

國立交通大學

環境工程研究所

碩士論文

下水污泥堆肥應用於受柴油污染土壤現地處理之研究

Applied sewage sludge compost to
diesel-contaminated soil *in-situ* treatment



研究生：張仕音

指導教授：林志高 博士

中華民國九十三年八月

下水污泥堆肥應用於受柴油污染土壤現地處理之研究

Applied sewage sludge compost to diesel-contaminated
soil *in-situ* treatment

研究生：張仕音

Student : Shih-In Chang

指導教授：林志高 博士

Advisor : Dr.Jih-Gaw Lin



A Thesis

Submitted to Department of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Environmental Engineering

August, 2004/8/12

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十三年八月

誌謝

在將近兩年的研究生生涯裡，終於到了該畫下句點的時候，伴隨我在實驗研究的路途上，有許多生活中的點點滴滴及數不完的片段回憶，這一路上有許多學長姐、同學、學弟妹、朋友及家裡成員的陪伴，使得醉心於實驗室的日子雖然辛苦但倒也怡然自得。

該感謝的人很多，首先要感謝指導教授 林志高博士，不管在實驗的架構、分析方法或是論文的撰寫上，都給予很大的幫助，其悉心的指導以及在茲念茲的諄諄教誨、耳提面命，讓我銘感五內，在此獻上萬分的謝意；感謝 陳勝一學長在實驗上的諸多建議以及在論文撰寫方面的修訂，使得本論文研究方向和整體架構上更加明確，另外，在口試期間，承蒙 賴俊吉老師、陳重元 老師及 何公亮博士三位口試委員的指正和給予許多寶貴意見，使得本論文能更加充實且詳細完整。

在研究室方面，首先感謝大家平時接受我冷笑話的茶毒，讓夏天的研究室充滿涼意，冬天的研究室徹底結冰，謝謝實況野球專家的宏旭學長、成熟穩重充滿男人味，但是講笑話比我還冷的志誠學長、嫵媚動人的秀鳳學姐、身材高大超用功的宏邦學長、喜歡插一隻皮夾在屁股上的人傑學長還有講話很老實的揚根、談吐溫雅的榮杰、擅長多功能虛擬實境模擬動畫的高手憲昌加上本所最漂亮的佳紘學妹、身材瘦小又愛軋車的理安學弟、很帥氣但不愛穿襪子的少奇學弟，有了你們在研究上的相互砥礪、縱使實驗履敗也能履戰，在多次挑燈夜戰的夜晚亦不覺得孤單。

最後要感謝我的家人在我就學期間，沒有因為很少回家而碎碎念，以及吾姊惠盆在英文部分文法的指正、吾弟仲瑋在電腦軟體資源上的免費提供、強迫我聽故事又愛搶電視看的瓊蓁，使得我在研究生涯中有了無比的助力與動力，另外，還有因提筆匆促而未能提及的好友們，在此，一併向你們致上十二萬分的謝意。

結束了在新竹的求學生涯，無限的感激將長駐我心，緊接著即將踏入職場，追求另一個人生目標，此刻將以更認真的態度追尋更精采的人生，再會了，風城。

張仕音 謹誌於交通大學環工所



下水污泥堆肥應用於受柴油污染土壤現地處理之研究

學生：張仕音

指導教授：林志高 博士

國立交通大學環境工程研究所

摘要

近幾年，石化產品之汽油、柴油及其他化學成品等高污染性的有機化合物在貯存和運輸方面十分頻繁而造成環境污染之事件層出不窮對於生態環境所造成的影響甚鉅。本研究所採用之生物復育技術是相當經濟且有效的油污染處理技術。利用污水廠之污泥予以堆肥後做為受柴油污染土壤的營養鹽和改良劑，模擬受柴油污染土壤現地復育之方式利用中央合成設計 (CCD) 與反應曲面法 (RSM) 作為實驗統計分析之工具，以摻合比 (濕重) 與水分含量作為實驗因子，再加上以溫度為正交區集設計，經由 MINITAB 統計軟體產生一反應曲面並探討獨立變數與反應變數之間的數學模式關係，探討其迴歸係數及變異數分析等相關數據並進行控制組之實驗分析。

由反應曲面結果可以知道生物降解最佳含水率範圍約在最大含水量之 20%-65% 間，且可知摻合比分別在最高 (土壤和堆肥在濕基下，1:1 之重量摻合比例) 和最低 (土壤和堆肥在濕基下，1:0.1 之重量摻合比例) 摻合比中有最顯著之效果。而上述摻合比中可發現，在降解初期約 10 至 15 天中，產生較快的降解，降解率約 50 至 55%，在最後 20 至 30 天，則有較緩慢之降解，降解率約 10 至 13%。由迴歸係數分析，可知含水率和摻合比無相互作用 (intereaction) 關係，但是溫度對生物之降解影響

相當顯著，亦即在冬天進行現地復育時，降解效率會較差。從滅菌組實驗中可發現只有 11% 之降解效果，故可知本研究之降解過程，主要係生物降解所產生。由配適一階反應模式得知具有相當高之相關係數，故可知本研究之降解過程，可由一階反應模式表示，最適當之摻合比係為 1:0.1 (濕重)，且其動力常數 K 值大於未添加堆肥於土壤中之兩倍。

關鍵詞: 柴油、堆肥、中央合成設計法、一階反應動力模式



Applied sewage sludge compost to diesel-contaminated soil *in-situ* treatment

Student : Shih-In Chang

Advisor : Dr. Jih-Gaw Lin

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

In recent years ,leakage of various petroleum hydrocarbons from underground storage tanks primarily at automobile service stations and from pipelines has been experienced at an alarming rate. It would become a environmental pollution accident. Bioremediation with compost is the most cost-effective clean-up technology for the treatment of diesel-contaminated soil. Central composite design (CCD) and response surface method (RSM) of bioremediation experiments were used to construct second order response surfaces for the total petroleum hydrocarbons (TPH) degradation rate to investigate the effects of compost amendment. Fourteen fixed volume batch reactors were designed by central composite design (CCD). The CCD was applied with two design factors (mix ratio and water content) and a block orthogonally (temperature). The experiment data for the central composite design (CCD) was generated by MINITAB. Total cell counts in soil samples were stained by the dye, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

The results showed that TPH of contaminated soil decreased in all treatments during bioremediation process. Addition of compost to contaminated soil showed a more rapid TPH reduction that occurred in the early stage (within about 10-15 days), i.e. 50-55% of TPH can be degraded. The 10-13% TPH reduction was obtained in the final stage (within about 20-30 days) with a slower degradation rate. By Estimated Regression Coefficients for TPH, the interaction of mix ratio and water content was insignificant ($P=0.868$). The biological reaction in

bioremediation process of the diesel contaminated soil was the major reaction, since the biocide (control experiment) was only 11% TPH reduction. The data of the bioremediation process were well described by a first order model. The degradation rate constant of TPH in the appropriate mix ratio was two times greater than that of contaminated soil only. The appropriate mix ratio (wet weight basis) of contaminated soil and compost was 1 to 0.1.

Keywords : Diesel; compost; central composite design; first order reaction



目錄

摘要	I
英文摘要	III
目錄	V
圖目錄	VIII
表目錄	X
第一章 前言	1
1-1 研究緣起	1
1-2 動機及目的	2
第二章 文獻回顧	4
2-1 石油碳氫化合物之組成	4
2-2 柴油之基本性質	4
2-3 柴油在環境中之宿命	7
2-3-1 有機污染物在土壤及地下水中的傳輸	10
2-4 柴油污染對環境之危害	10
2-5 柴油污染和無機物污染對生物之影響	11
2-5-1 柴油污染對土壤微生物之影響	11
2-5-2 無機物污染對生物之影響	12
2-6 柴油對人類健康之影響	14
2-7 影響土壤微生物活性因子	14
2-8 污染場址之復育技術	20
2-8-1 現地處理 (In-situ treatment)	22
2-8-2 離地處理 (ex-situ treatment)	23
2-9 實驗設計方法介紹	24
2-9-1 中央合成設計	24
2-9-2 反應曲面法和區集劃分	25
第三章 實驗設備及實驗方法	27
3-1 研究流程	27
3-2 實驗方法	31
3-2-1 土壤和堆肥之基本性質分析	31
3-2-2 土壤 pH 值	31
3-2-3 土壤電導度測定	32
3-2-4 含水率	32

3-2-5 田間容水量.....	33
3-2-6 有機碳含量.....	33
3-2-7 土壤質地分析.....	34
3-2-8 陽離子交換容量.....	36
3-2-9 重金屬分析.....	36
3-3 受柴油污染土壤採樣及萃取方法.....	38
3-4 實驗中總石油碳氫化合物之 (TPH _D) 分析.....	39
3-4-1 設備及材料.....	39
3-4-2 分析步驟.....	39
3-4-3 氣相層析分析.....	40
3-4-4 柴油成份分析.....	40
3-5 品質保證與品質管制 (QA/QC).....	42
3-5-1 建立起始檢量線.....	42
3-5-2 檢量線的線性和確認.....	42
3-5-3 柴油類有機物 (Diesel range organics, DRO) 之外標準品校正.....	43
3-5-4 方法偵測極限 (Method Detection Limit, MDL).....	44
3-5-5 空白樣品分析 (Blank).....	44
3-5-6 重覆樣品分析 (Duplicate).....	44
3-5-7 添加樣品分析 (Spike sample analysis).....	44
3-6 生物菌數測定.....	45
3-6-1 分析方法.....	45
3-6-2 觀察 (Visualization).....	45
3-7 實驗設備.....	47
3-7-1 反應槽.....	47
3-7 實驗設備及藥品.....	48
3-8 堆肥實驗.....	49
3-9 實驗設計與分析.....	52
3-10 單一因子之實驗規劃.....	57
3-10-1 TPH _D 降解之動力模式探討.....	59
第四章 結果與討論.....	60
4-1 基本性質分析之結果.....	60
4-2 反應級數之探討.....	62
4-3 實驗設計結果.....	62
4-3-1 統計分析.....	63
4-3-2 配適二階模型之設計.....	63
4-3-3 模型適當性與常態性假設檢驗.....	72
4-4 單一因子實驗規劃結果.....	76

4-5 生物菌數結果.....	86
4-6 生物降解過程中之 EC、PH 之變化.....	89
4-7 品質保證與品質管制 (QA/QC)	92
4-7-1 檢量線配製.....	92
4-7-2 方法偵測極限 (Method detection limit).....	92
4-7-3 空白分析 (Blank).....	92
4-7-5 重覆分析 (Duplicate).....	93
4-7-6 添加樣品分析 (spike sample analysis).....	93
第五章 結論與建議.....	97
5-1 結論	97
5-2 建議.....	99
第六章 參考文獻.....	100



圖目錄

圖 2-3-1、有機污染物之宿命	9
圖 2-8-1、現地生物處理與其他處理方式費用之比較	21
圖 3-1-1、柴油溶液揮發觀察圖	29
圖 3-1-2、實驗流程.....	30
圖 3-2-1、正三角形土壤質地分類圖	35
圖 3-3-1、網格狀之系統採樣方式.....	38
圖 3-4-1、烷類標準品 (ASTM D5307) 之層析圖譜.....	41
圖 3-7-1、柴油降解實驗之反應槽剖面圖	47
圖 3-8-1、堆肥反應槽.....	50
圖 3-8-2、堆肥實驗流程圖.....	51
圖 3-9-1、反應曲面法流程圖.....	54
圖 3-9-2、二因子中央合成設計之組成圖解：左上為因子部份區集、右上 為軸部份區集`.....	56
圖 4-3-1、TPH _D 在區集 31°C 下不同摻合比降解率之變化 (A) 在不同摻 合比下和含水率下之變化 (B) 在土壤與水分含量為 1:0.55 和 67% 時之三重覆分析.....	68
圖 4-3-2、TPH _D 在區集 15°C 下不同摻合比降解率之變化 (A) 在不同摻 合比下和含水率下之變化 (B) 在土壤與水分含量為 1:0.55 和 67% 時之三重覆分析.....	69
圖 4-3-3、TPH _D 之殘差與常態分佈	73
圖 4-3-4、殘差與配適值的圖	74
圖 4-3-5、TPH _D 之反應曲面法結果 (A) 反應曲面圖 (B) 等高線圖	75
圖 4-4-1、TPH _D 濃度隨時間降解之過程 (A)各摻合比之實驗組 (B)控制組	81
圖 4-4-2、實驗組 (1:0.1) 之 TPH _D 降解層析圖譜 (A)起始濃度 (B)最終濃 度.....	82
圖 4-4-3、堆肥組之 TPH _D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度.....	83
圖 4-4-4、土壤組之 TPH _D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度.....	84
圖 4-4-5、滅菌組之 TPH _D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度.....	85
圖 4-5-1、利用 DAPI 染色配合螢光顯微鏡所觀察到之微生物總菌數圖	87
圖 4-5-2、TPH _D 降解過程之總菌數分佈圖 (A)不同摻合比下之實驗 (B) 單獨土壤、單獨堆肥和滅菌實驗.....	88
圖 4-6-1、實驗過程中之 pH 值監測 (A) 不同摻合比下之實驗 (B) 單獨 土壤、單獨堆肥和滅菌實驗	90
圖 4-6-2、實驗過程中之 EC 值監測 (A) 不同摻合比下之實驗 (B) 單獨	

土壤、單獨堆肥和滅菌實驗	91
圖 4-7-1、柴油標準品之檢量線圖	94



表目錄

表 2-7-1、生物復育之影響因子	18
表 2-8-1、石油碳氫化合物於土壤與堆肥混合 21 天之質量平衡	23
表 3-4-1、柴油烷類標準品 (n-alkanes) 各成分之組成	41
表 3-7-1、實驗使用之儀器設備及藥品	48
表 3-9-1、中央合成設計水準與編碼	55
表 3-10-1、單一因子之實驗規劃	58
表 4-1-1、土壤與堆肥之基本性質分析	61
表 4-3-1、堆肥添加實驗之 TPH _D 在 30 天之降解和預測一階動力模式之 各項參數 (31°C 下之因子部分區集)	65
表 4-3-2、堆肥添加實驗之 TPH _D 在 30 天之降解和預測一階動力模式之 各項參數 (15°C 下之軸部分區集)	66
表 4-3-3、可旋轉之正交區集中央合成設計	67
表 4-3-4、迴歸係數預測 TPH _D 降解率之結果	70
表 4-3-5、TPH _D 之變異數分析	70
表 4-3-6、預測 TPH _D 之迴歸係數	71
表 4-4-1、土壤受柴油污染降解過程之 TPH _D (mg/kg) 實驗組	79
表 4-4-2、土壤受柴油污染降解過程之 TPH _D (mg/kg) 控制組	80
表 4-7-1、重金屬分析與陽離子交換實驗之線性相關係數	94
表 4-7-2、方法偵測極限 (A) TPH _D 實驗 (B) 重金屬與陽離子交換實驗	95
表 4-7-3、空白分析、添加回收率與再現性 (A) TPH _D 實驗 (B) 金屬與陽 離子交換實驗之空白分析、添加回收率與再現性	96

第一章 前言

1-1 研究緣起

隨著工商業的發展，石化燃料已成為當今各國之必需能源，而且其需求量也逐年提高，也使得石化產品之汽油、柴油及其他化學成品等高污染性的有機化合物在貯存和運輸方面變得十分頻繁，因此造成環境污染之機率亦相對提高。

中國石油股份有限公司（以下簡稱中油公司）之新中管線於民國八十四年十月間測試通油時，在台一號省道之後龍溪橋路段發生管線油品漏油事件，該漏油事件中約洩漏高級柴油 220 公秉。然而，洩漏之高級柴油流入後龍溪水後流達至出海口處。由於氣候及潮汐作用之影響，使部份柴油回流至後龍溪與西湖溪之感潮河段中，全程約 7-8 公里，對於生態環境所造成的影響甚鉅。事件發生後，中油公司除採取緊急應變措施，清除浮油、清理洩漏源處之污染土壤，並立即委託台灣油礦探勘總處進行漏油處地下水文調查、設置監測井及油污抽除等初步調查與整治工作。

而在事件發生三年後，中油公司及其相關單位對於沿岸河床所吸附之油污並未有具體之處理措施，故在經過三年之自然衰減後，發現受污染程度最高的區域，乃為西湖溪南岸支流採樣區和西湖溪西濱公路上支流墓地旁採樣區，其中最高達 2406 ppm，其餘更有不少地方超過 1000 ppm。以現今土壤污染管制法之總石油碳氫化合物 (Total petroleum hydrocarbons 以下均簡稱 TPH_D) 濃度為 1000 ppm。

在民國 92 年之後龍溪污染土壤計畫期間，經由民眾反映，於後龍溪

及西湖溪之河床底質仍可見殘存之油污染，再由該年度計畫進行採樣、評估調查後確認得知主要污染區塊中柴油總石油碳氫化合物濃度經自然衰減作用，已低於 100 ppm，可知污染已獲得相當顯著之改善 (童翔新等，1999)。

1-2 動機及目的

土壤污染是繼水污染、廢棄物污染及空氣污染問題後，必須再面臨的環保問題，但其污染防治工作卻是其中最為困難的。近年來，油污染事件頻傳，且由於土壤受油品污染的面積及體積通常都相當地大，復育工作通常困難重重。而若要改善受到油品污染的土壤，通常需依賴微生物的分解作用來移除，因此目前有許多增加微生物活性的方法，都可以有效地縮短土壤復育所需要的時間。例如利用大量地施予有機物刺激生物生長、控制較佳的含水率來提供微生物適合生長的條件、並以物理方式鬆土以增加空氣的供應量，或者是利用氮、磷等營養素加速微生物之生長及分解污染物之速率 (Alexander, 1994)。

以廢水處理廠而言，在妥善處理率提高後，其場區污泥產生量大幅增加，加上廢棄物清理法重新修訂，污泥已從單純清運而必須進行妥善處理與處置。在此前提下，污泥處理與處置費用日益加重的情形下，常會造成處理業者極大的負擔，污泥減量於近年來才再次受到業界重視，而目前各產、官、學界針對如何藉由廠內污泥減量，才能夠有效降低廢水處理場操作成本和避免二次污染等問題，均有相當廣泛地研究成果發表。

近年來許多研究針對特定的有機污染物，利用堆肥化過程加以降解，而達到了相當好的復育效果，例如可將污染的土壤與堆肥混合進行生物復

育，Namkoong *et al.*, (2002) 利用堆肥反應槽以堆肥摻合受柴油污染的土壤，結果發現於 30 天後可有效降解 98.4%，這主要是因為堆肥富含多樣化之微生物相及多量之有機質。

本次研究乃進行模擬受柴油污染土壤現地復育之方式並利用污水廠之污泥予以堆肥後做為受柴油污染土壤的營養鹽和改良劑，再依中央合成設計 (CCD) 與反應曲面法 (RSM) 作為實驗統計分析之工具，以摻合比 (濕重) 與水分含量作為實驗因子，再加上以溫度為正交區集設計，經由 MINITAB 統計軟體產生一反應曲面並探討獨立變數與反應變數之間的數學模式關係，探討其迴歸係數及變異數分析等相關數據並進行控制組之實驗分析。利用污泥堆肥之原因，乃是堆肥會產生穩定化，類似腐植土之產品，可以用來改良土壤，而且其粘性也會降低，在施用上不會造成困擾，加上堆肥裡面之有機質不但可以有效地改善土壤的物理性質，降低土壤的塑性及凝結性與增加土壤的保水能力，且能維持土壤的良好結構、增加陽離子交換能力並降低微量元素的流失，然而經消化後的穩定污泥還可以安全的放置在土地表面，而不會有臭味及病虫害傳播的顧慮 (Cecil, *et al.*, 2001)。

第二章 文獻回顧

2-1 石油碳氫化合物之組成

石油碳氫化合物 (Petroleum hydrocarbons) 含有相當複雜之混合成分，一般而言，可分為四個部份：飽和烴 (saturates)、芳香烴 (aromatics)、樹脂 (N, S, O) 和瀝青質 (asphaltene)。

在飽和烴部分 (saturates fraction)，分為直鏈烷類 (normal alkanes)，支鏈烷類 (isoalkanes) 和環烷類 (naphthenes)。在芳香烴部分則是分為揮發性單一芳香族如苯 (benzene)、甲苯 (toluene)、二甲苯 (xylenes) 等，多環芳香族碳氫化合物 (polyaromatic hydrocarbons)、(naphthenoaromatics)、芳香族硫化物如 thiophenes 和 dibenzothiophenes。在樹脂 (N, S, O) 和瀝青質 (asphaltene) 部分包含了極性分子如氮、硫和氧。其中，樹脂乃為可真實溶解於油中之無定形固體，而瀝青質 (asphaltene) 則為延散在油中之大分子膠體。綜合上述，這四部份在不同油類中之相對比例分配往往需依賴許多因子，如其來源、地質歷史、年代、移動和原油的改變等 (Balba *et al.*, 1998 ; Shell International Ltd, 1983)。

2-2 柴油之基本性質

柴油乃為由原油中蒸餾出來的重質碳氫化合物，其組成大約含 30% 的直鏈烷類 (n-alkanes)、45% 的烷類異構物和環烷類 (iso- and cycloalkanes)，以及 24% 芳香族碳氫化合物 (aromatic)，另外還有極少量的異戊二化合物 (isoprenoids)、硫化物、氮化物及氧化物等，本研究所

使用之柴油係購至中油公司之標準柴油，其性質如表 2-2-1 (Zytner, *et al.*, 2001 ; Lee, *et al.*,1992)。

柴油有機物 (diesel range organics, DRO) 在經過 GC-FID 分析圖譜和烷類標準品分析相互比較後，可發現其相當於烷類從 C₁₀ 到 C₂₃ 的範圍，其涵蓋的化合物沸點，約在 170 到 275 間，如圖 2-2-1 所示。



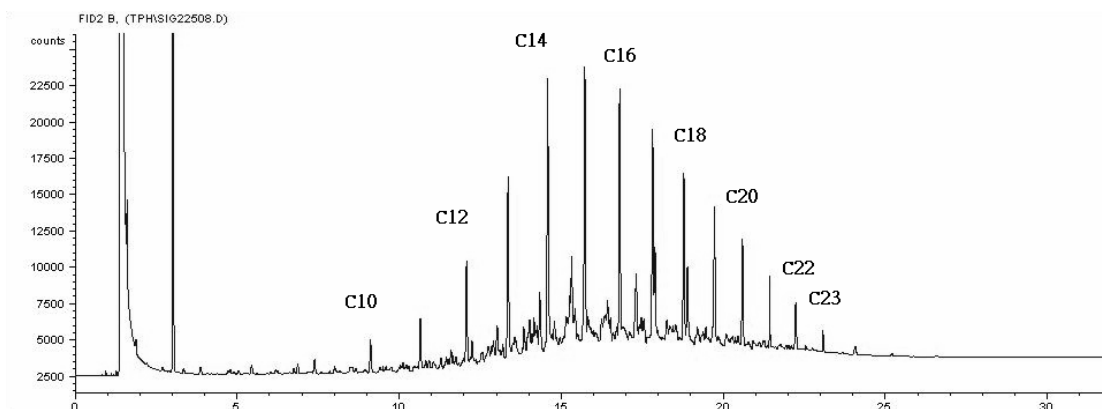


圖 2-2-1 、柴油 (中油) 標準溶液層析圖譜

表 2-2-1、中國柴油標準性質 (中國石油公司出品；黃靖雄，1996)

性質	試驗法	普通柴油	高級柴油
揮發性	蒸餾試驗法 90% 時 ()	675 以下	550 以下
閃火點	()	125 以上	115 以上
著火性	十六烷值法 (CN 法)	40 以上	47 以上
粘度	賽氏秒法 (SUS 於 100)	45 以下	38 以下
流動點	華氏度法 ()	30 以下	15 以下
含硫量	重量百分數法 (% 重量)	1.25 以下	0.5 以下
殘碳量	10% 殘碳量法 (% 重量)	0.35 以下	0.15 以下
殘灰量	重量百分數法 (% 重量)	0.02 以下	0.01 以下
水及沈澱物	體積百分數法 (% 體積)	0.1 以下	微量
腐蝕性	銅試片法	NO.1 以下	NO.1 以下

2-3 柴油在環境中之宿命

柴油在環境中之移動、命運及分布途徑，常根據溶解度、蒸氣壓、化合物在系統中作用過程及化合物之安定性等，分別有光分解、揮發、逕流損失、土壤吸附、淋洗、生物分解及化學分解等，如圖 2-3-1 所示。

(1) 光分解

當柴油受到陽光照射時，由於其強大之紫外線光會將柴油支鏈、或是環烷類化合物之化學結構破壞，但是由於土壤的透光率很低，一般該反應只發生在土壤表面上，作用較小，且只能處理未被混入土中之污染物質及在乾旱時，因毛細現象溶出至地表之污染物質。



(2) 揮發作用

柴油乃屬於半揮發性有機物，其進入土壤後有一部分會被吸附，而另一部分會游離而不被吸附，兩者間會呈平衡狀態，平衡後被吸附與游離二者之比例，即取決於柴油在土壤表面上之吸附作用常數。其未被土壤吸附之柴油因平衡破壞，重新平衡而再游離出部分揮發性有機物，如此一來，土壤中揮發性部分之柴油可逐漸揮發至大氣中。而柴油之揮發作用大小，常取決於其蒸氣壓、環境的溫度，及視土壤性質和水分含量等狀況而定，而空氣吹過土壤表面時，亦會加速揮發作用。

(3) 逕流損失


由於柴油不易溶於水，故其在水相中的遷移主要係吸附在土壤顆粒物

上，再經由逕流或侵蝕所產生的機械遷移，而造成柴油之損失，由於污染過後之柴油，大多數係沈積在土壤表層內，故一般不易造成地下水污染，但容易因沖刷作用而造水域的嚴重污染。

(4) 土壤之吸附作用

柴油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。這些作用係取決於柴油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。

(5) 生物分解作用



柴油在微生物代謝過程中，柴油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)。此種變質乃指柴油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。有機污染物在經過微生物逐漸分解後，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。

(6) 化學分解作用

柴油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。

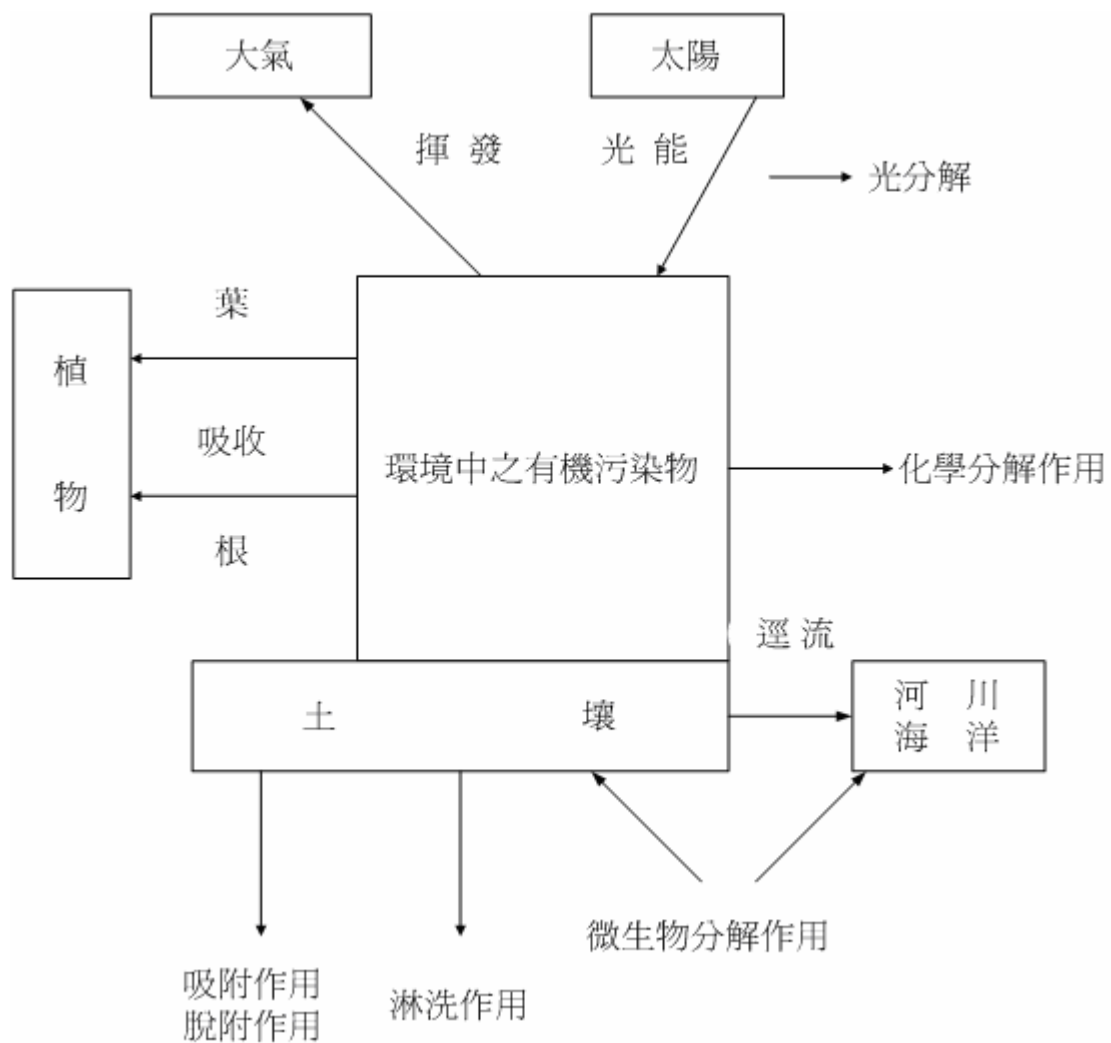


圖 2-3-1、有機污染物之宿命 (王一雄等，1995)

2-3-1 有機污染物在土壤及地下水中的傳輸

有機污染物在土壤中之傳輸移動，不像在水中或空氣中，可以四面八方任意擴散，而乃是由擴散作用 (Diffusion) 與整體移動二種過程，而污染物在土壤中移動之總量為擴散作用與整體移動二種過程之總和。有機污染物之擴散作用會受到土壤中之固體物質如無機礦物與有機質之阻礙，因此有機污染物在土壤中之擴散分散，受到土壤系統中之複雜性之影響很大。而主要影響有機污染物之因子有土壤水分含量、土壤吸附作用、土體密度及土壤溫度等。有機污染物在土壤剖面上之移動，包括由於土壤的機械耕種與細微粒子被水分運送，另有由土壤表面沖刷造成之地面逕流而運送，水分流動所生成之有機污染物，在土壤剖面中之整體運送狀況，主要乃決定於水流之方向和速率，和有機污染被土壤吸附的特性 (王一雄等，1997)。



2-4 柴油污染對環境之危害

柴油對環境之危害常因儲油槽遭受腐蝕而破裂產生漏油、油管破裂、廢油品任意傾倒或意外洩漏等情事而造成洩漏進入土壤或地下水中影響環境，加上外在環境物化特性的改變而使污染物經由脫附、揮發、擴散等作用，使土壤傳輸至地表空氣中，由此可知柴油對環境之污染範圍相當廣泛 (Alexander, 1994)，而在柴油進入土壤後，各種不同之生物都有可能受到影響，例如土壤微生物、動物、植物等，甚至人類會因食用受污染之動植物而可能遭受到更大之危害。

2-5 柴油污染和無機物污染對生物之影響

生物在生長時會因為忍耐力之不同而對污染物有不同之忍耐力，有些生物由於忍耐力較弱，亦即對污染物較敏感，就容易受到傷害，而有的生物具有抗污染物之能力，通常較不容易受到危害，而一旦污染濃度增加至超過生物之忍受程度時，將易導致生物死亡。在本研究中，土壤污染物除了有機污染物柴油外，還有土壤和堆肥本身之無機污染物如重金屬、無機氮、無機磷和鹽分污染等，不管是有機污染物或是無機污染物都會對生物造成影響，故針對有機污染物與無機污染物方面之影響將於結果中討論。

2-5-1 柴油污染對土壤微生物之影響

土壤微生物在過多之柴油濃度存在下，將會對土壤微生物的形態、數目和活性等造成相當的影響，而影響的程度和狀況，將取決於柴油之濃度、污染方式及土壤性質與氣候因子，被柴油污染影響土壤微生物之情況有：

(1) 不影響或輕微的影響

即較低柴油濃度在土壤中，對土壤微生物可能不會造成影響或僅有些微之影響。

(2) 直接的影響或間接的影響

柴油對土壤微生物所產生之直接影響係因土壤性質之影響或誘發原本無活性的潛伏微生物活性，而間接影響係以間接方式影響其他土壤微生物。

物活性而造成之影響。

(3) 刺激性的影響或抑制性的影響

柴油因富含有多種碳氫化合物，故可當作土壤微生物之碳源，而促進微生物之活性，但也可能對土壤微生物造成毒害而抑制其生長。

(4) 非專一性的影響

柴油主要乃是由碳氫化合物所組成，故能分解碳氫化合物之微生物種類相當地多，因此可以發現本研究所針對多數甚至全部種類之微生物都會有影響 (Del and Franca, 2001)。



(5) 暫時性的影響或持續性的影響

此一現象將視土壤受柴油污染濃度多寡而定，亦即當柴油污染濃度過量時有可能永久的殺死土壤微生物，而足量之柴油濃度可能暫時的抑制土壤微生物活性。

2-5-2 無機物污染對生物之影響

由於河川乃因經常或間歇被河水淹沒，故常衍生豐富之濕地生態資源，其中有許多生長在濕地之植物，常會因為污染情事的發生加上保持維護不易，而導致生長受到威脅。

在土壤中的無機物主要可分為植物生長之必要元素 (Essential

elements) 和非為植物生長之必要元素 (Non-essential)，而植物若從土壤中獲取過量或是不必要之元素，都會對其產生毒害。無機污染物在土壤中會因為錯合、吸附、沈澱、氧化還原作用加上土壤 pH、有機質含量、陽離子交換能力等作用，而使得植物也由這些途徑受到了影響 (王一雄等，2001)。

一般無機物影響方面主要有重金屬、無機氮、無機磷和鹽分污染等。而針對這些無機物污染部分，對於植物生長之影響分別敘述如下：

(1) 重金屬和微量元素之影響

在重金屬方面，由於各種重金屬對各種植物之毒害程度不同，故使得植物因忍耐度之差異而有不同之毒害症狀，較易分解之重金屬乃稱為生物有效性重金屬 (bioavailability of heavy metal)，其可藉由添加磷肥、腐植質、有機質及提高 pH 值等，在土壤中將其分解，而重金屬對微生物的毒害性由大至小可以排列成 $\text{Cr}(\text{VI}) > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Zn}$ (Volker *et al.*, 2002)。

(2) 無機氮和無機磷之影響

在無機氮、無機磷方面，可以知道氮是植物生長所需消耗之大量元素，但是一旦吸收過多會造成營養過剩甚至其它不良影響，而無機磷乃為植物生長之必要元素，常為植物之率限制因子，且磷常以磷酸鹽之形式進入土壤中，也因此而容易與鈣、鎂、鐵等形成難溶性化合物而導致上述營養元素之缺乏。

(3) 鹽分污染之影響

在鹽分污染方面，土壤中若鹽分過高，將易導致產生過高之滲透壓 (High osmotic pressure)，阻止植物吸收水分，進而妨礙其生長甚至造成枯萎。故一般在鹽分污染方面，係以土壤飽和抽出液之電導度 (Electrical conductivity, EC) 表示，亦即定義為大於 4 mmho/cm (或 ds/cm) 稱之為鹽土。

2-6 柴油對人類健康之影響

柴油中的苯及芳香烴是致癌性物質，硫會導致車輛的觸媒轉化器中毒及排放的有害粒狀物質。因此將柴油低硫化、低芳香烴化乃是未來的環保趨勢。另外，油品中的脂肪族碳氫化合物亦會對人體造成危害，其進入人體之主要路徑為肺及皮膚等，主要會造成頭痛、反胃、過敏及神經系統受損等病狀，加上脂肪族碳氫化合物為良好的溶劑，當人體吸入肺後會造成肺泡及細胞膜受損。由於芳香族碳氫化合物乃是油品中較毒之成分，人體一旦經由呼吸系統吸入或是經由皮膚接觸等途徑攝取，將造成骨骼細胞損傷、白血球減少、貧血、頭痛等病症 (童翔新等，1999)。

2-7 影響土壤微生物活性因子


柴油在土壤環境中之宿命和行徑，受到土壤微生物之影響相當地大，土壤微生物族群構成一個生化上的複雜系統，且能分解大多數之柴油，土壤微生物族群之活性常受到土壤有機物含量、水分含量、透氣性、溫度及

酸鹼度之影響，而微生物之活性往往影響其在土壤環境中分解油品之能力(陳谷汎等，2002)。影響微生物在土壤中分解柴油之主要因子之討論如下：

(1) 土壤有機物含量

土壤中之有機物能促進及穩定土壤之團粒作用，增加土壤通氣及提高透水性，減少逕流或沖蝕之害、增加陽離子交換能力以降低微量元素的流。土壤有機質具有極大之表面積，可吸附大量之油品，而吸附油品之方式，為同時具有表面吸附與深入內層吸附，對油品之吸收量大增，故其吸附作用和土壤有機質之關係相當密切。

(2) 土壤水分含量



當土壤水分過多時，將使得土壤孔隙被水分填滿，形成缺氧狀態，易導致微生物活性不佳，而土壤水分過少時，乾燥的土壤內會因為有機污染物被土壤吸附，而沒有擴散作用，故隨著水分含量之增加，水分競爭土壤表面之吸附中心，造成部分油品被水分子取代而自土壤中脫附，即迅速地增加污染物之擴散作用，這是由於水分子具有極性，使水成為離子性溶質之優良溶劑，大部分的油品與粘土礦物間之作用，都涉及以水當作媒體，許多污染物之蒸氣壓很低，必須在土壤水中以擴散作用或整體移動方式接近粘土礦物之表面。

(3) 土壤透氣性

一般而言，粗質的土壤通氣情況通常會比細質的土壤要來的好，而若土壤的有機質含量多也會較土壤較疏鬆的好，但越深層的土壤則因壓實的

關係而使通氣較不良，王一雄等 (1995) 提出的數據中顯示，在土層深度 3~8cm 可以展現出較大的微生物群和微生物活性，在自然界中好氧性微生物為較大部分，所以在通氣良好的土壤環境中，將能展現出較大之微生物活性，且在分解土壤有機物方面會有較佳的效果 (Rhykerd et al., 1999)。

(4) 溫度

溫度為影響微生物生長速率之重要因子，土壤的溫度會影響土壤中微生物之活動與繁殖，其中最重要的是影響微生物之活性。在低溫時，微生物之活性會較低，故造成整個生物分解速率降低，而高溫時，微生物代謝碳氫化合物的速率會加快，由 Q10 定理得知，溫度每上升 10^{°C}，微生物的代謝速率會增加兩倍。



(5) 土壤酸鹼度

pH 會影響重金屬等無機物之沈澱和溶解作用，也因而影響了污染物在土壤中之移動性。對於不同屬種的微生物而言，均有其最適當的土壤酸鹼度範圍，然而大部分微生物生長之最適酸鹼度為 pH 6 至 7.5 之中性偏微酸性之範圍 (王一雄，1997)。

童翔新等 (1999) 認為 pH 在大多數之生物復育中，其調整大多沒有必要，除非是受污染場址之 pH 特別極端或因生物降解使得 pH 造成明顯之變化，才需做調整。

(6) 其它

綜合上述，並針對其它生物降解之影響因子，如表 2-7-1 所述。



表 2-7-1、生物復育之影響因子 (Bopathy, 2000)

影響生物復育之主要因子

微生物

- 生長直到達到臨界生物質量
- 突變和水平基因的轉換
- 豐富的微生物群
- 代謝毒物之產生

環境

- 優先物質的消耗
- 營養鹽的缺乏
- 環境條件的抑制



物質

- 污染物濃度太低
- 污染物之化學結構
- 污染物之毒性
- 污染物之溶解度

生物好氧或厭氧過程

- 好氧/減少 潛能
- 有效的電子接受者
- 場址中微生物群的存在

生長基質與共代謝

污染物的種類

濃度

碳源存在交替

微生物之相互影響 (競爭, 交替, 和掠奪)

污染物的物化生物有效性

吸收平衡

不可逆的吸收

合併至腐植質

質量轉換的限制

氧的傳輸和溶解

營養鹽的傳輸

溶解度/可溶混性/和水



2-8 污染場址之復育技術

隨著土壤復育技術之發展，近年來已成為了相當成熟的科技，從文獻上得知以澳洲及紐西蘭之經驗，在一個面積分布範圍廣大之污染場址上，且沒有很高污染物質濃度的時候，即在管制標準兩倍以內，利用翻轉法為合適之整治方法，另外，翻轉法比排土客土及淋洗法具有優勢，這是因為以台灣環境現況要找尋適合的棄土放置場實屬不易，且利用化學淋洗的方法在成本考量上將較不具經濟效益，故以該方法做為本研究之復育方法，乃為較適當之考量，如果在高濃度污染區域 (hot spot) 時，亦即超過法規標準之三倍以上時稱之，亦可考慮利用其他整治方式進行整治 (葉琮裕、王瑞斌，2002)。



而依據復育目的主要可以區分為控制方法與清除方法，控制方法主要係利用工程技術，以有效減少或避免污染物質進入土壤中，該方法在施行時往往須配合清除技術，才能達到預期效果。一般而言，土壤復育技術大致可歸類為以下三種：

(1) 生物處理方法

該法主要乃利用微生物而去除污染物質，亦即將污染物降解或是轉變成低毒性或是無毒性之程度，其原理乃是在含有污染物質的環境下進行好氧或厭氧分解，配合充分的水分和利用微生物生存及成長所需之營養鹽及碳源來提供微生物生長之營養基質和分解污染物之微生物來源，而藉此來降低或是消除環境污染物，若以經濟成本考量，生物處理方法將比其他物化處理方法來得要低廉且不易破壞環境等之優點，如圖 2-8-1 所示。

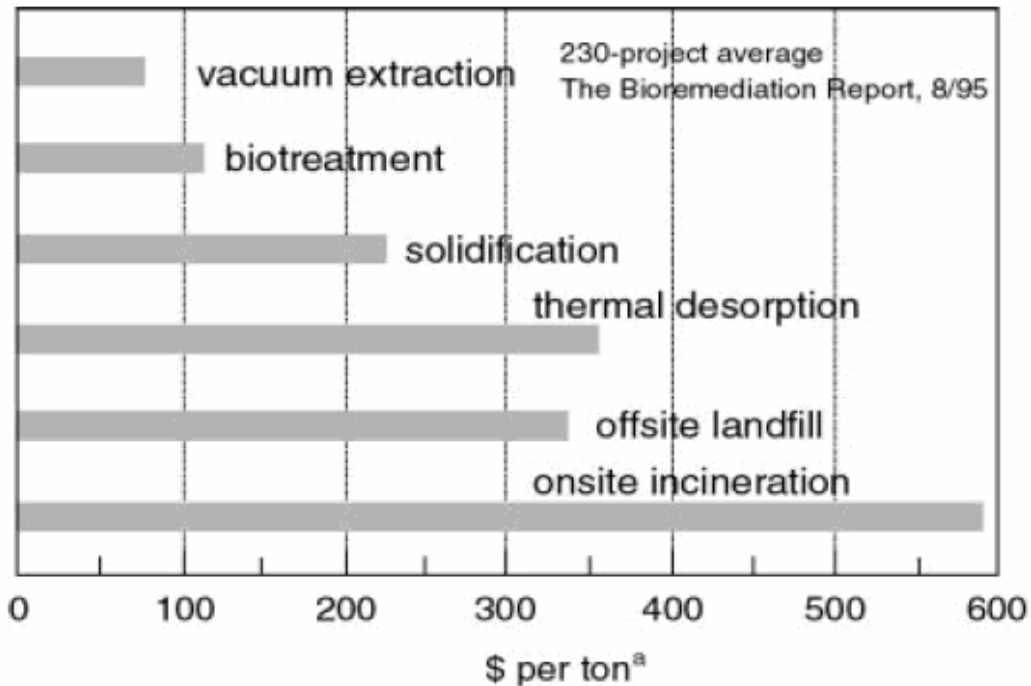


圖 2-8-1、現地生物處理與其他處理方式費用之比較 (Glass, 1995)

(2) 物理或化學處理方法



該法係使污染物表現出各種不同型態及種類，進而運用萃取、提出、化學除毒等機制，加以去除，如：沈澱與化學吸附作用、氧化或還原作用、固體之吸附作用及微生物的新陳代謝作用等。

(3) 工程處理法

即利用傳統工程機具進行客土、排土、翻轉等方式進行復育。目前國內針對受油污染之土壤主要乃採取自然衰減方式 (natural attenuation) 處理，而在實施生物復育工作時，若能配合上述翻耕方法使有機污染物在土壤內重新分布則不失為更相當有效率之辦法。

一般而言，針對油污染事件，較引人注目的技術乃生物處理方法，因為它可以適用在現地 (in-situ) 處理，也可以適用於離地 (ex-situ) 處理兩

大類。

2-8-1 現地處理 (In-situ treatment)

即對於受污染之土壤或地下水所在地加以處理，一般而言，現階段之土壤復育技術之發展以現地處理較受重視，主要優點是因為對操作人員之危害性甚少、且可保存地上建築物、經處理後，周圍之土地尚可利用、所需成本也較經濟，但是也有必須擴大場址的調查與監測、清除方式需考量程序控制及土壤種類之影響、且必須考量分離及控制方法等缺點 (張添晉等，1997)。

一般而言，現地處理包含有許多不同技術，大部分相同的方式亦即增加氧氣的有效性，如生物氣提法 (bioventing)、添加過氧化氫 (H_2O_2) 注入井內，或是利用添加營養鹽方式，如客土、翻土法再配合添加土壤改良劑、膨鬆劑 (bulking agents) 如木屑、稻草等，該方法乃為本研究所採用之方式，而其應用於現地處理之質量平衡如表 2-8-1 所示，由表中可知以堆肥混合受污染土壤其主要分解產物為二氧化碳 (CO_2)。而有些案例，係植種特殊能降解該污染物質之微生物進行生物降解 (Zytner *et al.*, 2001)。

表 2-8-1、石油碳氫化合物於土壤與堆肥混合 21 天之
質量平衡 (Hupe, 1996)

各部份組成	起始碳濃度部份 (%)
TPH _D 之萃取	8
揮發	4
轉換成 CO ₂	59
難分解有機物	24
微生物質量	4

2-8-2 離地處理 (ex-situ treatment)

離地處理 (ex-situ treatment)，也就是將受污染之土壤或地下水搬離至其它地方再加以處理。不過，離場處理比就地處理有較快、較容易控制且能處理更多種污染物及土壤種類之優點，但也因為離地處理之關係，故所花費之整治成本會較高。如上節所述，就地處理則比離場處理較為方便且較為經濟，加上若是處理通透性較高的土壤會有較佳的效果。

而以生物處理方進行離地處理，Cassidy *et al.*, (1997) 和 Puskas *et al.* (1995) 利用生物反應槽，其包含和現地處理相同之處理方式，但是係將土壤挖掘並轉移至反應槽內進行，利用反應槽之處理優點為可以利用均勻攪拌之方式達到氧氣和營養鹽之均勻散布，且可以在處理時適時地提高溫度，而達到相當良好之降解效果。Jorgensen, *et al.* (2000) 則利用堆肥以生物堆方式分別處理受礦油和柴油污染之土壤，結果礦油濃度由 2400 mg/kg 降解至 700 mg/kg 約 70%，而柴油濃度由 700 mg/kg 降解至 200 mg/kg 約 71% 之效果。

2-9 實驗設計方法介紹

對於多變數因子實驗系統之因子影響效應探討及最適化研究，常常會有不同因子與因子間交互影響效應存在；如果使用傳統的「一組實驗探討一個因子」之實驗設計方法，在固定其他因子，只改變一個因子水準下來進行探討，常會因各變數間所存在的交互影響效應，而無法得到真正的最佳條件組合。中央合成設計 (Central composite design) 與反應曲面法 (Response Surface Methodology, RSM) 為一結合數學應用、統計分析與實驗設計之技術，探討獨立變數與反應變數之間的數學模式關係，經由所關心的實驗區域內以有系統的方式進行實驗，進而求得所需要的反應值及變數值。

2-9-1 中央合成設計



一般而言，在實驗過程中，以因子設計 (factorial designs) 是最具效率的實驗，也就是除了可以瞭解因子之主效應關係外，還可以減少實驗之組數。故常用之線性統計模型為：

$$y = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

其中 μ 是總平均效應， τ_i 是列因子第 i 個水準的效應， β_j 是行因子第 j 個水準的效應， $(\tau\beta)_{ij}$ 是 τ_i 和 β_j 之間的交互作用效應，和 ϵ_{ij} 是隨機誤差項。然而當我們在探討因子之間的主效應是否顯著時，常常也需考慮到其交互作用是否也會影響整個實驗結果，除非無交互作用的模型是適當的，故此時必需要考慮曲率的效應，也就是必須以一個更完整的二

階模型設計來觀測實驗範圍之變化，而為了配適二階模型，即可利用中央合成設計 (Central composite design)，一般來說，中央合成設計即包含了一個 2^k 因子 (或解析度 的部份因子) 設計， $2k$ 個軸點試驗，和 n_c 個中心點試驗。而本研究採用中央合成設計的另一方面考量，是因為其具有容納區集劃分的能力，亦即可以用區集的方式進行中央合成設計，進行更靈活的安排實驗設計 (Montgomery, 1998)。

2-9-2 反應曲面法和區集劃分

反應曲面法乃為有助於研究問題模型的建立以及利用數學方式統計的手法，將反應時和變數的影響找到最佳化的反應，一般而言，其函數可以由下列表示：


$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon$$

其中 ϵ 代表反應 y 中所觀察到的雜音或誤差。而該函數所代表的曲面就稱之為反應曲面。然而在大多數之反應曲面問題中，反應和獨立變數間關係之形式常常是未知的，因此需利用反應曲面來找出對於 y 和獨立變數間適當的近似函數關係。

當利用反應曲面設計時，對於會擾亂的變數需要考慮以區集劃分來去除其影響，為了使區集效應不會影響反應曲面模型的參數估計值，在 2^k 設計中使用 2^r 個區集設計，這些設計的中心點應均勻分布給區集，如此的設計被稱之為正交地區集 (block orthogonally)，而二階設計要能正交地區集，有兩個條件必須滿足，這兩個條件分別是

1. 每個區集必須是一個一階正交設計；亦即

$$\sum_{u=1}^{n_b} x_{iu} x_{ju} = 0 \quad i \neq j = 0, 1, \dots, k \quad \text{對所有的 } b$$

其中 x_{iu} 和 x_{ju} 為實驗的第 u 個試驗中的第 i 個和第 j 個變數的水準

及 $x_{0u} = 1$ 對所有的 u 。

2. 各變數的總平方和中由各區集所貢獻的部份的比例必須等於區集裡觀測值個數與總觀測值個數的比例；亦即

$$\frac{\sum_{u=1}^{n_b} x_{iu}^2}{\sum_{u=1}^N x_{iu}^2} = \frac{n_b}{N} \quad i = 1, 2, \dots, k \quad \text{對所有的 } b$$

其中 N 是試驗總次數。

在本研究中，由於所考慮的溫度因素係為自然環境下無法人為控制之因子，故將溫度以區集劃分來去除其影響，根據中華民國統計月報之資料調查近二年之平均最高溫和最低溫，再利用實驗室之恆溫箱控制在上述溫度以模擬在最高溫和最低溫時降解過程，最後在實驗結果探討其差異 (Prochazka, et al., 2003 ; Montgomery, 1998)。

第三章 實驗設備及實驗方法

3-1 研究流程

本研究為了要進行受柴油污染之模擬研究，首先進行相關文獻蒐集，以決定共有哪些因子會影響生物降解，而為了要瞭解因子之間之相互關係，並期望能在減少實驗組數之情形下，於是利用中央合成設計實驗方法並配合反應曲面，將實驗後之結果，對於因子之相互影響關係，以 F 檢定方式判斷影響因子之顯著效果，以做為降解結果之依據。

在進行實驗設計前先進行土壤與堆肥之基本性質分析，以便能掌握土壤和堆肥之特性和決定影響因子之範圍，才能針對有興趣之範圍進行實驗設計。



本研究室所使用模擬受柴油污染之土壤，乃是採自西湖溪之未受污染土壤，這是針對後龍溪污染事件所影響的河川中測得柴油濃度最高的地方，故以此地點之土壤做為具代表性之土壤，而堆肥係由台北市民生污水處理廠（目前已關廠）下水污泥經過醱酵過程所產生之營養鹽，期望能從本實驗之結果在往後類似柴油污染事件能有效率地解決污染問題。

為了模擬受柴油污染之土壤，做法係將風乾過篩後之土壤取 4kg 於反應槽中，然後將柴油 (2500mg/kg) 均勻噴灑在土壤上，並仔細地攪拌使柴油能在土壤中分佈均勻，由於柴油乃半揮發性有機物，為了避免揮發部分的柴油造成最終降解效果之誤判，故先做了一個月的揮發實驗，亦即將柴油裝在燒杯內，以秤重方式觀察柴油揮發部分一個月，結果發現柴油揮發部分在第一周的揮發量占整個揮發量的 80%，如圖 3-1-1 所示。故

將攪拌均勻之土壤靜置一周後使其揮發穩定後，再依不同摻合比加入堆肥，予以攪拌均勻及採樣分析以作為評估柴油污染之初始污染濃度，再按照中央合成設計所規定的組數，針對不同實驗組之不同控制條件，以均勻灑水方式，添加水分使其達到欲監測之含水率，再放至恆溫箱中設定欲監測之溫度，以完成實驗條件之控制。

除了每日翻堆以保持土壤良好的通氣狀態外，在水分控制方面，利用秤重方式以補充因揮發而損失之水分（在此乃將柴油之揮發、降解、氧化等作用忽略不計，土壤減少之重量主要乃為水分蒸發所導致），並定期採樣以氣相層析儀分析 TPH_D 濃度，再依據實驗設計後之結果，判斷影響因子之相互作用是否顯著，和檢定其模型的適當性，以進行最後再確認之實驗。實驗設計之分析項目乃以測定 TPH_D 為主，而在最後之確定實驗再進行 TPH_D 和總菌數、EC 值、pH 值等並進行探討，以求能充分地瞭解生物降解之成效。本研究之流程如圖 3-1-2 所示。

在控制組方面，為了要進一步確定柴油降解反應是否主要由生物降解所造成，故進行測定單獨土壤 (soil only) 實驗組、單獨堆肥 (compost only) 實驗組和滅菌 (biocide) 組，在滅菌組方面，乃針對降解率較高的實驗組之摻合比，再利用疊氮化鈉 (NaN₃) 做為生物的抑制劑，這是由於疊氮化鈉具有除霉性、殺菌性的特性，故選擇將疊氮化鈉做為滅菌組之抑制劑，滅菌方法係將 25g 疊氮化鈉 (NaN₃) 加入 100ml 之蒸餾水，並將攪拌均後，再以噴灑方式作成滅菌組 (Taylor and Viraraghavan, 1999)。

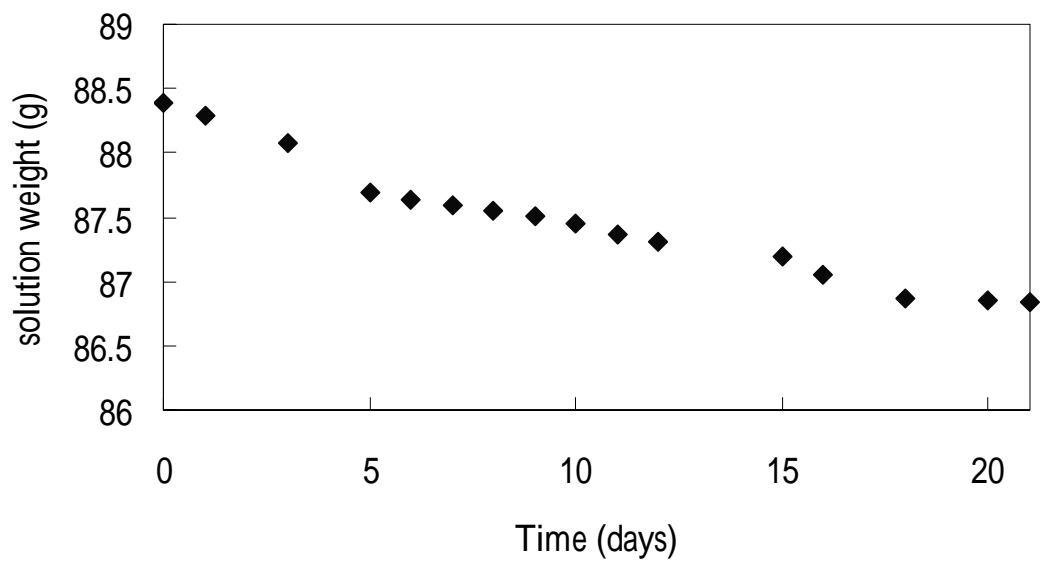


圖 3-1-1、柴油溶液揮發觀察圖



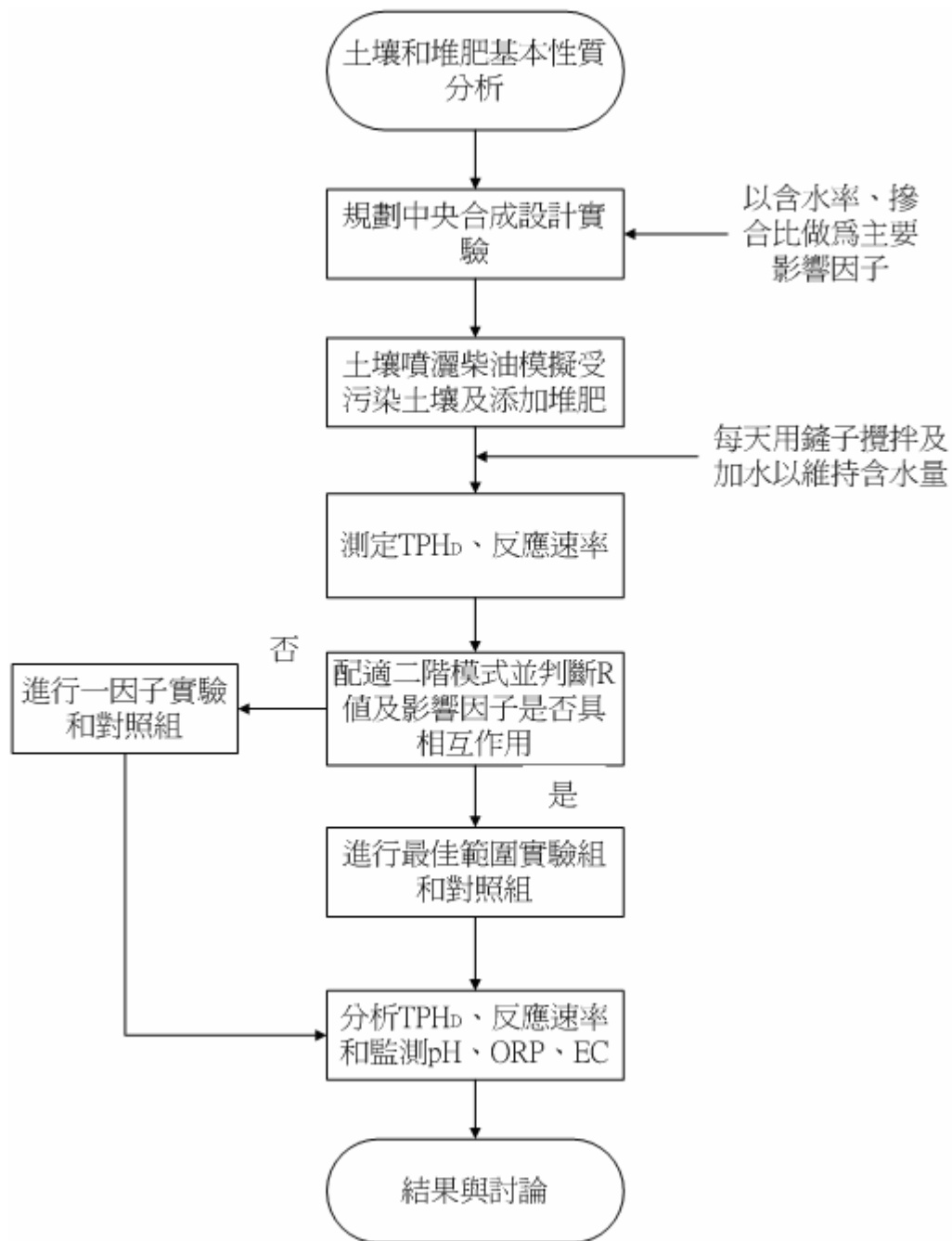


圖 3-1-2、實驗流程

3-2 實驗方法

3-2-1 土壤和堆肥之基本性質分析

本次實驗所使用的土壤乃是採自西湖溪西濱公路橋南岸下游小支流的土壤做為代表性的土壤，並於採集回來的土樣除去石礫、樹根、雜草及其它外來大型物等，經風乾後，磨碎使其通過 2mm 篩，而之所以過 2mm 篩，是因為土粒直徑在 2mm 以上者，一般統稱為石礫，而在 2mm 以下者才算為真正的土壤粒子 (王一雄，1997)，故需經由過篩後，再將之置放於保存箱中室溫保存。

另外欲摻合之營養鹽乃採自台北市民生污水處理廠 (目前已停廠) 污泥經堆肥化後之成品。為了使其均勻度相同，故也經風乾後先行磨碎後過 2mm 篩，再放置於保存箱中室溫中保存。

最後將上述之土壤和堆肥進行土壤 pH 值、含水率、有機質含量、陽離子交換容量、土壤質地分析等基本性質分析。

3-2-2 土壤 pH 值

土壤 pH 值之測定乃是根據環保署所研訂的土壤污染物檢測標準方法 (NIEA S410.60T)，取 20g 的土壤樣品於 50mL 的燒杯內，加入 20ml 的去離子水，並在 30 分鐘內攪拌懸浮液數次之後靜置約一小時，使其懸浮泥土沈澱，再利用校正後之 pH 計進行測定。如果所測得 pH 值大於 7，則需假設為石灰質土壤而進行前處理，即取 10g 的土壤樣品於 50mL 的燒杯中，加入 20mL 的 0.01M 之氯化鈣溶液，並在 30 分鐘內攪拌懸

浮液數次，之後靜置約 30 分鐘，使其懸浮泥土沈澱，再利用校正後之 pH 計進行測定，而報告結果為在 0.01 M 氯化鈣水溶液中測得之土壤酸鹼值。

3-2-3 土壤電導度測定

導電度計在測定前，宜以標準 KCl 溶液加以訂正，以確保樣品測定之準確性。導電度計所用之電極常數常將決定測定值之精確度，而在本實驗中乃以 1:1 土水比所得萃取液測定其結果。

一般土壤含鹽量高，導電度 (EC) 超過 2 ms/cm 鹽分所形成之滲透壓與水勢能相加，會使植物之張力提前達到可忍耐度 (土壤分析手冊，1995)。



3-2-4 含水率

含水率的測定方法是由環保署所研訂的土壤污染物檢測標準方法 (NIEA S280.61C)，方法為取乾淨附蓋稱量瓶置於烘箱內，以 105 ± 5 乾燥，然後蓋上蓋子移至乾燥器內冷卻至少 45 分鐘，測定稱量瓶的重量 (m_0)，精秤至 10 mg。以藥杓將 30 至 40 g 土壤置入稱量瓶中，加蓋精秤稱量瓶及土壤重 (m_1) 準確至 10 mg。將土壤、稱量瓶及瓶蓋放入 105 烘箱中，直至恆重。稱量瓶加蓋於乾燥器中冷卻器中冷卻至少 45 分鐘。取出加蓋稱量瓶，旋即精秤乾燥後土壤及稱量瓶重量 (m_2) 準確至 10 mg。

以下式乾重量為基礎計算水分含量百分比，重量百分比精確至 0.1

% :

$$\text{水分含量 } W_{H_2O}(m/m, \%) = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100$$

m_0 : 含蓋稱量瓶空重 (g)

m_1 : 含蓋稱量瓶及風乾土或田間含水土壤重 (g)

m_2 : 含蓋稱量瓶及烘乾土重 (g)

3-2-5 田間容水量

田間容水量 (Field capacity) 係指土壤中之水份，經重力而下降，至不再移動的水分含量。方法是將通過 40 號篩之風乾土樣，取出約 50 克，置於蒸發皿中，加少許清水拌和之，使成球狀，然後用拌和刀輕輕壓平之。再用滴管滴水一滴於壓平之土面上，如水點在 30 秒鐘內被土壤吸收，應再加少許清水拌和之。重複以上手續，直至水滴恰在 30 秒鐘內仍不被吸收，而擴散於壓平之面上呈光潤狀態者，此時之土壤水分含量即為田間之容水量，含水量測定方法和含水率相同 (易任，1986)。

3-2-6 有機碳含量

有機碳含量乃是採用 Walkley-Black 的方法，秤取 1.00 g 的風乾土壤樣品置於 500mL 三角燒瓶內，加入 1N K_2CrO_7 10mL 及 20mL 的濃硫酸，輕搖後靜置冷卻後，加入 100mL 的去離子水、5mL 的 H_3PO_4 及 2 滴 Diphenylamine 指示劑，再以 0.5N $FeSO_4$ 滴定之；滴定顏色由灰藍色開始滴定至綠色而達到滴定終點 (土壤分析手冊，1995)。

3-2-7 土壤質地分析

土壤質地是指土壤中大小粒子之分佈。更明確言之，是指土壤中砂粒、粉粒及黏粒含量之相對比例。由於土壤質地為影響土壤中物理化學反應之重要性質，故土壤質地乃是土壤基本性質分析中不可或缺之一項。本方法乃採用比重計法，即將土壤樣品經化學和物理之前處理，使土壤粒子分散。分散後之土壤粒子懸濁液於沈降筒內自然沈降，在一定時間，將一特製之比重計放入懸濁液內，測定土壤懸濁液之比重，然後可以依照史脫克斯定律 (Stokes` law) 之基本原理，將比重計讀數經由計算求得土壤樣品中砂粒、粉粒及黏粒之含量百分率，進換算而得到土壤中砂粒、粉粒及黏粒含量之相對比例，再由查圖 3-2-1，而判斷出土壤質地之性質 (土壤分析手冊，1995)。通常質地會影響土壤之通氣與排水，粗質地之土壤排水通氣好，但吸水能力較差；粘質地之土壤則易造成排水差、通氣不好，但吸水能力反而較差之情況。



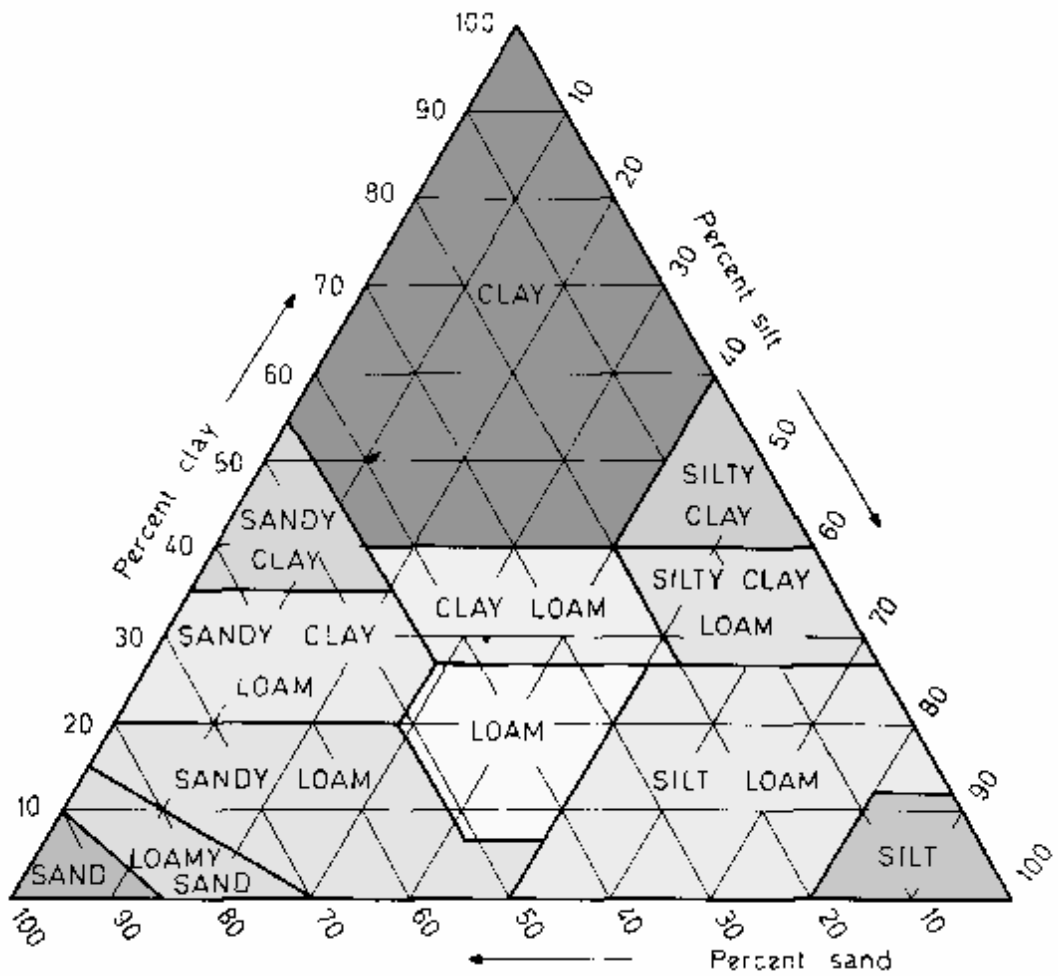


圖 3-2-1、正三角形土壤質地分類圖

3-2-8 陽離子交換容量

陽離子交換容量之測定乃是依據環保署所研訂的土壤污染物檢測標準方法 (NIEA S202.60A)。其方法乃先稱取 4.00g (精秤至 0.01g) 的風乾土壤，放置於離心管中，加入 33ml 1M 醋酸鈉溶液，試管加蓋，用振盪器振盪 5 分鐘，然後離心至溶液澄清為止。接著移出並丟棄上澄液，重覆上述步驟三次。加入 33ml 99% 異丙醇或 95% 乙醇，加蓋，用振盪器振盪 5 分鐘，然後離心至溶液澄清為止。然後丟棄上澄液，重覆上述步驟二次。加入 33ml 中性 1M 醋酸銨溶液，加蓋，用振盪器振盪 5 分鐘後，離心至溶液澄清為止，將洗滌液倒入 100ml A 級量瓶中。再重覆上述步驟二次，結合洗滌液以中性 1M 醋酸銨溶液定量至 100ml，用原子吸收或發射光譜儀或相當的方法測定鈉離子。

最後，以下列式子計算陽離子交換容量：

$$\text{陽離子交換容量 (meq/100g)} = \frac{C \times V}{W / (1 + R)} \times 100$$

C: 鈉離子濃度 (M)

V: 結合洗滌液以中性 1M 醋酸銨溶液稀釋後之最終體積 (mL)

W: 稱取經風乾之土壤重 (g)

R: 風乾土壤之水分含量

3-2-9 重金屬分析

本研究係根據環保署所研訂的土壤污染物檢測標準方法 (NIEA S321.63B) 檢測方法，並配合火焰式原子吸收光譜儀進行分析，其方法乃是稱取適量已經風乾處理之土壤樣品，將已預處理的土壤樣品以鹽酸和硝

酸混合，在室溫下靜置萃取 16 小時，再加熱至沸騰並迴流 2 小時。萃
出消化液經定量，再以適宜的原子光譜分析儀分析其濃度，並經下列式子
求出各重金屬濃度。

$$\text{土壤中各金屬元素(mg/kg)} = \frac{A \times V \times f \times 1000}{W \times 100 / (100 + W_{H_2O})}$$

其中

A：檢量線求得之濃度 (mg/l)

V：樣品經過濾或離心後定量之最終體積 (L)

f：上機測試時之稀釋倍數

W：風乾土壤之取樣量

W_{H_2O} ：土壤之水分含量



3-3 受柴油污染土壤採樣及萃取方法

在實驗過程中，每天將土樣用鏟子垂直翻轉以利保持好氧狀態下之分解及以稱重方式噴灑因揮發而損失之水分（在此乃假設土樣所減少之損失主要乃水分揮發所致，柴油之揮發和其氧化分解作用等，由於損失較少故忽略不計），以維持土樣的含水量，而採樣時，係利用系統採樣 (systematic grid sampling) 之方式，如圖 3-3-1 所示，系統採樣方法為提供於場址條件上較公正簡單的統計方法，通常比其他採樣計畫還優先考慮利用於預測污染場址的平均濃度、污染總量、分佈形態等 (Gilbert, 1987)。

將反應槽之土樣取六等分後以粗吸管插入反應槽之土樣中，重覆取樣後並混合攪拌以達均勻取樣目的，再秤取足量之土壤後，依照環保署所研訂之索式萃取法 (NIEA M165.00C)，該法除了適用於分離及濃縮不溶於水樣品的製備，還可確保萃取萃取溶劑與樣品基質密切接觸。將土壤置於圓筒濾紙中，加入無水硫酸鈉使其乾燥後，並以二氯甲烷和丙酮作為萃取溶劑，於一圓底瓶中，放入萃取溶劑及 1 或 2 粒乾淨沸石，將圓底瓶接至萃取設備，進行樣品萃取，以每小時 4 至 6 循環 (cycles / hr) 萃取 16 小時。最後以 K-D 濃縮裝置放入熱水浴中濃縮並以溶劑調整最終體積為 1.0 至 2.0 mL。

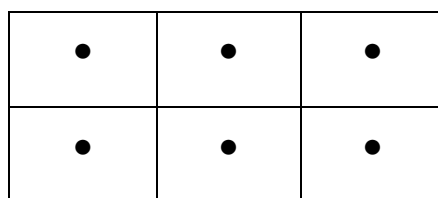


圖 3-3-1、網格狀之系統採樣方式。

3-4 實驗中總石油碳氫化合物之 (TPH_D) 分析

本實驗土壤中總石油碳氫化合物 (TPH_D) 之分析主要採用國內環保署公告之土壤及事業廢棄物中非鹵有機物檢測方法—氣相層析儀/火焰離子化偵測法 (GC/FID) 方法 (NIEA M611.00C) 為土壤中柴油 (TPH_D) 之分析方法，茲將分析方法之重點整理如下：

3-4-1 設備及材料

- (1) 氣相層析/火焰離子化偵測器 (GC/FID)
- (2) DB-5 管柱 (30-m length×0.53-mm internal diameter×1.5- μ m film)

3-4-2 分析步驟



(1) 直接注射

以注射器將萃取定容後之樣品直接注入 GC-FID 中。

(2) 氣相層析條件

載流氣體 (He) 流速：5 至 7 mL/分鐘

補充氣體 (He) 流速：30 mL/分鐘

注射埠溫度：200

偵測器溫度：340

升溫設定

起始溫度：45 ，維持 3 分鐘

升溫速度：45 以每分鐘 12 升溫至 275

最終溫度：275 ，維持 12 分鐘

3-4-3 氣相層析分析

分析柴油類有機物 (DRO) 時，係將 C_{10} 到 C_{23} 範圍內析出所有的波峰面積加總，亦即在 C_{10} 到 C_{23} 的滯留時間之間畫一水平的基線積分而得，如圖 4-6-2，而柴油類有機物 (DRO) 的層析條件會使管柱中的物質有相當程度的滲出，造成層析圖中的基線上升，故在分析 DRO 時，將執行此一圖譜面積扣除，並於每 12 小時內分析一二氯甲烷的空白，將樣品面積扣除此一空白面積後所得的面積差即為 DRO 的濃度，而進行氣相層析儀或氣相層析質譜儀之分析時，必須執行品管 (QC) 查核樣品分析來確認分析系統的功能。

3-4-4 柴油成份分析



為了要瞭解柴油總石油碳氫化合物 (TPH_D) 之成份組成，經由購置之烷類標準品 (ASTM D5307 Crude Oil Quantitative std.) 與文獻 (Jonge *et al.*, 1997) 進行柴油成份的確認，如圖 3-4-1、表 3-4-1 所示。由圖可知本實驗之柴TPH_D之濃度範圍為 C_{10} - C_{23} (沸點範圍乃 170 ~275 之間)，其中 Pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane, $C_{19}H_{40}$) 和 Phytane (2,6,10,14-tetramethylhexadecane, $C_{20}H_{42}$) 乃分別緊鄰 C_{17} 和 C_{18} 出現之支鏈化合物，為生物難分解之化合物，常可依此判斷生物降解過程中是否具有共代謝反應 (Puskas *et al.*, 1995)。

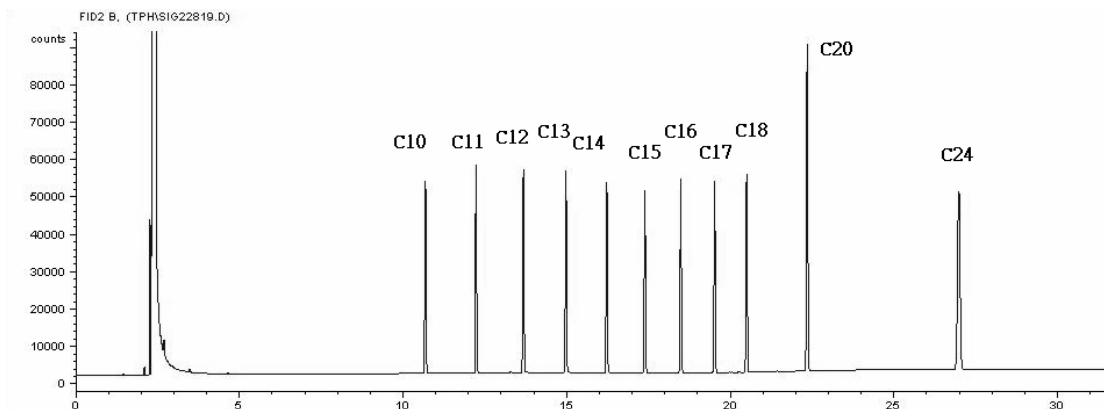


圖 3-4-1、烷類標準品 (ASTM D5307) 之層析圖譜

表 3-4-1、柴油烷類標準品 (n-alkanes) 各成分之組成

Hydrocarbons	Target TPH
C ₁₀ C ₂₂	Decane
C ₁₁ C ₂₄	Undecane
C ₁₂ C ₂₆	Dodecane
C ₁₃ C ₂₈	Tridecane
C ₁₄ C ₃₀	Tetradecane
C ₁₅ C ₃₂	Pentadecane
C ₁₆ C ₃₄	Hexadecane
C ₁₇ C ₃₆	Heptadecane
Pristane	2,6,10,14-tetramethylpentadecane
C ₁₈ C ₃₈	Octadecane
Phytane	2,6,10,14-tetramethylhexadecane
C ₂₀ C ₄₂	Elcosane
C ₂₄ C ₅₀	Tetracosane

(ASTM D5307 Crude Oil quantitative std. ; Wang, *et al.*, 1997)

3-5 品質保證與品質管制 (QA/QC)

本研究在為求保證分析結果的品質能符合某設定好之標準，利用一些步驟，應用統計學上的原理和方法，來評鑑或控制分析結果的準確度，以確保分析品質的可靠性、滿意度及經濟性。

3-5-1 建立起始檢量線

本方法係以注射針由索氏萃取法所得之固態樣品萃取液而導入系統，在導入模式須建立不同檢量線及設定氣相層析操作參數，使其在應用時，可供適當的儀器績效，而導入的方法係在實驗中以注射針取 239.8 μ l (取 240 μ l) 於中國石油加油站購買之標準柴油再以二氯甲烷 (dichloromethane) 定量至 100ml，依序列稀釋法分別配製 150、300、600、1500、3000ppm 等五種不同濃度之標準液，以一定之注射量 (1 μ l) 注入氣相層析儀中分析。

3-5-2 檢量線的線性和確認

若校正因子在工作範圍內之相對標準偏差 (RSD) 小於 20%，則可假設檢量線為通過原點之直線，而以平均校正因子代替檢量線作定量分析。若正因子在工作範圍內之相對標準偏差 (RSD) 大於 20%，則不能假設檢量線通過原點。

檢量線與滯留時間至少須每 12 小時確認一次，即以量測碳氫化合物標準品的滯留時間來確認，若待測物感應 (或計算濃度) 之偏差在起始檢量線 $\pm 15\%$ 以內，則可視起始檢量線仍為有效，而確認濃度係以 1500

ppm 之標準液做為檢量線之確認濃度。

所有在檢量線確認分析中之目標待測物均必須落在先前已建立之滯留時窗內，若有任一待測物不在所建立的時窗內，則必須採取修正措施復原系統或重新製作該化合物之檢量線。

溶劑空白和任何方法空白應與檢量線確認分析同時進行，以確定不致因實驗室污染而造成偽陽性之結果。

3-5-3 柴油類有機物 (Diesel range organics, DRO) 之外標準品校正

DRO 之校正與單一待測物有顯著的不同，最特別的是在滯留時窗範圍內的整體圖譜面積，包括在各個單一波峰下無法解析的混合物，都應該視為校正的感應。將待測物配製五種濃度之檢量線標準液。其中之一外標準溶液濃度須相當於或低於定量極限 (以製備方法中之最後特定體積不稀釋為基準)。其餘的濃度須涵蓋實際樣品的預期濃度或在偵測器之工作範圍內。將待測物檢量線標準溶液導入氣相層析儀中，並依注射劑量對面積製成數據表。

採用外標準品校正法分析的樣品，其分析序列前後均必須要有檢量線的確認，且其數據均須符合品管要求，若有樣品分析落在檢量線確認超出品管規範，即使最終檢量線符合品管要求，其間所分析之樣品均須重新分析。

3-5-4 方法偵測極限 (Method Detection Limit, MDL)

該法係指待測物在一含特定基質的樣品中，在 99% 可信度 (Confidence) 內，可偵測到該待測物之最低量濃度。即利用一系列含待測成份之已知基質樣品經過反覆分析測得其方法偵測極限值。

3-5-5 空白樣品分析 (Blank)

所有試劑空白或基質樣品添加樣品，須進行與真實樣品相同的處理及分析步驟。亦即在進行任何樣品之分析步驟前，須進行試劑空白分析，以確認所有玻璃、塑膠器皿及試劑中無干擾物質。執行每批樣品分析時，須同時進行一方法空白分析，以確認實驗室內無例行的污染。空白樣品必須經過與樣品相同的所有製備及測試步驟。每批樣品或至多 10 個樣品分析時，必須執行一個試劑空白。



3-5-6 重覆樣品分析 (Duplicate)

在分析每批樣品 (至多 10 個樣品) 時，須執行一個重覆或是基質樣品添加重覆分析，同一樣品分析二次，所得測定值計算其相對百分比偏差 R 認定分析的精密度。藉此可確定在實驗分析過程的精密度。

3-5-7 添加樣品分析 (Spike sample analysis)

添加樣品在分析每批樣品時，須執行一個基質樣品添加，再與原樣品經過相同程序處理分析計算其添加回收率，可檢測樣品的基質效應與檢測方法的誤差。以藉此了解檢測方法之適用性及樣品之基質干擾。

3-6 生物菌數測定

3-6-1 分析方法

本研究乃採 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色法配合螢光顯微鏡以進行生物菌數計數 (彭誌強, 2002), 其原理係將 DAPI 螢光染料, 藉由染料吸收較短波長, 而放出長波長之光時, 而鑑別出菌種或其生理特性。

方法乃將採樣後之懸浮液以 1:3 的體積進行固定, 再使用離心機於轉速 1000 rpm 下離心 3 分鐘, 使之成為 pellet。加入 1ml PBS (pH 7.2) 使 pellet 再懸浮, 並小心倒掉上層液, 再將樣品保存於 50% PBS-EtOH (vol/vol)。使用針筒 (5ml-27G) 慢慢抽打樣品, 再用均質器小心抽打數次。於 4°C 冷藏打散污泥。分別取 3 μ l 固定好的樣品點到 slide 的 well 上, 室溫風乾。分別將 Slide 浸入 50、80、96% (v/v) 的乙醇裡各脫水 2 分鐘。風乾後, 將 Slide 保存於室溫下不受污染處, 將 DAPI 染劑點至 well 上靜置約三十分鐘後, 以無菌水洗滌, 將其風乾後即完成微生物總菌固定之動作。

3-6-2 觀察 (Visualization)

一般染色後應立即觀察以免螢光消失後造成觀察後之困擾, 若不能立即觀察時, 則需放置在乾燥盒內, 以保持特異螢光。將 DAPI 染色當做總菌數, 以螢光顯微鏡在視野下拍照並計數總菌數, 平均同一樣品採取拍 10 組為平均值, 其目的乃為降低樣本之標準偏差。

一般大部分知道可以分解原油 (crude oil) 和煉油 (refined oil) 之微生物主要包含了真核生物和原核生物兩大類，而由上述分類之微生物分別有 *Nocardia* , *Pseudomonas* , *Acinetobacter* , *Flavobacterium* , *Micrococcus* , *Arthrobacter* , *Corynebacterium* , *Achromobacter* , *Rhodococcus* , *Alcaligenes* , *Mycobacterium* , *Bacillus* , *Aspergillus* , *Mucor* , *Fusarium* , *Penicillium* , *Rhodotorula* , *Candida* 和 *Sporobolomyces* (Atlas, *et al.*, 1992 ; Bossert, *et al.*, 1984) , 故本研究將參考上述微生物種類而進行計數。



3-7 實驗設備

3-7-1 反應槽

本次實驗反應槽之選擇乃採用透明壓克力材質製成。處理槽為一 42×33×10 cm 無蓋之方形槽體，其反應槽如下圖 3-7-1 所示。

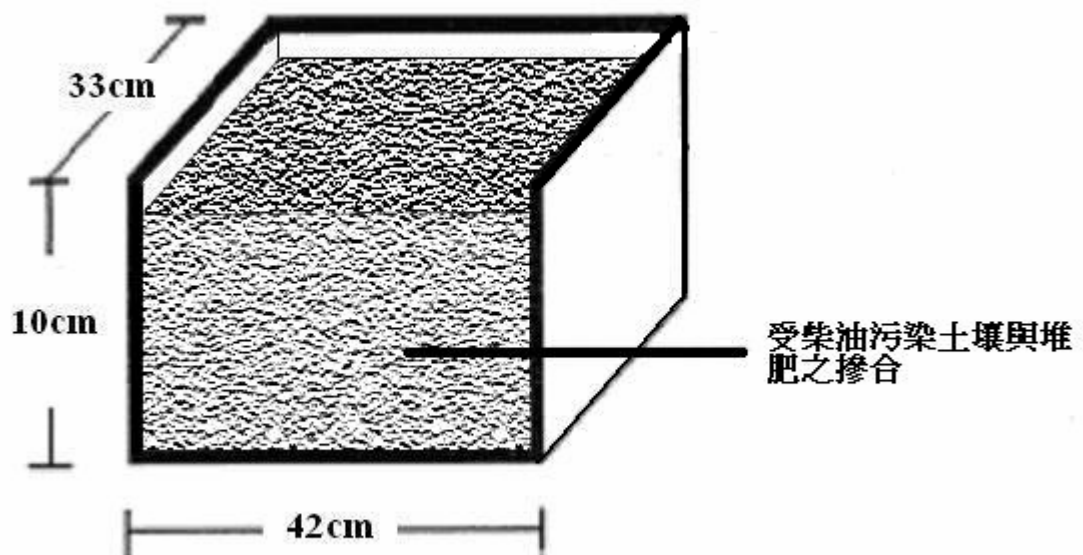


圖 3-7-1、柴油降解實驗之反應槽剖面圖

3-7 實驗設備及藥品

本研究所使用之儀器設備及藥品如下表 3-7-1 所示。

表 3-7-1、實驗使用之儀器設備及藥品

主要分析儀器及藥品	廠牌及規格
高級柴油 (Diesel)	中國石油公司
烷類標準品 (Crude Oil Quantitative Std.)	SUPELCO - ASTM D5307
二氯甲烷 (Dichloromethane)	Mallinckrodt
丙酮 (Acetone)	PANREAC
無水硫酸鈉 (Sodium sulfate anhydre)	PANREAC
DAPI 染劑 (4', 6-diamidino-2-phenylindole)	SIGMA D9542
乙醇 (Ethanol)	Shim akyu`s pure chemicals
圓筒濾紙 (Thimble filter)	ADVANTEC 30×100 mm
3 ml 離心機 (Universal centrifuge)	HERAEUS BIOFUGE PICO
10 ml 離心機 (Universal centrifuge)	MIKRO 22R
火焰式原子吸收光譜儀 (flame atomic absorption spectrometer)	HITACHI Model Z-8100
氣相層析儀 (Gas Chromatography)	HEWLETT-PCKARD 5890
螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy)	OLYMPUS COVER 018
高壓滅菌釜 (Vertical autoclave)	EASTERN MEPICAC EA-635
酸鹼度計 (pH meter)	SUNTEX microprocessor sp-2200
電導度計 (Conductiviyyt meter)	WTW CF330
電子分析天平 (Analytical balance)	SARTORIUS BP2215
超音波震盪器 (Ultrasonic cleaner)	BRANSON-5210
減壓濃縮機 (Rotavapor)	EYELA ASPIRATOR A-3S
103°C 高溫乾燥箱 (Hot air rapid drying oven)	RISEN
分析篩 (Sieves)	BUNSEKI FURUI
常溫恆溫培養箱 (Incubator)	ADVANTEC C1-612
低溫恆溫培養箱 (Cooling cabinet)	FIRSTEK SCIENTIFIC

3-8 堆肥實驗

本研究乃由清華大學歐榮杰同學進行碩士論文之實驗，該堆肥試驗是在台北市民生污水處理廠尚未關廠前所採集之污泥餅（現已關廠），其在污泥廠內已經過好氧消化之處理步驟，故在臭味和衍生病媒蚊方面已有相當好之控制，將污泥餅加入木屑做為膨鬆劑 (bulking agent)，再加上經馴養之成熟堆肥以達成植種之目的，以便能加速好氧之醱酵反應，堆肥之反應槽如圖 3-8-1，在實驗前以均勻混合後，再倒入反應槽中。在實驗過程中，採連續監測方式監測堆肥溫度之變化及定期定時測其水分含量、揮發性固體物，而最後而得到做為本研究所需之腐熟堆肥材料。其流程如圖 3-8-2 所示。



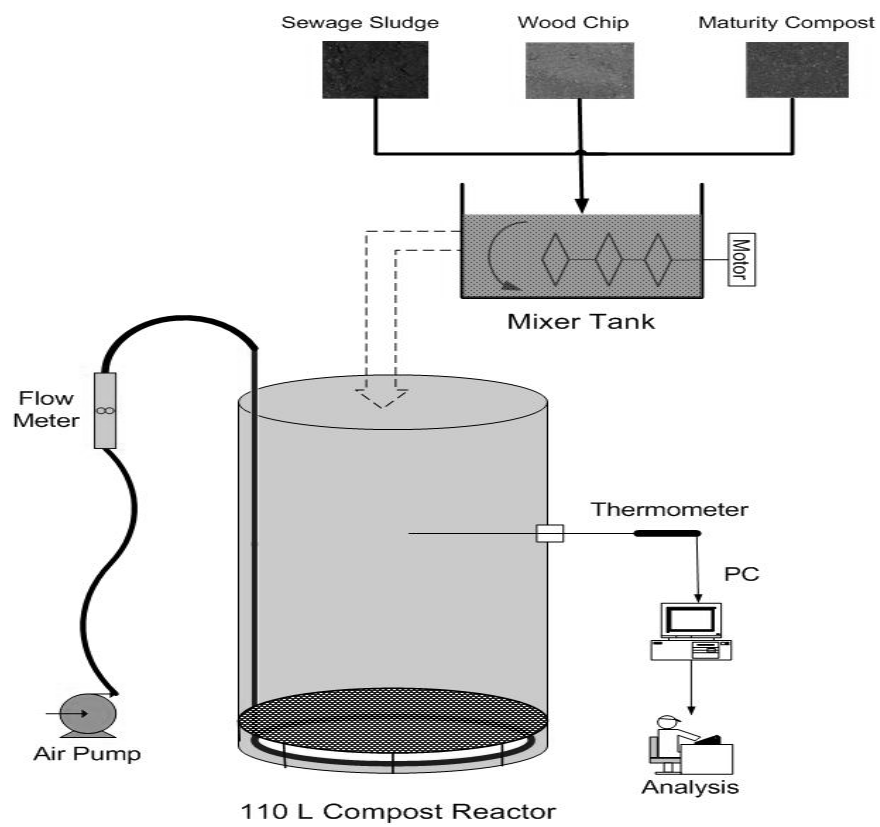


圖 3-8-1、堆肥反應槽

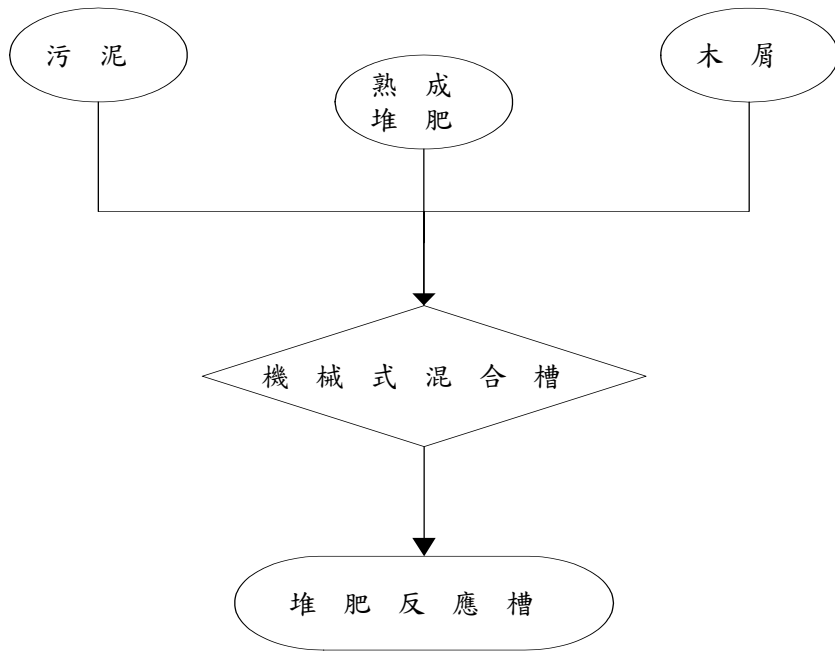


圖 3-8-2、堆肥實驗流程圖



3-9 實驗設計與分析

從實驗過程中可發現當實驗區域逼近最佳反應值附近時，系統中的曲率會增加，故一般反應曲面數學模式會考慮用二階曲率模式 (Second-order Model) 來近似反應曲面，以求能適切地描述反應函數裡的曲率，即

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

在式 (1) 中 y 為反應值， X_i 、 X_j 為變異參數， β_i 、 β_{ii} 及 β_{ij} 為由統計軟體 minitab 所分析之係數， ε 為誤差項。另一方面，以 F 檢定來檢驗二階模式的適當性，經由確認二階模式為良好配適時，則可以依此模式特徵化 (characterize) 此一反應曲面，以期能求得最適因子水準組合，其執行流程如圖 3-9-1 所示。



而反應曲面乃是由中央合成設計之統計數據分析所產生，藉由反應曲面圖形可以顯示出參數和反應值之關係，反應曲面法主要內容係利用因子設計 (Factorial design)、中央合成設計 (Central composite design) 等技巧之組合來進行實驗設計，如表 3-9-1 和圖 3-9-2 所示。並配合統計迴歸技巧求得反應曲面數學模式來輔助分析因子影響效應及尋找最適因子水準組合。而本實驗計共需探討的影響因子有含水率和摻合比，故針對影響因子係採用二因子設計。

本次實驗選擇配適反應曲面的實驗設計，主要是因為它的優點為可在有興趣的範圍裡有一個合理的點分佈，且能以區集的方式進行實驗、並檢驗二階模式的適當性、不需大量的試驗、不需要獨立變數太多的水準可保

證模型參數估計計算能簡化等。另外，模擬在實場時，溫度乃為無法控制因子，故考慮將其設為區集。而在進行二階模型實驗時，為了使中心點不會影響 2^k 設計中一般效應估計值，且提供防衛二階效應曲率的保護，加上還可以得到一個獨立的誤差估計量，故需增加中心點 (center points) 到 2^k 設計中，但是該中心點並不會影響 2^k 設計中一般效應估計值。

為了要預測反應值的變異數在球面上是常數的，故需將二階的反應曲面設計成可旋轉的 (rotatable)，也就是對所有距離設計中心同樣距離的點都是一樣的，其方法乃是透過 α 值的選擇，一般而言， α 的最佳選擇為 \sqrt{k} 。這個設計，稱之為一個球面 CCD (spherical CCD)，當這個範圍是一個球體時，設計必須包括中心點試驗以提供預測反應值相當穩定的變異數，故本實驗乃採 3 個中心點試驗。其設計為矩陣的表列方式，如表 3-9-1 所示。另外，在軸點的設計方面，是為了能將二次項納入模式中，而增加中心點方面，則是為了檢測曲率。最後選擇 TPH_D 之降解率做為反應變數之判斷，另外，實驗將採取隨機化順序的做法，該法乃是為了要防止未知的擾亂變數而使得在實驗中產生無法控制的變化而有影響結果之虞。

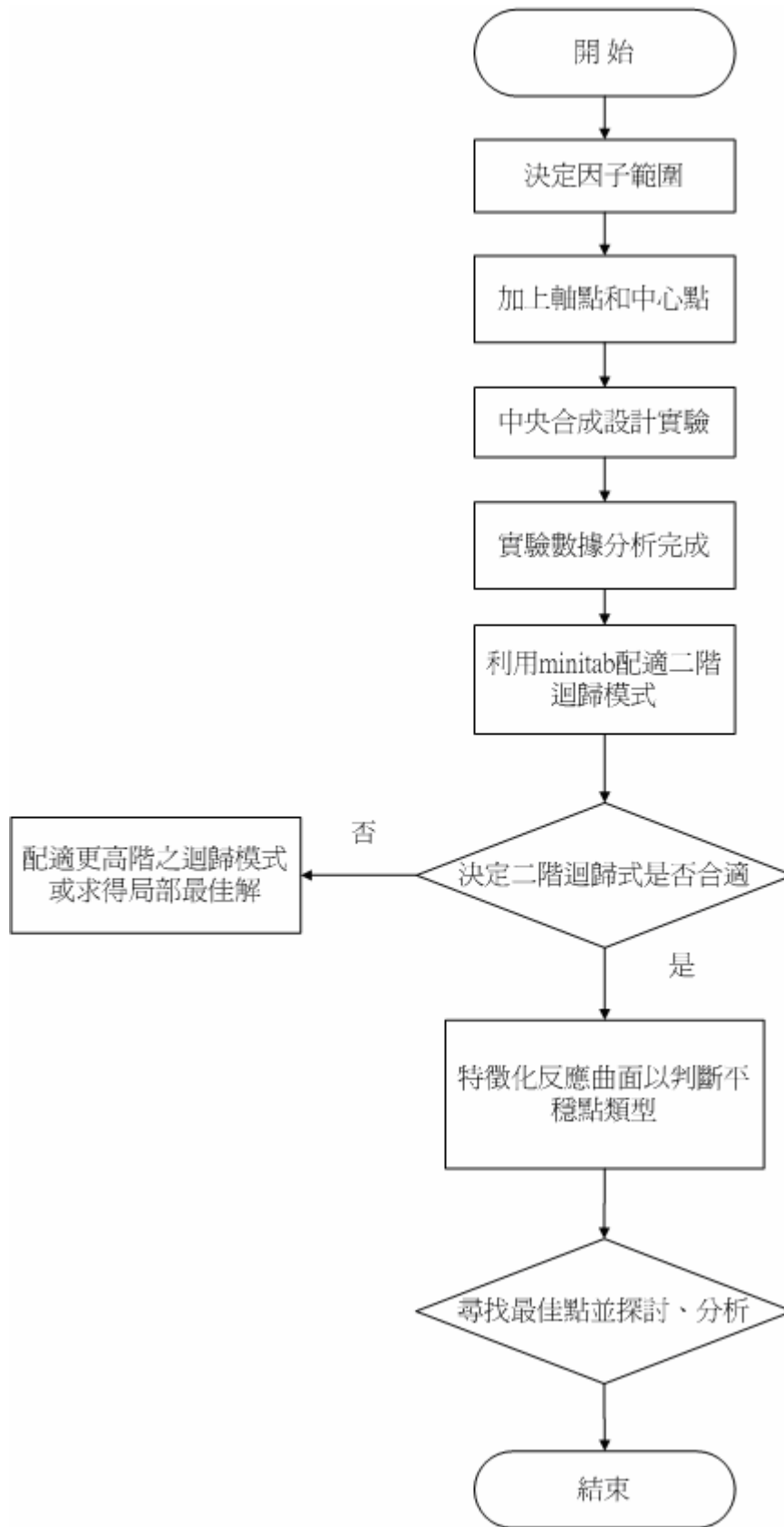


圖 3-9-1、反應曲面法流程圖

表 3-9-1、中央合成設計水準與編碼

因子設計		$-\alpha^a$	-1	0	1	α
污染土壤與堆肥 摻合比(乾重)		1:0.1	1:0.23	1:0.55	1:0.87	1:1
系統控 制之含 水量 ^b	土壤	0.4%	4%	13%	22%	26%
	堆肥	10%	56%	166%	276%	322%

^a α 值預設為 1.414，設定 α 值乃為了要成為可旋轉的球面 CCD (spherical CCD)

^b系統 (堆肥+ 土壤) 含水量乃指將風乾後之土壤和堆肥依不同比例摻合 (係依照 Namkoong *et al.*, 2002 之實驗方法) 後，添加蒸餾水至該系統而產生不同百分比



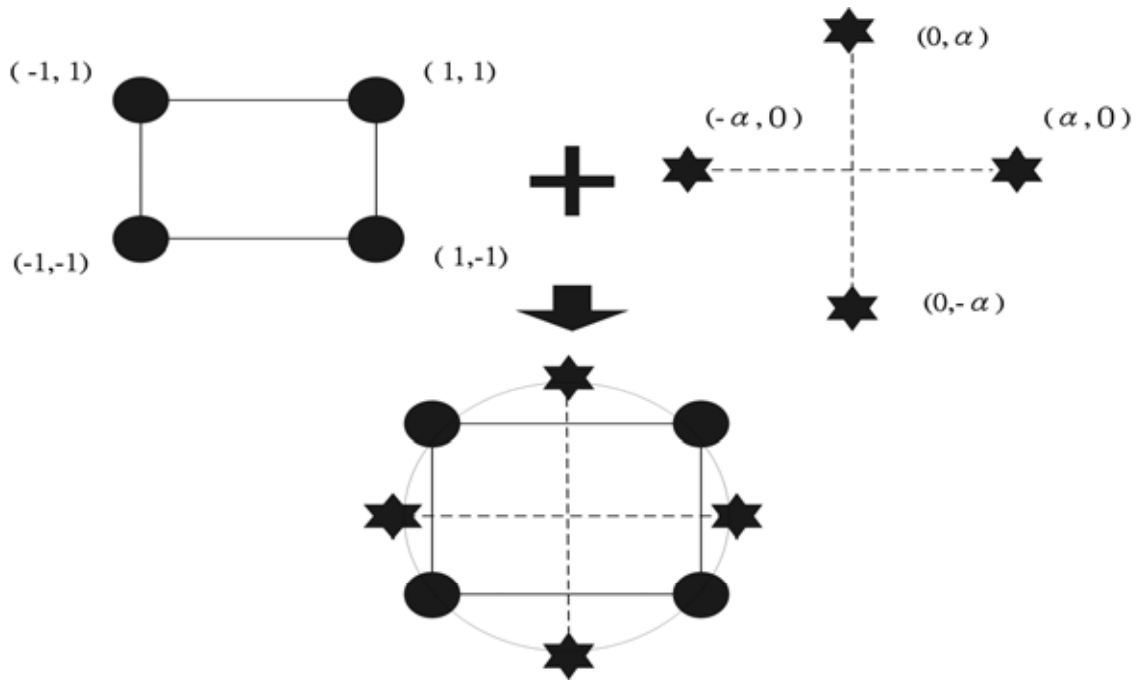


圖 3-9-2、二因子中央合成設計之組成圖解：左上為因子部份區集、右上為軸部份區集 (Techapun et al., 2002)



3-10 單一因子之實驗規劃

本研究係根據實驗設計結果再進行更進一步之確定實驗，實驗方式如表 3-10-1 所示。

將土壤和堆肥之摻合比採最低摻合比 (1:0.1) 和最高摻合比 (1:1)，其間以等比例分成四組之方式做為本實驗摻合比所配置之比例，該範圍選取係參考 Namkoong *et al.*, (2002)。在含水率選擇上則根據實驗設計之反應曲面結果，將以其最佳之含水率範圍作為本實驗之含水率控制，另外，在溫度方面，將依據中華民國統計月報得知，台灣近一、兩年來平均氣溫在 24 左右，相當接近一般實驗分析時常用的標準溫度 25，故該實驗乃將溫度控制在 25。為了要證明本實驗是否主要為生物參與所造成之降解，實驗過程中，將另外作控制組之分析，即單獨土壤組、單獨堆肥組、滅菌組三組，綜合上述之實驗，在實驗過程中將分析 TPH_D、總菌數和監測 pH 值、EC 值等項目，最後再對整個實驗所做的結果探討，期望在利用下水污泥堆肥對受柴油污染土壤的生物降解能力，以更完整地數據量化解釋降解的過程。

表 3-10-1、單一因子之實驗規劃

改良劑	摻合比 ^a
污染土壤:堆肥	1:0.1
	1:0.4
	1:0.7
	1:1
	滅菌組 (1:0.1) ^b
控制組	單獨土壤組
	單獨堆肥組

^a 污染土壤和堆肥在濕基下之摻合比

^b 添加 0.5% NaN₃ 至該系統



3-10-1 TPH_D 降解之動力模式探討

為了詳細地描述生物降解過程，乃利用化學反應動力模式來模擬 TPH_D 之消耗過程，而受油污染土壤之動力模式大多係以一階反應動力模式來表示。如下列所示：

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt$$

其中， C_0 = 起始污染濃度 (mg/kg)

C = 某單位時間之污染濃度 (mg/kg)

k = 一階速率降解常數 (day^{-1})

t = 時間 (day)



本研究欲利用一階反應動力模式來探討柴油濃度降解之反應速率、反應步驟及機制的資訊，並求得速率常數，以期能在考量經濟價值及其它環境的前提下，操作化學反應的進行。而反應速率式或反應次數係由實驗得知，不是憑空臆測或是由平衡方程式之係數得知，方法係將柴油濃度取自然對數 (Natural logarithmics) 和時間作圖，可以得到一線性迴歸，並以相關係數 (R^2) 來證實進行判斷是否適合一階降解動力模式 (Namkoong *et al.*, 2002 ; Taylor, 1999 ; Gestel *et al.*, 2003)。

第四章 結果與討論

4-1 基本性質分析之結果

為了瞭解實驗材料之基本特性，故針對本實驗所使用之土壤和堆肥進行基本性質分析，結果如表 4-1-1 所述。由分析結果可知經過風乾約一個月後，土壤和堆肥之最低含水率分別為 0.4 % 和 10 %，而田間容水量實驗其最大含水率分別為 26 % 和 322 %，而由於含水率乃為實驗設計所需考慮之影響因子，即依此範圍作為含水率之控制範圍。

有機碳含量部份可以發現採自西湖溪之土壤較缺乏有機碳，而下水污泥堆肥則含有豐富之有機碳，可以期待該堆肥能有效地改善土壤的物理性質，還可以改善土壤的顆粒化，降低土壤的塑性及凝結性與增加土壤的保水能力。在土壤質地分析部分，經由實驗所量測土壤之結果為黏粒佔 22.19 %、粉粒佔 22.96 %、砂粒佔 54.85 %，再從土壤質地分類圖，如圖 3-2-1 所示，可以判斷出該處之質地為砂質壤土，由於物理化學反應的作用，會使得土壤質地性質會影響土壤通氣性、土壤水分含量以及土壤微生物的活性等 (童翔新等，1999)。

100 克乾土壤中所能交換之陽離子量，也可稱作吸附能量 (Adsorptive capacity)，表達方式一般以毫當量為主，CEC 愈大，表示土壤吸附污染物或重金屬之能力愈大，也就是易阻礙污染物的傳輸。故由本研究之實驗結果，可以發現堆肥具有相當高之吸附污染物能力，且大於土壤約 20 倍，由此可知，土壤之吸附污染物能力較差強人意。

在 pH 值方面，可知土壤乃屬中性之土壤，而堆肥在風乾一個月後，

呈偏酸性，推測可能是由於堆肥材料使用木屑做為膨鬆劑加上尚完全穩定所造成。

在重金屬分析方面，西湖溪所採之土壤符合土壤污染管制標準，另外，根據國內有機質肥料規格 (89.8.31 農糧字第 890020813 號公告) 所規定之重金屬有害成分標準可知本研究所使用之堆肥其重金屬均符合有機肥料規格，為可適用於現址復育之材料。

表 4-1-1、土壤與堆肥之基本性質分析

	土壤	堆肥
含水量 (%)	0.4	10
田間容水量 (%)	26	322
有機碳 (%)	0.76	30.1
酸鹼度 (pH)	7.6	4.8
陽離子交換能力 (meq/100g 乾基)	3.3	63.5
重金屬 (mg/kg 乾基)		
	Cr 6.4 (<250) ^b	14.6 (<150) ^c
	Cu 9.2 (<400)	37.9 (<150)
	Ni 15.2 (<200)	23.9 (<25)
	Pb 4.8 (<2000)	28 (<150)
	Zn 23.7 (<2000)	297.4 (<500)
	Cd ND ^a (<20)	ND (<5)

^a ND, not detected.

^b 土壤污染管制標準

^c 有機肥料標準

4-2 反應級數之探討

由實驗之結果分別將各組實驗結果 TPH_D 降解過程之濃度以 $\ln C/C_0$ 對時間作圖，可以發現有相當高的相關係數，如表 4-3-1、4-3-2、4-4-1、4-4-2 所示，故可知利用一階反應速率來描述添加堆肥之反應級數相當地適合，在整體而言，本研究以下水污泥堆肥應用於受柴油污染之生物復育可視為一階反應，亦即代表柴油被微生物分解之速率正比於土壤中柴油之濃度。

4-3 實驗設計結果

在初步進行模擬受柴油污染實驗時，係以噴灑並均勻攪拌的方式混合，從實驗結果中可以發現利用堆肥當營養鹽予以摻合，可以確實地反應出降解效果，其起始濃度、 TPH_D 降解率、反應速率常數 (k) 和半衰期 (half life) 如表 4-3-1、表 4-3-2 所示。由實驗結果可以發現本研究之降解率最高者為在 31 因子區集之 1:1 實驗 (即摻合比和水分含量分別為 1:0.87、140%)，有 67% 之較高降解率，可知該組實驗因子之控制具有顯著之降解效果。而降解率較低者為在 15 軸區集之 0: α 實驗 (摻合比和含水率分別為 1:0.55、131%)，只有 13% 之降解率，由此可知在最大含水量之情形下，其降解能力由於受到抑制，而導致較低之降解效果。

在溫度影響方面，如表 4-3-3 所示。由迴歸係數可以得知該效應 (P-value 為 0.023) 相當顯著，以重覆分析組如圖 4-3-1 (B)、4-3-2 (B) 之降解率來看的話，高溫和低溫相差約 9%，且都有顯著的降解效果，這說明了台灣因地處亞熱帶，溫度差異雖然顯著但對微生物影響並不大，且經

由中華民國統計月報的資料，在夏天平均溫度 31 下和冬天平均溫度 15 下都適合微生物之生存，也因此可推測在台灣的土壤環境中，很適合微生物生長，故有機污染物均容易受到微生物之分解。

4-3-1 統計分析

將實驗設計之結果以降解率作為實驗探討之反應參數，其編碼變數、自然變數、反應參數等所配適的模型表，如表 4-3-3 所示，再由 minitab 統計軟體進行分析，其反應曲面圖結果，如圖 4-3-5 所示。而在迴歸係數檢定部分，係經由 F 檢定之後利用 P-value 來判斷其顯著性。P-value 係指會導致棄卻虛無假設的最小顯著水準，一般以 0.05 以下判斷為具有顯著性效應，亦即定義高於 95% 以上之信心水準為顯著。從結果可得知摻合比和含水率之主效應其 P-value 分別為 0.990 和 0.255，相互效應 P-value 為 0.868，由 P-value 可以判斷出主效應和相互效應兩者均相當地高故表示該兩者效應不顯著，如表 4-3-4 所示。由迴歸係數預測表中發現 R^2 為 77.4，且修正過後的 R^2 只有 54.6，這通常是因為愈多不顯著的迴歸係數會使衡量模型解釋總變異的比率 R^2 愈低，也會造成 R^2 和修正過後的 R^2 (R_{adj}^2) 值相差非常多。一般做法常將不顯著因子刪除，再重新迴歸可以得到更佳之總變異比率，但在階層原理 (hierarchy principle) 之限制下，致使無法將不顯著因子刪除，而無法獲得更佳之 R^2 值 (Prochazka, 2003)，而所謂之階層原理係指模型包含一個高階項，就應該包含由高階項組成的所有低階項。

4-3-2 配適二階模型之設計

從變異數分析，如表 4-3-5 所示。可發現缺適性 (lack of fit) 檢定的

P-value 相當地低，只有 0.002，這代表缺適性相當顯著，亦即該反應曲面無法找出最佳解，此時必需要再配適更高階模式，或只能求出局部解。最後，從此二階模型可以成為一可旋轉的球面 CCD (spherical CCD)，而該模型能在有興趣研究的範圍內提供良好的預測，另外，從迴歸係數表中，如表 4-2-6 所示，可以預測本次實驗設計結果所配適的二階模型 (second-order model) 為

$$y = 54.67 - 0.04X_m - 3.83X_w + 6.73X_m^2 - 8.77X_w^2 - 0.75X_mX_w + 7.21$$

其中， X_m =堆肥與土壤摻合比之變數

X_w =水分含量之變數

y = TPH_D 之反應變數



表 4-3-1、堆肥添加實驗之 TPH_D 在 30 天之降解和預測一階動力模式之各項參數 (31°C 下之因子部分區集)

Factorial Block (mix ratio、water content)	TPH _D initial concentration (mg/kg)	TPH _D Degradation (%)	k ^b	r ^c	Half-life (day)
-1:1(1:0.23、69%)	2307 ± 190 ^a	63	0.03	0.7666	23
1:-1(1:0.87、28%)	2532 ± 396	64	0.0352	0.8828	20
1:1(1:0.87、140%)	1999 ± 232	67	0.0366	0.833	19
-1:-1(1:0.23、14%)	2350 ± 158	57	0.0295	0.85	23
0:0A(1:0.55、67%)	2040 ± 215	59	0.0284	0.758	24
0:0B(1:0.55、67%)	1932 ± 78	56	0.0289	0.813	24
0:0C(1:0.55、67%)	1801 ± 110	59	0.0259	0.711	27

^a The ± indicates one standard deviation of the mean (n = 3). ^b k=the first order kinetic constant

^c r=correlation coefficient

表 4-3-2、堆肥添加實驗之 TPH_D 在 30 天之降解和預測一階動力模式之各項參數 (15°C 下之軸部分區集)

Axial block (mix ratio、 water content)	TPH _D initial concentration (mg/kg)	TPH _D Degradation (%)	k ^b	r ^c	Half-life (day)
0:α(1:0.55、131%)	1818 ± 141 ^a	13	0.0033	0.2114	210
α:0(1:1、90%)	1801 ± 110	54	0.0221	0.7934	31
0:-α(1:0.55、3.8%)	2295 ± 162	41	0.0137	0.793	51
-α:0(1:0.1、131%)	1889 ± 363	62	0.0331	0.929	21
0:0D(1:0.55、67%)	2040 ± 215	50	0.0248	0.816	28
0:0E(1:0.55、67%)	1932 ± 78	50	0.0225	0.772	31
0:0F(1:0.55、67%)	1801 ± 110	54	0.0234	0.786	30

^a The ± indicates one standard deviation of the mean (n = 3). ^b k=the first order kinetic constant

^c r=correlation coefficient

表 4-3-3、可旋轉之正交區集中央合成設計

實驗	區集 ()	摻合比 (土壤:堆肥)	含水量 (%)	TPH _D 降解率 (%)
1	31	1 (1:0.87)	-1 (28)	64
2	31	-1 (1:0.23)	1 (69)	63
3	31	1 (1:0.87)	1 (140)	67
4	31	0 (1:0.55)	0 (67)	59
5	31	0 (1:0.55)	0 (67)	59
6	31	-1 (1:0.23)	-1 (14)	57
7	31	0 (1:0.55)	0 (67)	56
8	15	0 (1:0.55)	0 (67)	54
9	15	α (1:1)	0 (90)	54
10	15	0 (1:0.55)	$-\alpha$ (4)	41
11	15	0 (1:0.55)	0 (67)	50
12	15	0 (1:0.55)	0 (67)	50
13	15	0 (1:0.55)	α (131)	13
14	15	$-\alpha$ (1:0.1)	0 (27)	62

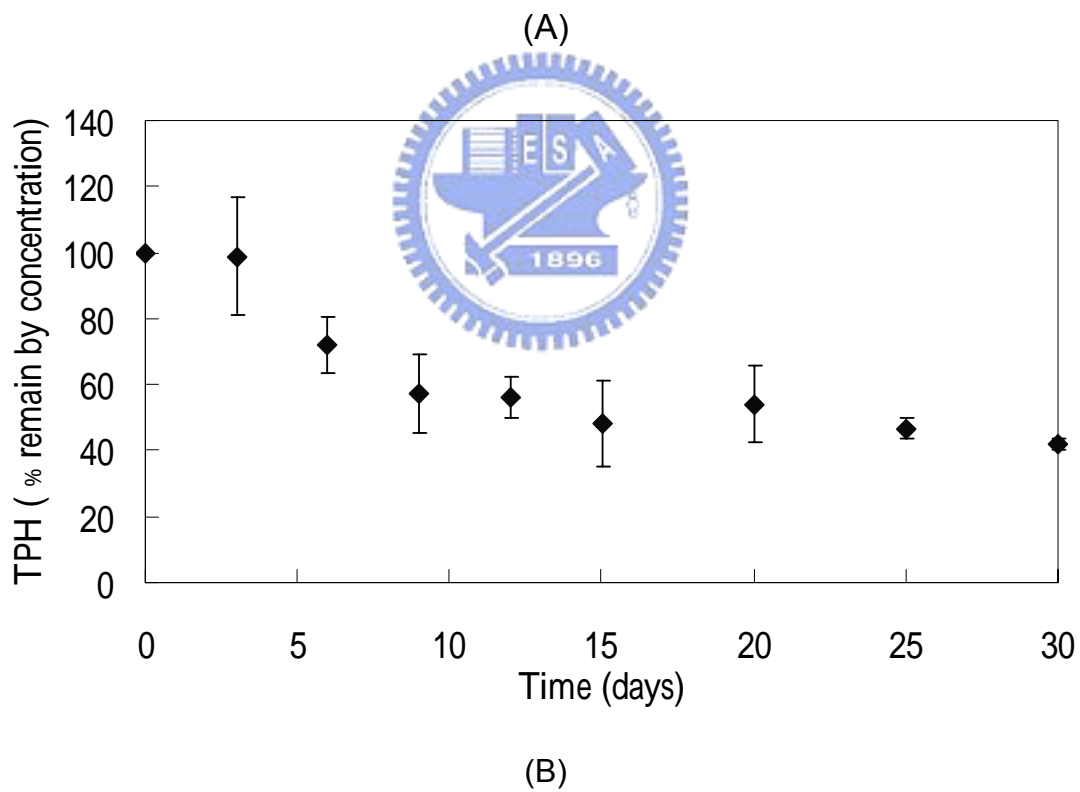
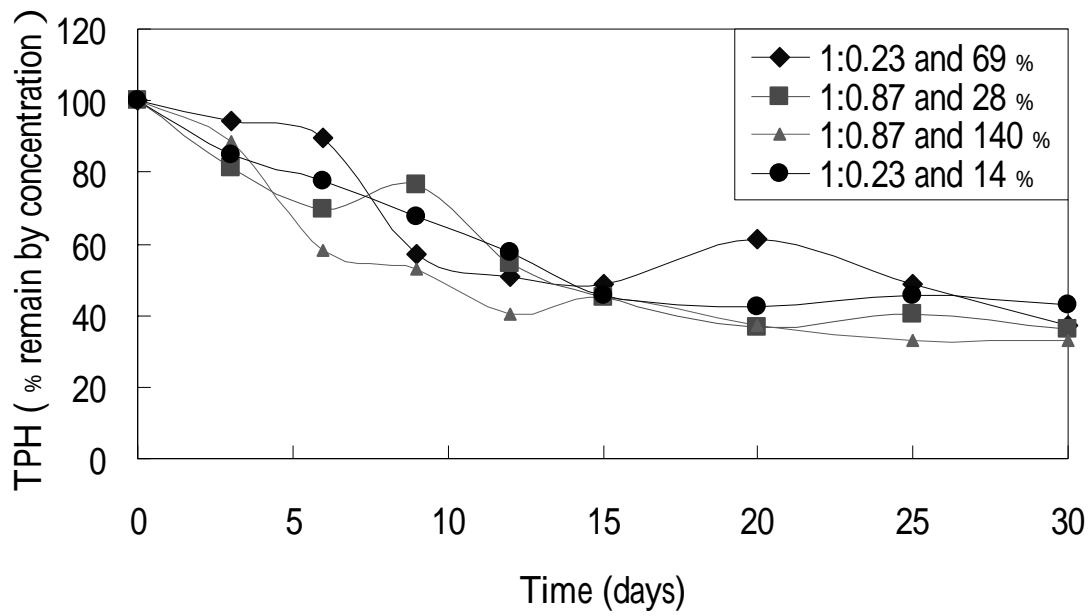


圖 4-3-1、TPH_D 在區集 31°C 下不同摻合比降解率之變化 (A) 在不同摻合比下和含水率下之變化 (B) 在土壤與水分含量為 1:0.55 和 67% 時之三重覆分析 (error bars 係重覆採樣三次之標準差)

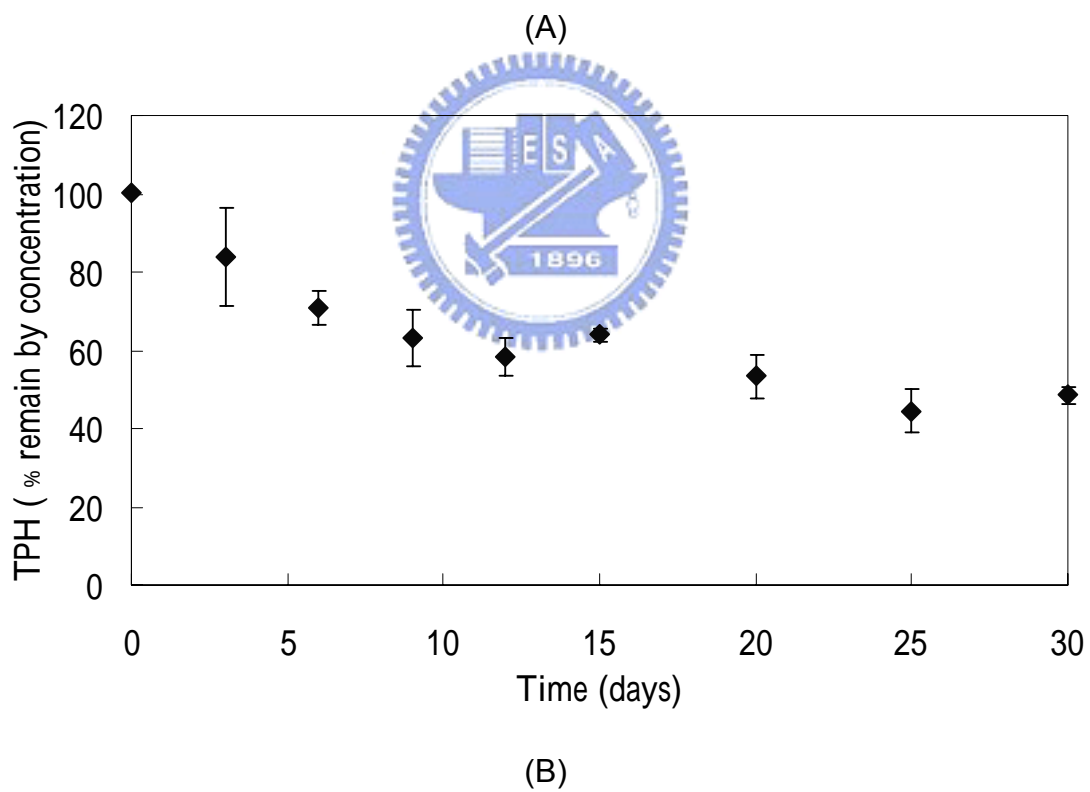
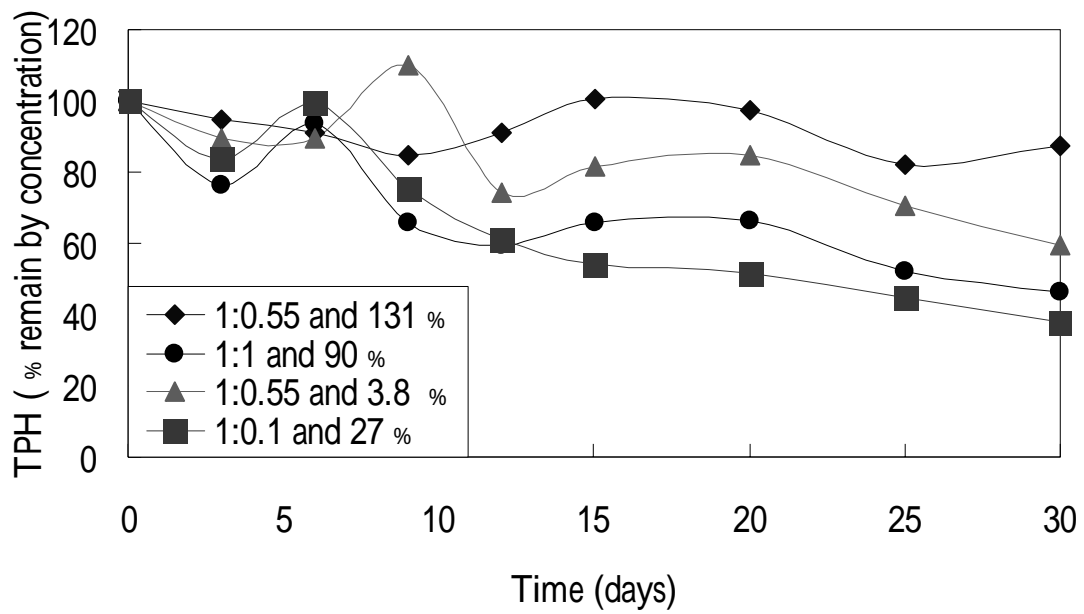


圖 4-3-2、TPH_D 在區集 15°C 下不同摻合比降解率之變化 (A) 在不同摻合比下和含水率下之變化 (B) 在土壤與水分含量為 1:0.55 和 67% 時之三重覆分析 (error bars 係重覆採樣三次之標準差)

表 4-3-4、迴歸係數預測 TPH_D 降解率之結果

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	54.667	3.560	15.356	0
Block	7.214	2.331	3.096	0.017
mix ratio	-0.039	3.083	-0.013	0.990
water content	-3.825	3.083	-1.241	0.255
mix ratio*mix ratio	6.729	3.209	2.097	0.074
water content*water content	-8.771	3.209	-2.733	0.029
mix ratio*water content	-0.750	4.360	-0.172	0.868
S = 8.720 R-Sq = 77.4% R-Sq(adj) = 54.6%				

表 4-3-5、TPH_D 之變異數分析

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	1	728.64	728.643	728.643	9.58	0.017
Regression	5	1094.58	1094.584	218.917	2.88	0.100
Linear	2	117.04	117.042	58.521	0.77	0.499
Square	2	975.29	975.292	487.646	6.41	0.026
Interaction	1	2.25	2.250	2.250	0.03	0.868
Residual Error	7	532.27	532.274	76.039		
Lack-of-Fit	3	515.61	515.607	171.869	41.25	0.002
Pure Error	4	16.67	16.667	4.167		
Total	13	2355.5				

表 4-3-6、預測 TPHD 之迴歸係數

Term	Coef
Constant	54.6667
Block	7.21429
mix ratio	-0.03921
water content	-3.82475
mix ratio*mix ratio	6.72917
water content*water content	-8.77083
mix ratio*water content	-0.75



4-3-3 模型適當性與常態性假設檢驗

在常態性檢定方面，一個非常有用的方法就是建構一個殘差的常態機率圖，在變異數分析中，對殘差做此圖通常相當有效，如圖 4-3-3 所示，這個圖形為一條直線，在目檢直線時，重點應擺在圖形中間附近而非兩端，由該圖可得知殘差值皆平均分佈於線性，亦即判斷該實驗數據符合常態性分佈的假設。

該模式的適當性，可以由殘差檢查來判斷，而殘差的檢查應該是任何變異數分析中很自然的一部份，如圖 4-3-4 所示。若模型是恰當的，則表示殘差應該是無結構的 (structureless)，也就是說，由圖可以看出沒有任何明顯的形狀。有時候，觀測值的變異數會隨觀測值的增加而變大，亦即當殘差變大時，會使殘差對配適值的圖看起來像是開口向外的漏斗或麥克風，該項誤差容易在測定儀器時而發生。

觀察最後分析得到的反應曲面，如圖 4-3-5 所示。為一鞍點之圖形，代表本實驗結果無法求得最佳範圍，亦即有兩個局部較佳之範圍，會造成該圖形之結果，將由最後單一因子實驗分析結果中一併討論。

綜合上述反應曲面法之實驗結果可得知，不論何種添加堆肥摻合比之實驗，若有足夠之水分，均可得到相當顯著之降解效果，但是必須最後再進行單一因子實驗以便探討更詳盡之降解過程及反應機制。

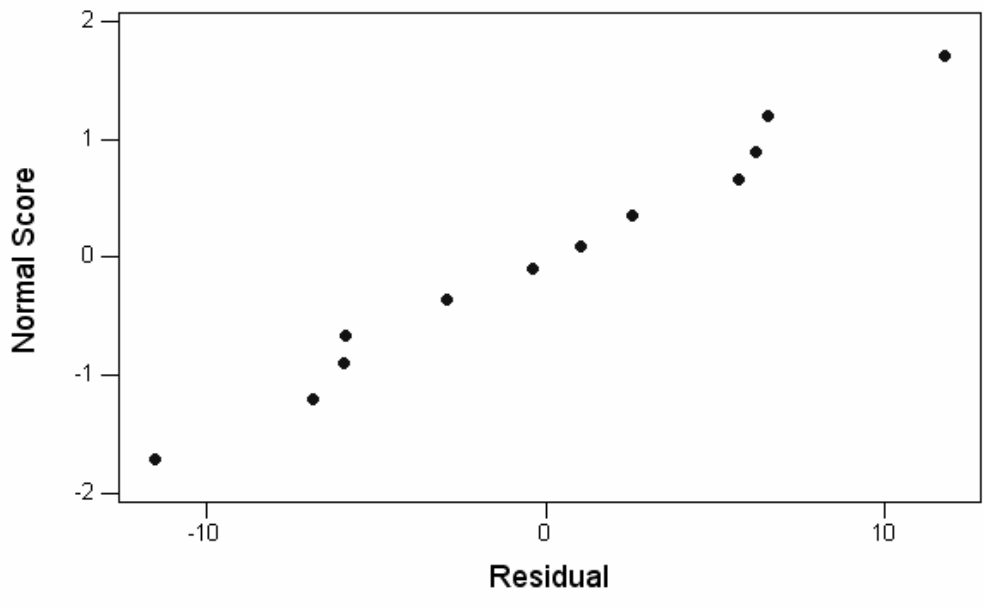


圖 4-3-3、TPH_D之殘差與常態分佈



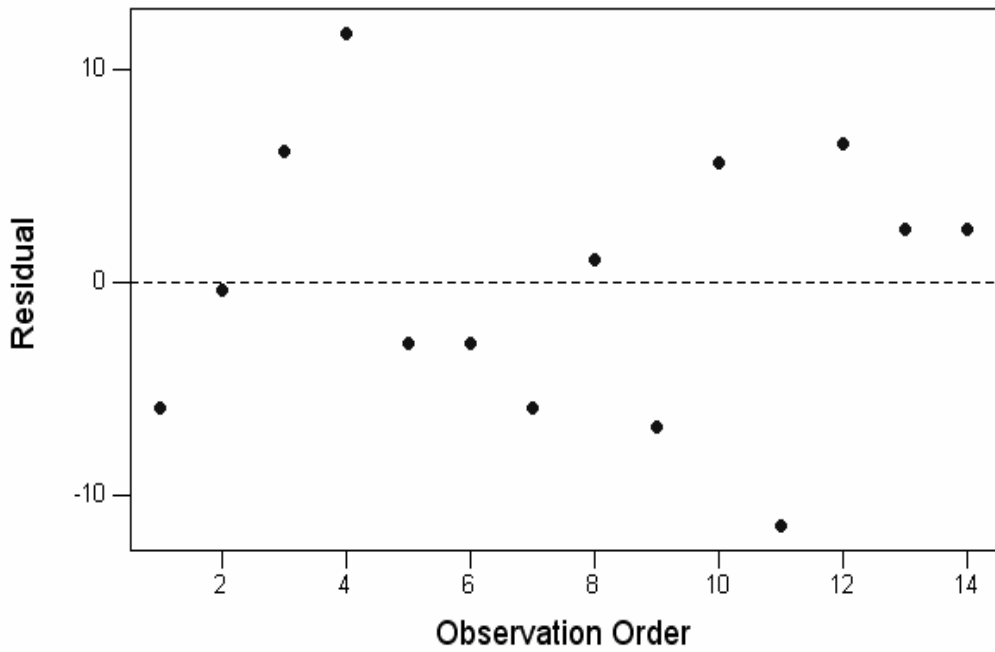
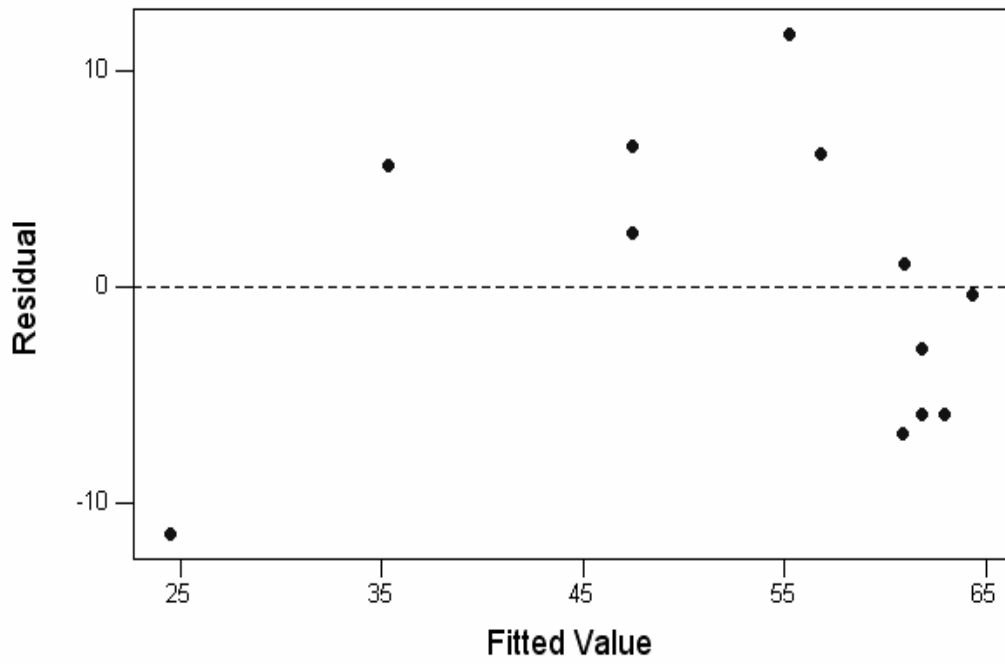
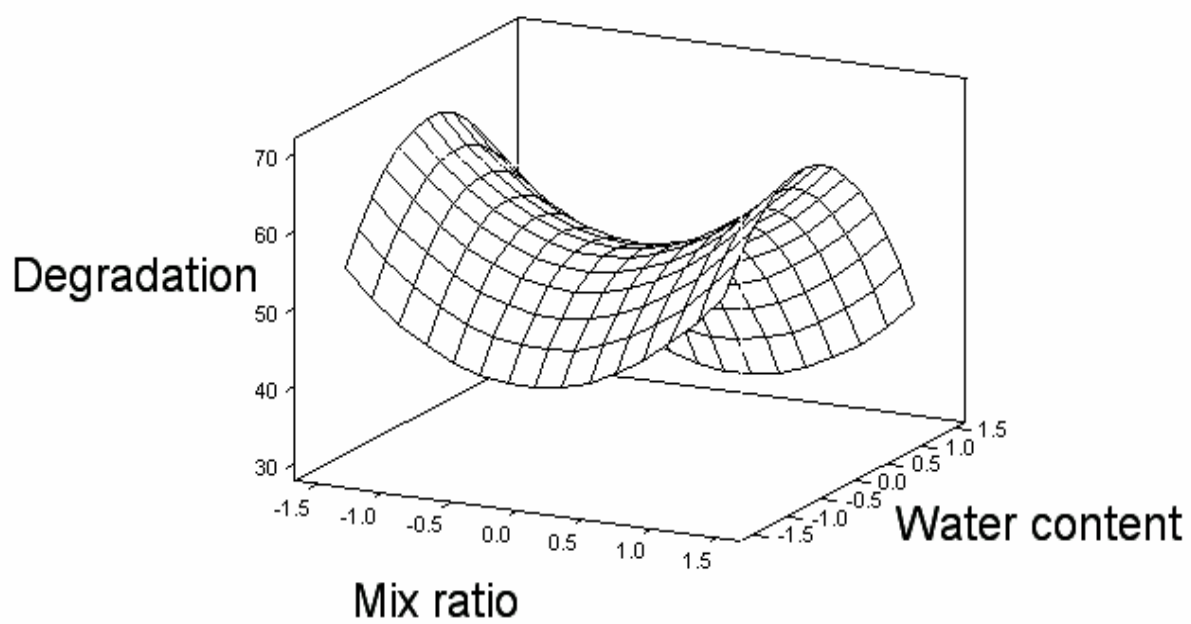
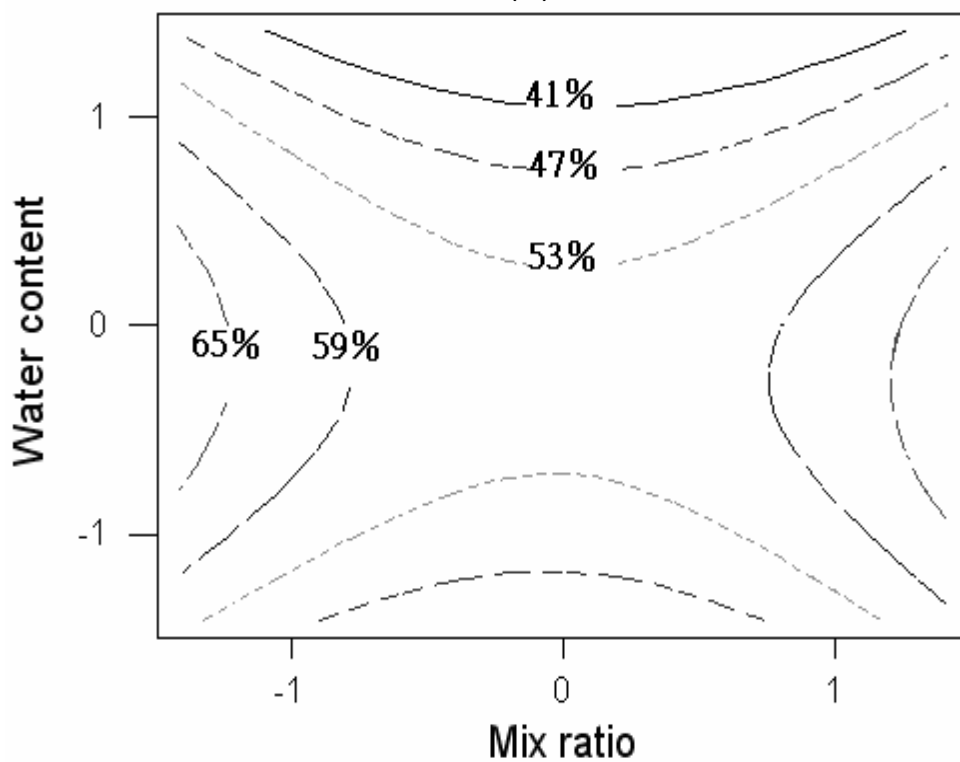


圖 4-3-4、殘差與配適值的圖



(A)



(B)

圖 4-3-5、TPH_D 之反應曲面法結果 (A) 反應曲面圖 (B) 等高線圖

4-4 單一因子實驗規劃結果

由反應曲面法之結果，如表 4-3-4 所示，得知摻合比和含水率彼此間之相互作用 (intereaction) 不顯著，即表示摻合比和含水率無相互影響之關係，故進行單一因子實驗來加以確認實驗結果是否符合反應曲面所述。含水量在經由實驗設計結果中將其控制在最大含水量之 60 %，再藉由不同之摻合比，加上分析 TPH_D、總菌數和監測 pH 值、EC 值等項目，最後再對整個實驗所做的結果探討，期望在利用下水污泥堆肥對受柴油污染土壤的降解能力，能更完整地解釋降解的過程。

在實驗組各摻合比方面，如表 4-4-1 所示，可以由 TPH_D 降解率得知和反應曲面法之圖形結果互相吻合，即在低摻合比 (1:0.1) 和高摻合比 (1:1) 之情形下可以得到最顯著之降解效果。由圖 4-4-1 所示，由圖中可知在低摻合比下，雖然初期柴油分解能力不若高摻合比，但比中間摻合比部分要來的高，研判是在環境適合微生物生長下，呈現較佳之降解能力，而隨著摻合比之提高造成環境受到抑制，使得降解能力受到影響，在到了最高之摻合比時則因為此時微生物數較高，見圖 4-5-2，而在降解初期，產生較低摻合比快速之降解效果，然而，在分解完較易分解之碳氫化合物之後，對於較難分解之碳氫化合物則受限於環境因素而導致降解能力趨於緩慢。而從低摻合比 (1:0.1) 之層析圖中，如圖 4-4-2 所示，可以發現隨著鄰近 C17 與 C18 之 Pristane 和 Phytane 乃為難分解化合物，而在最終濃度時產生少部分的降解，由此可知在該生物反應條件下，除了基本之代謝反應外，尚有共代謝反應之發生 (Ronald, 1995)。

在加入堆肥的情形下，可知均可得到相當顯著之降解率，另外，Puskas 等 (1995) 曾提出油污染土壤以泥漿反應槽之方法，其降解結果在

前 10~15 天內約有 60~70% 之降解，而在往後之 20~30 天內之降解呈緩慢狀態，約額外產生約 5~7% 之降解效果，而本研究以較顯著降解的低摻合比而言，在前 10~15 天內約有 45~55% 之降解，而往後之 20~30 天內之降解則額外產生有 9~13% 之降解，故可知與本研究比較，雖然方法不同，但結果亦有類似情形。

為了要降解 TPH_D，過高之摻合比雖然有明顯之降解，但是受限於環境狀況不佳，故未能達到最佳效果，且亦容易在環境方面造成過重之負荷導致環境有二次污染之虞，而由單獨堆肥之控制組可以發現其降解率和單獨土壤之控制組一樣明顯地較差，如圖 4-4-3、圖 4-4-4 所示，從此可得知添加堆肥雖會使得碳源等營養鹽增加，但並不能代表會優先佔有柴油之降解，換句話說，當添加會優先被降解的碳源超過了柴油的量時，柴油之降解就可能會被抑制 (LaGrega et al., 1994; Namkoong, 2002; Xiaoqing, 1995)，故在含高量營養鹽之堆肥，將由於肥分過高而導致生物降解效果變差。

在土壤組方面，如表 4-4-2 和圖 4-4-4 所示，可知在未添加營養鹽和植種微生物之情形下，其自然衰減作用仍有約 34% 之降解效果，可以知道，在自然衰減之情形下，土壤微生物仍舊能代謝柴油之能力。

在滅菌組方面，如圖 4-4-5 所示，經過滅菌後之實驗，比較最終濃度和起始濃度後發現均未有明顯之改變，再配合表 4-4-2，可以得到滅菌組之降解率只有 11%，即可證實本研究之柴油降解，主要係以生物降解為主，其它物化反應等對本研究之影響甚小。

柴油污染事件，往往影響面積過大，故在實施現地復育時，堆肥之需

用量亦愈大，因此容易造成二次污染，但若採用連續施用堆肥方法，將有更佳之降解效果，而可避免導致環境過度負荷，且可維持植物正常生長 (Ronald, 1995)。故綜合上述，可知添加堆肥做為土壤改良劑雖然可以增加 TPH_D 降解率之提高，但是若添加過多之堆肥，將會對降解率造成抑制，甚至造成環境負荷，而在上述比較之下可發現低摻合比之添加劑量即可得到相當顯著之降解效果 (68%)，以一階動力常數來看，發現低摻合比 (1:0.1) 其動力常數約大於單獨土壤組 (soil only) 之兩倍多，故可見本研究利用低摻合比之堆肥進行受柴油污染土壤之生物降解，確實可以得到相當顯著且無二次污染之虞效果。



表 4-4-1、土壤受柴油污染降解過程之 TPH_D(mg/kg) 實驗組

Experimentation (Water content)	TPH _D initial concentration (mg/kg)	Degradation rate (%)	k	r	half life (day)
1:0.1 (31%)	2155 ± 190 ^a	68.1	0.041	0.94	17.11
1:0.4 (65%)	2071±104	64.5	0.037	0.96	18.57
1:0.7 (86%)	2043±139	64.4	0.037	0.94	18.88
1:1 (101%)	2090±87.5	69.4	0.038	0.92	18.05

^a The ± indicates one standard deviation of the mean (n = 3).

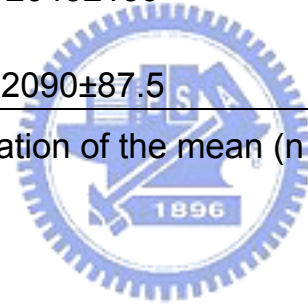
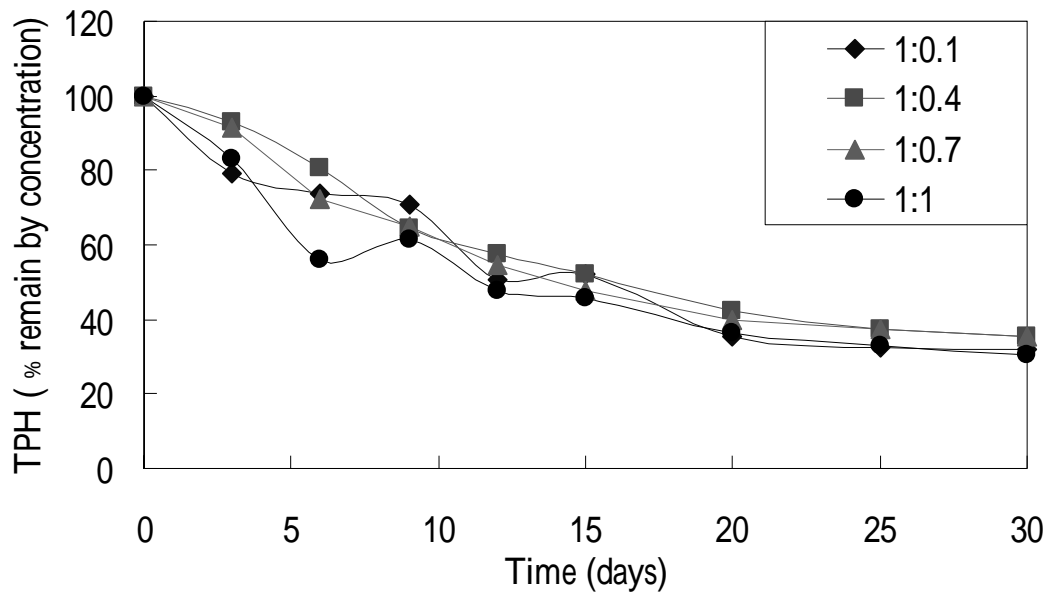


表 4-4-2、土壤受柴油污染降解過程之 TPH_D(mg/kg) 控制組

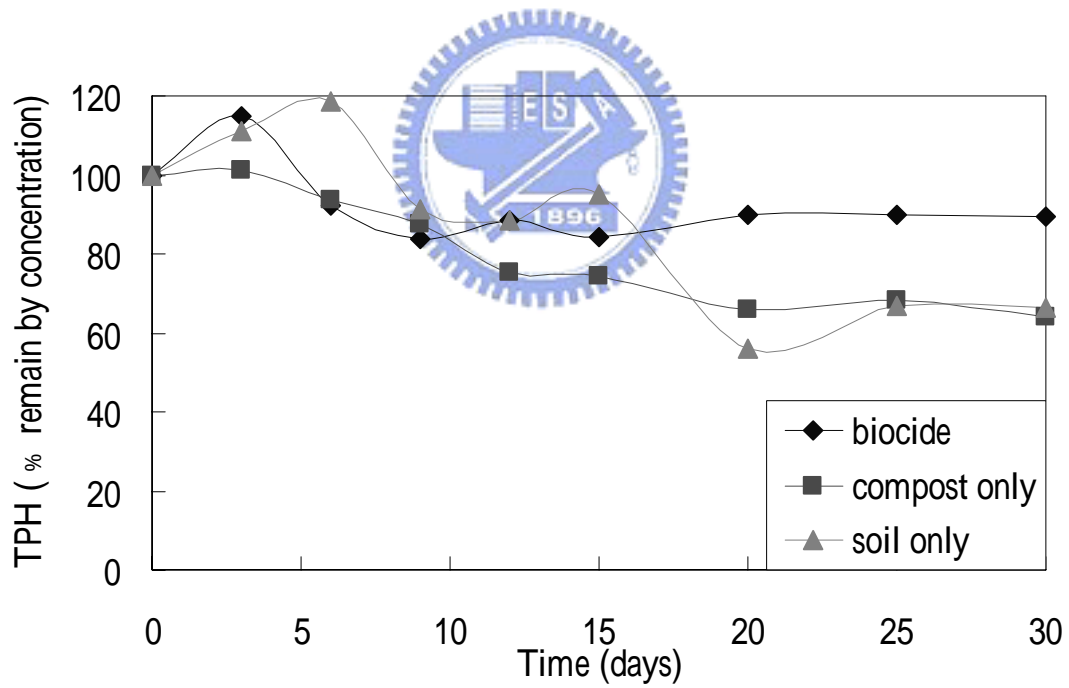
Control (Water content)	TPH _D initial concentration(mg/kg)	Degradation rate (%)	k	r	half life
soil only (15%)	1835±439 ^a	33.8	0.018	0.81	37.9
compost only (187%)	2007±180	35.8	0.017	0.90	41.3
sterilization (31%)	1789±107	10.7	-	-	-

^a The ± indicates one standard deviation of the mean (n = 3).



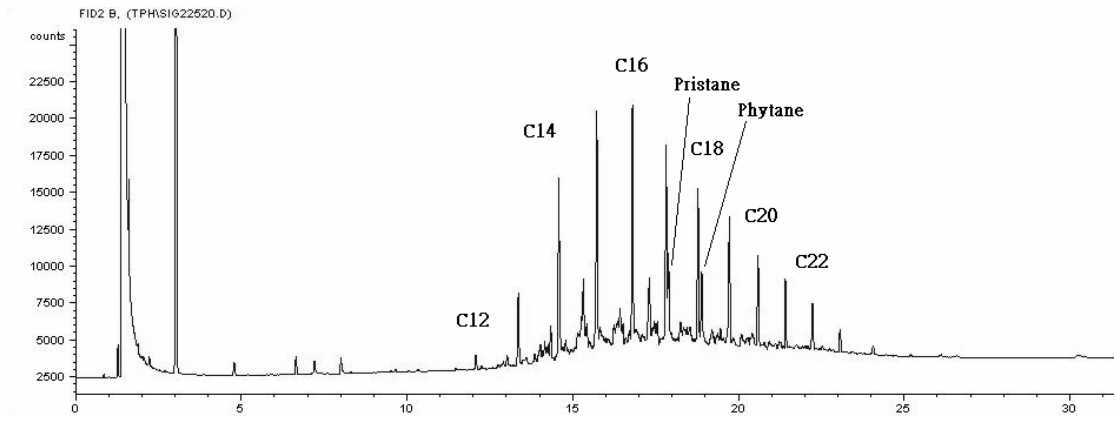


(A)

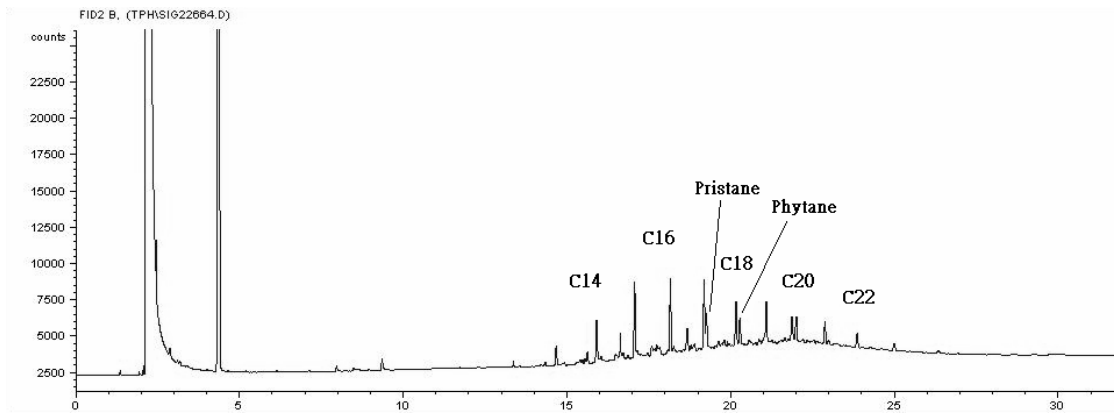


(B)

圖 4-4-1、TPH_D 濃度隨時間降解之過程 (A)各摻合比之實驗組 (B)控制組

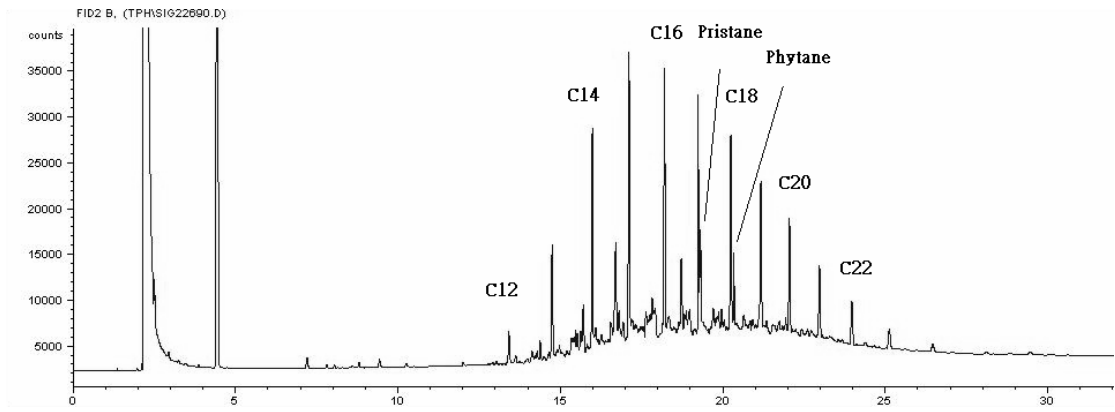


(A)

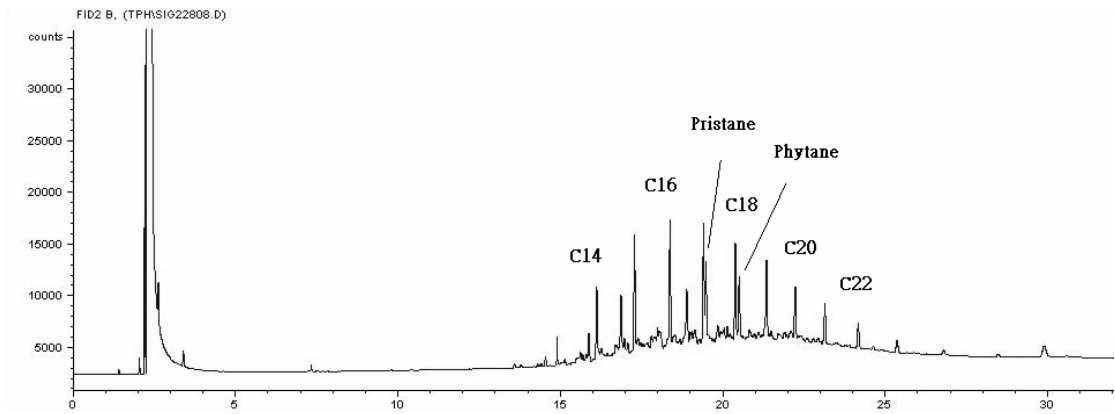


(B)

圖 4-4-2、實驗組 (1:0.1) 之 TPH_D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度

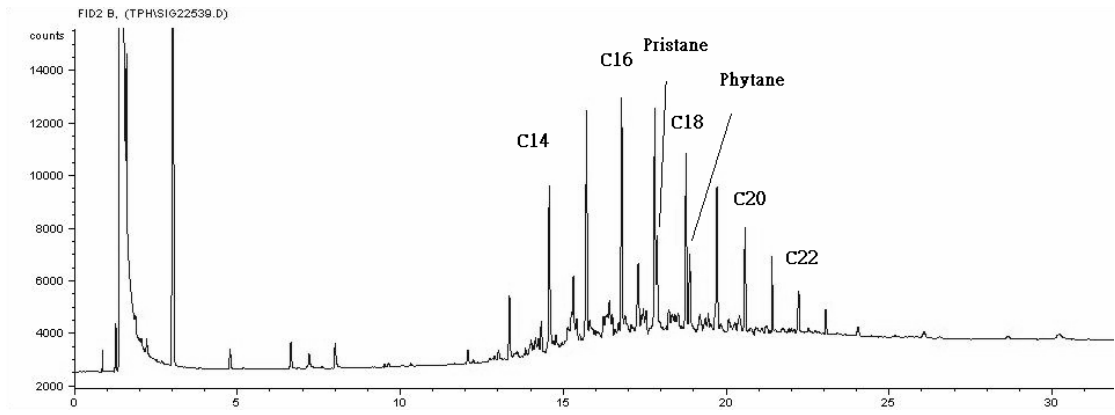


(A)

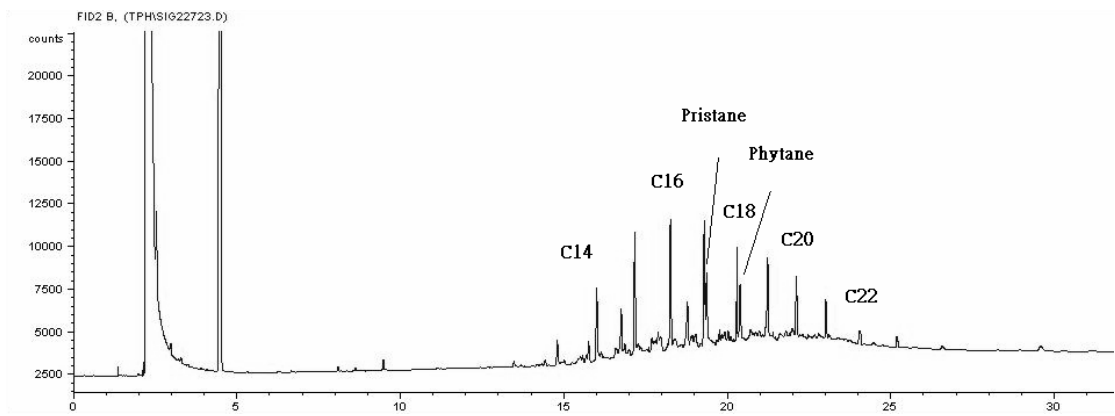


(B)

圖 4-4-3、堆肥組之 TPH_D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度

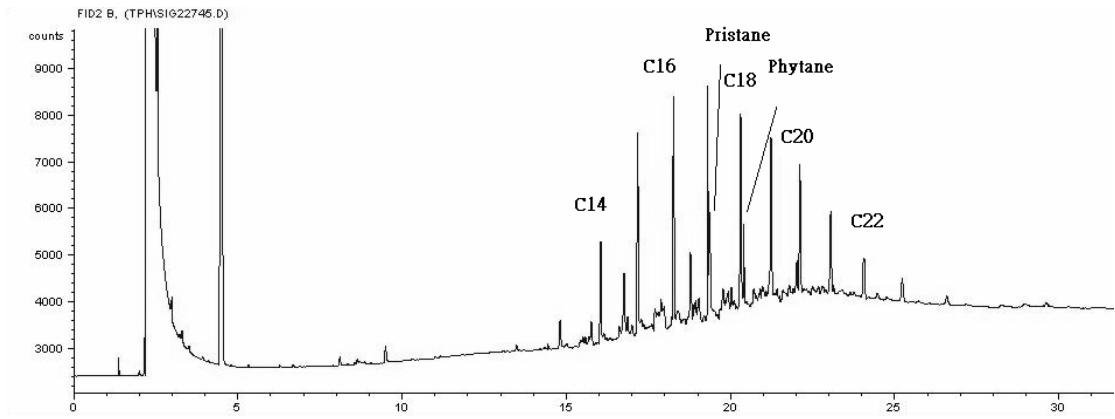


(A)

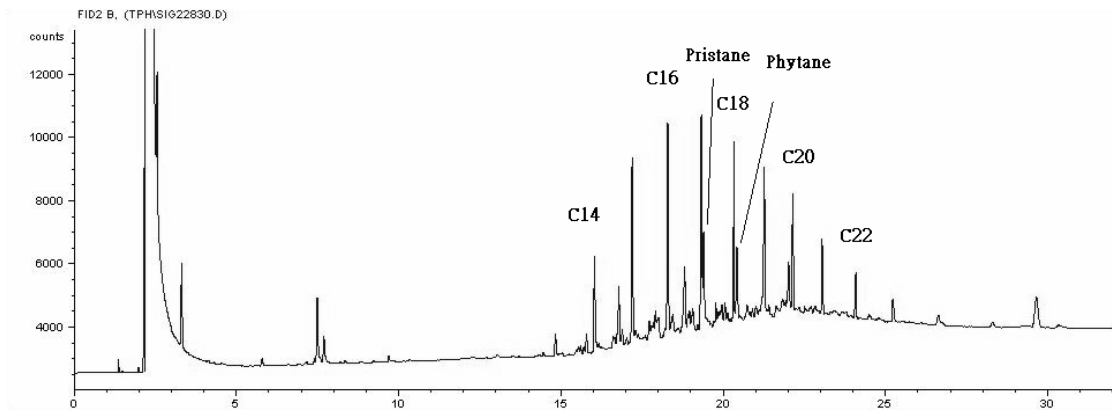


(B)

圖 4-4-4、土壤組之 TPH_D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度



(A)



(B)

圖 4-4-5、滅菌組之 TPH_D 降解層析圖譜 (A) 起始濃度 (B) 最終濃度

4-5 生物菌數結果

本研究對微生物之總菌數判定，乃係由 DAPI 染色法配合螢光顯微鏡照相技術再進行微生物菌數之計算，在實驗後經由螢光顯微鏡照得之菌相如圖 4-5-1 所示，該照相機所拍得之微生物菌數經由計數後，再依比例換算成總微生物菌數，其微生物菌數分布結果如圖 4-5-2 所示。由圖中可觀察到微生物菌數有相當明顯地增減趨勢，故可推測在低摻合比下，具有較適當的環境 (pH 約為 6.5) 可以供微生物適時地生存，使得降解率較高，但隨著摻合比之提高，所觀察到的微生物菌數則無較明顯地增減趨勢，可推斷係因為受限於不適生存的環境 (pH 值約為 5.4) 所造成，使得微生物生長環境受到抑制，導致降解效果不如低摻合比。而雖然微生物菌數沒有相當程度地增減，但是高摻合比最後也有和低摻合比相同之降解效果，推測此一現象，乃因為微生物雖然受限於不適生存的環境，但此時微生物菌數比中間摻合比來的多，故環境雖然在受到抑制情形下，仍產生了較中間摻合比高之效果，且和低摻合比呈相似降解效果，由此亦可推測微生物所受到的環境抑制其效果仍相當地有限。

由圖 4-5-2 中發現控制組之微生物總菌數亦無明顯增長之現象，此亦為控制組降解率偏低之原因。就堆肥組方面而言，雖然總菌數高，但是除了環境受到抑制外，加上營養鹽亦過多的情形下，而導致堆肥組降解率較差。土壤組則因為本身在缺乏營養鹽情形下加上其本身含有之微生物數目較少，故降解率亦較差。在滅菌組方面，由於 DAPI 染色法無法識別活菌與死菌之計數，故在初期部分仍可觀察到部分微生物菌，推測應為死菌造成的誤判，而在後期尚發現漸漸有微生物出現之情形，推測應為抑菌劑在經過一陣子之滅菌後效力減弱導致微生物開始生長之現象。

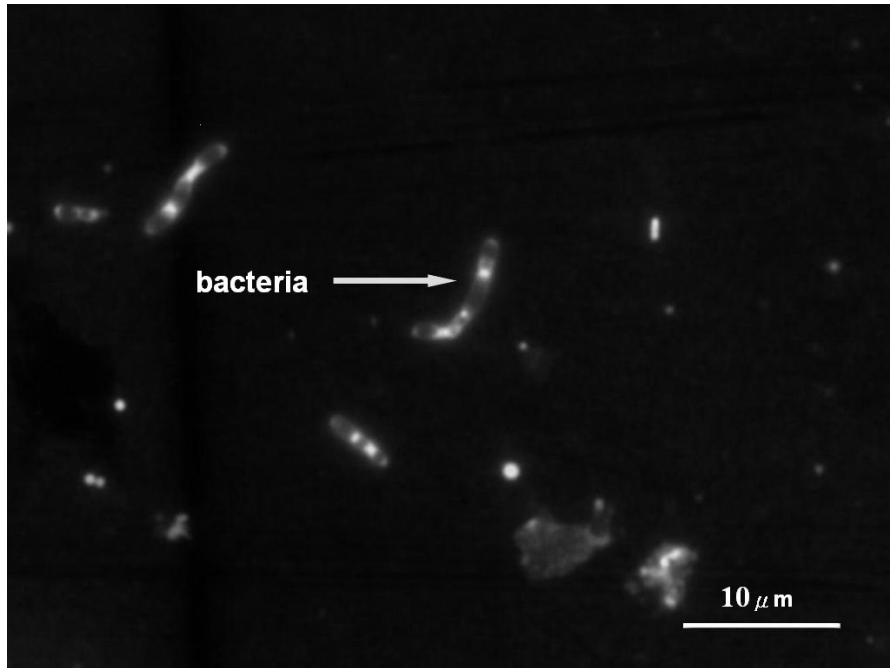
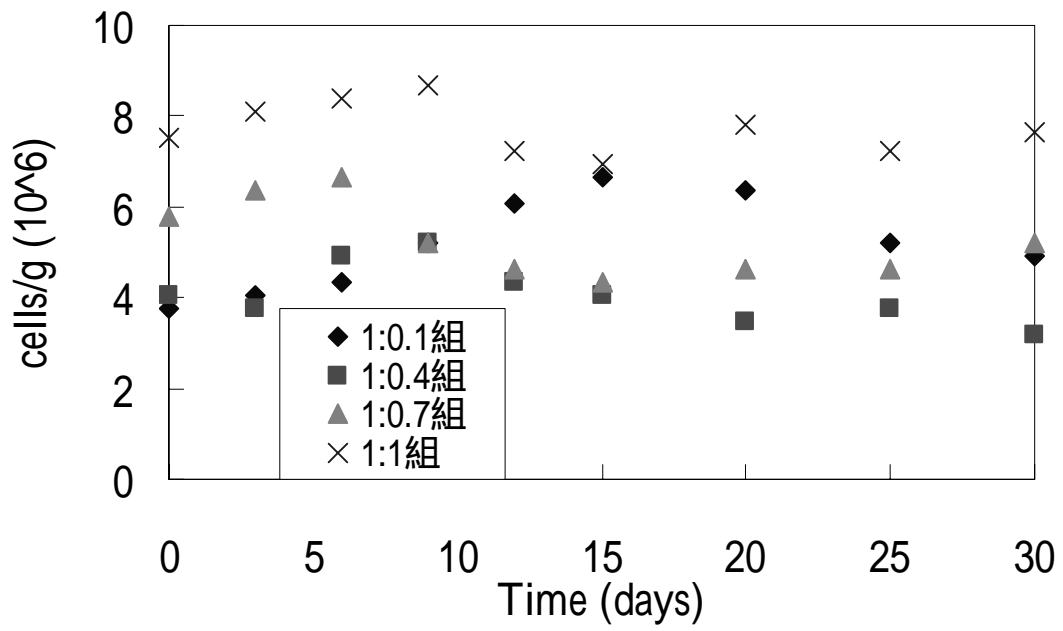
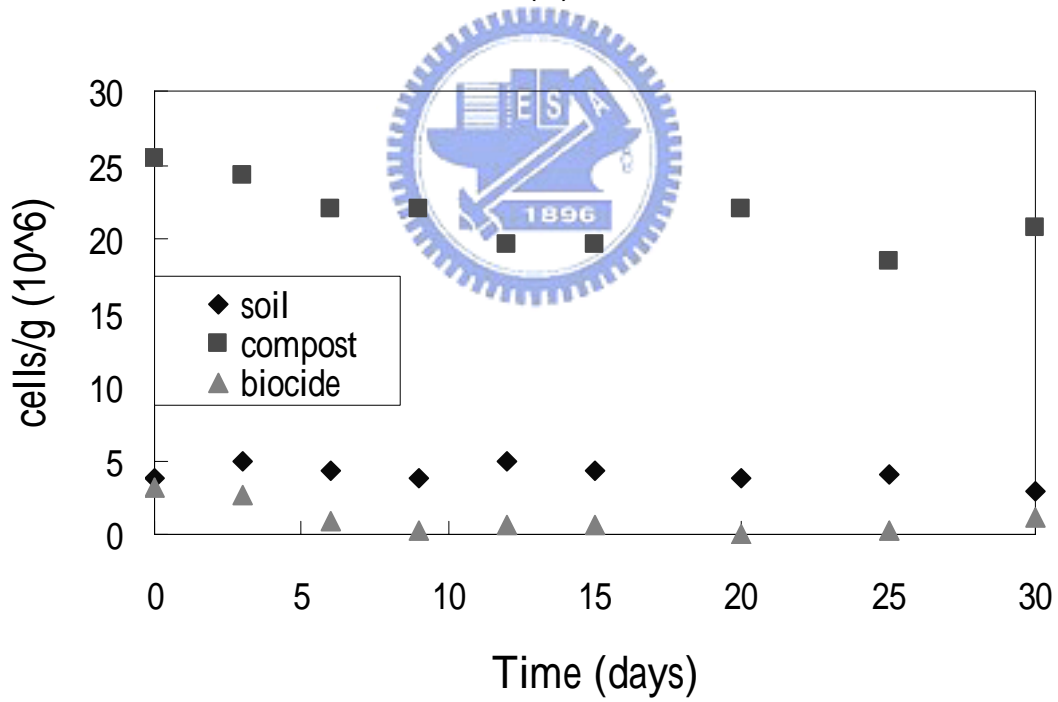


圖 4-5-1、利用 DAPI 染色配合螢光顯微鏡所觀察到之微生物總菌數圖





(A)



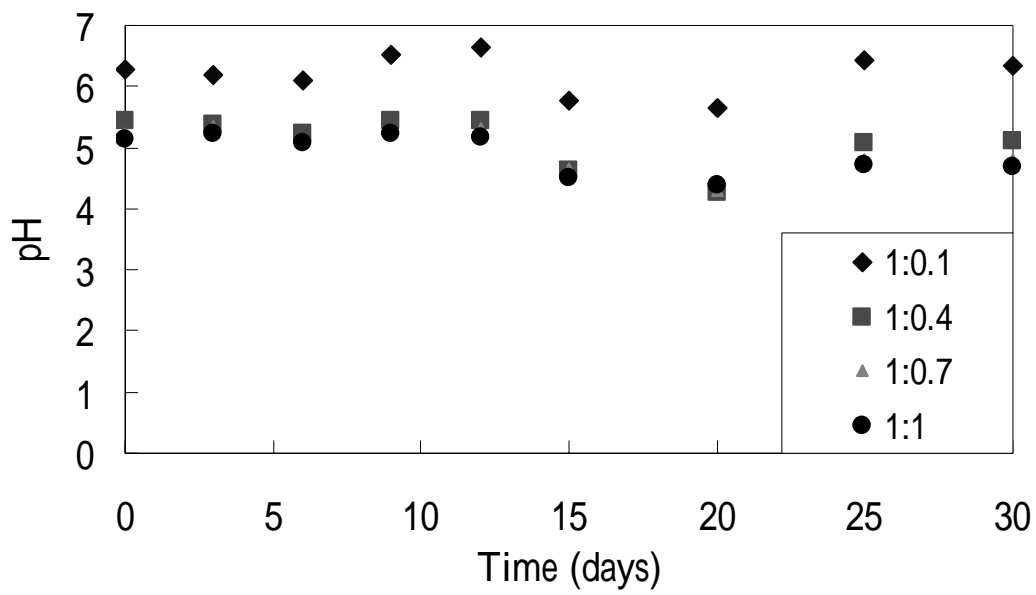
(B)

圖 4-5-2、TPH_D 降解過程之總菌數分佈圖 (A)不同摻合比下之實驗 (B) 單獨土壤、單獨堆肥和滅菌實驗

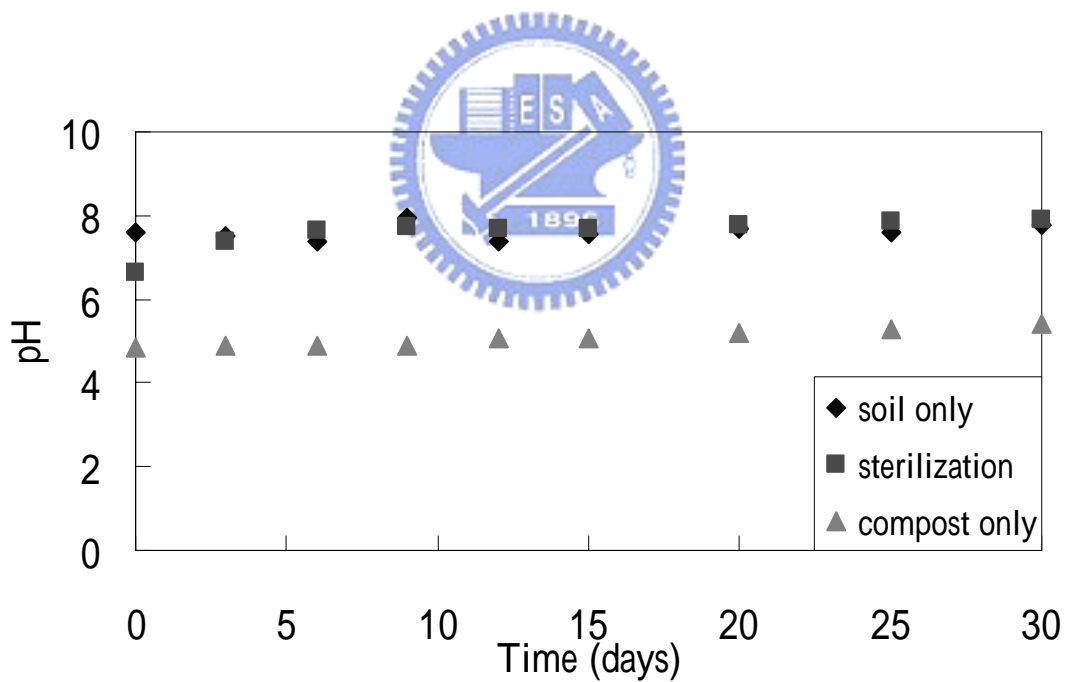
4-6 生物降解過程中之 EC、pH 之變化

在生物降解過程中，常常可能因為微生物產生特定酵素而使得 pH 值改變，而且微生物之活性亦會影響 pH 值，而在降解過程中，產生嚴重酸化或是鹼化之現象，而有影響植物或其他生物之虞，本研究在生物降解過程中 pH 之變化，可由圖 4-6-1 所示。由 pH 隨時間之變化可以得知在本研究中，並無嚴重之酸化或鹼化之現象。

為了瞭解在堆肥添加入土壤之復育實驗中，其可溶性鹽類濃度是否會變化，而加以監測，以評估是否會有造成土壤鹽化及作物之生長抑制之可能，而一般係電導度大於 4 ms/cm 判定為會造成土壤鹽化。由圖 4-6-2 所示，可知本研究之 EC 值，在實驗組方面乃為 1.0~3.4 ms/cm，而控制組方面，除了滅菌組因加入疊氮化鈉 (NaN_3) 而呈現較高值外 (5.4~5.9 ms/cm)，其餘介於 0.36~3.8 ms/cm 之間，故得知本次研究過程中將無造成土壤鹽化之虞。

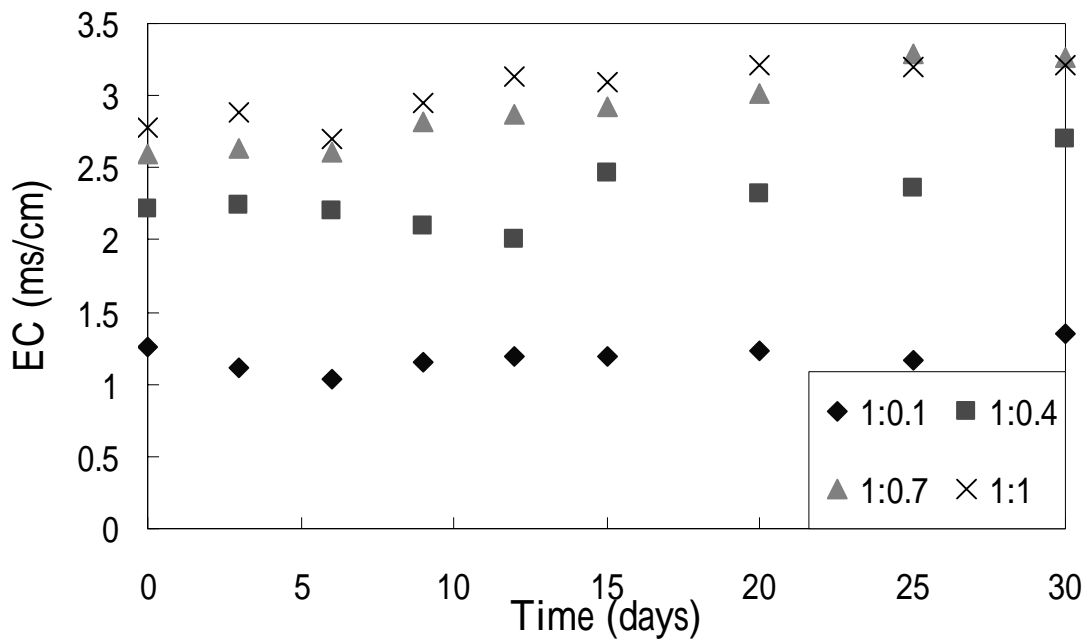


(A)

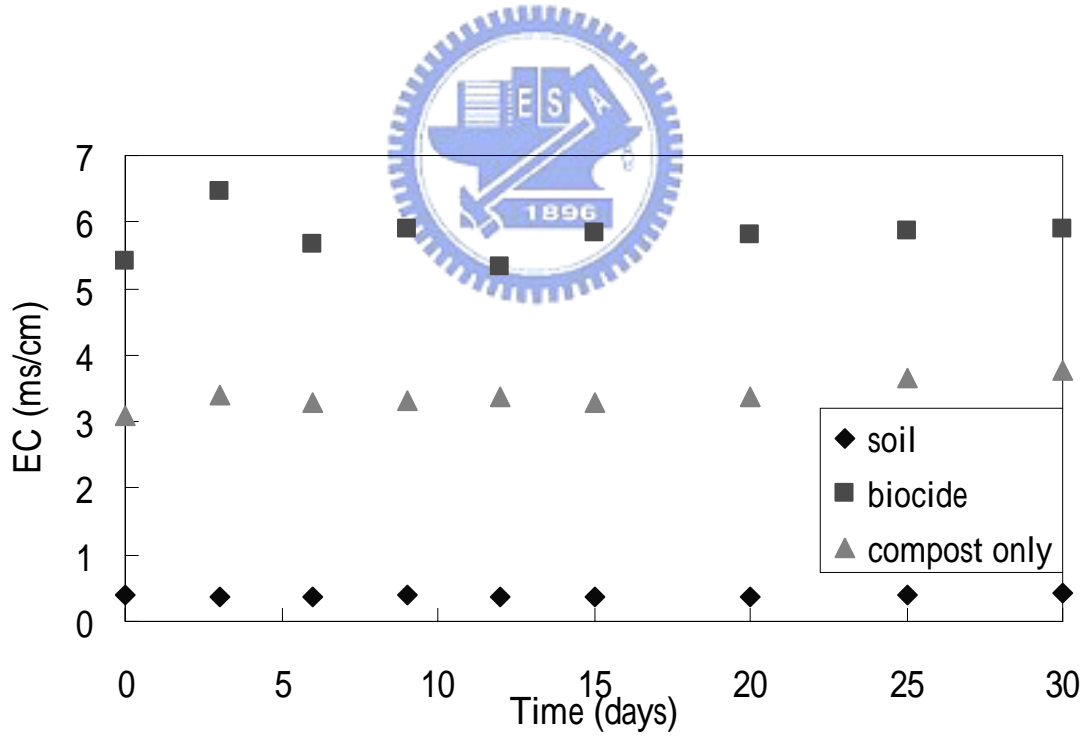


(B)

圖 4-6-1、實驗過程中之 pH 值監測 (A) 不同摻合比下之實驗 (B) 單獨土壤、單獨堆肥和滅菌實驗



(A)



(B)

圖 4-6-2、實驗過程中之 EC 值監測 (A) 不同摻合比下之實驗 (B) 單獨土壤、單獨堆肥和滅菌實驗

4-7 品質保證與品質管制 (QA/QC)

4-7-1 檢量線配製

本研究所製備之柴油標準溶液乃是以序列稀釋法配製，即以五種不同濃度分別進行分析，再由不同濃度下積分獲得之面積與濃度作圖，利用直線的最小平方差方程式 (least square error equation) 而求得一直線回歸方程式，並計算其相關係數。如圖 4-7-1 所示。而重金屬和陽離子交換實驗亦由上述方式配製，如表 4-7-1 所示，而由檢量線得知，相關係數 R^2 值依檢測方法 (NIEA-PA103, 1999) 之規定需大於或等於 0.995，由本研究之相關係數可知皆符合檢量線製備之規定。

4-7-2 方法偵測極限 (Method detection limit)



針對索式萃取法進行方法偵測極值之建立，本研究係將利用西湖溪之土壤做為摻合基質樣本，依儀器偵測極限配製其 4 倍濃度之標準溶液，而重金屬和陽離子交換實驗係以硝酸溶液配製，將上述配製方式分別重覆方法分析七次，將分析所得標準差乘以 3 倍，即為本研究之方法偵測極限，如表 4-7-2 所示。

4-7-3 空白分析 (Blank)

為了探討實驗過程中可能發生之人為或非人為之誤差，則需要進行空白分析實驗，瞭解藥品與器具是否遭受到污染，以避免人為疏失而造成誤差。本研究所進行之空白分析結果，如表 4-7-3 所示，發現並無污染情形，符合實驗室品質管制。

4-7-5 重覆分析 (Duplicate)

經由同一樣品重覆分析二次，可以瞭解數據之差異性，一般係用相對百分偏差 R (Relative percent difference)，來認定其分析之精密度。由表 4-7-3 可得知TPH_D 之相對百分偏差介於 1.0-6.8 % 之間，其平均值為 4.2 %，而重金屬和陽離子交換實驗則為 0.3-12.7% 之間。

4-7-6 添加樣品分析 (spike sample analysis)

添加樣品分析則是為了要瞭解在實驗過程中，檢測方法之適用性及是否會受到樣品之基質干擾，結果如表 4-7-3 所示，由表中可以得知本次研究重覆分析平均回收率為 86.3%，而重金屬和陽離子交換實驗最低亦有 84%。綜合上述，本實驗之品質管制均符合其規定之標準。



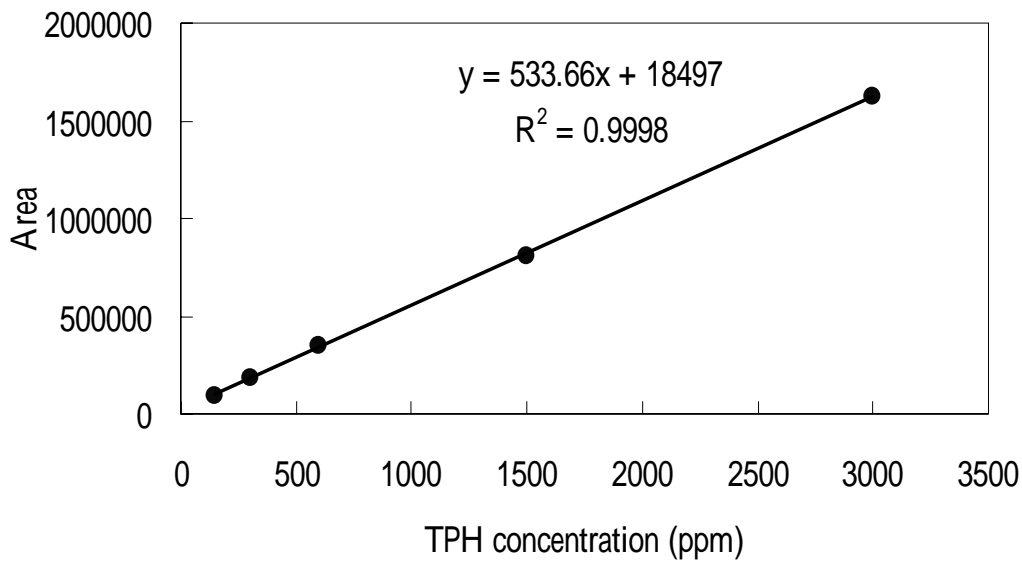


圖 4-7-1、柴油標準品之檢量線圖

表 4-7-1、重金屬分析與陽離子交換實驗之線性相關係數

Type	R-square
Cu (ppm)	0.9997
Zn (ppm)	0.999
Pb (ppm)	0.9999
Cr (ppm)	0.9988
Cd (ppm)	0.9995
Ni (ppm)	0.9987
^a Na (ppm)	0.998

^a indicate concentration of sodium ion in the CEC (cation exchange capacity) experiment

表 4-7-2、方法偵測極限 (A) TPH_D 實驗 (B) 重金屬與陽離
交換實驗

(A)

	MDL ^a
TPH _D (mg/kg)	4.4

^a method detection limit (3×St. deviation)

(B)

Type	MDL ^a
Cu (ppm)	0.019
Zn (ppm)	0.004
Pb (ppm)	0.037
Cr (ppm)	0.011
Cd (ppm)	0.005
Ni (ppm)	0.079
^b Na (ppm)	0.002

^a method detection limit (3×St. deviation)

^b indicate concentration of sodium ion in the CEC (cation exchange capacity) experiment

表 4-7-3、空白分析、添加回收率與再現性 (A) TPH_D 實驗 (B) 金屬與
陽離子交換實驗之空白分析、添加回收率與再現性

(A)

Time (day)	^a Blank (mg/kg)	Recovery (%)	Relative percent difference (%)
0	ND	87.0	2.7
3	ND	83.9	4.9
6	ND	80.9	3.6
9	ND	84.3	1.8
12	ND	89.0	6.8
15	ND	93.3	6.8
20	ND	86.4	3.6
25	ND	85.5	1.0
30	ND	86.6	6.3
Mean	-	86.3	4.2

^a indicate smaller than MDL (method detection limit)

(B)


	Blank (mg/kg)	Recovery (%)	Relative percent difference (%)
Cu	ND ^a	104	3.5
Zn	ND	92	4.1
Pb	ND	96	10.2
Cr	ND	92	12.7
Cd	ND	88	-
Ni	ND	84	6.4
Soil-Na ^b	ND	100	0.3
Compost-Na	ND	98	8.1

^a indicate smaller than MDL (method detection limit)

^b indicate concentration of sodium ion in the CEC (cation exchange capacity) experiment

第五章 結論與建議

5-1 結論

1. 由本研究之結果可以發現添加堆肥於受柴油污染之土壤確實有不錯的降解效果，而在 1:0.1 濕重土壤與堆肥之摻合比下，即可達到相當顯著的降解 (68%)，且在 pH、EC、重金屬等方面對於復育後之場址亦較無二次污染之虞，雖然 1:1 亦有同樣之效果，但容易因施用過多之堆肥而有導致突增場址負荷或二次污染 (secondary pollution) 之虞。
2. 從實驗設計之反應曲面結果可以知道生物降解最佳含水率範圍約在最大含水量之 20%-65% 間，且可知摻合比分別在最高 (1:1 濕重) 和最低 (1:0.1 濕重) 摻合比中有較佳之降解。
3. 由迴歸係數分析，可知含水率和摻合比無相互作用 (intereaction) 關係，但是溫度對生物之降解影響相當顯著，亦即在冬天進行現地復育時，降解效率會較差。
4. 由總菌數實驗中，在低摻合比方向，可以發現因為生長條件較佳 (pH 偏中性)，故微生物菌數有相當明顯地增減趨勢，使得降解率較高，而其他摻合比則可能受限於環境特性 (pH 偏酸性)，故所觀察到的微生物菌數則無較明顯地增減趨勢，但是由於高摻合比 (1:1 濕重) 也有和低摻合比之相同降解效果，由觀察微生物菌數推測此一現象可以發現雖然微生物菌數沒有相當程度地增減，但是在微生物菌數較高的情形下，而產生了相似效果。

5. 利用一階動力模式配適本研究之 TPH_D 之降解可以發現相當適合，因為由確認實驗中可以得到相當高的相關係數 ($r=0.81-0.96$)。
6. 在較佳低摻合比和高摻合比之一階動力常數後可知分別約大於土壤未加堆肥實驗之兩倍。
7. 滅菌組之降解率只有 11%，故由此可知本研究之柴油降解方式，除了其他物化反應降解之外，主要係以生物降解方式為主。
8. 由本研究所得之最佳低摻合比 (1:0.1) 其動力常數約大於單獨土壤組 (soil only) 之兩倍多，故可見本研究利用堆肥進行受柴油污染土壤之生物降解，確實可以得到相當顯著之效果。
9. 故綜合上述，在能有效降解受柴油污染之土壤及避免使環境突增負荷，且能有效改良土壤，其最適當之摻合比為 1:0.1，即土壤和堆肥 (濕重) 之摻合比例，乃為本研究所得之結論。

5-2 建議

1. 由於本研究之總菌數係以 DAPI 染色法進行固定後，利用螢光顯微鏡照相計數之方法，但是無法判別活菌與死菌之差別，容易因此在計數上發生人為誤差，故若能配合測定脫氫酵素活性 (Dehydrogenase activity) 以決定微生物活性或是測定土壤呼吸測定 (Soil respirometric tests) 以提供生物降解之潛能，將更能完整地瞭解微生物之增長變化 (Namkoong, 2002 ; Balba, 1998)。
2. 本研究所使用之堆肥，於風乾一個月後，推測係尚未完全穩定，而產生酸化之現象，導致較高之摻合比產生抑制，而無更高之降解效率表現，故針對現地復育技術，需採用穩定之堆肥進行生物降解，相信在考量二次污染風險之下，所使用之堆肥量將可得到更佳之降解效果。
3. 影響生物復育之因子除了微生物之外，尚有營養鹽、污染物濃度及毒性、電子接受者、溫度、pH、氧化還原電位 (Redox potential, ORP) 等，若針上述影響因子均以實驗因子統計方式進行研究，做為現地復育時之參考時，將更能得到更客觀之結果。
4. Ronald (1995) 提到，可以利用間歇式地連續施用肥料於受油污染之土壤中，可以更有效地減少柴油污染濃度，且能保護植物生長及無徒增環境負荷之虞，故往後可考慮配合復育時間因素，以利用最佳間隔時間進行受柴油污染之土壤，方能得到更有效率之降解效果。

第六章 參考文獻

- Alexander, M. (1994) Biodegradation and bioremediation. *Academic Press*, New York
- Atlas, R. M. and Bartha, R. (1992) Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 12, Plenum Press, New York, pp. 287-338
- Balba, M. T., Awadhi, N. A. and Daher, R. A. (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 32, pp. 155-164
- Boopathy, R. (2004) Anaerobic biodegradation of no.2 diesel fuel in soil: a soil column study. *Bioresource Technology*, Vol. 94, pp. 143-151
- Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, Vol. 74, pp.63-67
- Bossert, I. and Bartha, R. (1984) The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology*, Macmillan, New York, pp.435-473
- Cassidy, D.P. and Irvine, R. L., (1997) Biological treatment of a soil contaminated with diesel fuel using periodically operated slurry and

solid phase reactors. *Water Science Technology*. Vol. 35, No. 1, pp.185-192

Cecil, L. H., David, Z. R. and Richard, K. (2001) Municipal Sewage Sludge Management/engineering. *Technomic Publishing Company, Inc.*

Del' Arco, J. P. and Franca, F. P. (2001) Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environmental Pollution*, Vol.110, pp.515-519

Gestel, K. V., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J. and Ryckeboer, J. (2003) Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, Vol.125, pp.361-368

Gilbert, R. O. (1987) Statistical methods for environmental pollution monitoring. *Pacific Northwest Laboratory*, pp. 20-23

Glass, D.J., Raphael, T., Valo, R. and Van eyk, J. (1995) International Activities in Bioremediation. *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*, edited by R.E. Hinchee, J.A. Kittel, and H.J. Reisinger, pp. 11-33.

Hupe, K., Luth, J.C., Heerenklage, J. and Stegmann R. (1996) Enhancement of the biological degradation of contaminated soils by compost addition. *Science of Composting*, London: Blackie

Academic and Professional, pp. 913-923.

Jorgensen, K. S., Puustinen, J. and Suortti, A. M. (2000) Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, Vol. 107, pp. 245-254

Jonge, H. D., Freijer, J. I., Verstraten, J. M. and Westerveld, J. (1997) Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environmental Science Technology*, Vol. 31, pp. 771-775

LaGrega, M.D., Buckingham, P.L. and Evans, J.C. (1994) Hazardous Waste Management. *McGraw-Hill*, New York.

Lee Linda S., Mats Hagwall, Joseph J., (1992) Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. *Environmental Science Technology*, Vol. 26, No.11

Montgomery, (1998) Design and analysis of experiments. *John Wiley & sons*

Namkoong W., Hwang E. Y., Park J. Y. and Choi J.Y. (2002) Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, Vol. 119, pp.23-31

Nocentini, M., Pinelli, D. and Fava F. (2000) Bioremediation of a soil

contaminated by hydrocarbon mixtures : the residual concentration problem. *Chemosphere*, Vol. 41, pp.1115-1123

Prochazka, S., Mulholland, M. and Lloyd, J. A. (2003) Optimisation for the separation of the oligosaccharide, sodium Pentosan Polysulfate by reverse polarity capillary zone electrophoresis using a central composite design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 31, pp.133-141

Puskas, K., Awadhi, A. N. and Abdullah, F. (1995) Remediation of oil contaminated sandy soil in a slurry reactor. *Environment International*, Vol. 21, No. 4, pp.413-421

Rhykerd, R. L., Crews B., McInnes, K.J., Weaver, R.W. (1999) Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresource Technology*, Vol. 67, pp. 279-285

Ronald, M. A. (1995) Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp.317-327

Shell International Ltd., (1983) The chemistry of petroleum. *The Petroleum Handbook*, 6th ed., Elsevier. New York, pp.223-264

Taylor, C. and Viraraghavan T. (1999) A bench-scale investigation of land treatment of soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere*, Vol. 39, No. 10, pp.1583-1593

Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. (2002) Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulose-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 12, pp.99-105

Volker, R., Wolfgang, B and Oscar H.P. (2002) Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere*, Vol. 49, pp.559-568

Wei, Y., Walter K. D., Katherine banks, M., Skalsky, J. and Strauss, E. A. (1995) Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 9, pp.3367-3372

Wang, Z. and Merv, F. (1997) Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 774, pp.51-78

Wolfgang, D., Doris, F., Martin, S., Petra, M. B. and Peter, K. (1995) Comparison of ex-situ and in-situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. *International Biodeterioration and*

Biodegradation, pp.301-316

Xiaoqing, Y., Erickson, L. E. and Fan, L.T. (1995) A study of the dissolution rate-limited bioremediation of soils contaminated by residual hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 41, pp.299-232

Zytner, R.G., Salb, A., Brook, T.R., Leunissen, M. and Stiver, W. H. (2001) Bioremediation of diesel fuel-contaminated soil. *Can. J. Civ. Eng.* 28, pp.131-141

王一雄，1997。土壤環境污染與農藥。明文書局

王一雄、陳尊賢、李達源，1995。土壤污染學。國立空中大學用書

王一雄、陳尊賢、李達源，2001。土壤資源利用與保育。國立空中大學用書

行政院環境保護署，2000。土壤及地下水污染場址整治與控制計畫撰寫及審查作業準則

行政院主計處，2003。中華民國統計月報 (Monthly statistics of the republic of china)，453 期

施英隆，2002。環境化學，五南圖書出版股份有限公司，pp.80-89

易任，1986。土壤力學試驗步驟及試驗報告。曉園出版社，pp.9

陳谷汎、高志明，2002。土壤及地下水生物復育技術，工業污染防治，第84期，pp.136-157

黃靖雄，1996。現代車用柴油引擎，全華科技圖書股份有限公司，pp.40-50

童翔新、林仕明等，1999。苗栗縣後龍溪漏油污染河床調查評估及清除之可行性研究，期中報告，苗栗縣環境保護局

葉琮裕組長、王瑞斌，2001。農地土壤污染處理技術，環保訓練園地，第63期



彭誌強，2002。以 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 研究污泥同時好氧消化及金屬溶出程序之菌相變化，國立中興大學環境工程研究所碩士論文，pp.58-63

張添晉、陳尊賢、章裕民等，「土壤污染改善技術參考指引」彙編，行政院環保署研究計畫成果報告，1997