

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

提昇多環芳香烴污染土壤生物復育之創新方法

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC94-2211-E-009-008-

執行期間： 94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位： 國立交通大學環境工程研究所

計畫主持人： 林志高

報告類型： 精簡報告

報告附件： 出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式： 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 27 日

提昇多環芳香烴污染土壤生物復育之創新方法

一、中文摘要

現今利用厭氧生物處理土壤中多環芳香烴 (PAHs) 的研究逐漸增加，根據研究顯示在硫還原的條件下 PAHs 能有效地被降解，但直接以馴養成熟的硫還原菌 (SRB) 為優勢菌種處理 PAHs 的研究甚少，且鮮少進行影響因子與最適操作條件的探討。本研究以馴養成熟之硫還原菌為優勢菌種處理受 PAHs 污染之土壤；並利用中央合成實驗設計法，找出降解的最適操作條件。本研究主要討論三個影響因子：pH 值、微生物濃度及共基質濃度 (乙醇)。實驗結果顯示在酸性的情況下，其 PAHs 降解的效果較佳，且微生物含量越高其去除效率也越好，而添加多量的額外基質並無顯著地增加 PAHs 的降解。在乙醇濃度低於 35 mg/L、pH 介於 4~6.5 且微生物濃度達到 70% 以上時，PAHs 降解率可達到 90% 以上。

關鍵詞：多環芳香族烴 (PAHs)、硫還原菌 (SRB)、厭氧生物處理、中央合成實驗設計

二、前言

以往相較於水與空氣污染，土壤污染對於人類的影響較不直接，故常被人類所忽略。其中多環芳香族烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 為世界已知的致癌化學物中最龐大的一群。PAHs 已名列美國環保署公告之 129 種優先列管物質，且亦為國內環保署建議優先列管之有害空氣汙染物 (Ramsay *et al.*, 2003)。

環境中 PAHs 的主要來源為人為產生，即碳氫化合物不完全燃燒所致。而 PAHs 一旦排放至大氣，會經由雨水沖刷而沉積在土壤環境中。然而 PAHs 屬於化學結構穩定的高疏水性物質，使得其極易累積、吸附在土壤中，造成環境的衝擊。以往的處理方法大多為物化處理 (如稀釋法、安定法、萃取法等)，其有成本負荷及二次污染之虞

等缺點。因此，現在諸多研究皆轉而利用微生物來進行污染物的降解，生物處理已為現代的主流趨勢。生物復育法 (Bioremediation) 是利用微生物在好氧或厭氧的情況下，經由礦化作用 (Mineralization) 或生物轉化作用 (Biotransformation) 將污染物轉變成水及二氧化碳、或不具毒性

之中間產物，使受污染的土壤恢復其原本正常之用途。

過去的研究顯示 PAHs 在好氧及厭氧情況下皆可被降解。好氧處理的部份已被廣泛討論，但實際上，大部分的污染場址，約只有表面 1-10 mm 的地方是好氧，其餘 90-99% 皆是在厭氧的狀態 (Rockne and Strand, 1998)，故利用厭氧處理更能符合現況。以厭氧處理程序而言，許多研究以純菌或混合菌系統來處理受 PAHs 污染的土壤，並比較在硫酸還原、甲烷生成和脫硝等不同環境條件下的降解效率。而其結果指出在硫還原的環境下 PAHs 去除效率最佳 (Coates *et al.*, 1996; Rothermich *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2002)。

硫還原菌 (Sulfate-Reducing Bacteria, SRB) 屬於絕對厭氧菌，廣泛的分布在各個厭氧環境中。有鑑於 PAHs 在硫酸還原環境下之降解效果最佳，本研究以馴養成熟之 SRB 混合菌種來處理受 PAHs 污染的土壤，並選擇五種不同的 PAHs 作為目標污染物。以中央合成實驗設計法 (Central composite design, CCD) 規劃實驗操作條件，探討不同 pH 值、微生物濃度及共基質 (乙醇) 濃度對 PAHs 降解之影響，並利用反應曲面法 (Response surface methodology, RSM) 分析結果分析並建立其最適操作條件。

三、研究材料與方法

1. 實驗土壤

本研究所用土壤採自新竹交通大學博愛校區。採集深度約 30 cm，破碎後自然風乾，經 2 mm 篩網過篩備用。其基本特性如表 1 所示。

表1. 土壤基本性質

Parameter	Value
pH	7.0 ± 0.02*
Moisture Content (%)	1.09 ± 0.11*
Volatile solid (%)	4.70 ± 0.17*
C (%)	1.49
N (%)	0.54
H (%)	0.86

*平均值 ± 標準偏差 (n=3)

2. 多環芳香族烴化合物 (PAHs)

本研究選擇五種 PAHs 為目標污染物，分別為 Naphthalene、Fluorene、Phenanthrene、Fluoranthene 和 Pyrene，以探討不同環數的 PAHs 其個別生物降解的情形。

3. SRB 菌種

本研究所使用的 SRB 源自於養豬廢水的厭氧污泥，經加入 SRB 生長之營養鹽進行長期批次馴養所得。配置好的營養鹽需經高壓滅菌釜進行滅菌 15 分鐘 (121°C)；滅菌後的營養鹽以 NaOH 及 HCl 調整 pH 值至 7.2~7.5 後方可進行馴養使用。

4. 配製擬污染土壤

分別秤取 0.01 g 的 PAHs 溶在二氯甲烷中，再將此溶液添加至 200 g 的土壤中，攪拌均勻後，讓土壤自然風乾。此即為生物實驗的儲備土壤。

5. PAHs 生物降解實驗

根據實驗設計的規劃，取擬受 PAHs 污染的土壤 10 g 於 250 mL 棕色瓶中，分別加入各種不同比例的新鮮營養鹽、植種及乙醇後調整 pH 值至實驗所設的條件下。再將反應槽放置在恆溫震盪水槽中，溫度控制在 35°C，並以 150 rpm 的速度震盪，生物降解實驗進行時間為期一個月，比較實驗起始與進行一個月後土壤中的 PAHs 濃度，計算其降解率。實驗設計規劃的操作因子水準如表 2。

6. 土壤中 PAHs 之萃取與分析

本研究以微波萃取法 (Microwave Assisted Extraction) 進行土壤中 PAHs 之萃取。將土樣置入萃取瓶中，以 16 mL 之丙酮與 16 mL 之二氯甲烷為萃取溶劑，在 96°C 的溫度下萃取 17 分鐘。萃取後之溶劑液以減壓濃縮機濃縮至 1~2 mL，並以二氯甲烷定量至 3 mL。GC-FID 分析條件為：注射口溫度 280°C、偵測器溫度 280°C、初始溫度 100°C 維持 1 分鐘，以 6 °C/min 的速率上升至 280°C 維持 10 分鐘。

四、結果與討論

1. PAHs 降解最適操作條件

(1) 中央合成設計結果

經中央合成設計法所設計之各實驗組操作條件及實驗結果如表3 所示。PAHs 降解率與各操作因子關係之等高線圖如圖 1 所示。圖 1 中的三張圖雖非皆為完整的收斂曲線，但仍可找出其最適操作條件。其中，在低乙醇濃度的條件下 (hold value = 46.22 mg/L)，pH 與微生物濃度對 PAHs 降解率的關係，如圖1(a)。在 pH 值介於 4~6.5 且微生物濃度於 70% 以上時，PAHs 的降解率能達到 90% 以上。觀察在高微生物濃度條件下，pH 值與乙醇濃度對 PAHs 降解率的影響，如圖 1(b)，在酸性條件下且乙醇濃度 35 mg/L 以下時，PAHs 有最高的降解效率。而在酸性環境下，微生物濃度與乙醇濃度對 PAHs 降解率的分析如圖 1(c)，PAHs 降解率最適條件是出現在微生物濃度高於 65% 且乙醇濃度低於 40 mg/L 之時。綜合上述，在略微酸性的條件下有助於 PAHs 由土壤中釋出，增加 PAHs 之生物有效性 (Bioavailability)，此結果與凌等所作之研究成果一致 (凌慧紋，2004)。此外，PAHs 之降解率隨著微生物濃度之提高呈現增加的趨勢，意謂著添加已馴化之硫還原菌可促進 PAHs 的降解率。此外，共基質 (乙醇) 之添加並無法促進 PAHs 之降解，此結果亦與 Lei 等人 (2005) 之研究成果一致。由實驗結果顯示欲使 PAHs 的降解率能達 90% 以上，其最適操作範圍為 pH = 4 ~ 6.5、微生物濃度在 65% 以上和乙醇濃度低於 35 mg/L。

表 2. 中央合成設計因子水準表

Factor	Levels				
	- 1.68	- 1	0	+ 1	+ 1.68
X ₁ : pH	4.0	5.4	7.5	9.6	11.0
X ₂ : 微生物濃度 (%)	30	40	55	70	80
X ₃ : 乙醇濃度 (mg/L)	30	46	70	94	110

表 3. 中央合成設計因子與對應反應參數表

Run Order	Coded Value			Natural Value			Response
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	微生物濃度(%)	乙醇濃度(mg/L)	
1	- 1.68	0	0	4.0	55	70	82.55
2	0	0	+ 1.68	7.5	55	110	78.50
3	- 1	- 1	- 1	5.4	40	46	66.52
4	0	0	- 1.68	7.5	55	30	86.73
5	0	0	0	7.5	55	70	89.58
6	+ 1	- 1	- 1	9.6	40	46	77.26
7	0	+ 1.68	0	7.5	80	70	75.23
8	+ 1	+ 1	+ 1	9.6	70	94	53.26
9	+ 1	+ 1	- 1	9.6	70	46	73.38
10	0	0	0	7.5	55	70	68.62
11	- 1	- 1	+ 1	5.4	40	94	78.35
12	- 1	+ 1	+ 1	5.4	70	94	53.72
13	+ 1.68	0	0	11.0	55	70	50.86
14	0	0	0	7.5	55	70	70.51
15	- 1	+ 1	- 1	5.4	70	46	88.19
16	+ 1	- 1	+ 1	9.6	40	94	77.01
17	0	- 1.68	0	7.5	30	70	57.69

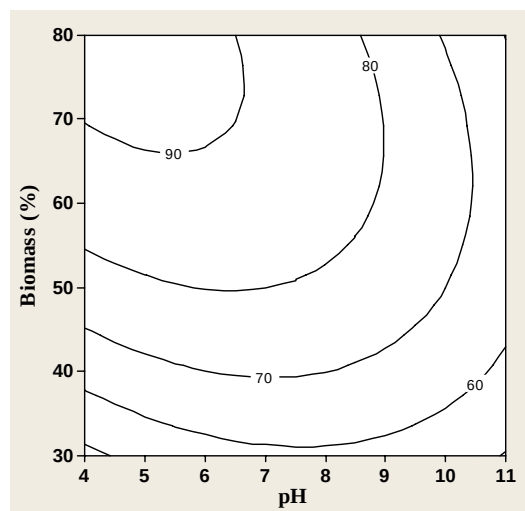
(2) 配適二階模式分析

PAHs 降解率的變異數分析及迴歸分析如表 4 和表 5 所示。在迴歸分析中，P-value 可用來判斷因子的顯著性，當 α 為 0.05 時，則表示在 95% 信賴區間下，若因子的 $P < 0.05$ 則其為顯著 (Significant)。而 lack-of-fit 的值則是用來判斷所建立的模式是否符合所得到的數據。若 lack-of-fit 的 P-value 低於 0.05，則表示在 95% 的

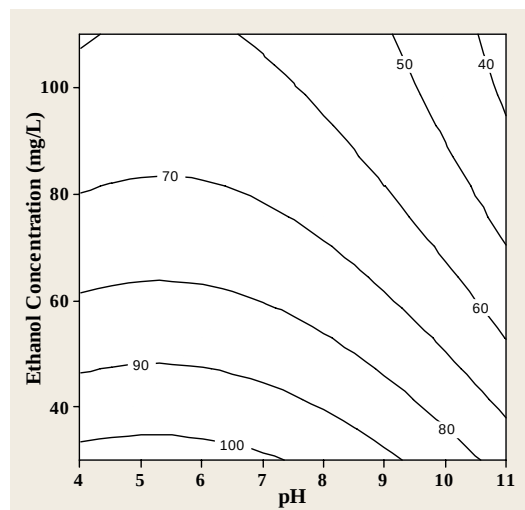
信賴水準下此模式不適用於所得數據。而由表 4 中 lack-of-fit 的 P-value 可知，分析所得之 PAHs 降解模型為適用的。由表 5 可知，對於 PAHs 降解率而言，乙醇濃度與微生物濃度之間交互影響的 P-value 值小於 0.05，則表示此兩因子的交互作用對 PAHs 降解而言較為顯著。另外，PAHs 降解率的相關係數 R^2 為 0.76 表示由二階反應曲面設計所得之預測值與實際實

驗值相當接近。而本實驗設計所得之二階反應模型如式 1。

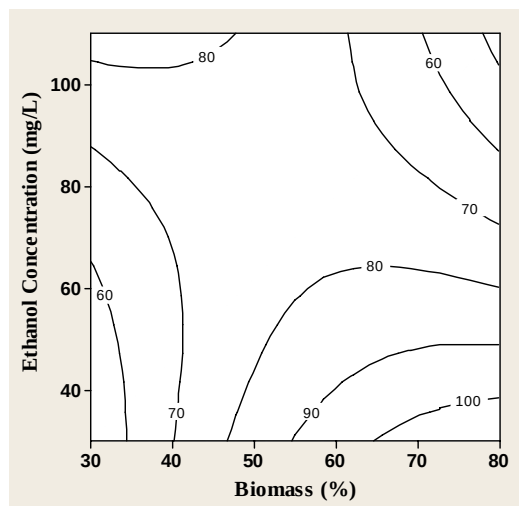
$$Y = 78.0 + 0.07 X_1 - 5.57 X_2 - 3.39 X_3 + 1.22 X_1^2 - 5.44 X_2^2 + 0.43 X_3^2 - 4.05 X_1 X_2 + 3.19 X_1 X_3 - 15.7 X_2 X_3 \quad (R^2 = 0.76)$$



(a)



(b)



(c)

圖 1. (a) pH 與微生物濃度對 PAHs 降解率之等高線圖。(b) pH 與乙醇濃度對 PAHs 降解率之等高線圖。(c) 乙醇濃度與微生物濃度對 PAHs 降解率之等高線圖。

四、結論

由以上實驗分析結果可得以下結論：

1. PAHs 降解的最適操作條件為 pH = 4 ~ 6.5、乙醇濃度低於 35 mg/L 及微生物濃度高於 65%。此三種影響因子在此範圍下，PAHs 的降解效率可達到 90% 以上。
2. 利用硫還原菌處理土壤中 PAHs 具有顯著的成效。在適當的條件下，實驗進行 30 天即可有約 90% 的降解率，而有些文獻需要一個月以上的時間才可達成這樣的效果，如表 6。
3. 經變異數分析結果可知乙醇濃度與微生物濃度之間的交互作用對 PAHs 降解率有較顯著的影響。且 lack-of-fit 的 P-value 大於 0.05，則在 95% 的信賴水準下，實驗數據適

用分析所得到的 PAHs 降解模型。

表 4. PAHs 去除率之變異數分析

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	3142.73	3142.73	349.19	2.48	0.122
Linear	3	581.05	581.05	193.68	1.38	0.327
Square	3	384.75	384.75	128.25	0.91	0.483
Interaction	3	2176.93	2176.93	725.64	5.16	0.034
Residual Error	7	984.92	984.92	140.70		
Lack - of - Fit	5	936.98	936.98	187.40	7.82	0.117
Pure Error	2	47.93	47.93	23.97		
Total	16	4127.65				

表 5. PAHs 去除率之迴歸分析

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	78.0035	6.835	11.412	0.000
X ₁	0.0747	3.210	0.023	0.982
X ₂	-5.5721	3.210	-1.736	0.126
X ₃	-3.3901	3.210	-1.056	0.326
X ₁₂	01.2238	3.533	-0.346	0.739
X ₂₂	-5.4382	3.533	-1.539	0.168
X ₃₂	0.4308	3.533	0.122	0.906
X ₁ * X ₂	-4.0525	4.194	-0.966	0.366
X ₁ * X ₃	3.1850	4.194	0.759	0.472
X ₂ * X ₃	-15.6700	4.194	-3.736	0.007

表 6. PAHs 厭氧生物降解之成果比較

Substrate	PAHs	Electron Acceptor	Degradation efficiency	Reference
Uncontaminated Soil	Phenanthrene	Sulfate	100% in 34 days	(Chang <i>et al.</i> , 2002) ^a
Sediment	Acenaphthene	Sulfate	76% in 105 days	(Rothermich <i>et al.</i> , 2002) ^a
Sediment	Phenanthrene	Sulfate	83.3% in 6 months	(Lei <i>et al.</i> , 2005) ^a
Sediment	Naphthalene	Sulfate	< 50% in 30 days	(Coates <i>et al.</i> , 1996)
Sediment	Phenanthrene	Sulfate	< 50% in 30 days	(Coates <i>et al.</i> , 1996)
Uncontaminated Soil	Phenanthrene	Sulfate	94.7% in 30 days	本研究

^a: 文獻所討論的 PAHs 污染物不只單一化合物，此表僅列出眾多 PAHs 中降解效率最佳者。

五、參考文獻

1. J. A. Ramsay, H. Li, R. S. Brown and B. A. Ramsay, "Naphthalene and anthracene mineralization linked to oxygen, nitrate, Fe(III) and sulphate reduction in a mixed microbial population", *Biodegradation*, Vol.14, pp.321-329 (2003).
2. K. J. Rockne and S. E. Strand, "Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments", *Environmental Science and Technology*, Vol.32, pp.3962-2967 (1998).
3. B. V. Chang, L. C. Shiung, S. Y. Yuan, "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil", *Chemosphere*, Vol. 48, No.7, pp.717-724 (2002).
4. M. M. Rothermich, L. A. Hayes and D. R. Lovley, "Anaerobic, Sulfate-Dependent Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum - Contaminated Harbor Sediment", *Environmental Science and Technology*, Vol.36, pp.4811-4817 (2002).
5. J. D. Coates, J. Woodward, J. Allen, P. Philp and D. R. Lovley, "Anaerobic Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Alkanes in Petroleum - Contaminated Marine Harbor Sediments", *Applied Environmental Microbiology*, Vol.63, No.9, pp.3589-3593 (1997).
6. 凌慧紋, "以生物淋溶法處理受重金屬污染之河川底泥過程中底泥物化因子的變化", 碩士論文, 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系, 第 94-103 頁(2004)。
7. L. Lei, A. P. Khodadoust, M. T. Suidan, H. H. Tabak, "Biodegradation of sediment-bound PAHs in field contaminated sediment", *Water Research*, Vol 39, pp. 349-361 (2005).
8. J. D. Coates, R. T. Anderson and D. R. Lovley, "Oxidation of PAHs under sulfate-reducing conditions", *Applied And Environmental Microbiology*, Vol.62, pp.1099-1011 (1996).