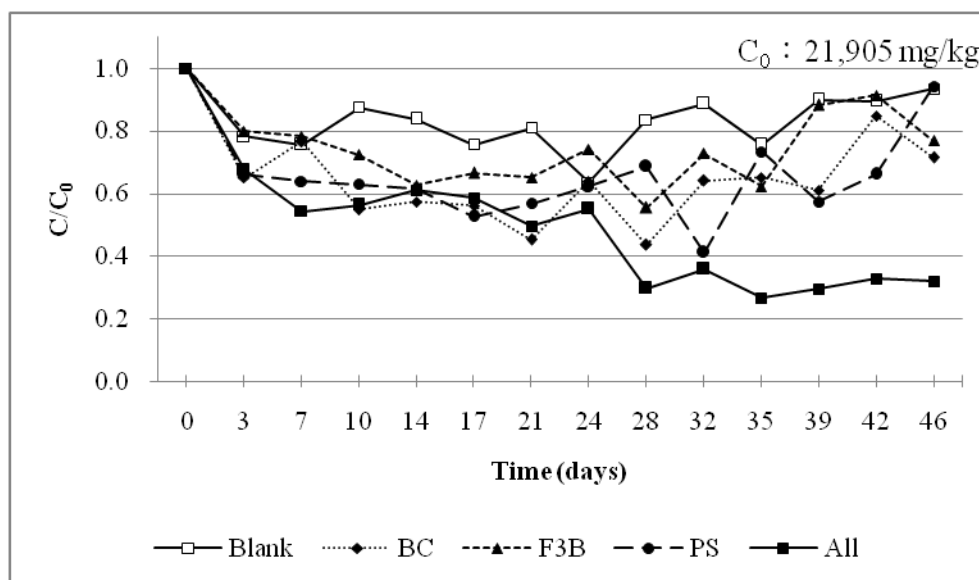


圖 5-26 生物通氣法不同植菌之柴油濃度殘餘率結果

1. 柴油濃度降解趨勢判斷：試驗後第 3 日發現第一次降解，BC 組、PS 組與 ALL 組污染殘餘率 (C/C_0) 介於 0.65-0.69 之間，Blank 組與 F3B 組殘餘率分別為 0.78 與 0.80，3 日後降解趨勢較平緩，推斷為微生物已將易分解有機物降解完畢所造成。實驗 28 日時 ALL 組殘餘濃度大幅降低，柴油濃度殘餘率為 0.30，其他組別皆無明顯降解趨勢。以 Mann Kendall Test 進行降解趨勢判斷，統計結果如表 5-8 所示，ALL 組 Z well 達-3.360 降解趨勢明顯，其他植菌組 Z well 介於-1.029 至-1.440 之間，無明顯降解趨勢。由試驗結果得知在本試驗生物通氣條件下混合菌有較佳降解趨勢，最終柴油濃度殘餘率為 0.32。

表 5-8 生物通氣法不同植菌之柴油濃度降解趨勢分析結果

組別	判斷趨勢	Z well
Blank	Stable/No Trend	-0.069
BC	Stable/No Trend	-1.029
F3B	Stable/No Trend	-1.577
PS	Stable/No Trend	-1.440
ALL	Decreasing	-3.360

2. 微生物活性趨勢判斷：微生物活性方面，本研究在生物通氣模場植菌及添加營養鹽前（第 0 週）便採集土樣以生物呼吸儀進行 5 天的批次試驗，作為模場微生物攝氧的背景資料，而第 1 週則為模場植菌與添加營養鹽當日，並依序進行 6 週次採樣。土壤模場以菌株名代稱，如 Blank 組為未植菌且未通氣空白試驗組，之後依序分為 BC 組、F3B 組、PS 組及三菌混合的 ALL 組。

圖 5-27 為土壤模場植菌種及添加營養源後，直至通氣第 6 週之各組累積攝氧量變化，當中可發現 BC 組、F3B 組及 ALL 組攝氧變化較為平穩，PS 菌則在第 2 及第 4 週有提高，但由此數據仍無法明確了解微生物在試驗期間內之攝氧變化及活性表現，故後續以圖 5-28 至圖 5-34 對各週次攝氧累積曲線進行檢視，初步分析微生物活性。

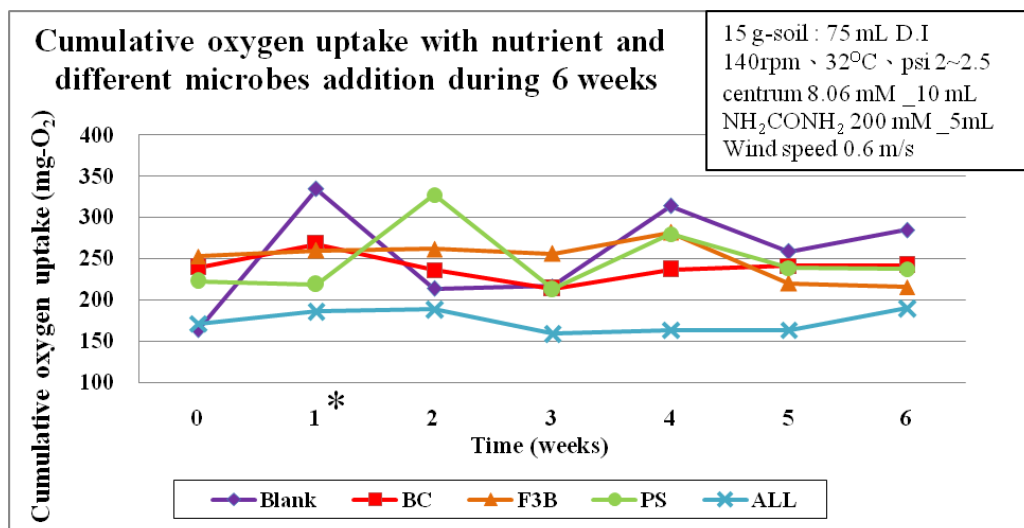


圖 5-27 生物通氣模場植菌種及營養源添加後各週次累積攝氧量變化圖

*：植菌及營養鹽添加時間點

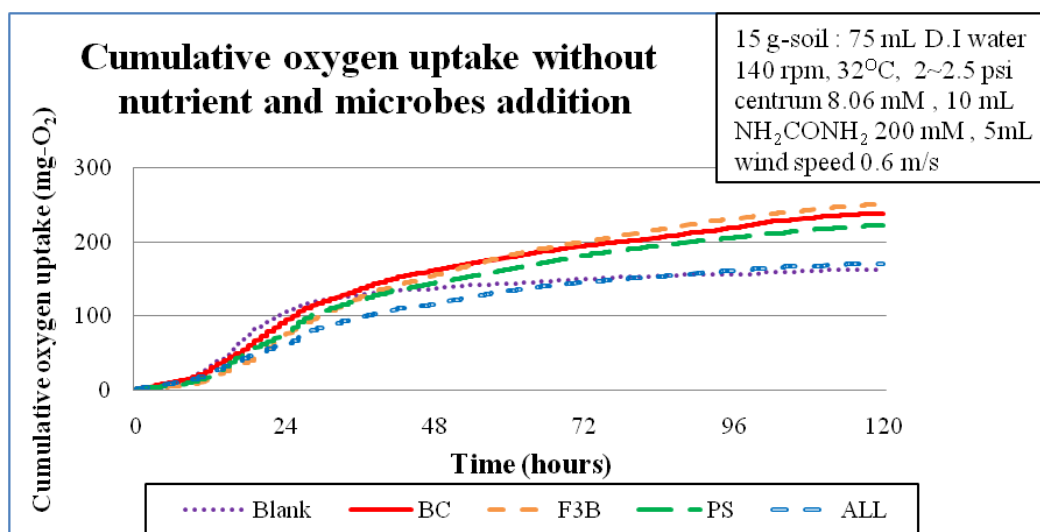


圖 5-28 生物通氣模場植菌種及營養源添加前微生物累積攝氧量

植菌種前可發現 24 小時內未通氣組在初期攝氧曲線較其餘組別高，可能因為土壤中微生物正適應氧氣及營養源充足的環境，故攝氧曲線有逐漸上升之趨勢。另外 4 組則因微生物原已處於通氣環境下，故反應較無未通氣組劇烈。

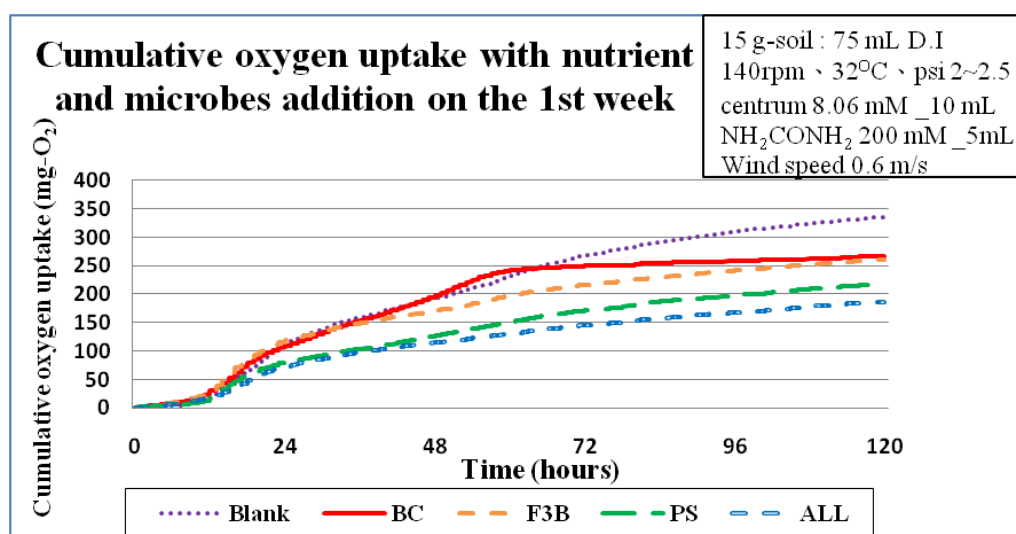


圖 5-29 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 1 週微生物累積攝氧量

植菌後第 1 週可發現 BC 組及 F3B 組初期攝氧量較高，顯示微生物在模場中獲得足夠營養鹽後，使其活動能力及累積攝氧量上升。24 小時後各組微生物攝氧趨勢逐漸平緩，而 BC 組直至 48 小時後逐漸平緩。

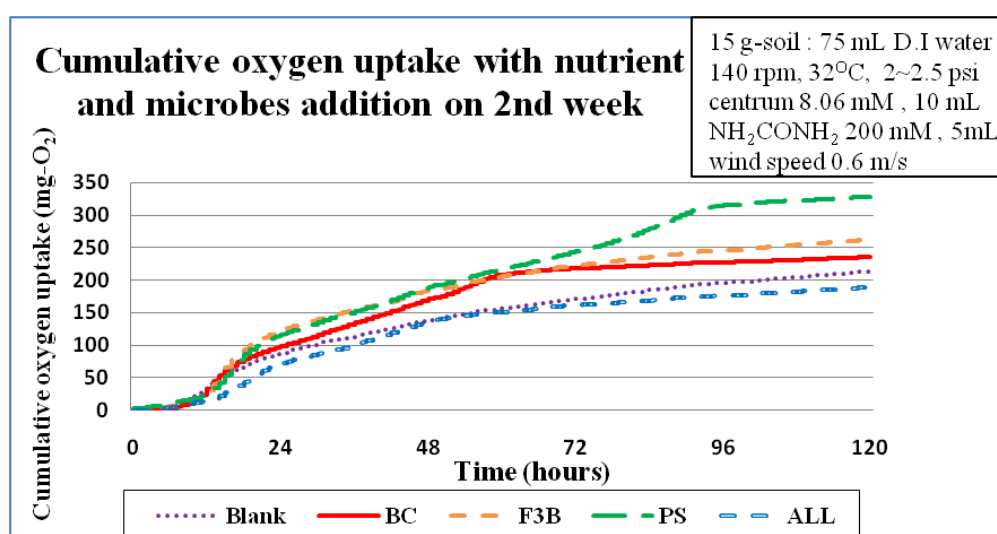


圖 5-30 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 2 週微生物累積攝氧量

植菌後第 2 週可發現 PS 組有明顯的攝氧反應，顯示微生物在土壤模場獲得足夠營養鹽後，族群數量應已增加，故累積攝氧量上升。與第 1 週相比，植菌組在 48 小時內攝氧趨勢略有上升。

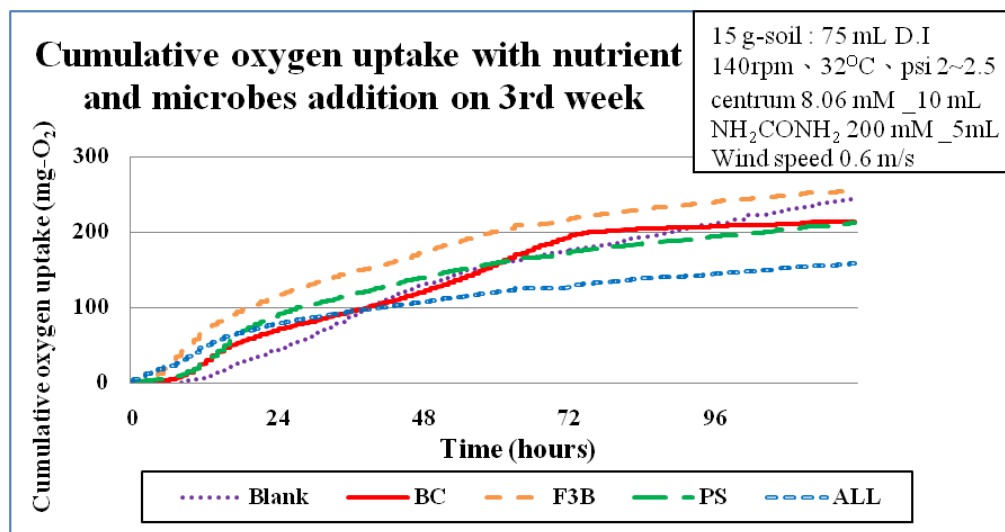


圖 5-31 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 3 週微生物累積攝氧量

植菌後第 3 週可發現 F3B 組初期攝氧曲線有明顯上升，推測模場中營養源應被微生物消耗許多，故呼吸試驗中供給之營養源可提高微生物活性。BC 組於 72 小時後攝氧趨勢才趨緩，較前 2 週晚，推測原因應與 F3B 組有相似情形。

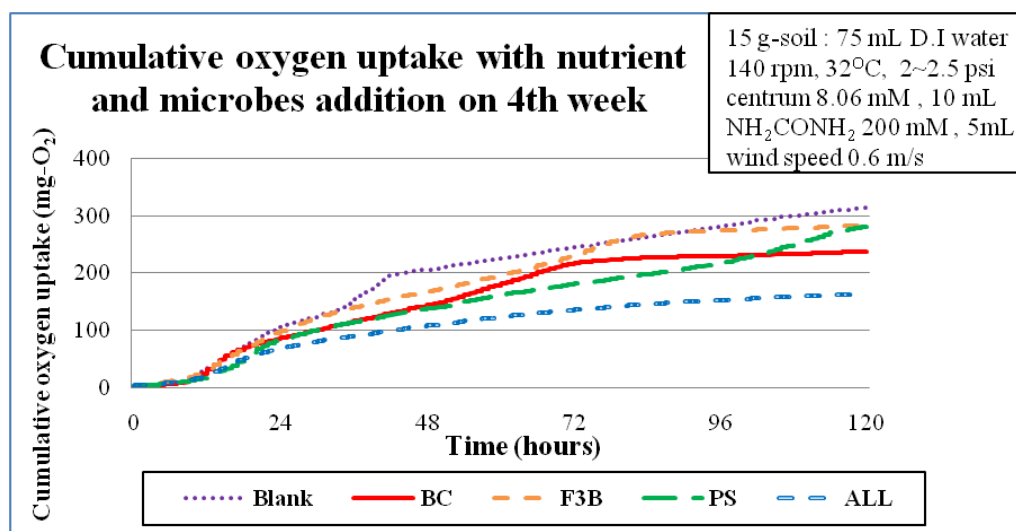


圖 5-32 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 4 週微生物累積攝氧量

植菌後第 4 週，F3B 組初期攝氧趨勢已無第 3 週明顯，且與 BC 組、PS 組在 72 小時內曲線皆較平緩，顯示微生物活性應有降低之情形，ALL 組攝氧累積曲線雖低，但仍能維持相似的曲線，顯示模場中微生物狀況變化應不大。

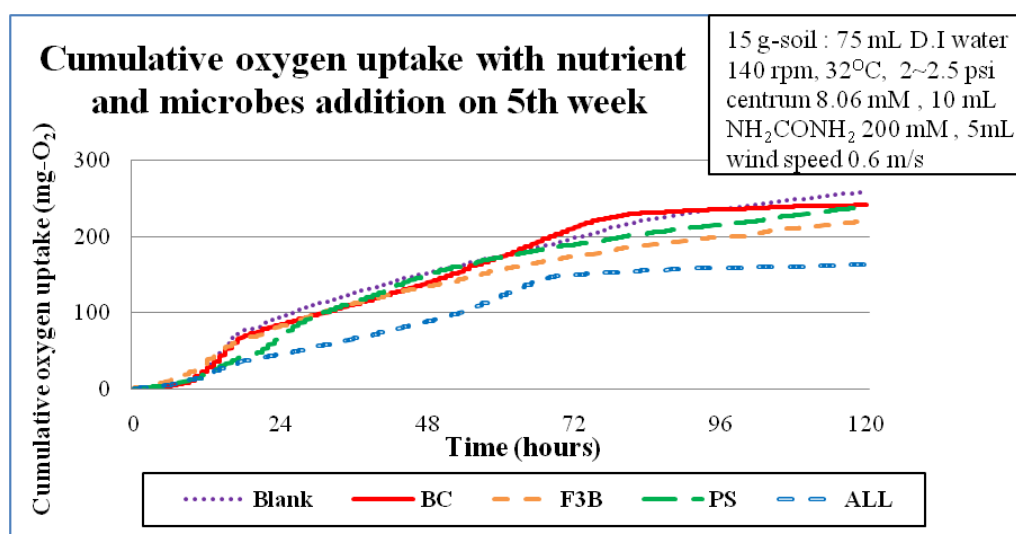


圖 5-33 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 5 週微生物累積攝氧量

植菌後第 5 週，各植菌組初期攝氧曲線可區分出 BC 組、F3B 組較高，PS 組及 ALL 組較平穩，而攝氧曲線在 72 小時後趨於平緩，顯示模場中微生物數量應有降低，故需較長時間才足以消耗呼吸試驗中所提供之營養源。

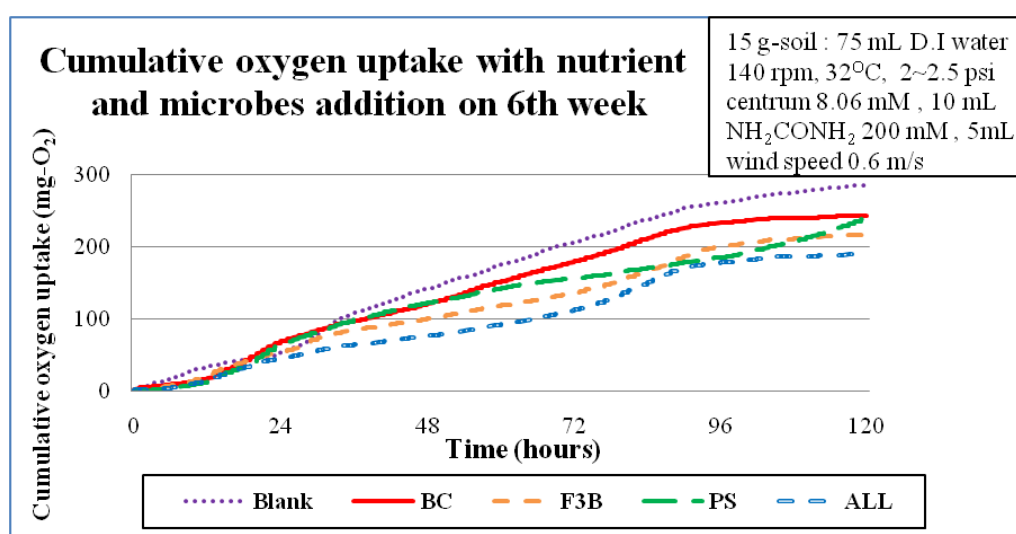


圖 5-34 生物通氣模場植菌及營養鹽添加後第 6 週微生物累積攝氧量

植菌後第 6 週，各植菌組初期攝氧趨勢皆有延遲情形，且攝氧曲線於 24 小時後穩定上升，直至 96 小時後才逐漸平緩，顯示模場中微生物存活狀況應較第 5 週差，呼吸試驗中所提供營養源需更長時間才能消耗完畢。

由上述 6 週次累積攝氧量曲線圖可發現，BC 組及 F3B 組在呼吸試驗中皆有較佳的攝氧趨勢，PS 組次之，ALL 組攝氧曲線在前第 4 週較為圓滑，顯示土壤中微生物族群應相當穩定，但第 5 週時，攝氧曲線明顯呈現穩定上升後平緩趨勢，顯示土壤微生物族群應已減少，故反應瓶中微生物需花費更多時間使族群增加行降解反應。而由攝氧累積曲線較不易看出微生物活性趨勢，故後續以各週次間採集土壤的生物呼吸試驗在 24 小時內攝氧率平均值所繪製之趨勢變化圖進行活性分析。

圖 5-35 為呼吸儀試驗連續 6 週各週次之第 24 小時攝氧率的變化圖，BC 菌在第 1 週達到 4.4 mg-O₂/hr 後逐漸降低，曲線於第 4 週時再次上升至 3.5 mg-O₂/hr；F3B 菌攝氧率在第 1 週至第 3 週約為 4.7~5 mg-O₂/hr 之後逐漸降低；PS 菌在前 2 週攝氧率達到 4.8 mg-O₂/hr 之後逐漸降低；ALL 組在第 1 週攝氧率上升至 2.9 mg-O₂/hr，於第 3 週再次上升至 3.2 mg-O₂/hr 後逐漸下降，攝氧反應時程維持最久。

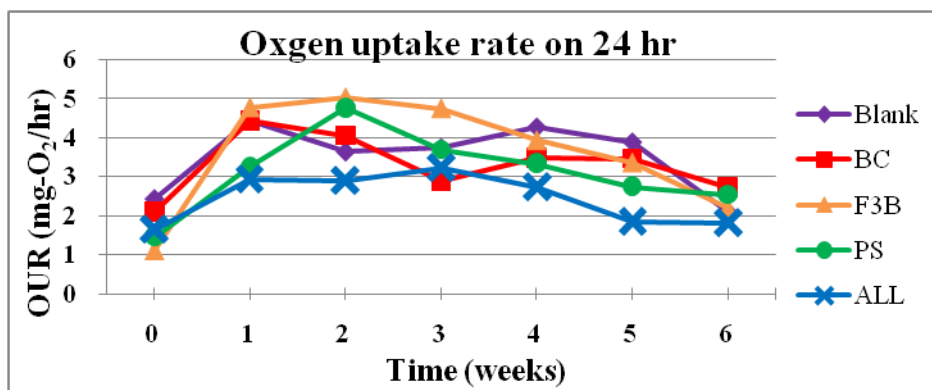


圖 5-35 植菌及添加營養鹽下各週次採集土壤之呼吸試驗 24 小時內微生物攝氧率趨勢圖

由各週次 24 小時內的攝氧率結果得知，未通氣的空白對照組在試驗過程中曲線起伏不定，可能是因為模場內原本氧氣含量稀少，多處於厭氧或缺氧狀態，但呼吸試驗時則受到強力供氧導致微生物需適應環境劇變，故使曲線起伏不定。在未添加營養源環境中，植種微生物 F3B 組約投入 3 週後活性提高，BC 組、PS 組及 ALL 組則在投入 4 週後活性提高，而在施加足量營養鹽的柴油污染土壤中，BC 組初期活性可延長至第 2 週，並於第 4 週時活性略有提高；F3B 組初期活性可維持至第 3 週後降低；PS 組可維持至第 2 週；ALL 組則能維持至第 4 週。

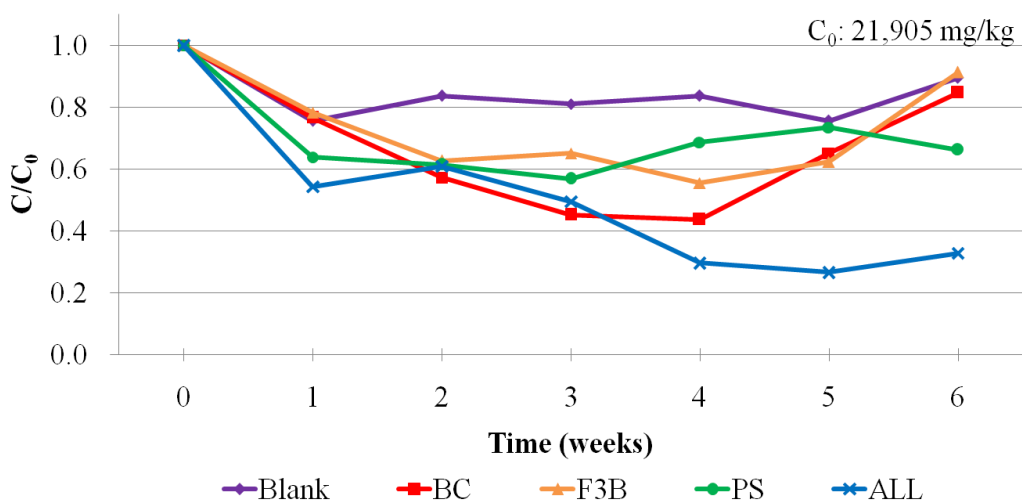


圖 5-36 生物通氣模場柴油濃度殘餘率變化趨勢圖

圖 5-36 為添加營養源後各植菌組柴油濃度殘餘率變化趨勢，對照圖 5-35 可發現各組初期的降解期皆能維持至第 2 或第 3 週，且柴油殘餘率也介於 50% 至 70%，明顯較未添加營養源前的柴油濃度殘餘率低，第 4 週後，ALL 組殘餘率更可達到 30% 以下，顯示混和菌在高濃度柴油污染下，比起單菌更能有效降解柴油濃度。而對照攝氧率與柴油濃度殘餘率圖後可發現，試驗開始 4 週內，兩者在曲線中能呈現一定程度的相關性，顯示此攝氧率曲線應能作為微生物降解過程中，微生物活性與污染物降解率間的參考，為後續可研究之方向。

5.12 生物通氣法相關操作參數之探討

氧氣：本研究使用風力驅動生物通氣設備及人造風場提供氧氣進入模場土壤層內，促使微生物生長及分解柴油濃度。而風速選用則依照台中及台南兩監測站測得之平均風速資料，分別為 1.6 m/s 及 3.2 m/s 作為實驗設計。模場架設完成後，使用風速計量測環境風速及管內風速，發現實際進入土壤層中之風量與環境實測風速有所差異，雖然模場使用人造風場於 24 小時不間斷進行通風，因此土壤層內氧氣濃度約能維持在約 18%，但未來若運用於實場整治上，則會受到地形及周遭建物等阻礙，使得設備操作期間未能全天候進

行通氣，並可能呈現間歇性風力、微風或無風等情形，亦是本研究試驗結果應用於實場中時，不易掌控的操作參數之一。氣泡式呼吸儀搭配生物泥漿法所進行之呼吸試驗則由鋼瓶提供充足氧氣，故此操作參數較不易影響實驗結果，惟管內壓力若未控制適當則會導致氣泡受壓差影響而不易產生，影響實驗結果。

擴散影響半徑：由添加營養源後所進行的擴散影響半徑試驗結果顯示，在風速 0.6m/s 條件下模場有效擴散半徑距離為 15 cm，經比較生物呼吸測試在 3 種距離的氧氣濃度後，雖然 D15 處氧氣濃度較低，僅 17.3%，但從 Mann Kendall Test 統計得出 Z Well 值可看出，即使土壤間氧氣濃度皆充足，但柴油降解趨勢仍與擴散影響距離呈反比，其原因可能是，中央通氣管附近的營養液受到通氣影響，而使土壤間擴散作用提高，更多微生物可運用其養分進行污染物降解。在實場整治方面，由於地質環境不比模場試驗的土壤質地單純，故應先考慮土壤層通氣的成效是否會受到限制，若經質地分析為不合適的環境，則應考慮以其他工法進行整治。在良好的土壤質地條件下（如砂質壤土）進行生物通氣時，由於地下土層環境無體積限制，故空氣經設備導入土層後，應能達到較完整的擴散面積，其擴散半徑中有效降解柴油的區域應能隨之提高，故本研究建議後續若有類似之模場設置，則可於模場外型鑿出適量通氣孔洞，以更符合實際土壤環境。

水分：由於模場中可定期以表面撒水方式溼潤土壤，故水分控管容易，但實場若進行生物通氣法整治時，其污染源通常位於地下數公尺，以表面撒水方式無法有效補充水分，需額外由通氣井或注入井將水分補充至污染區域，並藉由土壤擴散作用或通氣設備強力吹送方式，始能讓水分流通至其餘目標土壤間。

溫度：本研究土壤生物通氣模場因於室內進行相關試驗，故溫度變化較室外來得小，且通入風量受日夜溫差影響也較小；而實場整治中因為無法控制當日通入之風量及溫度，且高濃度柴油污染土壤多屬於地下環境，故土壤溫度不易控制且通常較低，導致微生物降解速率提昇不易。因此本研究在呼吸試驗中，以恆溫水域控制試驗中微生物處在適合降解碳氫化合物之溫度範圍，以提高微生物攝氧強度及其變化量，再予以推估實場微生物可能之活性範圍。

營養源：根據土壤元素分析結果，本研究之土壤模場內氮源及磷源明顯

不足，故採用尿素（ NH_2CONH_2 ）補充氮源，市售磷肥補充磷源，並以翻拌方式將營養鹽均勻拌入土壤中，提高微生物利用效率。然而實場整治過程中無法藉著翻拌方式將營養鹽均勻拌入土壤層中，通常會由通氣井投入合適比例的營養液，再利用空壓機等設備高壓輸送方式，始能讓營養鹽由通氣之井篩處向外移動。本研究採用的生物通氣系統是倚靠自然風力供給氧氣，通入壓力較低，營養液移動範圍有限，故未來若運用於實場整治時，需在成本考量之下以較密集的注入方式達到良好降解成效，而依照微生物的不同亦有各自適應之養分來源，若想維持其生物活性表現，則需於生物通氣法整治期間持續補充營養源，並避免過程中衍生二次污染。另一方面應考慮實場污染區是否有受到其他有機物或重金屬污染，造成微生物即使在合適的營養源比例下，仍未能有效率的降解柴油，反而出現抑制或毒化的情形發生。

攪拌方式：本研究使用生物泥漿法進行攪拌與供給氧氣等方式，協助微生物與污染物能有效接觸，促進微生物降解效果。當污染物從固相轉移至液相時，微生物隨之進行分解，而為了達到兩相間的平衡，因此污染物會再次從固相轉移至液相，如此週而復始不斷進行。而本研究污染物為柴油，其本身不溶於水，因此在試驗過程中必須以攪拌或提供營養源等方式協助微生物接觸柴油，進行反應後始能得到微生物攝氧量之相關數據，故兩相間的質傳效率亦為相當重要的限制因子。而從文獻中可發現未經攪拌之試驗土壤有階梯式攝氧情形，其原因為表層土壤未經擾動時，微生物進行反應所產生之 CO_2 被累積於土壤間，當累積至足以通過表層土壤時，才能由 KOH 吸收，故氧氣補充為間歇性，攝氧量曲線有如階梯一樣。但從本研究試驗結果得知，由於柴油本身不易溶於水，但適當的攪拌過程仍已經有效避免文獻中出現的階梯式攝氧狀況，雖然無法使柴油直接有效溶於液相中，但仍能改善質傳的限制。

另一方面，藉由改善攪拌基座也可提高泥漿間微生物接觸效率，如本研究採用往復式恆溫震盪水浴使泥漿得以攪拌及恆溫控制，但由於往復震盪過程中會導致泥漿液面起伏不定，偶有泥漿濺入二氧化碳吸收管之情形，量雖稀少但若未能注意恐會影響數據結果，故建議可改為由馬達統一帶動之磁石攪拌器，使轉速一致且泥漿液面平穩之優點，但試驗機組則需置於恆溫空間進行，以免受溫差影響導致氣泡產生體積不一致。

柴油降解菌：本研究於生物通氣模場中除了為土壤中原生微生物建立良好通氣環境外，亦添加足量營養源營造合適的降解環境，但由相關試驗結果可看出，經植種柴油降解菌的組別在污染物分解的效率上較未植菌時高，且

三種菌混合組亦較單一菌組別高，其結果可能為某微生物分解污染物所產生的代謝物，恰巧可為其餘微生物所利用，故彼此呈現協同作用而提高污染物降解效率，雖於本研究中未能分析及探討其代謝物產生狀況，但仍能由結果初步判斷應有協同作用產生，故顯示以生物通氣法進行污染整治時，植種微生物應考慮投入後是否會對原生微生物產生拮抗或協同作用，以避免整治成效受到影響。

風化後污染土壤：本計畫中以中油公司的新鮮柴油自行配置高濃度污染土壤進行生物通氣法相關試驗，但在實場污染區中經常可發現具有數年洩漏歷史的風化柴油污染土壤，其土壤中原生微生物生態與風化柴油的結構皆與自製模場的條件有所差異，因此本計畫使用的柴油降解菌應用於風化柴油污染土壤時，其活性與降解成效皆有可能呈現不同的趨勢，故在植菌種前應再次進行反應槽微生物降解試驗，以找出最佳的單菌組或複合菌組投入實場中。

5.13 微生物活性指標探討

本研究以氣泡式呼吸儀搭配生物泥漿法，於生物通氣模場採集土樣後進行生物呼吸試驗，監測 5 天所累積的攝氧量曲線，評估土壤中微生物可能的生長情形，未經簡化的攝氧率曲線因監控軟體每 10 分鐘自動紀錄 1 點，數據圖表顯得密集且紊亂，故在以算術平均方式將攝氧率數據量化後，以 24 小時為單位連續繪製 3 點作圖。然而若要作為土壤模場中微生物活性指標，則應考慮指標的時間單位是否具備立即性，且能否涵蓋足夠的微生物攝氧反應，再考慮到呼吸試驗環境與土壤生物通氣模場有著攪拌方式與供養方式的差異，若指標時間拉長恐會讓試驗結果與模場情形呈現截然不同的方向，最終判斷 24 小時內幾乎可發現微生物有較明顯的攝氧反應，故以此為指標基準。本研究認為以活性曲線作為指標，比起總菌落數測定需耗時兩天，且菌落計算常有變異性大之缺點，活性曲線較能穩定看出每週生物活性趨勢，且經由試驗結果更能清楚呈現營養鹽添加前後微生物攝氧的週期變化，實屬研究中重大貢獻。

呼吸試驗操作條件中，營養鹽使用尿素及小善存進行補充，並不受土壤模場中營養鹽濃度影響，故添加之配比一致化的前提下，可觀察到微生物若族群數量充足，呼吸試驗 24 小時內可將污染物反應完畢，攝氧曲線趨於平緩；

若族群數量減少，則於 48 小時至 72 小時後，攝氧曲線才能趨於平緩。而土壤生物通氣模場無添加營養源時，微生物則需在呼吸試驗中獲得營養源，故皆以 24 小時內進行增長並與污染物反應，而攝氧反應明顯所致。因此由 5 天呼吸試驗之結果，除可利用攝氧率觀察微生物當週活性趨勢，亦可從累積攝氧量曲線看出土壤中微生物的族群生存情形，使操作人員在判讀微生物活性時，能有較精準且有科學根據的表達方式。雖然活性曲線與柴油濃度降解趨勢圖相比較時，因生物通氣模場畢竟為土壤層通氣環境，故可能於試驗期間促使其他微生物與污染物反應過程中，有相關代謝物產生，而受到呼吸試驗環境不同影響，此情形恐無法忠實呈現。而植菌且添加營養源 4 週後濃度變化趨勢圖雖已不利於進行比較，但考慮呼吸試驗所得數據及其指標呈現方式，應仍能提供土壤生物通氣模場微生物當時存活狀況。

5.14 結論

在本研究進行呼吸試驗時，以震盪轉速 140 rpm、恆溫 32°C、操作壓力 2.2~2.5 psi 條件下，添加足量尿素與小善存溶液作為營養鹽，其 5 日間攝氧率可觀察微生物當週活性趨勢，亦可從累積攝氧量曲線評估土壤中微生物族群的生存情形，使操作人員能以較精準且有科學根據的方式，判斷微生物活性。

於生物通氣模場進行氣體擴散半徑試驗結果得知，模場有效擴散半徑為 15 cm，對照模場內不同距離之氧氣濃度後可發現，距離中央通氣管 25 cm 處有較高於 15 cm 處之氧氣濃度，但恐因距離通氣管較遠，營養液不易受到氣流推動而使土壤間無良好的擴散情形，故降解趨勢經 Mann Kendall Test 判定為無明顯柴油污染物降解現象。

三種微生物混菌組 (ALL 組)於生物通氣模場添加營養源試驗中，有效促使柴油濃度大幅降低，柴油濃度殘餘率可達 0.30，相較其餘植菌組有最佳的柴油降解趨勢。顯示混菌組中應有微生物於降解過程中產生之代謝物，能供其餘菌種運用，使菌種間產生協同作用，幫助降解柴油污染物。

由呼吸試驗中微生物活性趨勢圖可發現，生物通氣模場未添加營養源時，微生物需適應模場環境 2 週至 3 週後，活性才有提昇；營養源添加後，BC 組及 PS 組微生物活性可連續提高 2 週，F3B 組活性可連續提高 3 週，ALL 組活性則能連續提高 4 週後才逐漸降低。

5.15 建議

本研究進行呼吸試驗時，以往復式恆溫震盪水域作為攪拌基座，可同時進行攪拌及恆溫控制，然而震盪過程中會導致泥漿液面起伏不定，若泥漿因此濺入二氧化碳吸收管恐會影響準確性，建議可改為由馬達統一帶動之磁石攪拌器，使轉速一致化以及達到均勻攪拌之要求，然而試驗機組則需置於恆溫空間進行，以免受溫差影響導致氣泡產生體積不一致。

本研究以人造風場營造不間斷風力條件進行生物通氣法相關試驗，然而實場整治時未必常有連續通風狀況，故可能導致土壤層中氧氣濃度起伏不定，因此建議後續研究可改變不同風力條件，探討土壤間氧氣濃度對微生物活性影響評估，及微生物降解柴油污染物所需最低氧氣濃度值等方向，進行生物通氣法成效之研究。

由本研究中呼吸試驗結果所得到的微生物累積攝氧量曲線及活性趨勢圖，可用以判斷土壤模場中，微生物生長情形及營養源對其降解反應之影響，故建議後續研究可由此監測方法輔以土壤 EA 元素分析，於微生物活性降低時適時補充被耗盡的營養源，使整治過程中投入的資源更為經濟且有效率。

六、參考文獻

- Brown, R.A., R.E. Hinchee, R.D. Norris and J.T. Wilson (1996). "Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons: A Flexible, Variable Speed Technology," Remediation, 6 (3), 95-109.
- Gibson, D.T. (1971). "Microbial Degradation of Hydrocarbons," pp. 667-696. In: Goldberg, E. D. (ed.) , Physical and chemical sciences research report I. Dahlem Workshop Report on the Nature of Sea Water.
- Hinchee, R.E. and S.K. Ong (1992) . "A Rapid In Situ Respiration Test for Measuring Aerobic Biodegradation Rates of Hydrocarbons in Soil," Journal of the Air & Waste Management Association. 42: 1305-1312.
- King, N.J. (1978). The Oil Industry and Microbial Ecosystem, Heyden and Sons.
- Leeson, A., and R.E. Hinchee. (1997). Soil Bioventing Principles and Practice, Lewis Publishers, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Pamukcu, S. (1997). "Electro-Chemical Technologies for In-situ Restoration of Contaminated Subsurface Soils," Electronic J. Geotechnical Engineering.
- Rastogi, M., S. Singh and H. Pathak (2002). "Emission of Carbon Dioxide from Soil," Current Science 82 (5) : 510-517.
- Dominguez, R. C., J. Leu and M. Bettahar (2012). "Sustainable Wind-driven Bioventing at a Petroleum Hydrocarbon-Impacted Site." Wiley Periodicals, 65-78.
- 史盟秀,「BTEX 在幾種台灣主要土壤中之吸附與降解」,碩士論文,國立屏東科技大學環境工程與科學系,2001。
- 行政院環境保護署,「98 年度土壤及地下水污染整治年報」,第 50-51 頁,2009。
- 行政院環境保護署,「土壤中總石油碳氫化合物(TPHs)檢測之研究」,中華民國行政院環境保護署環境檢驗所研究報告,2003。
- 行政院環境保護署,「土壤中總石油碳氫化合物檢測方法」,氣相層析儀／火焰離子化偵測器法,2007。
- 行政院環境保護署,「油品類儲槽系統土壤及地下水污染整治技術選取、系統設計要點與注意事項參考手冊印製」,1996。

- 邱明良，「受多環芳香族碳氫化合物—萘、菲污染土壤之生物復育研究」，中興大學，第 160-170 頁，2000。
- 車明道，「土壤受氯化碳氫化合物污染整治技術與問題評析」，第六屆土壤污染防治研討會—受有機污染物污染之整治復育技術論文集，第 61-95 頁，1999。
- 江舟峰，「氣泡式呼吸儀的測定原理與操作技巧 技術研究報告」，朝陽科技大學，2001。
- 洪瑞敏，「活性污泥之呼吸儀毒性試驗研究」，朝陽科技大學，第 63-66 頁，2003。
- 倪佩君，「柴油污染土壤之代謝研究」，崑山科技大學，第 30-31 頁，2011。
- 陳俊宏，「生化需氧量呼吸儀測定法之研究」。朝陽科技大學，第 12-13 頁，2003。
- 黃德坤、陳大麟、林舜龍 等，「環境法醫技術應用在油污染源之鑑定」。《工業污染防治》，期 91，23-41。台北市，經濟部工業局，2008。
- 許東鳴，「淡水河流域水文時空變異分析」，碩士論文，國立中央大學水文與海洋科學研究所，桃園，2009。
- 曾依雷，「柴油降解菌組合的最佳化」。碩士論文，國立成功大學環境工程系研究所，台南，2005。
- 劉高登，「受到機油污染土壤之代謝及復育之研究」，崑山科技大學，2006。