

國立台灣大學工學院化學工程學研究所

碩士論文

Department of Chemical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis



以土壤清洗復育土壤並以 NTU-1 移除溶液中正十六烷

Implementing Soil Washing for Soil Remediation and  
Using *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 for the Treatment  
of the Residual Solution

楊曜彰

Yao-Chang Yang

指導教授：劉懷勝博士

Advisor: Hwai-Shen Liu, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016

## 中文摘要



本研究目的主要在於探討如何利用土壤清洗的方式移除土壤中的烷類污染，並利用 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 能夠生物降解並包覆烷類的特性，處理溶液中的烷類，達到生物復育土壤的目的。

研究顯示，本實驗所使用的液態礦物培養基能夠清洗被烷類污染的土壤。以研究中的實驗條件為例，土壤粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 土壤，經分析土壤中會含有 3.2 ml *n*-C16/g soil，利用 100 ml 培養基以批次攪拌清洗 10 秒後，培養基中約含 800 ppmv *n*-C16。

為了避免土壤中的水溶性物質，如有機酸或礦物質，在土壤清洗的過程中溶於清洗所使用的培養基，影響 NTU-1 於培養基中的生長，所以本實驗以自來水與去離子水預清洗土壤並烘乾，才將土壤用於後續實驗操作。

將清洗過土壤的培養基植入 NTU-1 培養 72 小時，初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液(OD<sub>600nm</sub> 約為 1.0)。72 小時之後，NTU-1 可以透過生物降解與物理包覆移除 95% 培養基中的正十六烷。

探討影響培養基清洗效果的因素時，提高培養基的溫度有最好的清洗效果。以本研究為例，土壤粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 土壤，利用 100 ml 培養基與污染土壤一起煮沸 5 分鐘，以沸騰時培養基液體的流動取代攪拌清洗。培養基能夠清洗土壤中約 20% 的正十六烷含量，進一步培養 NTU-1 達 72 小時後，經分析，NTU-1 能移除培養基中約 95% 的正十六烷。

關鍵字：土壤清洗、*Rhodococcus erythropolis* NTU-1、生物復育、生物降解

## Abstract



For bioremediation, we focused on how to apply soil washing method with MSM (mineral salt medium) to wash *n*-hexadecane (*n*-C16) on soil. Furthermore, we apply *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 (NTU-1) bioflocules and biodegradation for *n*-hexadecane removal in MSM.

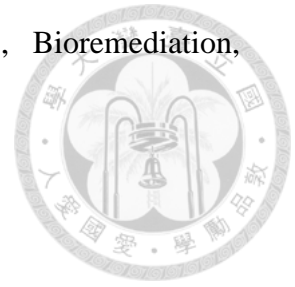
Firstly, results showed that nearly 800 ppmv *n*-C16 can be washed by 100 ml MSM from 0.5 g contaminated soil of which the particle size is 20/50 mesh and the added volume of pollutant is 4 ml *n*-C16/g soil. By analyzing with GC-FID, soil will contain 3.2 ml *n*-C16/g soil after added *n*-C16 as pollutant.

Secondly, to avoid hydrosoluble compounds in soil being desolved in MSM during soil washing, which may constrain the biodegradation ability of NTU-1, we have to pre-wash soil. Being pre-washed by both tap water and DI water, soil can be used for subsequent experiments.

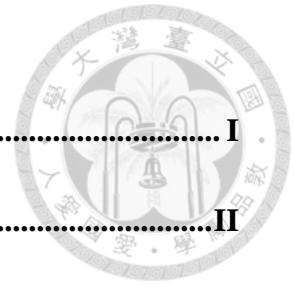
After incubated in MSM used to wash contaminated soil for 72 hours, NTU-1 will remove approximately 95% of total *n*-C16 in MSM by both biodegradation and bioflocules.

Last but not least, the washing effectiveness of MSM can be promoted by increasing the temperature of MSM. Results showed almost 20% of total *n*-C16 can be removed from 0.5 g soil whose particle size is 20/50 mesh and the added volume of pollutant is 4 ml *n*-C16/g soil during soil washing at 100°C. After 72 hours NTU-1 incubation, almost 95% of total *n*-C16 in MSM will be removed.

Keywords : Soil washing, *Rhodococcus erythropolis* NTU-1, Bioremediation,  
Biodegradation



## 目錄



|   |     |
|---|-----|
| 中文摘要.....   | I   |
| Abstract.....                                     | II  |
| 目錄.....   | IV  |
| 圖目錄.....  | VII |
| 表目錄.....  | X   |
| 第一章 緒論.....                                       | 1   |
| 1.1 前言 .....                                      | 1   |
| 1.2 研究目的與論文綱要 .....                               | 3   |
| 第二章 文獻回顧.....                                     | 4   |
| 2.1 石油碳氫化合物簡介及其對環境和人類之影響 .....                    | 4   |
| 2.2 處理石油碳氫化合物污染之方法 .....                          | 6   |
| 2.3 以微生物處理石油碳氫化合物 .....                           | 13  |
| 2.3.1 生物復育簡介.....                                 | 13  |
| 2.3.2 微生物攝取碳氫化合物之模式.....                          | 18  |
| 2.3.3 微生物分解碳氫化合物之方式.....                          | 26  |
| 2.4 微生物降解碳氫化合物之代謝途徑.....                          | 30  |
| 2.4.1 直鏈烷之氧化機制.....                               | 30  |
| 2.4.2 支鏈烷之氧化機制.....                               | 34  |
| 2.4.3 烯烴類及環烷類之氧化機制.....                           | 36  |
| 2.5 實驗菌株 <i>Rhodococcus erythropolis</i> 介紹 ..... | 40  |
| 2.5.1 <i>Rhodococcus</i> 菌屬介紹 .....               | 40  |
| 2.5.2 <i>Rhodococcus erythropolis</i> 特性與應用 ..... | 43  |
| 2.6 微生物之細胞聚集現象 .....                              | 47  |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 2.7 土壤清洗在土壤復育中的應用 .....        | 49        |
| 2.8 微生物在土壤復育中的應用 .....         | 53        |
| <b>第三章 實驗材料與方法 .....</b>       | <b>56</b> |
| 3.1 實驗材料.....                  | 56        |
| 3.1.1 實驗菌株.....                | 56        |
| 3.1.2 實驗藥品與儀器.....             | 58        |
| 3.2 培養基組成與配製 .....             | 59        |
| 3.2.1 液態礦物培養基.....             | 59        |
| 3.2.2 菌株保存培養基.....             | 62        |
| 3.2.3 菌株活化培養基.....             | 63        |
| 3.2.4 計數平板培養基.....             | 63        |
| 3.3 實驗方法.....                  | 64        |
| 3.3.1 菌株的活化及生長曲線.....          | 64        |
| 3.3.2 礦物培養基菌液製作.....           | 65        |
| 3.3.3 正十六烷污染土壤的製備.....         | 66        |
| 3.3.4 清洗正十六烷污染的土壤.....         | 67        |
| 3.3.5 氣相層析儀之條件設定.....          | 72        |
| 3.3.6 正十六烷校正曲線.....            | 73        |
| 3.3.7 以 NTU-1 處理培養基中的正十六烷..... | 74        |
| <b>第四章 實驗結果與討論 .....</b>       | <b>76</b> |
| 4.1 土壤實驗前的預清洗.....             | 77        |
| 4.2 清洗被正十六烷污染的土壤.....          | 81        |
| 4.2.1 篩選適合實驗的土壤的粒徑大小.....      | 81        |
| 4.2.2 土壤的污染程度.....             | 83        |
| 4.2.3 清洗被正十六烷污染土壤的方法.....      | 86        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.3 以 NTU-1 處理培養基中的正十六烷 .....           | 90         |
| 4.4 提升液態礦物培養基對污染土壤的清洗效果 .....           | 97         |
| 4.4.1 正十六烷含量計算.....                     | 97         |
| 4.4.2 重複清洗污染土壤.....                     | 98         |
| 4.4.3 重複使用液態礦物培養基清洗污染土壤.....            | 101        |
| 4.4.4 重複使用底部液態礦物培養基清洗污染土壤.....          | 104        |
| 4.4.5 酸鹼值對液態礦物培養基清洗效果的影響.....           | 105        |
| 4.4.6 溫度對液態礦物培養基清洗效果的影響.....            | 107        |
| 4.4.7 鹽類濃度對液態礦物培養基清洗能力的影響.....          | 112        |
| 4.4.8 以溫度提升培養基清洗效果並利用 NTU-1 移除正十六烷..... | 114        |
| 4.4.9 討論.....                           | 117        |
| <b>第五章 結論 .....</b>                     | <b>118</b> |
| <b>第六章 參考文獻 .....</b>                   | <b>121</b> |

## 圖目錄

|   |    |
|---|----|
| 圖 2.3.2-1 原油中常見的碳氫化合物化學結構分類 (Alloway & Ayres, 1998).....  | 18 |
| 圖 2.3.2-2 微生物細胞攝取有生物界面活性劑附著的碳氫化合物示意圖 (Ratledge, 1988) .....                                     | 23 |
| 圖 2.3.2-3 菌株 <i>Pseudomonas sp.</i> 分泌界面活性劑後攝取碳氫化合物示意圖 (Fritsche & Hofrichter, 2000) .....      | 24 |
| 圖 2.3.3-1 碳氫化合物分解流程圖，實線代表 carbon flux、虛線代表 O <sub>2</sub> flux 及電子接收者 (Berthe-Corti, 1999)..... | 28 |
| 圖 2.3.3-2 好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritsche & Hofrichter, 2000) .....                                | 28 |
| 圖 2.3.3-3 長碳鏈烷類的好氧及厭氧性降解途徑，點狀線的箭頭是指推測的代謝路徑 (Wentzel et al., 2007) .....                         | 29 |
| 圖 2.4.1-1 微生物代謝分解直鏈烷之途徑，圖中 1 為 <i>n</i> -alkane 單氧化酶、2 為醇脫氫酶、3 為醛脫氫酶 (Britton, 1984).....       | 33 |
| 圖 2.4.2-1 菌株 <i>Brevibacterium erythrogens</i> 降解異十九烷的途徑 (Pirnik et al., 1974)° .....           | 35 |
| 圖 2.4.3-1 烯烴類生物降解可能的代謝途徑(張蘭英等，2007).....  | 36 |
| 圖 2.4.3-2 環己烷的代謝途徑 (Fritsche & Hofrichter, 2000) .....  | 37 |
| 圖 2.4.3-3 不產孢放線菌降解利用不同碳氫化合物之途徑及經過 $\beta$ -oxidation 後合成細胞生長所需相關物質 (Alvarez, 2003) .....        | 39 |
| 圖 2.5.1-1 由 <i>Rhodococcus</i> 催化發生的各種不同的氧化反應 .....   | 42 |
| 包括幫助生長及降解各種污染物的反應 (Larkin et al., 2005) .....   | 42 |
| 圖 3.1.1-1 顯微鏡下的 <i>Rhodococcus erythropolis</i> NTU-1(劉志文，2007) .....                           | 57 |
| 圖 3.3.1-1 NTU-1 菌株在 Nutrient Broth(NB)營養液中的生長曲線 .....   | 64 |
| 圖 3.3.5-1 正十六烷在氣相層析儀中之校正曲線 .....  | 73 |



|  |    |
|--|----|
| 圖 4.1-1 用清洗過 0.5 g soil 污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤未經過預清洗程序。正十六烷添加量：4 ml <i>n</i> -C16/g soil、培養基體積：100 ml、培養基酸鹼值：5.5、初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液(OD <sub>600nm</sub> 約為 1.0).....  | 79 |
| 圖 4.1-2 用清洗過 0.5 g soil 污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤已經過預清洗程序。正十六烷添加量：4 ml <i>n</i> -C16/g soil、培養基體積：100 ml、培養基酸鹼值：6.88、初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液(OD <sub>600nm</sub> 約為 1.0)..... | 79 |
| 圖 4.1-3 利用清洗過污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤未經過預清洗。經 72 小時培養時間後，拍照記錄 NTU-1 於培養基內的物理包覆現象.....   | 80 |
| 圖 4.1-4 利用清洗過污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤有經過預清洗。經 72 小時培養時間後，拍照記錄 NTU-1 於培養基內的物理包覆現象.....   | 80 |
| 圖 4.2.2-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，NTU-1 經 96 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化.....   | 84 |
| 圖 4.2.3-1 玻璃過濾器底部為 60 mesh 篩網，用來盛放或過濾污染土壤.....   | 87 |
| 圖 4.2.3-2 利用培養基重複淋洗 5、8、10 次或以玻棒攪拌清洗 10 秒，培養基中的正十六烷濃度。清洗對象是粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml <i>n</i> -C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤.....                                     | 89 |
| 圖 4.3-1 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化.....   | 94 |
| 圖 4.3-2 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後酸鹼值隨時間的變化.....   | 94 |
| 圖 4.3-3 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後細胞乾重隨時間的變化.....  | 95 |
| 圖 4.3-4 實驗組：NTU-1 在清洗過污染土壤的培養基中經 72 小時培養，生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。虛線表示培養基初始正十六烷濃度.....  | 95 |
| 圖 4.3-5 對照組：NTU-1 以 800 ppmv 正十六烷為碳源，經 72 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化.....  | 96 |

|   |     |
|---|-----|
| 圖 4.3-6 實驗組與對照組培養基經 72 小時培養 NTU-1 後，培養基酸鹼值隨時間的變化.....                                 | 96  |
| 圖 4.4.2-1 每次利用乾淨的 100ml 培養基攪拌清洗污染土壤，每次清洗後液態礦物培養基中的正十六烷濃度.....                         | 100 |
| 圖 4.4.2-2 每次利用乾淨的 100ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，每次清洗後，土壤中剩餘正十六烷佔清洗前總正十六烷含量的百分比變化.....         | 100 |
| 圖 4.4.3-1 重複使用 100 ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度隨重複使用次數的變化.....                       | 103 |
| 圖 4.4.3-2 增加 100 ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤的時間，培養基中正十六烷濃度隨攪拌時間的變化.....                        | 103 |
| 圖 4.4.5-1 酸鹼值分別為 3、5、7、9 的液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度變化.....                           | 107 |
| 圖 4.4.6-1 溫度分別為 25、50、75、100℃ 的液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度變化.....                      | 110 |
| 圖 4.4.8-1 培養基以沸騰方式清洗污染土壤，待培養基被分離與冷卻至室溫後，植入 NTU-1 培養 72 小時，NTU-1 生物降解與物理包覆隨培養時間的變化 ... | 116 |
| 圖 4.4.8-2 培養基以沸騰方式清洗污染土壤，待培養基被分離與冷卻至室溫後，植入 NTU-1 培養 72 小時，培養基酸鹼值隨培養時間的變化.....         | 116 |

## 表目錄

|   |    |
|---|----|
| 表 2.2-1 各種處理程序對於不同污染物的適用性 (Canter & Knox, 1986).....  | 9  |
| 表 2.2-2 各種復育技術之特點和應用性 (Ram et al., 1993a) .....   | 10 |
| 表 2.2-2 各種復育技術之特點和應用性(續) .....  | 11 |
| 表 2.2-3 復育方法適用性與否的影響因素 (Vik et al., 2001) .....   | 12 |
| 表 2.3.1-1 自然界中能利用石油碳氫化合物之好氧性微生物分類 (Van Beilen et al., 2003).....  | 14 |
| 表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法 (Korda et al., 1997) .....   | 16 |
| 表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法(續).....  | 17 |
| 表 2.3.2-1 各種有機物在 25°C 時於水中之溶解度 (Thomas et al., 1986) .....  | 19 |
| 表 2.3.2-2 各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji et al., 2007) .....   | 25 |
| 表 2.5.2-1 微生物降解碳氫化合物時之酵素分類 (Van Beilen & Funhoff, 2007) ..  | 44 |
| 表 3.2.1-1 Mineral Salt Medium 組成表 .....   | 61 |
| 表 3.2.1-2 Trace Salt Solution 組成表 .....   | 61 |
| 表 3.2.2-1 菌株保存培養基組成表 .....  | 62 |
| 表 4.2.1-1 利用酸鹼值為 7 的 100 ml 培養基攪拌清洗 1.0 g 土壤後，培養基中的正十六烷濃度。正十六烷添加量：2 ml <i>n</i> -C16/g soil，粒徑大小：8/20 mesh、20/50 mesh ..... | 82 |
| 表 4.2.2-1 利用酸鹼值為 7 的 100 ml 培養基攪拌清洗不同污染程度的土壤，液態礦物培養基中的正十六烷濃度.....   | 84 |
| 表 4.2.2-2 土壤清洗方式分別為 (1) 在原燒杯中批次清洗污染土壤 (2) 將污染土壤從原燒杯中以刮勺刮取至另一個乾淨的 250 ml 燒杯中再進行批次清洗。清洗後培養基中的正十六烷濃度.....                      | 86 |
| 表 4.2.3-1 分別利用培養基與去離子水，以批次攪拌清洗粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml <i>n</i> -C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤，溶液中的正十六烷濃度                   |    |

|   |     |
|---|-----|
| .....   | 89  |
| 表 4.4.4-1 利用培養基清洗污染土壤，培養基中的正十六烷濃度。清洗方式分為<br>(a) 1 次攪拌清洗 (b) 1 次攪拌清洗後，回收底部 60 ml 培養基重複清洗土壤，重<br>複操作 2 次..... | 105 |
| 表 4.4.6-1 不同溫度培養基對正十六烷的清洗量佔土壤中總正十六烷含量百分比<br>.....   | 110 |
| 表 4.4.6-2 清洗步驟改善順序各階段的結果，以培養基中正十六烷濃度佔土壤中<br>正十六烷總含量百分比表示.....   | 111 |
| 表 4.4.7-1 培養基中的含氮鹽類 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度由 0.1% (w/v)提升到 0.5% (w/v)時，<br>培養基中正十六烷濃度.....          | 113 |

## 第一章 緒論



### 1.1 前言

十九世紀後人類開始使用石油，隨著對石油有越多的了解進而發展更多石油相關的用途後，人類對石油資源的依賴程度日益增加。石油除了主要用於各類引擎的燃料，提供如汽車、機車、公車等地面運輸工具外，也提供如飛機、船艦等用途。石油也在一般生活中扮演重要的角色，主要是石油的相關衍生產品已成為民生必需品的來源。也因為石油在人類文明中的重要性非常高，石油交易也在能源市場中佔有重要定位，亦衍生出了非常龐大的期貨與選擇權市場。而石油交易價格也左右了世界經濟局勢的發展，從委內瑞拉因近幾年石油價格波動造成國內政經局勢的動盪，便可見其影響力之大。石油價格與交易量也是觀測全球經濟發展的重要指標之一。

雖然石油資源擁有極高的經濟價值，但也是環境污染的主要來源之一。除了一般所知燃燒石油資源所產生的碳排放之外，在油田探鑽與開採、原油煉製、石化能源運送及使用過程中，都有可能因人為疏失而外洩至自然環境中造成嚴重的石油污染。例如今年年初，台灣籍「德翔台北輪」於台灣北部石門海域擱淺，船體本身燃料用油外洩，造成北海岸的石油污染。2010年3月美國墨西哥灣漏油事件亦是近幾年最重大的石油污染事件，預估的原油外洩量為兩億加侖。這些污染事件除了需很長時間復原以外，污染源經食物鏈後層層累積，對人體的影響也是不容忽視的，可能會影響人體內的新陳代謝、免疫系統、生殖系統甚至產生癌症等 (Li et al., 2008)。

為解決石油造成的環境污染，常被利用的方法主要分物理處理法與化學處理法，兩種方式各有其優點存在，但仍存在操作上的限制或成本過高的缺點。而生物復育法在近年則逐漸受到重視 (Roudier, 2005)。



生物復育是指利用微生物的生理機制來降解代謝石油碳氫化合物造成的污染，經微生物降解代謝後，石油污染物能被轉變為分子結構較簡單、毒性較低的物質 (Madsen, 1991)。生物復育法的主要優點包含了微生物取得較容易、成本低、不會造成環境的二次污染與操作方便 (Van Stempvoort & Biggar, 2008)。

## 1.2 研究目的與論文綱要

本論文中的實驗所使用的微生物是 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1，其可降解代謝 C<sub>6</sub>~C<sub>32</sub> 烷類的菌株。在以長碳鏈烷類為唯一碳源培養時，NTU-1 除了表現出降解烷類的功能外，也表現出細胞聚集的現象，將烷類包覆並形成結塊(張緯農, 2009)。因此可以透過生物降解及物理撈除的方法將碳氫化合物污染移除，縮短了生物復育所需的時間。

本論文的目的是在於探討如何利用培養基以土壤清洗的方式復育土壤，並利用 NTU-1 能夠降解並包覆烷類的特性處理培養基中的烷類。論文章節的編排及內容說明如下：

第二章：介紹石油污染與主要的復育方法，並簡介微生物降解代謝碳氫化合物的途徑。接著說明實驗菌株與目前生物復育於土壤污染的應用，以及土壤清洗的技術發展。

第三章：實驗藥品、儀器、實驗方法及實驗儀器的參數設定。

第四章：實驗結果及討論。結果包含：實驗前土壤的預清洗步驟；土壤污染程度的設定；如何用培養基清洗土壤中的正十六烷；以 NTU-1 處理培養基中的正十六烷；如何提升培養基對土壤的清洗效果。

第五章：結論。

## 第二章 文獻回顧



本研究的目的是，在如何利用培養基以土壤清洗的方式復育土壤，並利用 NTU-1 能夠降解並包覆烷類的特性處理培養基中的烷類。所以在這一章節中將介紹相關研究的基礎背景及發展。首先會簡介與比較各種石油碳氫化合物污染的移除方法。接著討論生物處理碳氫污染物的技術，重點放在微生物攝取代謝碳氫化合物的方法、途徑，以及探討微生物聚集現象發生的原因。並簡介本實驗中所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* 的特性及相關研究。另外，也會介紹清洗土壤的相關方法。

### 2.1 石油碳氫化合物簡介及其對環境和人類之影響

石油的組成來自一連串複雜、分子量不一的碳氫化合物及其他元素如硫、氮、氧、微量金屬的混合物，主要存在於地底下，外觀上是一種黏稠、深褐色液體。成為古代海洋或湖泊中的生物經過漫長的演化形成的混合物 (Cooney et al., 1985)。石油的性質因產地而異，密度為  $0.8\sim 1.0\text{ g/cm}^3$ ，黏度範圍很廣，凝固點差異大，會介於  $30\sim -60^{\circ}\text{C}$ ，沸點範圍為常溫到  $500^{\circ}\text{C}$  以上，可溶於多種有機溶劑，雖不溶於水，但可與水形成乳狀液。

石油碳氫化合物的三種形態由碳數的多寡來決定，含三個碳以下的碳氫化合物如甲烷、乙烷、丙烷以氣態存在，又稱天然氣；液態石油則為含碳量介於4~30之間的碳氫化合物；含高碳量的固態石油又以石臘及瀝青為主(黃武良，1999)。石油為組成複雜的混合物，主要成分如下頁所示：



- (1) 正烷類(*n*-alkanes)
- (2) 含支鏈的烷類(branched chain alkanes)
- (3) 環烷類(cycloalkanes)
- (4) 異烷類(isoprenoids)
- (5) 芳香族(aromatics)
- (6) 極性物質



主要成分碳數分布為 $C_{10}\sim C_{20}$ ，且上述之種類依比例多寡依次為正烷類、支鏈烷類、環烷類、芳香族、最低為異烷類 (Calabrese et al., 1988)。

石油帶來便利的生活，但也因為不當且過度的利用，造成對環境嚴重的污染。石油對環境產生的污染主要是來自於油田開採、煉製、運送及使用的過程中進入土壤、水體或空氣中而造成 (Allard & Neilson, 1997; Atlas & Bartha, 1992)。儘管目前世界各地環保意識高漲，對於石油開發、煉製、運送即使用都有嚴格的管制，然而還是會有無法控制、預期外的意外發生。以近年來發生的重大石油污染事件為例，2016 年秘魯國營石油公司位於秘魯東北部洛雷托大區的輸油管破裂，導致漏油，亞馬遜雨林內此類事件在今年已發生第三起，今年 2 月發生的兩處破裂，漏出超過 1000 桶的原油。2015 年美國加州聖芭芭拉也發生漏油事件，事發地點位於聖芭芭拉瑞福礁州立海灘，共有 14.3 萬加侖的原油流出，其中一些原油流進了太平洋，周圍海灘及遠至曼哈頓海灘都能見到黑色的焦油斑點。類似的國際事件也發生在 2010 年 4 月，美國史上最嚴重漏油事件，負責公司英國石油公司在美國墨西哥灣租用的鑽井平台發生爆炸，造成 1500 米深海的原油洩漏，約 2 億加侖原油流入墨西哥灣，嚴重破壞沿岸和海洋生態環境 (Camilli et al., 2010)。另外，在台灣也有類似的事件發生，2016 年 3 月的北海岸，貨櫃輪「德翔台北」號因為失去動力、機艙進水，於石門區鄰近石門洞處擱淺，船上潤滑油外漏，油污污染附近海域。

石油污染問題日益嚴重，土壤若被石油污染，殘留在土壤中的石油碳氫化合物會在糧食中累積，並通過食物鏈危害人類健康，另外，當石油流入水體中可能會黏附在魚類、藻類上造成海洋生物死亡，造成水產品品質下降、降低水體的利用價值 (Callier et al., 2002)。至於石油污染對於人類的直接影響，則包含影響體內的新陳代謝、免疫系統、生殖系統甚至產生致命的疾病 (Callier et al., 2002)。因此人類在面對隨時可能發生的石油污染危機，應努力的尋找有效處理石油碳氫化合物污染的方法，以維護環境及人們的健康，達到人與環境永續生存的目標。

## 2.2 處理石油碳氫化合物污染之方法

石油碳氫化合物造成的污染主要發生於土壤、海洋或地下水。當污染濃度較低時，大自然通常具有自淨的能力，能透過大氣、水流的擴散，或是光分解、氧化及微生物的分解作用等物理、化學或生物方法，將污染物轉化為毒性較低的物質，使環境中污染濃度降低並回復到原始的狀態 (Golwer, 1983)。然而，自然界有其最大能負荷的限度，當石油污染物濃度過高，則會造成永久性的環境污染。因此，必須以人工移除石油碳氫化合物的方式解決大自然無法處理的石油污染。

一般來說對於碳氫化合物的人工移除、復育技術包含了氣體清除、油/水分離系統、真空萃取系統、高熱及催化焚化爐、碳填充床系統以及生物處理系統等，表 2.2-1 指出對於不同的有機污染物所適用的有效處理程序 (Canter & Knox, 1986)，從表中可以發現生物處理方式適合處理具揮發性與不具揮發性的有機物，並不適合用來處理重金屬污染。而表 2.2-2 詳細說明了各種復育技術的特點以及應用性 (Ram et al., 1993a)，從表格中可以知道現地生物復育法的適用性會受限於極端酸鹼值的環境條件或重金屬與毒化物的存在。

人工復育石油碳氫化合物的方法依其處理機制可分為三種，物理處理法、化學處理法及生物處理法。三種方法各自有其適用的條件與優缺點，以下簡介這三種方法。



#### (1) 物理處理：

傳統的物理處理法是使污染物在氣態、液態及固態三相間轉換。此方法適用的處理條件是簡單的污染物，藉由高溫或是電能來破壞污染物的結構，需要大量熱能或電能，成本較高但耗時較短。另外，物理處理法並不適用於毒性高的污染物，因為若是以汽化的方式來處理毒性物質，易形成氣態污染物進入大氣中，造成空氣的污染。

常見的物理處理法如：熱處理、熱脫附、焚化、土壤清洗、揮發、固化/安定化、氣提、吸附、結晶、密度分離、沈降、過濾、透析/電透析、逆滲透等 (Roudier, 2005; Stegmann et al., 2013; Canter & Knox, 1986; Riser-Roberts, 1998)。

#### (2) 化學處理：

透過化學反應將污染物破壞，減輕對環境的負擔，能夠將毒性物質轉變成讓微生物更容易降解之物質，缺點是無法將所有碳氫化合物轉變為無毒性之物質，可能會造成二次的環境污染 (Nicholas, 1987)。另外，由於污染物大多為混合物，故難以找到能同時處理多元污染物的化學藥劑，所以處理上具有較麻煩且成本高的缺點。且化學反應甚少有轉化率達到 100% 的情況，會有原污染物的殘留問題，而反應中亦有可能產生其他有毒性的副產物。

常見的化學處理法有：化學封存、氧化還原、超臨界流體萃取、溶劑萃取、蒸氣萃取、化學安定/固化、超臨界流體氧化等 (Riser-Roberts, 1998)。

### (3) 生物處理：

近年來生物移除技術大量的被使用於處理碳氫化合物污染問題，利用微生物分解轉化污染物，將污染物予以礦化或轉化成危害性較低的其他物質 (Korda et al., 1997; Vidali, 2001)。微生物的種類繁多，可以處理不同種類的碳氫化合物，且分解污染物之後的產物具有一致性和可預測性，對於環境也較為友善。相較於物理及化學的處理方式，生物處理法成本低廉且易於使用，因此利用生物復育技術已經漸漸取代物理、化學處理技術 (Scholze et al., 1988; Pandey & Jain, 2002)，但是由於微生物培養時間相對較長，所以有耗時的缺點。

由於石油污染的現場會有污染範圍與環境特性的差異，因而有所限制，所以多半利用混合技術來克服污染場址的限制，結合每種方法的長處以達到最好的復育效果。此外，除了了解不同人工復育石油碳氫化合物的方法以外，如何選擇適當的方法來處理不同情況的污染源也是十分重要，許多因子都是在選擇合適的復育方法時需考量的。以下列出幾個重要的影響因子 (Ram et al., 1993b; Vik et al., 2001)：

- (1) 污染物及污染場址的特性
- (2) 復育工作的驅動因素及目的
- (3) 風險管理及環境的永續發展
- (4) 投資者的看法及成本效益
- (5) 技術上的適用性及可行性

以上幾個影響因子中，主要考量因素為操作上的適用性及可行性，因為不同的復育技術在不同污染地區的執行效果不相同。且近年來許多復育技術逐漸被發展出來，如何確認所選擇的復育技術是否合適則需要有系統的實驗證明與評估程序，表 2.2-3 則列出幾個對於復育方法適用性的一般考量因素 (Vik et al., 2001)。

表 2.2-1 各種處理程序對於不同污染物的適用性 (Canter & Knox, 1986)。

| Process                     | Volatile Organics                | Nonvolatile Organics        | Inorganics                                     |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|--|
| Air stripping               | Suitable for most cases          | Not suitable                | Not suitable                                   |
| Steam stripping             | Effective concentrated technique | Not suitable                | Not suitable                                   |
| Carbon adsorption           | Inadequate removal               | Effective removal technique | Not suitable                                   |
| Biological degradation      | Effective removal technique      | Effective removal technique | Not suitable – metals toxic                    |
| pH adjustment precipitation | Not applicable                   | Not applicable              | Effective removal technology                   |
| Electrodialysis             | Not applicable                   | Not applicable              | Inefficient operation/inadequate removal       |
| Ion exchange                | Not applicable                   | Not applicable              | Inappropriate technology – difficult operation |



表 2.2-2 各種復育技術之特點和應用性 (Ram et al., 1993a)

| Technology                                  | Applicability   | Soil Type and Saturated Zone Characteristics   | Variations   | Cost             | Permits  |
|---|---|--|--|------------------|--|
| <i>LPH recovery</i><br>LPH withdrawal       | All lighter-than-water petrochemicals except for the most viscous fuel and lube oils  | Works better with more-permeable soils   | Total fluid extraction, passive bailers, dual pump recovery, recovery wells, thermally assisted LPH recovery, mop and disk skimmers                                    | Variable         | Groundwater discharge, product storage, and possibly, groundwater withdrawal             |
| <i>Vadose zone</i><br>Soil vapor extraction | LPH less than about 0.5 ft, contaminants with $V_p > 1$ mmHg (BTEX, gasoline, MTBE, PCE, TCE, TCA, mineral spirits, MeOH, acetone, MEK, etc.) | Permeable soils, ROI > 10 ft, depth-to-water greater than 3 ft                                       | Thermally assisted venting, horizontal venting, surface sealing, passive vent points, closed loop venting, concurrent groundwater pumping for VOCs in capillary fringe | Low              | Air discharge permit may be required   |
| <i>In situ</i> percolation (bioremediation) | Any aerobically biodegradable chemical in the vadose zone   | Works better in permeable soils; depth-to-water greater than 3 ft                                    | Oxygen and nutrients need to be supplied to the subsurface   | Low to moderate  | Air discharge permit may be required when soil venting used to provide oxygen            |
| Excavation                                  | All soils and contaminants  | All soil types   | Dewatering may be used to expose soils in capillary fringe   | High             | On-site treatment of excavated soil may require permitting                               |
| <i>Saturated zone</i><br>Sparging           | Contaminants in saturated zone with $K_H > 0.1$ and $V_p > 1$ mmHg; contaminants: BTEX, gasoline, PCE, TCE, TCA, mineral spirits              | Hydraulic conductivity > $10^{-5}$ cm/s (silty sand or better); at least 5 ft of saturated thickness | Hot air, steam, and cyclic sparging, concurrent groundwater pumping  | Low              | Air discharge permit; water discharge if concurrent groundwater pumping                  |
| <i>In situ</i> bioremediation               | Any biodegradable chemical in the saturated zone; inhibited by pH extremes, heavy metals, and toxic chemicals                                 | Nutrients are transported better in more-permeable soil  | Oxygen supplied by sparging or peroxide addition; nutrient addition with groundwater recovery and reinjection  | Moderate to high | Water discharge for nutrient injection, air discharge if performed with sparging/venting |
| Excavation                                  | All soils and contaminants  | All soil types   | Dewatering needed, groundwater containment may be used (slurry walls, sheet piles)   | Very high        | Permits for dewatering operations  |



表 2.2-2 各種復育技術之特點和應用性(續)

| Technology                         | Applicability   | Soil Type and Saturated Zone Characteristics   | Variations  | Cost   | Permits   |
|------------------------------------|---|--|---|--|---|
| Groundwater recovery and treatment | Uses: (1) LPH recovery, (2) provides hydraulic control of contaminant plume, (3) pump and treatment technologies                          | Transmissivity, depth-to-water and saturated-zone thickness determine optimal strategy | Recovery wells, well points, interceptor trenches   | Variable                                     | Well installation, groundwater withdrawal and groundwater discharge |
| Groundwater recovery               |   |  |   |  |   |
| Liquid-phase carbon                | Removal of compounds with low solubility/high adsorptivity  | See groundwater recovery   | High pressure (75 to 150 psi) and low pressure (12 to 15 psi)                                       | Low to high depending on contaminant loading | Water discharge permit  |
| Air stripping                      | Compounds with $K_H > 0.1$ ; contaminants with $K_H$ between 0.01 and 0.1 may require an air-water ratio $> 100$                          | See groundwater recovery   | Packed towers, low profile, heated and closed-loop air stripping; off-gas treatment may be required | Low, if no off-gas treatment required        | Air and water discharge permits                                     |
| Advanced oxidation                 | Most effective on sulfide cyanide, double-bonded organics (PCE, TCE), BTEX, phenols chlorophenols, PCBs, PAHs, some pesticides            | See groundwater recovery   | Hydroxy/radicals produced by combinations of UV, ozone, and peroxide                                | Moderate to high                             | Water discharge permit  |
| Bioreactors                        | Any biodegradable compound  | See groundwater recovery   | Fixed-film and suspended growth reactors  | Moderate to high                             | Water discharge permit  |
| Off-gas treatment                  |   |  |   |  |   |
| Vapor-phase carbon                 | Adsorptive capacity generally increases with increasing molecular weight  | NA   | Pretreatment dehumidification; on-site regeneration   | Moderate                                     | Air discharge permit  |
| Catalytic oxidation                | Conventional units can treat all compounds containing carbon, hydrogen, and oxygen; concentrations should not exceed about 20% of the LEL | NA   | Some units can treat chlorinated compounds, exhaust gas scrubbing may be required                   | Moderate to high                             | Air discharge permit  |
| Thermal oxidation                  | Compounds containing carbon, hydrogen, and oxygen; usually not amenable to halogen-containing compounds                                   | NA   | Exhaust gas scrubbing may be required   | Moderate to high                             | Air discharge permit  |

Abbreviations: NA, not applicable; LEL, lower explosion limit; ROI, radius-of-influence; LPH, liquid-phase hydrocarbon; MTBE, methyl *tert*-butyl ether; PCE, perchloroethylene; TCE, trichloroethylene; TCA, trichloroethane; MEOH, methanol; MEK, methyl ethyl ketone; BTEX, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes; PCBs, polychlorinated biphenyls; PAHs, polyaromatic hydrocarbons.



表 2.2-3 復育方法適用性與否的影響因素 (Vik et al., 2001)。

| RISK MANAGEMENT APPLICATION   | CONTAMINANTS / MATERIAL TREATED  | REMEDIAL APPROACH   | PROCESS LOCATION   |
|---|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• source reduction</li> <li>• pathway interruption</li> <li>• protection of receptors</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• contaminant(s)</li> <li>• concentration range</li> <li>• source and age</li> <li>• bulk / materials-handling characteristics</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• removal</li> <li>• containment</li> <li>• rehabilitation</li> <li>• biological treatment</li> <li>• chemical treatment</li> <li>• physical treatment</li> <li>• solidification / stabilisation</li> <li>• thermal treatment</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>in situ</i></li> <li>• <i>ex situ</i></li> <li>• on site</li> <li>• off site</li> <li>• in-vessel</li> </ul>                                       |
| STRATEGY  | IMPLEMENTATION   |   | OUTCOME  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• integration / combined approaches</li> <li>• active / passive measures</li> <li>• long term / low input</li> <li>• carrier (for <i>in situ</i> techniques, i.e. air or water)</li> <li>• institutional measures</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• process planning</li> <li>• site management</li> <li>• verification</li> <li>• monitoring</li> <li>• neighbourhood impacts</li> <li>• aftercare</li> <li>• flexibility</li> </ul> |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• destruction of contaminants</li> <li>• removal of contaminants (elsewhere)</li> <li>• stabilisation of contaminants</li> <li>• containment</li> </ul> |



## 2.3 以微生物處理石油碳氫化合物

### 2.3.1 生物復育簡介

生物復育(bioremediation)是利用微生物將有機污染物分解並且轉變為構造簡單、毒性較低的有機分子之過程 (Yadav & Reddy, 1993)。接著將介紹生物處理法中的優缺點、微生物的種類、特性，及常見生物處理的方法。生物復育逐漸取代傳統的物理及化學處理法的原因，主要因為生物復育法有以下幾個優點 (Van Stempvoort & Biggar, 2008)：

- (1) 相較於物理或化學處理法來說，微生物培養容易，成本較低。
- (2) 生物復育法使用上來說較安全且對環境較為友善。
- (3) 微生物種類眾多，能處理各種石油碳氫化合物。

雖然自然界中微生物種類繁多，並不是每種微生物皆具有分解有機污染物的特性，能分解石油污染物的微生物以細菌、放線菌、酵母菌、真菌或藻類為主，表 2.3.1-1 為一些能夠利用石油碳氫化合物之好氧性微生物 (Van Beilen et al., 2003)，於表中的細菌欄位可以找到本實驗所使用的菌屬 *Rhodococcus*。而一項成功的微生物復育通常都需滿足以下條件 (Bouwer & Zehnder, 1993)：

- (1) 能分解污染物，使其失去毒性或使濃度降低。
- (2) 能將污染物濃縮，並配合物理法或化學法將污染物完全移除。
- (3) 可處理不同種類之混合污染物。
- (4) 不會破壞環境平衡或對人體造成傷害。
- (5) 具有好的再現性且易於培養、價格低廉。

表 2.3.1-1 自然界中能利用石油碳氫化合物之好氧性微生物分類 (Van Beilen et al., 2003)。

| Microorganisms that aerobically degrade aliphatic hydrocarbons  |                         |                       |                   |
|---|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| Bacteria  | Yeasts                  | Fungi                 | Algae             |
| <i>Achromobacter</i>  | <i>Candida</i> (+)      | <i>Aspergillus</i>    | <i>Prototheca</i> |
| <i>Acinetobacter</i> (+)  | <i>Cryptococcus</i>     | <i>Cladosporium</i>   |                   |
| <i>Alcanivorax</i> (+)  | <i>Debaryomyces</i> (+) | <i>Corollasporium</i> |                   |
| <i>Alcaligenes</i>  | <i>Hansenula</i>        | <i>Cunninghamella</i> |                   |
| <i>Bacillus</i>   | <i>Pichia</i>           | <i>Dendryphiella</i>  |                   |
| <i>Brevibacterium</i>   | <i>Rhodotorula</i>      | <i>Fusarium</i>       |                   |
| <i>Burkholderia</i> (+)   | <i>Saccharomyces</i>    | <i>Gliocladium</i>    |                   |
| <i>Corynebacterium</i>  | <i>Sporobolomyces</i>   | <i>Lulworthia</i>     |                   |
| <i>Flavobacterium</i>   | <i>Torulopsis</i>       | <i>Penicillium</i>    |                   |
| <i>Mycobacterium</i> (+)  | <i>Trichosporon</i>     | <i>Varicospora</i>    |                   |
| <i>Nocardia</i>   | <i>Yarrowia</i>         | <i>Verticillium</i>   |                   |
| <i>Pseudomonas</i> (+)  |                         |                       |                   |
| <i>Rhodococcus</i> (+)  |                         |                       |                   |
| <i>Sphingomonas</i>   |                         |                       |                   |
| <i>Streptomyces</i>   |                         |                       |                   |
| A (+) indicates that information on the genetics of alkane degradation is available for strains belonging to the genus. |                         |                       |                   |

生物復育技術可根據操作的場地分成兩大類：現地(in situ)生物復育及離地(ex situ)生物復育 (Riser-Roberts, 1998)。兩方法的詳細說明與介紹如下：



#### (1) 現地生物復育：

現地復育即在受污染的區域直接進行生物復育。例如，處理污染土壤、地下水或海洋時，不需先將土壤或水體取出移到其他地方再進行生物復育。工程上的現地生物復育技術，主要有下列幾種方式：添加微生物、添加營養鹽、添加電子提供者(盧至人，2002)。表 2.3.1-2 為一些常見現地生物復育法 (Korda et al., 1997)。

現地生物復育法的優點為工程上操作的難度不高、符合自然環境特性、設施較少、設備易獲得、相對來說較經濟等(盧至人，2002)。但此方法有其缺點與問題，例如，有場址的限制、受到自然界的因素如天候影響、植入的菌株是否經實驗證明其表現會比原始存在於污染區的菌株來得好、是否需要多種類的菌株才能完全處理這些污染物、處理時間過長及當污染物移除後，這些菌株將如何處理 (Bartha & Atlas, 1977; Boopathy, 2000)。

#### (2) 離場生物復育：

離場生物復育技術是指在污染源擴散前，將被污染的土壤或水體，帶離所在地做處理 (Riser-Roberts, 1998)。依據不同微生物和污染物的交互作用會有不同的反應器設計，主要可以分為污泥相的生物復育及固相的生物復育。污泥相的生物復育可以用來處理以黏粒為主的土壤。而固相生物復育又可分成地耕法、生物堆土法和堆肥法 (Vidali, 2001)。

離場生物復育法具有處理較快速、反應條件易控制並能處理多種污染物及土壤種類的優點。缺點則為搬運污染物及反應器或其他設備投資成本較高 (Vidali, 2001)。



表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法 (Korda et al., 1997)。

| Table 3 In situ treatments |  |  |  |  |  |
|----------------------------|--|--|--|--|--|
| Treatment                  | Description  | Applicable to  | Advantages   | Constraints  | Reference                                  |
| Biostimulation             | Biostimulation involves the addition of oxygen, water and mineral nutrients (usually combinations of nitrogen, phosphorus, and trace metals)   | Groundwater, soils   | Acceleration by as much as 100-fold of the reproduction of organisms already present at the site   | Nutrient application requires concurrent ecological monitoring studies. Although dilution, tidal mixing etc. should minimize the potential for adverse ecological effects, certain components of the fertilizer could be toxic to some species. In addition, algal blooms could occur as a result of the sudden availability of nitrogen and phosphorus                            | Orzech et al. 1991; U.S. EPA 1989          |
| Bioventing                 | This remediation technique combines conventional advective soil venting with biodegradation. The soil-venting phase of the process takes advantage of the highly volatile nature of the components present in the hydrocarbon mixture. In the biodegradation phase, the less volatile high-molecular-mass hydrocarbon compounds are broken down and the more volatile organics removed during conventional venting | Soils  | Addresses full range of petroleum hydrocarbons. Is among the most effective methods of supplying indigenous microorganisms with enough oxygen to support degradation of hydrocarbon contaminants | A shallow water table prevents diffusion of gases and makes application of bioventing less feasible. Furthermore, the solid matrix must allow for sufficient air movement  | Van Eyk 1994; Reisinger et al. 1994        |
| Bioaugmentation            | This method involves the direct application of microorganisms originating from (a) the remediation site (b) an off-site vendor (c) genetic engineering. The microorganisms have been cultured and adapted, while their degrading ability can be enhanced for specific contaminants and site conditions   | Groundwater, soils   | One of the most effective bioremediation techniques  | The possibility of adverse ecological effects from the introduction of off-site or genetically engineered microorganisms should be examined and minimized  | Orzech et al. 1991; Leavitt and Brown 1994 |
| Surfactants                | Synthetic or biogenic substances are used to increase the aqueous solubility of solid hydrocarbons, and emulsify liquid hydrocarbons   | Solid and liquid aliphatic and aromatic hydrocarbons (including hydrophobic organic compounds) | Enhancement of contaminant accessibility to microorganisms, nutrients, and possibly oxygen. Improvement of the bioremediation efficiency   | Surfactant use is still controversial. Synthetic surfactants may adversely affect the permeability of the microbial cell membrane, thus reducing or eliminating the biodegradative potential of indigenous microorganisms. Surfactant injection must be carefully controlled to be ecologically acceptable and to offer more economical and physical advantages than disadvantages | Ducreux et al. 1994; Churchill et al. 1995 |



表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法(續)。

| Table 3 (Contd.)                                     |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|
| Treatment  | Description  | Applicable to  | Advantages   | Constraints  | Reference  |
| Hydrogen peroxide                                    | Hydrogen peroxide can be used as an efficient, alternative oxygen source to enhance in situ biodegradation                                     | Biodegradation of aromatic compounds and volatile fatty acids. Subsurface applications | Provides oxygen at a rate up to two orders of magnitude faster than diffusers (systems to saturate injected water with air). The growth of aerobic bacteria in general and hydrocarbon-degrading bacteria in particular, as well as the breakdown of gasoline are significantly enhanced by the addition of $H_2O_2$ | Although $H_2O_2$ has been used successfully in a number of cases, problems, including too rapid decomposition, gas blockage, and ineffectiveness, have been encountered elsewhere   | Lu 1994a; Brown and Norris   |
| Nitrate  | Nitrate is used as an alternative electron acceptor, instead of aeration of the injected water or amendment with $H_2O_2$                      | Subsurface applications  | Nitrate is relatively inexpensive, highly soluble in water, does not adsorb to soil matrices, and does not decompose. Thus it can be readily distributed within an aquifer   | Nitrate concentrations in groundwater typically are limited by regulatory standards to 46 mg/l. Another disadvantage is that nitrate is effective for fewer classes of compounds than oxygen. Nitrate-utilizing bacteria do not degrade aliphatic compounds. Benzene is not readily degraded under denitrifying conditions | Hutchins and Wilson 1994; Brown and Norris 1994b; Battermann et al. 1994 |
| Fertilizer application (water-soluble or oleophilic) | Fertilizer application stimulates microbial metabolism by supplying the indigenous oil-degrading microorganisms with nutrients (N, P, K, etc.) | Soil, groundwater, sediments   | Acceleration of the natural biodegradation process, especially in sites with low nutrient content  | A toxicology assessment is required to evaluate the possibility of harmful biological effects of excessive nutrient application  | Prince et al. 1994; Sveum et al. 1994                                    |

### 2.3.2 微生物攝取碳氫化合物之模式

大部份石油碳氫化合物皆為疏水性，且對水的溶解度都相當低，此物理性質會限制微生物對於石油碳氫化合物的分解效率，儘管如此微生物還是能夠分解利用這些幾乎不可溶解的基質 (Haines & Alexander, 1974)。表 2.3.2-1 表示各種有機物在水中之溶解度 (Thomas et al., 1986) 表中可見在溫度為 25°C 下，本實驗主要使用的烷類正十六烷的溶解度為 0.00002 mg/L。除了溶解度以外，微生物攝取石油碳氫化合物污染時所面臨的挑戰還來自以下兩個原因 (Abdel-Megeed, 2004)：

- (1) 石油污染物通常都是複雜的混合物。
- (2) 較低分子量的碳氫化合物因為溶劑效應(solvent effects)，破壞微生物細胞膜的調結功能，對細胞膜具有相當的毒性。

圖 2.3.2-1 為原油中常見的碳氫化合物分類，主要包含三大類：直鏈或支鏈烷類、環烷類及芳香族類 (Alloway & Ayres, 1998)。

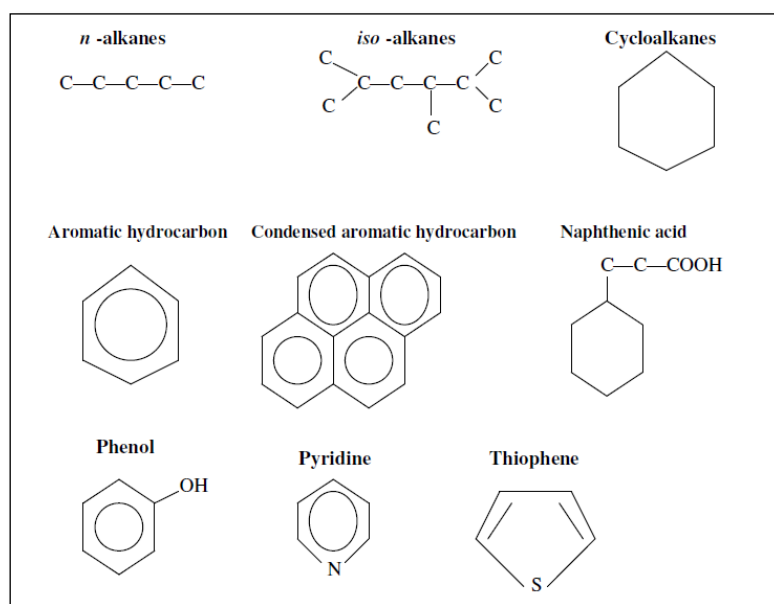


圖 2.3.2-1 原油中常見的碳氫化合物化學結構分類 (Alloway & Ayres, 1998)。

表 2.3.2-1 各種有機物在 25°C 時於水中之溶解度 (Thomas et al., 1986)。

| Group                  | Chemical                                      | mg/L       |
|------------------------|---|------------|
| Aliphatic hydrocarbons | Heptane (C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> )     | 2.9        |
|                        | Octadecane (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> )  | 0.66       |
|                        | Nonane (C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> )      | 0.22       |
|                        | Decane (C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> )     | 0.052      |
|                        | Hexadecane (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> ) | 0.00002    |
|                        | Eicosane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )   | 0.00000011 |
| Aromatic hydrocarbons  | Naphthalene                                   | 31         |
|                        | Biphenyl                                      | 7.2        |
|                        | Acenaphthene                                  | 4.3        |
|                        | Anthracene                                    | 0.050      |
|                        | Phenanthrene                                  | 1.1        |
|                        | Pyrene  | 0.13       |
|                        | Chrysene                                      | 0.0020     |
|                        | 1,2-Benzpyrene                                | 0.0053     |
| Others                 | 4-Chlorobiphenyl                              | 0.96       |
|                        | Palmitic acid                                 | 0.0035     |
|                        | DEHP  | 0.29       |

儘管利用微生物進行生物復育，在利用石油碳氫化合物時會有溶解度低、石油污染物通常為複雜的混合物、溶劑效應三點的困難，但仍有能利用溶解性低或具毒性碳氫化合物的微生物復育技術，主要是因為這些微生物能夠以不同方式來攝取低溶解性的碳氫化合物，且對碳氫化合物的毒性有一定的耐受性。微生物對於水溶性很低的碳氫化合物利用方式可以根據化合物如何由外界傳送到細胞表面，以及由細胞膜傳送至細胞內部酵素活性基上分為下列三種 (Bouchez-Naitali et al., 1999; Goswami & Singh, 1991; Westgate et al., 1995)。

- (1) 微生物直接攝取溶於水中的碳氫化合物。
- (2) 微生物分泌界面活性劑使碳源乳化成微小油滴，油滴顆粒小於微生物細胞，進而攝取利用。
- (3) 微生物直接接觸油滴顆粒大於微生物細胞的大油滴，並降解。

第一種攝取模式主要發生在低分子量的碳氫化合物上。由於低分子量碳氫化合物的水溶性較高，具有一定的質傳速率能傳送到細胞表面讓微生物直接攝取 (Rojo, 2009)，所以碳氫化合物溶在水中的速率、濃度及微生物攝取的速率是此模式代謝速率的主要決定因素。此溶於水相的有機分子直接被利用的現象，其證據在於有些能夠利用碳氫化合物的微生物其生長速率隨著芳香族烷類在水中的溶解度增加而增加 (Wodzinski & Johnson, 1968)。生物復育發展初期，學者認為只有溶於水中的碳氫化合物能被細菌所利用 (Gibson, 1984)。之所以認為會有除了微生物直接攝取溶於水中的碳氫化合物以外的其他方式，是因為有其他研究發現低溶解性碳氫化合物的降解速率比能夠溶於水相中的碳氫化合物來得高，這樣的結果指出有其他的機制使微生物能順利攝取低溶解性的碳氫化合物 (Leahy & Colwell, 1990)。



第二種攝取模式主要是與微生物釋放出的生物界面活性劑有關。大部分能降解石油碳氫化合物的菌株在不同環境下會釋放出生物界面活性劑(biosurfactant)，能夠將疏水性化合物乳化成微小油滴，此油滴顆粒小於微生物細胞，所以能夠增加微生物與碳氫化合物的接觸面積，以提高微生物的降解速率 (Desai & Banat, 1997; Rosenberg & Ron, 1999)。這個形成微小油滴的過程又被稱為假溶解(pseudosolubilizaion)，意即形成微胞粒子(micelles)。微胞粒子也就是被乳化微小油滴，其形成的原因是，界面活性劑的分子包含親水端及疏水端，水中的界面活性劑會隨著濃度上升聚集形成微胞粒子。微胞粒子能將疏水的碳氫化合物包覆，並以親水端將其帶入水相中。

圖 2.3.2-2 為碳氫化合物被生物界面活性劑附著後，微生物細胞再攝取碳氫化合物的示意圖 (Ratledge, 1988)。圖 2.3.2-3 則為菌株 *Pseudomonas sp.* 以碳氫化合物為培養碳源時，分泌出生物界面活性劑鼠李醣脂(rhamnolipids)，與碳氫化合物形成微胞粒子而被微生物細胞攝取的圖 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。此外，這些生物界面活性劑也可能會鍵結在微生物細胞表面上，進而提高微生物表面的疏水性 (Hua et al., 2003; Mulligan, 2005)。

以目前研究發展成果來看，微生物在碳氫化合物環境下產生的生物界面活性劑主要有以下幾類 (Niescher et al., 2006)：醣脂類(glycolipids)、脂肽類(lipopetides)、磷脂類(phospholipids)、多醣脂類(liposaccharides)、脂肪酸類(fatty acids)、高分子界面活性劑(polymeric surfactant)等。表 2.3.2-2 為各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji et al., 2007)，由表中可知有些 *Rhodococcus erythropolis* 菌種會產生海藻糖脂類(trehalose lipids)做為生物界面活性劑。

第三種攝取碳氫化合物的方式，是微生物能夠貼附於水相、固態或液態疏水性碳氫化合物的界面上，並攝取進入細胞內加以利用 (Volkering et al., 1997)。這些微生物除了利用本身表面的疏水性外，會在利用碳氫化合物時改變細胞膜表面的成分，例如脂質或脂肪酸，來提高細胞表面的疏水性，促進與疏水性化合物的接觸 (Morgan & Watkinson, 1994)。

大多數微生物在攝取碳氫化合物的過程中，這三種機制常常同時存在，或是有兩個同時存在。若只有某一種機制存在時，通常透過添加界面活性劑來提高降解的效率。在第二和第三種的模式中，都和微生物貼附於碳氫化合物與水相之間的介面以及分泌生物介面活性劑有關係，生物介面活性劑能將碳氫化合物轉化成小油滴，也就是說提高了碳氫化合物在水相的比例，能有效提高降解的效率 (Ron & Rosenberg, 2002)。此兩種模式也因為在實際情況下，石油碳氫化合物造成的污染中，以溶解性低的長碳鏈烷類為主，所以成為微生物攝取碳氫化合物的主要機制。

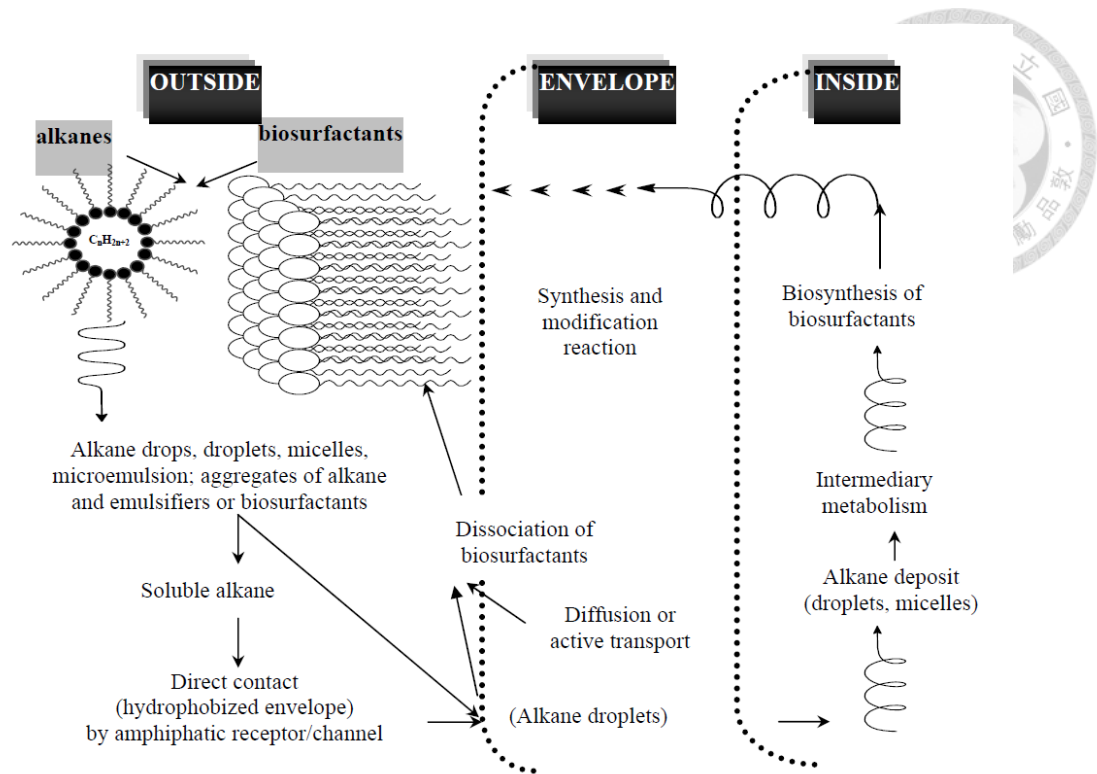


圖 2.3.2-2 微生物細胞攝取有生物界面活性劑附著的碳氫化合物示意圖

(Ratledge, 1988)。

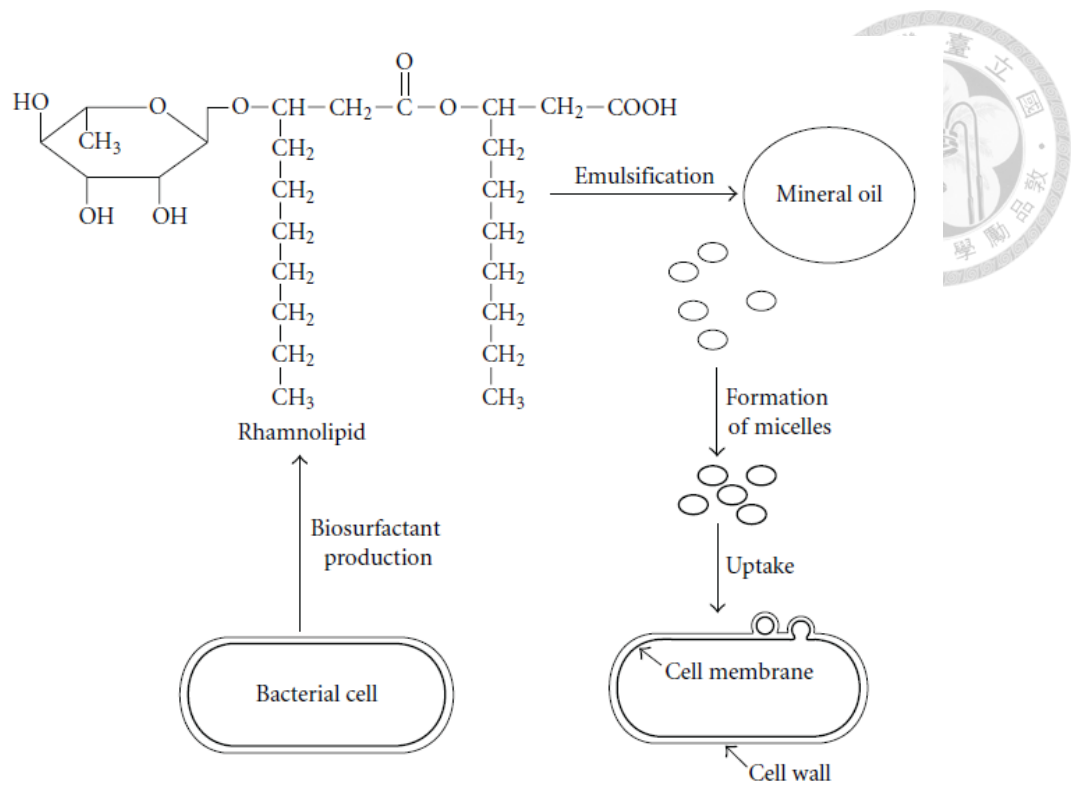


圖 2.3.2-3 菌株 *Pseudomonas* sp. 分泌界面活性劑後攝取碳氫化合物示意圖

(Fritsche & Hofrichter, 2000)。

表 2.3.2-2 各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji et al., 2007)。

| Biosurfactant                       | Source   | Biosurfactant                       | Source  |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|---|
| <b>Glycolipids</b>                  |  | <b>Ornithine-lipid</b>              | <i>Pseudomonas</i> sp.  |
| Trehalose lipids                    | <i>Rhodococcus erythropolis</i><br><i>Nocardia erythropolis</i>  |                                     | <i>Thiobacillus</i> sp.   |
| Trehalose Dimycolates               | <i>Mycobacterium</i> sp.<br><i>Nocardia</i> sp.  |                                     | <i>Agrobacterium</i> sp.  |
| Trehalose dicorynemycolates         | <i>Arthrobacter</i> sp.  | <b>Phospholipids</b>                | <i>Gluconobacter</i> sp.  |
| Rhamnolipids                        | <i>Corynebacterium</i> sp.   |                                     | <i>Candida</i> sp.  |
| Sophorolipids                       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Pseudomonas</i> sp.  |                                     | <i>Corynebacterium</i> sp.  |
|                                     | <i>Torulopsis bombicola</i><br><i>Torulopsis apicola</i><br><i>Torulopsis petrophilum</i><br><i>Torulopsis</i> sp. | <b>Fatty acids / Natural lipids</b> | <i>Micrococcus</i> sp.  |
|                                     |  |                                     | <i>Thiobacillus</i> sp.   |
| Cellobiolipids                      | <i>Ustilago zaeae</i><br><i>Ustilago maydis</i>  |                                     | <i>Acinetobacter</i> sp.  |
| Aminoacid-lipids                    | <i>Bacillus</i> sp.  |                                     | <i>Pseudomonas</i> sp.  |
| <b>Lipopeptides and lipoprotein</b> | <i>Streptomyces</i> sp.  |                                     | <i>Micrococcus</i> sp.  |
|                                     | <i>Corynebacterium</i> sp.   |                                     | <i>Mycococcus</i> sp.   |
|                                     | <i>Mycobacterium</i> sp.   |                                     | <i>Candida</i> sp.  |
| Peptide-lipid                       | <i>Bacillus licheniformis</i>  |                                     | <i>Penicillium</i> sp.  |
| Serrawettin                         | <i>Serratia marcescens</i>   |                                     | <i>Aspergillus</i> sp.  |
| Viscosin                            | <i>Pseudomonas fluorescens</i>   | <b>Polymeric surfactants</b>        |   |
| Surfactin                           | <i>Bacillus subtilis</i>   | Emulsan                             | <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>                                 |
| Subtilisin                          | <i>Bacillus subtilis</i>   | Biodispersan                        | <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>                                 |
| Gramicidins                         | <i>Bacillus brevis</i>   | Mannan-lipid-protein                | <i>Candida tropicalis</i>   |
| Polymyxins                          | <i>Bacillus polymyxa</i>   | Liposan                             | <i>Candida lipolytica</i>   |
|                                     |  | Carbohydrate-protein-lipid          | <i>Pseudomonas fluorescens</i><br><i>Debaryomyces polymorphis</i> |
|                                     |  | Protein PA                          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                     |
|                                     |  | <b>Particulate biosurfactants</b>   |   |
|                                     |  | Vesicles and fimbriae               |   |
|                                     |  | Whole cells                         | <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>                                 |

(Desai & Banat 1997, Karanth et al. 1999)

### 2.3.3 微生物分解碳氫化合物之方式

微生物以各自的方式攝取並降解碳氫化合物，以碳氫化合物作為生長所需的主要碳源。這些微生物將碳源傳送到細胞內進行代謝降解。在降解過程中發生氧化還原反應，藉由電子轉移來產生能量單位 (Berthe-Corti & Ebenhöf, 1999)，此能量進一步被用在微生物合成蛋白質、脂質或建構新的細胞上。電子轉移過程中的電子供應者(electron donor)通常是碳氫化合物，而氧氣、二氧化碳、錳離子、鐵離子、硝酸鹽類和硫酸鹽類常常是電子接收者(electron acceptor)，在不同的有機物代謝反應中會有不同的電子接收者 (Lovley, 1991)。圖 2.3.3-1，微生物降解碳氫化合物之流程圖，描述烷類經氧化還原反應後產生脂肪酸並進行後續的代謝反應。以下介紹微生物降解碳氫化合物時較常見的氧化還原方式，包含好氧性及厭氧性降解。

#### (1) 好氧性降解(aerobic degradation)：

氧分子為好氧性細菌氧化還原反應的最終電子接受者，利用氧化反應將碳氫化合物轉化成脂肪酸並進行後續的代謝作用，生成細胞生長所需的化合物及能量 (Wentzel et al., 2007)。圖 2.3.3-2 為好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritsche & Hofrichter, 2000)，圖中即表示了碳氫化合物被降解後進行後續的代謝反應，經檸檬酸循環後產生能量單位與幫助細胞生長。另外，在氧氣充足的情況下，經好氧性降解的碳氫化合物能以較快的速率被微生物完全降解 (Riser-Roberts, 1998)。

## (2) 厭氧性降解 (anaerobic degradation) :

厭氧菌的數量大約佔了自然環境中微生物族群的 10~15% (Casella & Payne, 1996)。厭氧降解和好氧降解最大的不同處在於電子接收者不同，氧分子並非厭氧性降解的電子接受者，而是無機物質如硫酸根、硝酸根、鐵離子、錳離子或二氧化碳…等。近年來，有許多關於利用硫酸鹽還原菌(sulfate-reducing bacteria) (Cravo-Laureau et al., 2005; Rueter et al., 1994; So et al. 2003) 及反硝化細菌(denitrifying bacteria) (Ehrenreich et al., 2000) 在無氧環境下進行長碳鏈烷類氧化反應的研究。在這些微生物系統中，硫酸鹽及硝酸鹽的功能如好氧性分解中氧分子的角色，當作最終電子接受者。延胡索酸鹽(fumarate)結合反應、羧化反應(carboxylation)分別為碳氫化合物進行厭氧代謝的初始反應機制。好氧性及厭氧性細菌降解長碳鏈碳氫化合物過程及比較如圖 2.3.3-3 所示 (Wentzel et al., 2007)。

由於厭氧菌的生長速率在一般情形下較好氧菌來得慢，碳氫化合物的厭氧性分解速率較低 (Aeckersberg et al., 1998)。然而利用厭氧菌降解有機污染物仍有其優點，優點為處理特定的污染物時，在相同條件下，欲達到相同的代謝效果，厭氧菌較好氧菌的用量少 (Babel, 1994)。

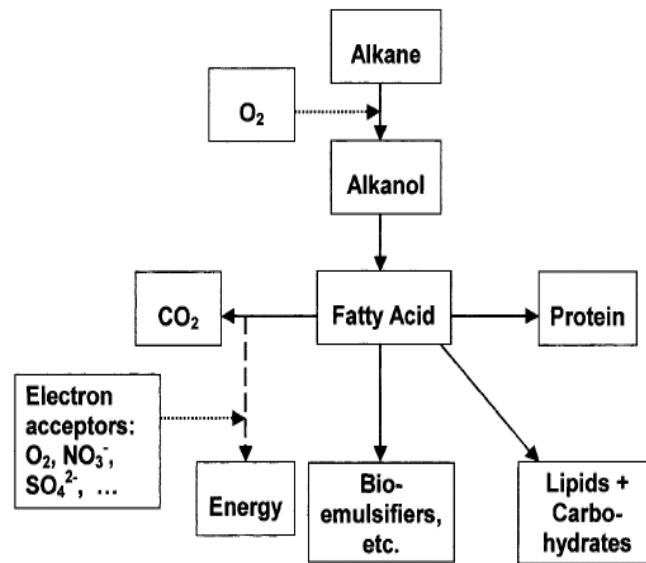


圖 2.3.3-1 碳氫化合物分解流程圖，實線代表 carbon flux、虛線代表  $O_2$  flux 及電子接收者 (Berthe-Corti, 1999)。

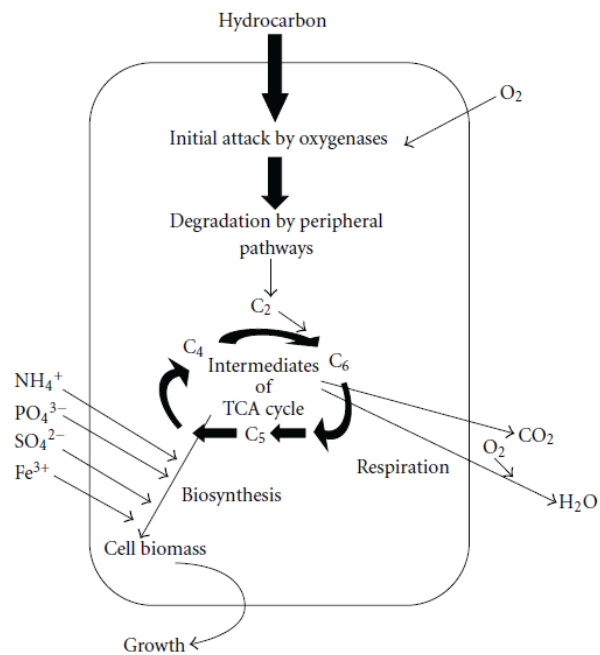


圖 2.3.3-2 好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。



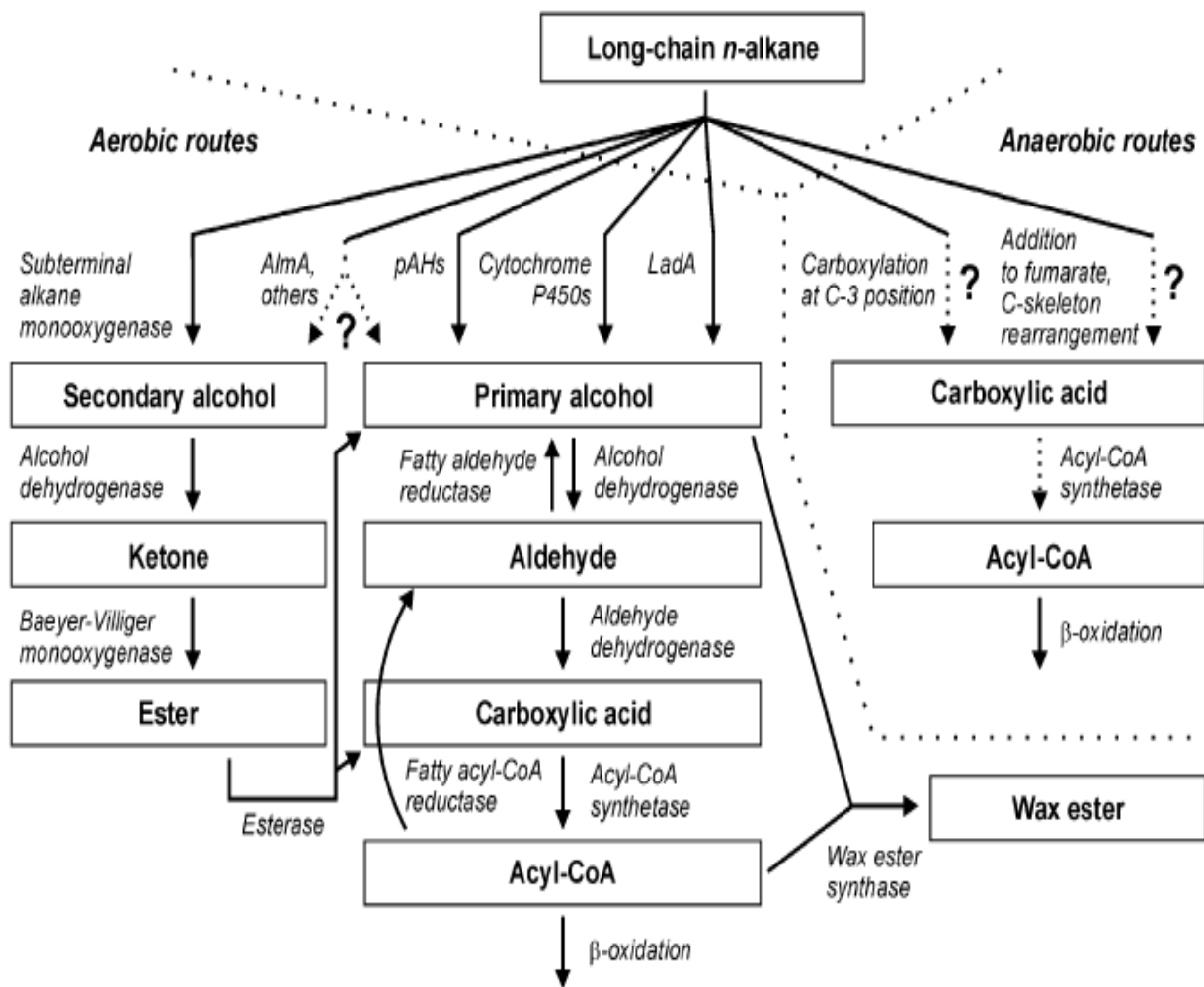


圖 2.3.3-3 長碳鏈烷類的好氧及厭氧性降解途徑，點狀線的箭頭是指推測的代謝路徑 (Wentzel et al., 2007)。

## 2.4 微生物降解碳氫化合物之代謝途徑

碳氫化合物分子的立體結構對微生物降解利用碳氫化合物時的難易程度有很大的影響，結構越簡單的化合物越容易被分解。相同化學結構的化合物中，分子量較低的化合物比分子量高的化合物來得容易被微生物利用降解。但碳鏈長度差異在 5 個碳以內則不會有太大的差別 (Huesemann, 1995)。依此原則，石油碳氫化合物中，被微生物利用降解的難易度排序大致如下：直鏈烷類 > 支鏈烷類 > 支鏈烯烴類 > 分子量較低的芳香族類 > 環烷類 > 多環芳香族碳氫化合物 > 瀝青稀類 (Atlas & Bragg, 2009; Huesemann, 1995; Ulrici, 2000)。

烷類的主要污染物為直鏈烷和支鏈烷。直鏈烷由於其立體結構簡單，是石油碳氫化合物中最容易受到微生物氧化酶攻擊的成分，降解過程類似於微生物分解脂肪酸 (Westlake et al., 1978)。也因直鏈烷類在構造上容易被微生物所利用，微生物最常利用直鏈烷類作為其生長所需的碳源，其中又以  $C_{10}\sim C_{25}$  最適合微生物利用作為基質 (Bartha & Atlas, 1977)。而碳數小於 10 的短鏈正烷類，由於易揮發且在細胞膜的通透與調節上並不容易控制，可能因為溶劑效應，對微生物有較大的毒性 (Atlas, 1981)。

微生物利用碳氫化合物時，主要有好氧性及厭氧性兩種氧化還原方式。本研究中所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 為好氧性細菌，以下介紹微生物對碳氫化合物的好氧性代謝途徑。

### 2.4.1 直鏈烷之氧化機制

直鏈烷類為原油中最主要的成分之一 (Harayama et al., 1999)。其中，以長碳鏈，碳數介於  $C_{10}\sim C_{25}$  的直鏈烷類為微生物最常利用的基質，通常微生物對此範圍的直鏈烷類有最快的降解速率 (Bartha & Atlas, 1977)。碳數小於 10 的短鏈烷

類則因為會破壞微生物細胞膜的通透及調結功能，對多種微生物而言具毒性，但也因其碳數較少能以較快的速率從石油污染物中揮發移除 (Fritsche & Hofrichter, 2000)而不需採取透過微生物生物復育的方式處理。



微生物降解烷類的作用一般是在好氧的情況之下進行 (Berthe-Corti & Fetzner, 2002)，降解過程中，除了氧原子的參與，微生物亦會分泌不同的氧化酶於細胞的表層開始進行氧化反應，分泌的氧化酶包含單氧化酶(monooxygenase)和雙氧化酶(dioxygenase)。烷類經一次末端氧化後，形成了一級醇類(primary alcohol)，接著透過 NADH 和 NAD<sup>+</sup>的共同反應將醇類轉化為脂肪酸，最後進入  $\beta$ -oxidation 循環 (Schunck et al., 1987)。由於不同的微生物分泌的氧化酶並不相同，所以微生物降解代謝烷類的路徑便不相同。

對長碳鏈直鏈烷類的代謝途徑而言，直鏈烷類的氧化途徑主要為三類：單末端氧化(monoterminal oxidation)、雙末端氧化(diterminal oxidation)、次末端氧化(subterminal oxidation) (Gibson, 1984)。

#### (1) 單末端氧化：

單末端氧化為微生物代謝直鏈烷時最主要的途徑 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。直鏈烷單末端氧化的途徑為，微生物釋放出單氧化酶，利用 NADH<sub>2</sub> 作為電子提供者並結合氧分子作為電子接受者，攻擊直鏈烷上  $\alpha$  位置的碳，反應生成一級醇類。接著利用醇脫氫酶(alcohol dehydrogenase)將醇氧化成醛類，接著微生物利用醛脫氫酶(aldehyde dehydrogenase)，NADH<sub>2</sub> 再次和氧氣作用將醛氧化成脂肪酸 (Nieder & Shapiro, 1975)。長鏈脂肪酸會結合 CoA 並進入  $\beta$ -oxidation 進而生成 acetyl-CoA (Van Hamme et al., 2003; Watkinson & Morgan, 1990; Wentzel et al.,

2007)。上述過程可參考圖 2.4.1-1。這些長鏈脂肪酸有可能會與細胞膜上的脂質結合，但主要還是會進入檸檬酸循環 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。



## (2) 雙末端氧化：

直鏈烷氧化過程中，微生物除了分泌單氧化酶外，也會分泌出雙氧化酶，能夠同時氧化烷類兩端的甲基生成雙質子醇 (Sokatch, 1969)，再經過接下來的氧化反應生成長鏈雙質子羧酸(dicarboxylic acid)，最後進入  $\beta$ -oxidation (Coon, 2005; Watkinson & Morgan, 1990)，上述過程的流程可參考圖 2.4.1-1 所示。

## (3) 次末端氧化：

如圖 2.4.1-1 所示。次末端氧化發生於烷類基質的鏈長至  $C_{16}$  (Binazadeh et al., 2009; Gibson, 1984; Whyte et al., 1998)或碳數介在  $C_3 \sim C_6$  的短碳鏈烷類中 (Ashraf et al., 1994)。次末端氧化的主要對象是氧化直鏈烷中  $\alpha$  位置的碳，將其氧化成為酮類。接著酮再被氧化形成一級醇和醋酸，一級醇氧化成為脂肪酸後進入  $\beta$ -oxidation 代謝循環，而醋酸則進入 TCA 循環。在部分微生物中，單末端及次末端氧化反應能夠同時存在 (Rojo, 2009)。

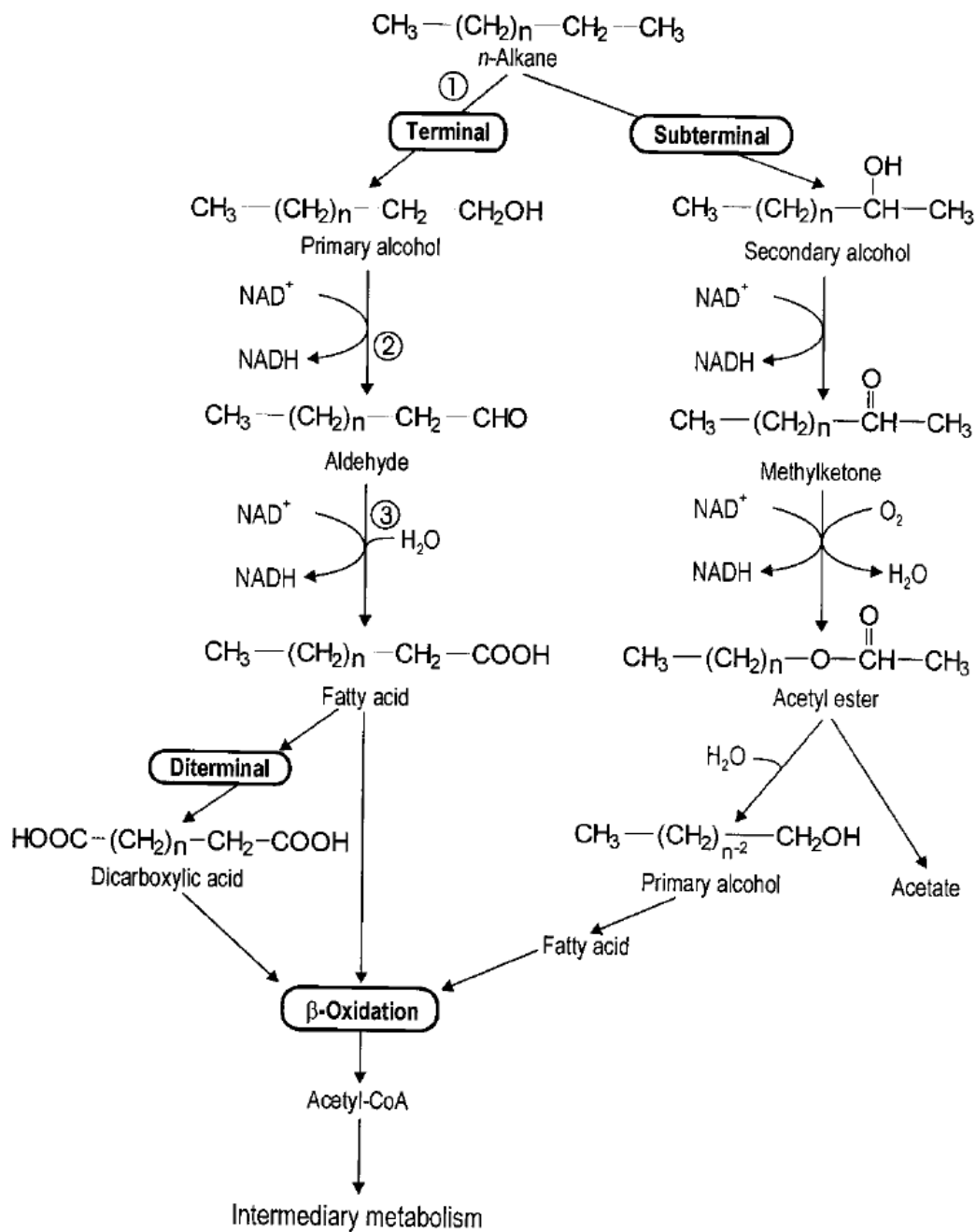


圖 2.4.1-1 微生物代謝分解直鏈烷之途徑，圖中 1 為  $n$ -alkane 單氧化酶、2 為醇脫氫酶、3 為醛脫氫酶 (Britton, 1984)。

## 2.4.2 支鏈烷之氧化機制

因碳氫化合物的立體結構對微生物降解利用碳氫化合物的能力有很重要的影響，支鏈烷類相對於直鏈烷類也因其立體結構較複雜而較難以被微生物降解，支鏈越多越難以被降解利用，特別是含 3 級或 4 級的碳原子結構，其空間障礙會影響氧化酶的作用，所以具有能夠降解支鏈烷能力的微生物相對較少 (Britton, 1984)。

異十九烷(pristane or 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane)因其支鏈結構複雜，往往在原油或石油污染物的降解過程中呈現穩定的存在而不易被分解，所以常被視為微生物降解支鏈烷類的指標 (Morgan & Watkinson, 1994)。目前已有許多具有降解異十九烷能力的微生物被發現，例如 *Brevibacterium sp.* (Pirnik et al., 1974)、*Corynebacterium sp.* (McKenna & Kallio, 1971b)及 *Rhodococcus sp.* (Fraaije et al., 2002; McKenna & Kallio, 1971a)等。

由於 3 級碳的阻礙，異十九烷首先會經由  $\alpha$ -oxidation 形成異十九酸(pritanoic acid)，接著進行  $\beta$ -oxidation 形成三甲基十三酸(trimethyl tridecanoic acid)、三甲基十一酸(trimethyl undecanoic acid)或是進形  $\omega$ -oxidation 形成三甲基十三酸(trimethyl tridecandioic acid)後再進行  $\beta$ -oxidation，直到異十九烷被分成琥珀酸(succinic acid)並進入 TCA 循環為止 (Pirnik et al., 1974)。圖 2.4.2-1 為 Pirnik 學者提出的利用菌株 *Brevibacterium erythrogens* 降解異十九烷的單末端氧化及雙末端氧化途徑。

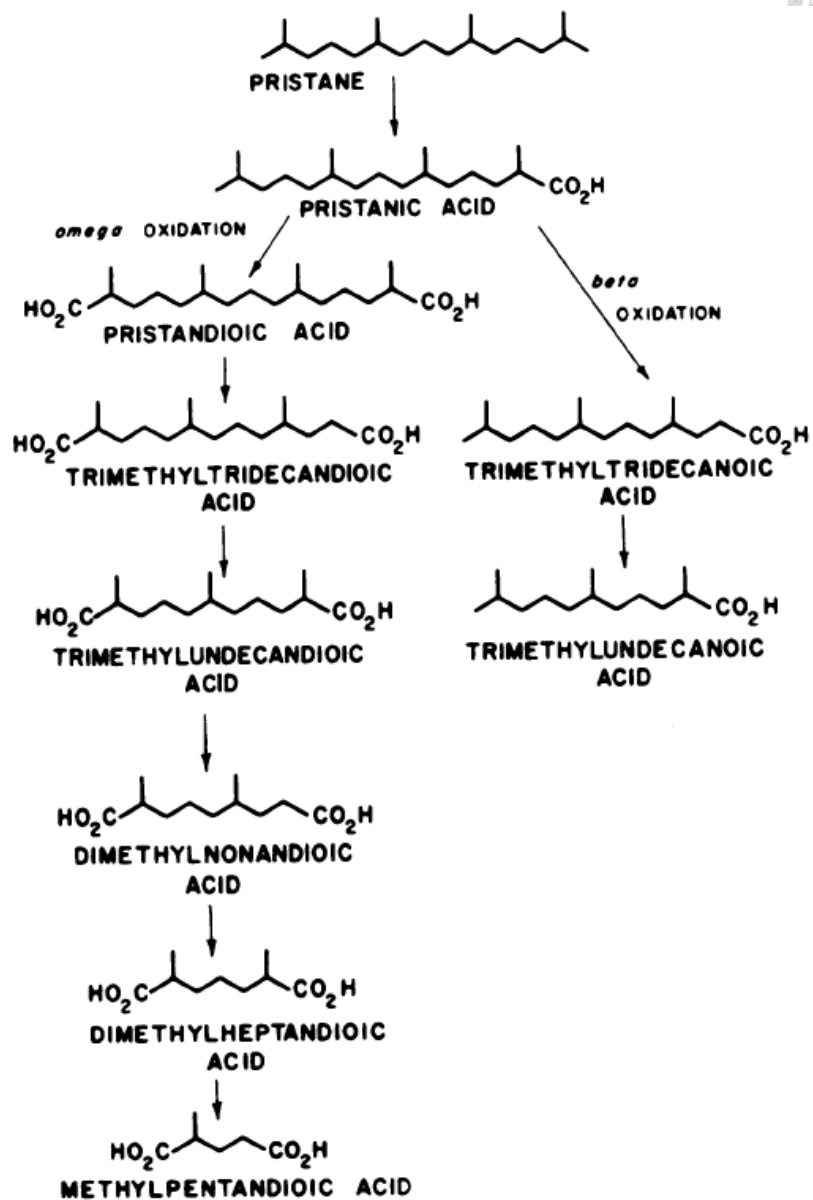


圖 2.4.2-1 菌株 *Brevibacterium erythrogens* 降解異十九烷的途徑 (Pirnik et al., 1974)。

### 2.4.3 烯烴類及環烷類之氧化機制

烯烴類及環烷類僅佔石油碳氫化合物污染中的小部分，其被氧化代謝的過程如下。

烯烴類的代謝途徑如圖 2.4.3-1 所示，起始氧化的途徑包含微生物可以攻擊甲基端，也可攻擊雙鍵 (Watkinson & Morgan, 1990)。若是起始氧化發生於雙鍵，而雙鍵出現在 1、2 碳的位置，則可能會有以下三種反應途徑：(1) 與水行加成反應，生成醇類、(2) 與單氧化酶反應生成一環氧化合物，再氧化形成二元醇、(3) 在碳氫化合物飽和末端發生氧化反應。而若是雙鍵的位置出現在中間部位時，烯烴的降解會與烷類的降解方式相似(張蘭英等，2007)。

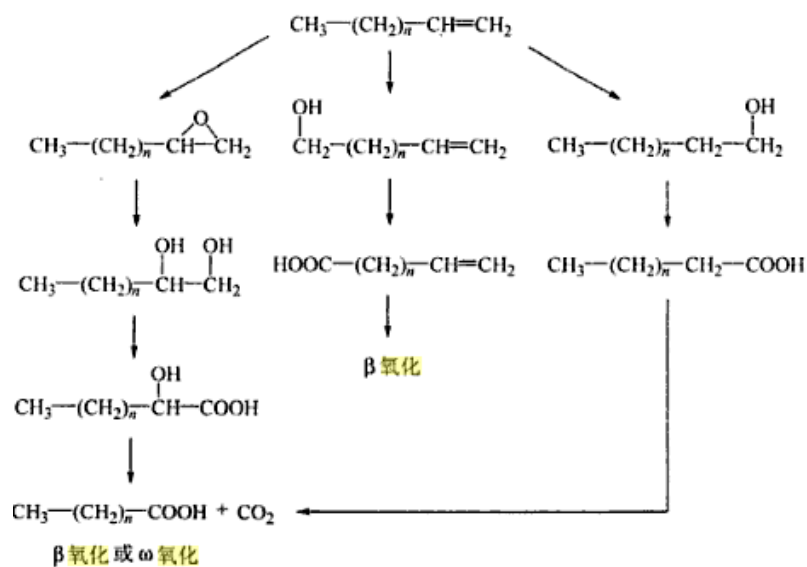


圖 2.4.3-1 烯烴類生物降解可能的代謝途徑(張蘭英等，2007)。



環烷類因結構較複雜難以被微生物所食用。能夠被微生物所代謝利用的情況，大部分是透過多種微生物的共同代謝作用完成的。代謝後的產物，以環己烷類為例，被微生物代謝後，會分解成二氧化碳及水分子 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。一般環己烷的代謝途徑如圖 2.4.3-2 所示，環己烷降解代謝成環己醇、環己酮、和  $\epsilon$ -己酸內酯後，開環形成羧基羧酸並進入  $\beta$ -oxidation 代謝循環(張蘭英等，2007)。雖然還烷類結構複雜難以被微生物所利用，但具有烷烴支鏈或羧基的環烷類，可促進降解的情形 (Morgan & Watkinson, 1994)。

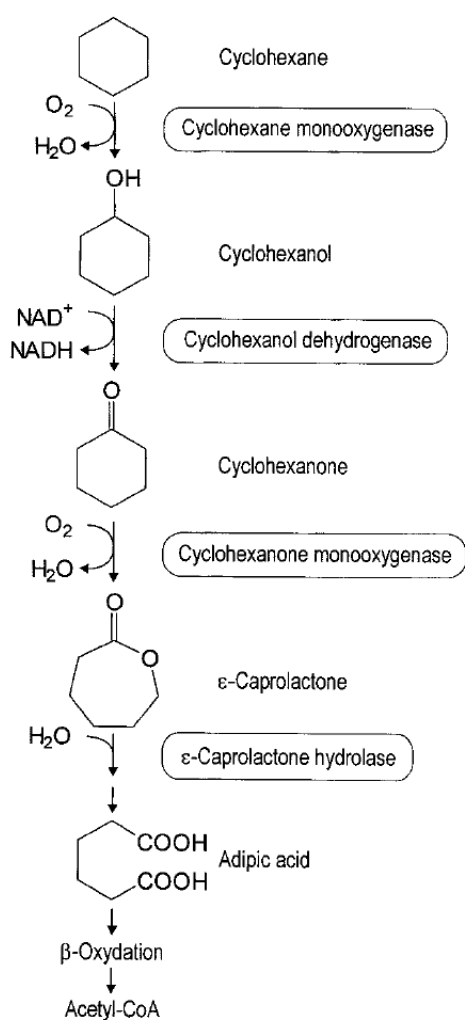


圖 2.4.3-2 環己烷的代謝途徑 (Fritsche & Hofrichter, 2000)。

本實驗中所使用的 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 為一種不形成分生孢子或內孢子的諾卡氏型放線菌，圖 2.4.3-3 為學者 Alvarez 在 2003 年整理的有關不產孢放線菌降解各種碳氫化合物時的代謝路徑，並解釋了中間產物進入  $\beta$ -oxidation 之後的各種應用。由圖中可以知道，*Rhodococcus* 菌屬降解代謝正十六烷後，最後形成 mycolic acids 的途徑。另外，這些不產孢放線菌在利用不同形態的碳氫化合物如直鏈烷、支鏈烷或環烷類…等之後，所生成的中間產物會進入  $\beta$ -oxidation，最終這些物質將轉變為以下幾種細胞生長所需的物質 (Alvarez, 2003)：

- (1) 生長所需能量(energy)。
- (2) 影響細胞表面親疏水性的 mycolic acids。
- (3) 建構細胞膜所需的磷脂質(phospholipids)。
- (4) 儲存能量的甘油三脂(triacylglycerols)。
- (5) 其他脂質(lipids)。

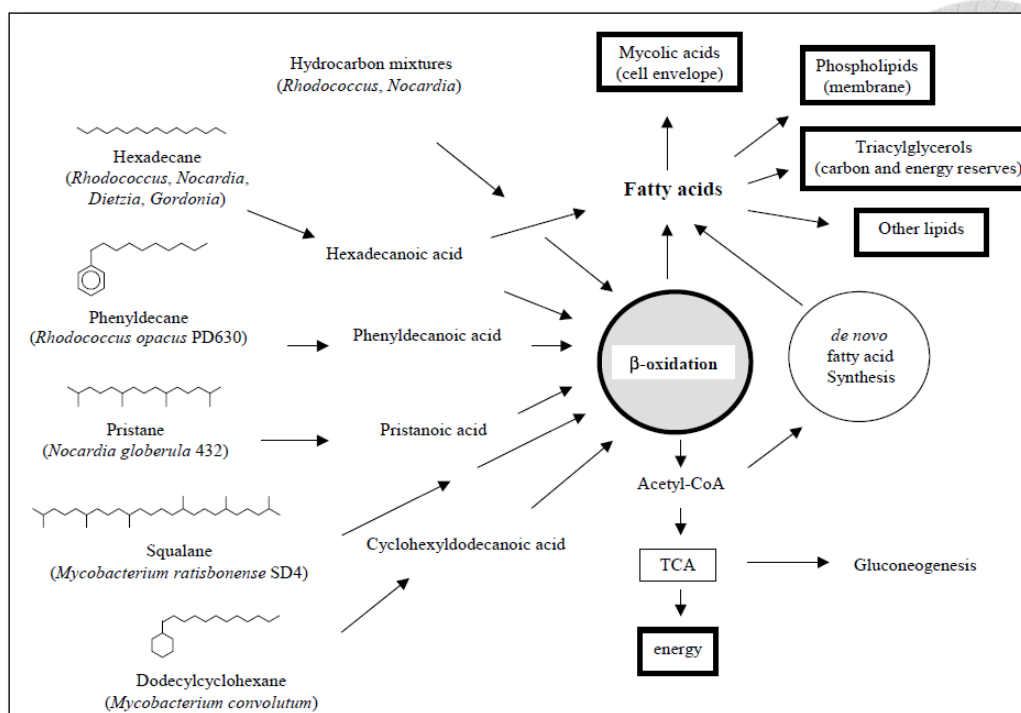



圖 2.4.3-3 不產孢放線菌降解利用不同碳氫化合物之途徑及經過  $\beta$ -oxidation 後合成細胞生長所需相關物質 (Alvarez, 2003)。

## 2.5 實驗菌株 *Rhodococcus erythropolis* 介紹

### 2.5.1 *Rhodococcus* 菌屬介紹



*Rhodococcus* 菌屬可以從許多環境中被分離出來，包括北極到南極圈、土壤、岩石、地下水、海底沈積物、動物的糞便、昆蟲內臟或是動植物的致病菌中，皆能發現 *Rhodococcus* 菌種的蹤跡 (Finnerty, 1992)。*Rhodococcus* 菌屬屬於革蘭氏陽性菌、好氧、無鞭毛、不具運動性、通常呈現球狀或是桿狀且為不形成分生孢子或內孢子的諾卡氏型放線菌(nocardioform actinomycetes) (Finnerty, 1992; Larkin et al., 2005)。細胞大小約為 2~3  $\mu\text{m}$ 。*Rhodococcus* 菌屬的細胞壁組成有 40% 是由 mycolic acids 所組成，mycolic acids 是由高分子量的  $\alpha$ -alkyl 和  $\beta$ -hydroxy 脂肪酸構成且含 54~60 個碳鏈長，因此 *Rhodococcus* 菌屬細胞表面具有高疏水性 (Carvalho & Fonseca, 2004; Carvalho & Fonseca, 2005)，且對化學毒物有高抵抗性及能夠抵禦脫水等性質 (Collins et al., 1982)。本實驗中所使用的菌株 *R. erythropolis* NTU-1，經過其對正十六烷的 MATH (microbial adhesion to hydrocarbons)細胞吸附實驗，證實細胞表面的確具有相當的疏水性(劉志文，2007)。其除了對環境有高度的容忍性外，還具有多樣性的代謝機制與參與代謝反應的氧化酶，能分解、轉化多種有機化合物，包含一些分子結構複雜、毒性高的化合物 (Larkin et al., 2005)，以上特性讓 *Rhodococcus* 在提升原油回收量的領域中，佔有很重要的地位。

*Rhodococcus* 菌屬具有多樣代謝機制，能分解、轉化多種有機化合物，主要是因為 *Rhodococcus* 菌屬中含有多種類型的酵素如單氧化酶及雙氧化酶，使其能夠降解掉大範圍的有機污染物。本實驗中所使用的菌株 *R. erythropolis* NTU-1 為好氧菌，以下介紹，好氧情況下，*Rhodococcus* 菌屬各種不同類型的單氧化酶及

雙氧化酶催化的反應 (Larkin et al., 2005)。

- (1) Epoxidation 環氧化(如 cytochrome P450 enzymes)，芳香類的環氧化物可能會被轉化為 phenols 或是水解為 trans-diols。
- (2) Cis-dihydroxylation 順雙羥基化反應(如 naphthalene dioxygenase)。
- (3) Hydroxylation of second alkyl group 第二烷基的氫氧化。
- (4) Hydroxylation of primary alkyl group 第一烷基的氫氧化(如 alkane monooxygenase 烷類單氧化酶)。
- (5) Sulfoxidation of sulfide to sulfoxide 硫化物的磺化。
- (6) Sulfoxidation of sulfoxide to sulfone 硫氧化物的磺化。

*Rhodococcus* 菌屬透過各種氧化酶幫助其進行上述的反應，以降解不同的碳氫化合物。圖 2.5.1-1 表示了由 *Rhodococcus* 所含有的酵素催化進行的各種反應。

此外研究顯示 *Rhodococcus* 菌屬有很強的聚集能力，尤其是在和碳氫化合物接觸的情況下 (Finnerty, 1992)。*Rhodococcus erythropolis* 除了能夠分泌生物界面活性劑外，還能夠分泌生物凝絮劑，能夠讓很多種不同的懸浮固體形成聚集現象 (Kurane & Tomizuka, 1992)。*Rhodococcus* 菌屬對於多種有機污染物具有生物降解的能力。而能夠分泌生物界面活性劑與生物凝絮劑的特性使 *Rhodococcus* 菌屬對碳源的接觸利用變得更容易。

90 年代以後，因為 *Rhodococcus* 菌屬除了對環境有高度的容忍性 (Larkin et al., 2005)。*Rhodococcus* 菌屬還具有多樣性的代謝機制，能分解、轉化多種有機化合物，包含分子結構複雜、毒性高的化合物 (Larkin et al., 2005)。再加上其細



胞聚集所產生包覆烷類的現象 (Finnerty, 1992)，而逐漸受到重視，在生物復育的領域中，佔有很重要的地位。

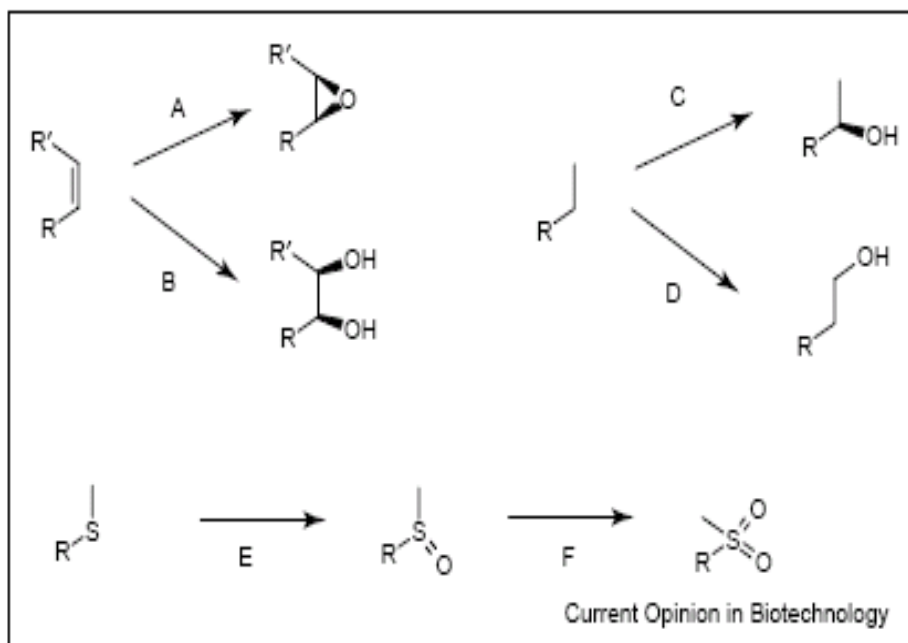


圖 2.5.1-1 由 *Rhodococcus* 催化發生的各種不同的氧化反應

包括幫助生長及降解各種污染物的反應 (Larkin et al., 2005)。

*Rhodococcus* 菌屬包含了以下14個菌種：*R. coprophilus*、*R. equi*、*R. fascians*、*R. erythropolis*、*R. globerulus*、*R. rhodnii*、*R. marinonascens*、*R. opacus*、*R. percolatus*、*R. rhodochrous*、*R. ruber*、*R. zopfii*、*R. pyridinivorans* 及 *R. koreensis* (Bell et al., 1998)。

### 2.5.2 *Rhodococcus erythropolis* 特性與應用

上節中我們知道了 *Rhodococcus* 菌屬能夠降解多種有機污染物，除了因為 *Rhodococcus* 菌屬能分泌出多種酵素來進行各種代謝反應，利用碳氫化合物外，其細胞表面的疏水性，或是在培養過程中分泌的界面活性劑、絮凝劑，都能提升細胞使用碳源的效率。接下來將對本研究所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* 的降解能力及應用作介紹。


由於 *Rhodococcus erythropolis* 細胞具有多種酵素，這些酵素參與 *Rhodococcus erythropolis* 中的許多化學反應，如氧化作用 (oxidation)、去氫作用 (dehydrogenation)、環氧化作用 (epoxidation)、水解作用 (hydrolysis)、氫氧化作用 (hydroxylation)、去鹵素作用 (dehalogenation) 及去硫作用 (desulfurisation) 等。*Rhodococcus erythropolis* 也因為多樣的酵素能夠參與多樣的反應，因而具有多種不同的生物轉換及降解的能力，這些能力被利用於各種不同的生物技術、環境處理及化學品的合成轉換等 (Carvalho & Fonseca, 2005)。表 2.5.2-1 為一些微生物氧化碳氫化合物時的酵素分類 (Van Beilen & Funhoff, 2007)。由表中可知非血基質二鐵烷類羥化酶 (alkB-related alkane hydroxylases) 及 Bacterial P450 oxygenase systems 這兩種類型的氧化酵素為 *Rhodococcus* 菌屬主要的氧化酵素來源。而本實驗中使用菌株 *R. erythropolis* NTU-1 所分泌之氧化酵素主要為 alkB 的類型 (Sayavedra Soto et al., 2006)。

表 2.5.2-1 微生物降解碳氫化合物時之酵素分類 (Van Beilen & Funhoff, 2007)。

| Enzyme class                                       | Composition and cofactors  | Substrate range   | Presence shown in   | Reference for GenBank entries |
|--|--|---|---|-------------------------------|
| Soluble methane monooxygenase (sMMO)               | $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ hydroxylase; dinuclear iron reductase, [2Fe-2S], FAD, NADH regulatory subunit                    | C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub> (halogenated)-alkanes, alkenes, cycloalkanes             | <i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylocella</i>                                   | McDonald et al. (2006)        |
| Particulate methane monooxygenase (pMMO)           | $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ hydroxylase trimer composed of PmoA, PmoB, PmoC; mononuclear copper and dinuclear copper in PmoB | C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> (halogenated)-alkanes, alkenes                           | <i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylomicrobium</i> , etc. | McDonald et al. (2006)        |
| AlkB-related alkane hydroxylases                   | Membrane hydroxylase; dinuclear iron rubredoxin; mononuclear iron rubredoxin reductase, FAD, NADH                          | C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> alkanes, fatty acids, alkylbenzenes, cycloalkanes, etc. | <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , etc.         | van Beilen et al. (2003b)     |
| Eukaryotic P450 (CYP52, Class II)                  | Microsomal oxygenase; P450 heme reductase; FAD, FMN, NADPH   | C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> alkanes, fatty acids                                   | <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>   | Iida et al. (2000)            |
| Bacterial P450 oxygenase systems (CYP153, class I) | P450 oxygenase; P450 heme ferredoxin; iron-sulfur ferredoxin reductase, FAD, NADH  | C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> alkanes, (cyclo)-alkanes, alkylbenzenes, etc.           | <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , etc.         | van Beilen et al. (2006)      |
| Dioxygenase  | Homodimer; copper, FAD   | C <sub>10</sub> -C <sub>30</sub> alkanes  | <i>Acinetobacter</i> sp. M-1  | Maeng et al. (1996)           |

目前關於 *R. erythropolis* 菌株的研究成果都表示此菌株能夠有效降解碳氫化合物。例如，Peng 等學者篩選出 *R. erythropolis* 3C-9 能降解油類的菌株，其能降解範圍是碳數介於 C<sub>5</sub>~C<sub>36</sub> 的直鏈烷類，並在降解過程中產生碳鏈長介於 C<sub>9</sub>~C<sub>22</sub> 的脂肪酸與 2 種醣脂作為界面活性劑 (Peng et al., 2007)。Huang 等學者分離出的菌株 *R. erythropolis* T7-2 能乳化並降解碳鏈長度為 C<sub>12</sub>~C<sub>36</sub> 的直鏈烷類。以人工海水為培養基，溫度為 15°C，在最佳化的營養條件下，7 天內約能降解掉 75% 培養基中的柴油，而柴油在培養基中的初始濃度為 1% (w/v) (Huang et al., 2008)。 *R. erythropolis* DCL14 能降解碳鏈長 C<sub>5</sub>~C<sub>16</sub> 的碳氫化合物，完全降解掉燃油中的直鏈烷、異烷類、環烷類及芳香族化合物需九個月的時間 (Carvalho & Fonseca, 2005)。





除了透過各種氧化酶催化的反應降解代謝碳氫化合物外，*R. erythropolis* 也能在降解代謝碳氫化合物的過程中合成多種化合物，如生物界面活性劑、凝絮劑、氨基化合物及高分子…等，用途廣泛 (Bell et al., 1998)。其中，*R. erythropolis* 菌株在利用低水溶性的碳氫化合物作為碳源時，會分泌生物界面活性劑，其成份主要為醣脂類或脂肪酸，若這些物質存在於細胞表面，可使細胞表面的疏水性增強，若釋放到培養基中則能降低油和水之間的表面張力，有效幫助 *R. erythropolis* 菌株攝取碳氫化合物更加容易 (Lang & Philp, 1998)。而 *R. erythropolis* 分泌並釋放的生物界面活性劑對碳氫化合物的攝取有所幫助，其原因以下整理出三點：

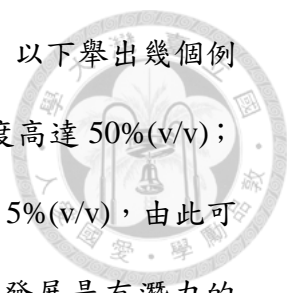
- (1) 生物界面活性劑與細胞鍵結(如 mycolic acids)，使細胞較易貼附在油相及水相之間的疏水性碳源表面 (Neu, 1996)。
- (2) 幫助降低油水兩相的表面張力，使疏水性碳源較容易進入細胞內 (Fiechter, 1992)。
- (3) 細胞外的界面活性劑能幫助疏水性碳源分散至水中，提高細胞與碳源接觸的機會 (Finnerty, 1994)。

*Rhodococcus erythropolis* 細胞表面的組成約有 40% 是 mycolic acids，因此細胞表面有很強的疏水性，此疏水性使細胞在油水兩相的環境中時，會貼附於油水相介面上 (Neu, 1996)。*R. erythropolis* 菌株在利用低水溶性的碳氫化合物作為碳源時，除了分泌生物界面活性劑，細胞表面的 mycolic acids 亦提供了細胞明顯的疏水性質，均能夠幫助細胞攝取碳源時更加容易 (Lang & Philp, 1998)。細胞表面的疏水性，除了幫助細胞攝取疏水性碳源外，也能提升污染物的移除效果，這是因為當大量的細胞將疏水性物質包覆後，會形成可物理移除的團塊，即可以直接

以物理移除的方式處理污染物 (Carvalho & Fonseca, 2005)。 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 在分別以異十九烷及正十六烷為唯一碳源培養的情況下，在 56 小時後會出現聚集現象，被包覆的烷類達總量的 40~50%，總移除量可達到 90% 以上 (Sayavedra-Soto et al., 2006)。

本實驗室研究 NTU-1 進行碳氫化合物的降解與包覆，NTU-1 利用正十六烷為碳源時，培養基的表面張力至培養的第 70 小時會從最初的 70 mN/m 降至 60 mN/m 左右，顯示有生物界面活性劑的釋放，但釋放到培養基中的量可能不多(張緯農，2003)。在另外一項實驗，利用異十九烷及正十六烷為 NTU-1 培養碳源的生長過程中，NTU-1 表面的脂肪酸會明顯增加，這也使得 NTU-1 細胞表面疏水性增強(劉志文，2007)。因此我們可以知道，NTU-1 疏水性的增加主要來自於細胞表面累積的脂肪酸，細胞整體疏水性加強能使細胞接觸烷類變得更加容易。從研究結果中可知以正十六烷為唯一碳源培養 NTU-1 至約 40 小時以後，NTU-1 細胞會因其表面的疏水性形成結塊將烷類包覆，因而能利用物理撈除來移除未被降解代謝的烷類。在實驗範圍為正十六烷濃度介於 1000~3000 ppmv 間，NTU-1 的移除效果在約 40 小時即能達到 95% 以上(張緯農，2009)

另外，*R. erythropolis* 菌種會藉由改變細胞膜上脂肪酸的含量維持細胞膜的通透性 (Heipieper et al., 1994)。以 *R. erythropolis* DCL14 為例，發現細胞膜上磷脂質的脂肪酸飽和程度會隨著碳源濃度提高而增加，但是當碳源為短鏈的醇類如甲醇、乙醇時，碳源濃度的提高，脂肪酸的飽和程度則會下降 (Carvalho et al., 2005)。其他影響細胞膜脂肪酸飽合程度的因素還有環境溫度及酸鹼值等 (Peng et al., 2007; Whyte et al., 1999)。

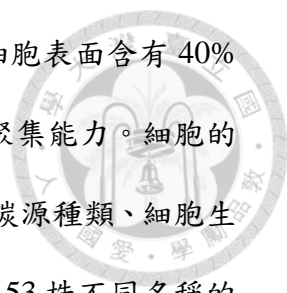


為說明 *R. erythropolis* 菌種對於環境毒性有相當的耐受性，以下舉出幾個例子。在水溶性溶劑乙醇或丁醇下，*R. erythropolis* 可以忍受的濃度高達 50%(v/v)；在非水溶劑下，*R. erythropolis* 可以忍受十二烷及甲苯的濃度達 5%(v/v)，由此可知 *R. erythropolis* 在非傳統的反應系統中其生物催化作用的發展是有潛力的 (Carvalho & Fonseca, 2004)。此外，本實驗所使用的 NTU-1 在不同鹽濃度或是海水為培養基下，都可以保有其降解能力，實驗結果顯示在鹽度小於 3.5%，NTU-1 仍然保有其特性(劉志文，2011)，此項研究成果也顯示 NTU-1 應用到不同條件的環境中是有其競爭力的。

## 2.6 微生物之細胞聚集現象

學者 Calleja 為細胞聚集現象(cell aggregation)定義，為在生理條件下，細胞集聚在一起形成一相當穩定且連續的多細胞菌團 (Calleja, 1984)。此一聚集的現象在自然界中其實並不少見，許多微生物會傾向於貼附到界面上或是聚集在一起 (Busch & Stumm, 1968)。通常微生物聚集的目的是為了提高攝取營養物的效率、抵抗毒性物質的進入或是對抗環境壓力以維持生理機能…等 (Chang & Su, 2003; Logan & Hunt, 1988; Sannasi et al., 2009)。

影響微生物聚集現象的因素眾多，包括物理、化學及生物因子，其中碳源種類、溫度、疏水性作用力、凡得瓦力、靜電作用力、微生物生長階段…等是最常被研究的因子 (Bossier & Verstraete, 1996; Malik et al., 2003)。微生物聚集現象在石油碳氫化合物的生物復育應用中有以下 2 點優點：(1) 促進微生物接觸及降解污染物，(2) 被包覆的碳氫化合物能以物理方式來移除並作下一步的處理 (Sayavedra Soto et al., 2006)。



本實驗使用的菌株 NTU-1，其所屬菌屬 *Rhodococcus* 因為細胞表面含有 40% 的 mycolic acids，使其細胞膜具有很高的疏水性而具有良好的聚集能力。細胞的疏水性是改變微生物聚集現象的原因之一。但疏水性質會受到碳源種類、細胞生長階段等因素影響 (Olofsson et al., 1998)。Iwabuchi 等學者測試 53 株不同名稱的 *Rhodococcus* 菌種發現，包含 *R. erythropolis* 在內的 34 個菌株會在培養過程中發生細胞聚集現象，形成結塊並沉到培養基底部 (Iwabuchi et al., 2003)。也有相關的研究成果指出，表面為疏水性的菌株 *R. erythropolis* S+14He，其在利用正十六烷的過程中，細胞會聚集形成結塊並懸浮在培養基的表面上 (Kim et al., 2002)。此一結塊並懸浮在培養基表面的現象，也在以正十六烷為唯一碳源培養 NTU-1 當中可以觀察到。

在前面的文獻回顧中已有提到，*R. erythropolis* 菌屬能分泌出生物絮凝劑，在培養環境中發生絮凝作用。舉例而言，Takeda 等學者利用從自然界分離出的 *R. erythropolis* S-1 菌株，在以葡萄糖為碳源的條件下能產生蛋白質類的絮凝劑 NOC-1 (Takeda et al., 1991)。其他能生產絮凝劑的菌株還有 *Paecilomyces* (Takagi & Kadowaki, 1985)、*Klebsiella pneumonia* (Nakata & Kurane, 1999)、*Citrobacter* (Fujita et al., 2000)、*Bacillus mucilaginosus* (Deng et al., 2003) 等。

影響細胞聚集現象的因素有很多，對於 NTU-1 而言除了細胞表面疏水性外也還有其他的條件會影響細胞的聚集。本實驗室過去曾研究 NTU-1 以正十六烷培養，培養基在不同酸鹼值時，表面電位的變化。實驗發現 NTU-1 pH 由 7 降到 2 時，細胞表面的電位會由 -27 mV 上升至 -4 mV 左右，而正十六烷隨著酸鹼值由 7 降至 2 時，表面電位會從 -30 mV 升到 10 mV 左右 (梁茂實, 2007; Liu & Liu,

2010)。這個結果代表著不同酸鹼值所造成的培養基離子強度變化會影響 NTU-1 及正十六烷表面的帶電量。若表面帶電量絕對值變小的話，會加強油滴與細胞之間的吸附作用，有利於油滴與細胞間的接觸 (Gong et al., 2003; Ly et al., 2006)。所以當細胞表面電位值降低或是疏水性增加時，此兩項因素的改變會使得微生物對於碳氫化合物有較高的吸附能力並較易形成細胞聚集現象 (Bowen et al., 2001; Hua et al., 2003)。舉例來說，Malik 等學者篩選出的 *A. johnsoni* S35 菌株，其表面具有相當高的疏水性及低表面電位，因而對於許多不形成聚集的菌株有很好的共聚集效果 (Malik et al., 2003)。

## 2.7 土壤清洗在土壤復育中的應用

開採石油與煉油的過程中發生的石油外洩意外，往往造成外洩地點附近土壤非常嚴重的污染。被原油污染的土壤(crude oil contaminated soils, COCSs)會對生態環境與人類健康造成危害 (Li et al., 2008)。其危害主要來自於碳氫化合物本身的毒性、致癌性與會經由食物鏈在各食物階層中累積 (Callier et al., 2002)。土壤中的碳氫化合物主要會吸附在土壤中的有機質上，或以非水溶液態液體(non-aqueous phase liquid)存在 (Pignatello, 1998)。如何在有效移除土壤中碳氫化合物的前提下，同時不破壞環境，是復育污染土壤最主要的挑戰。

以目前的發展來看，復育石油污染土壤的主要方式都各有其缺點。例如，熱處理技術(thermal treatments)的高成本、生物降解技術(biodegradation processes)耗費時間長、抽水處理法(pump and treat)的低成效 (Roudier, 2005)。而近幾年，添加萃取劑(extracting agents)以改善土壤清洗法(soil washing)或土壤淋洗法(soil flushing)程序的相關研究則有具前景的結果。添加萃取劑主要用於提升土壤中污

染物的溶解度、污染物的脫附程度 (Mulligan et al., 2001)。另外，藉由添加萃取劑於清洗土壤的水中，能將原本在土壤中的碳氫化合物轉移至液相，所以也有助於提升生物降解的效率 (Wang et al., 2013)。以下說明土壤清洗法與土壤淋洗法。

#### (1) 土壤清洗：

是一種離地復育土壤的方法，所以污染土壤在復育之前，須先被挖掘移置復育場地。主要以水作為清洗的溶液，一般而言土壤清洗法操作時，土壤重量比上液體體積的比例從 1 g/ml 至 0.01 g/ml 不等 (Mousset et al., 2014)，當中以 0.05 g/ml 至 0.4 g/ml 為最常見的操作範圍。土壤清洗法主要透過兩種方式移除土壤中的污染物，(1) 將污染物溶解於水中或使污染物懸浮於水面。(2) 透過粒徑大小分離、重力分離等方式將污染物濃縮在體積較小的土壤中。

利用土壤清洗復育石油碳氫化合物污染的土壤已被廣泛研究 (Deshpande et al., 1999; Chang et al., 2000; Vreysen and Maes, 2005; Santa Anna et al., 2007)。而在土壤清洗法中添加萃取劑是為了改善碳氫化合物的脫附效果 (Yang et al., 2006)，也提高碳氫化合物於水中的溶解度，所以添加萃取劑於土壤清洗程序中，比只利用水來清洗土壤節省操作的時間。但早先研究多半會添加合成界面活性劑，合成界面活性劑本身的毒性與不易被生物所分解的特性，使得添加合成界面活性劑以復育土壤的技術會有造成土壤二次污染的可能性。因此，具有低毒性且能被生物所分解的界面活性劑變成為主要的研究方向 (Mulligan et al., 2001)。

## (2) 土壤淋洗：

土壤淋洗法是一種現地復育土壤的方法，利用水或其他適合的溶液將污染物從土壤中萃取出來。於污染現場的一端將溶液注射入污染土壤中，並於另一端回收溶液。添加萃取劑於土壤淋洗法中主要是為了藉由降低油水界面的表面張力，改善碳氫化合物的在土壤中的流動性 (Mulligan et al., 2001)。如此便能更容易地透過淋洗法移除土壤中的碳氫化合物達到復育的目的。但土壤淋洗法有其使用上的限制，主要適用於輕度的碳氫化合物污染，會受到土壤多相性(heterogeneity)、碳氫化合物性質等的影響 (Atteia et al., 2013)。土壤淋洗法現地處理的特性，使其不需先挖掘污染土壤，能降低干擾污染場址環境的程度並減少操作人員接觸碳氫污染物的機會 (Villaverde et al., 2005)。

無論是土壤清洗法或是土壤淋洗法，都透過添加萃取劑來改善復育土壤的效果。萃取劑包含合成界面活性劑、生物界面活性劑、環糊精(cyclodextrins)、助溶劑(cosolvents)等 (Mulligan et al., 2001; Mao et al., 2015)。由於界面活性劑為兩性分子，所以添加界面活性劑能有效提升對污染土壤的清洗的效果，其從污染土壤中移除石油碳氫化合物的過程主要可以分為兩個機制：(1) 藉由降低油水介面的張力使得碳氫化合物變為較小的油滴。(2) 界面活性劑分子的疏水端將小油低包覆形成微胞 (Mulligan et al., 2001)。合成界面活性劑能夠顯著提高土壤復育的效果 (Mulligan et al., 2001)，但合成界面活性劑往往不易被生物分解，容易殘留並吸附在被復育的土壤中，反而會造成土壤的二次污染 (Laha et al., 2009)。反之，生物界面活性劑則具有能被生物降解、低毒性、可在污染現地製造並用於現地復育中、成本低的優點 (Von Lau et al., 2014; Bustamante et al., 2012)。微生物如 *Rhodococcus* 和 *Pseudomonas* 菌屬因為具有產生生物界面活性劑的能力，而被用

於研究石油污染土壤的復育 (Kuyukina et al., 2005; Santa Anna et al., 2007)。另外，也有從再生能源如脂肪醇與糖類中所製造的界面活性劑，舉例來說，烷基聚葡萄糖苷(alkyl polyglucosides)及為此種非離子界面活性劑 (Fukuda et al., 1993)。由於烷基聚葡萄糖苷具有低毒性、與可被生物分解的特性 (Park et al., 2007)，在二十一世紀初已被廣泛研究並利用 (Weerawardena et al., 2000; Mehling et al., 2007)。雖然對環境而言，具備低毒性且能被生物所分解特性的界面活性劑比一般有機溶劑更適合用於復育污染土壤，但在實際復育土壤的過程中，如何根據污染物的種類與污染場址的環境條件，選擇適當的界面活性劑以達到復育土壤的目的，比界面活性劑本身所具有對環境友善的特性更來得重要 (Deshpande et al., 1999)。

土壤中的碳氫化合物透過清洗法或淋洗法移除後，溶液中的碳氫污染物需進一步處理。在眾多處理方法中，微生物因具有多樣的酶與降解途徑，所以生物降解法經常被用於處理碳氫化合物的環境污染問題中 (Chaudhry & Chapalamadugu, 1991)。另外，生物處理法具有低成本的優點，是最常被用來處理廢水的方法 (Lindtner et al., 2004)。但在應用生物的降解特性時，需要對特定化合物的生物降解機制有充分的了解，須考慮包含物理、化學條件與微生物在不同環境下的特性。不同微生物的不同的降解途徑會受到環境中氧氣濃度、酸鹼值、溫度等的影響 (Abramowicz, 1990; Haritash & Kaushik 2009)。



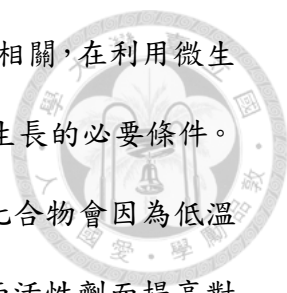
## 2.8 微生物在土壤復育中的應用

在自然環境中，土壤污染最常來自於石油碳氫化合物的污染或重金屬污染，受碳氫化合物污染的土壤，因土壤顆粒表面覆蓋了疏水性的碳氫化合物，因而使得土壤本身的含水能力下降 (Dibble & Bartha, 1979)。生物復育技術在復育被石油碳氫化合物污染的土壤中逐漸受到重視，由於土壤的種類與性質各異，能否成功應用生物復育技術處理土壤中的碳氫化合物污染源，取決於是否使用了適當具降解代謝碳氫化合物污染源的微生物，以及是否有適當的環境條件 (Aislabie et al., 2006)。*Rhodococcus erythropolis* 能夠降解污染土壤中的碳氫化合物，降解速率與細菌量呈正相關 (Koronelli, 1996)。

各種生物復育技術被應用在被石油碳氫化合物污染的土壤，這樣的土壤污染通常是因為石油碳氫化合物的意外外洩所造成 (Christofi et al., 1998)。在以生物技術處理環境復育的發展中，微生物添加(microbial augmentation)是生物復育方法中的一種 (Christofi et al., 1998)。微生物添加，是透過額外添加的微生物以達到加速降解碳氫化合物污染的方法，提供特定且適當的數量以完成生物降解的步驟。近幾年的研究成果，已可透過微生物添加的方式成功降解來自石油碳氫化合物的污染 (Kanaly et al., 2000; Lendvay et al., 2003)。以目前的研究成果可知，具有降解代謝石油碳氫化合物的微生物包含 *Rhodococcus*、*Sphingomonas*、*Pseudomonas* (Aislabie et al., 2006)。

在自然環境中，生物降解能力的活躍性是利用生物降解處理環境中石油碳氫化合物污染必須解決的問題。在研究如何增強微生物生物降解的能力時，須考量往往碳氫化合物的降解程度是來自於多種不同微生物的降解能力 (Alexander, 1999)。革蘭氏陽性菌中的*Rhodococcus* 菌屬以能夠降解烷類的性質而被廣為人知 (Finnerty, 1992)。

研究指出在受到石油碳氫化合物與重金屬污染的土壤中，高濃度的污染會抑制具生物復育能力的微生物在降解代謝碳氫化合物的表現，亦有可能由於污染區域的物理或化學條件並不適合具降解代謝污染物能力的微生物生長 (Roane et al., 2001)。藉由添加有助於微生物生長的營養添加物，往往能提升為生物降解碳氫化合物的能力 (Ivshina et al., 2001)。目前對於進行生物復育時，尋找碳源與氮源的最佳比例，以提升降解代謝土壤中的碳氫化合物的效果仍沒有一致的定論 (Morgan & Watkinson, 1989)。生物復育方法的效率與成果也受到其他因素的影響，如 (1) 污染物濃度 (2) 氧氣濃度 (3) 溫度 (4) 其他非碳氫化合物污染源的存在 (5) 土壤的含水量 (6) 微生物生長間的競爭關係等。進一步提高氮源或磷源並不一定能夠增加微生物的生物界面活性劑產量，主要原因是部分微生物分泌生物界面活性劑的最佳條件是與所需的最少氮源相關的，與環境中所提供的氮源總量無關。所以過度提供氮源或磷源並不會因此而提升降解代謝碳氫污染源的效果 (Christofi & Ivshina, 2002)。



由於微生物生物降解的能力與微生物本身的生長狀況息息相關，在利用微生物處理土壤中的碳氫化合物污染源的同時，也必須兼顧微生物生長的必要條件。若石油碳氫化合物的污染發生在環境溫度較低的土壤時，碳氫化合物會因為低溫而使得黏性增強。部分*Rhodococcus*菌株能夠透過產生生物界面活性劑而提高對烷類的生物降解效果，主要是因為生物界面活性劑能夠幫助微生物更容易接近土壤中的碳氫化合物，尤其是當土壤污染發生於較低溫的環境中時 (Whyte et al., 1999)。另外，通常伴隨碳氫化合物污染一併出現的其他分子量的低的有毒物質會因溫度較低而較不易揮發，因而阻礙了微生物生長的能力，生物降解的能力亦被限制 (Margesin & Schinner, 1999)。

### 第三章 實驗材料與方法



#### 3.1 實驗材料

##### 3.1.1 實驗菌株

本實驗所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 (簡稱 NTU-1) 由實驗室前輩(盧曉鳳, 2000)從中油桃園廠採集之生物污泥槽廢水, 經過馴養、篩選及純化後得到的一混合菌株, 命名為 TN-4 混合菌株。經食品工業研究所進行 16SrDNA 序列分析及鑑定後, 顯示 TN-4 中所含的三種菌株分別為 *Bacillus fusiformis*、*Ochrobacterum sp.* 及 *Rhodococcus erythropolis*。

TN-4 混合菌株中的 *Bacillus fusiformis*、*Ochrobacterum sp.* 並無法利用長鏈烷類為唯一碳源生長, 而 *Rhodococcus erythropolis* 則具有降解並包覆長鏈烷類能力, 因此在 TN-4 混合菌株中主導負責降解及包覆長鏈烷類的菌株為 *Rhodococcus erythropolis*, 本實驗室並將其命名為 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1(張緯農, 2003)。以下簡介菌株 *Rhodococcus erythropolis*。

*Rhodococcus erythropolis* NTU-1 為好氧、不具運動性、大小約為 2~3  $\mu\text{m}$  的革蘭氏陽性桿菌, 如照片 3.1.1-1 所示。在計數平板培養基上可以觀察到外觀, 為表面光滑且顏色為淡粉紅色的菌落。另外, 從食品所鑑定報告顯示, NTU-1 的細胞壁含有 meso-DAP 與 mycolic acids, 細胞中含半乳糖(galactose)及阿拉伯糖(arabinose)等醣類, 主要脂肪酸成分為直鏈  $\text{C}_{16:0}$  及  $\text{C}_{18:0}$ 。



圖 3.1.1-2 顯微鏡下的 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1(劉志文，2007)

### 3.1.2 實驗藥品與儀器



- Hexadecane (品號：A10322, 分析級, Alfa Aesar, U.S.A)
- Dodecane (品號：297879, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- Pristane (品號：P2870, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- NaCl (品號：12314, 試藥級, Alfa Aesar, U.S.A)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (品號：M7774, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (品號：402702, 試藥級, JT Baker, U.S.A)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (品號：104873, 試藥級, Merk, Germany)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (品號：13216, 試藥級, Riedel-de Haen, Germany)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (品號：35392, 試藥級, Riedel-de Haen, Germany)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (品號：12354, 試藥級, Riedel-de Haen, Germany)
- Agar Powder (品號：05038, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- Nutrient Agar (品號：70116, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- Nutrient Broth (品號：03856, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- Ethyl Acetate (品號：443506, 試藥級, Sigma-Aldrich, U.S.A)
- 滅菌斧 (TM-327, Tomin)
- 無菌操作台 (海天)
- 酸鹼測定儀 (CyberScan pH 510, Thermo Scientific)
- 分光光度計 (GENESYS 10S UV-Vis, Thermo Scientific)
- 迴旋式恆溫震盪培養箱 (LM-600R, 裕德)
- 冷凍離心機 (Hettich Universal 320R, Hettich)
- 烘箱 (OV30, 宇田企業有限公司)
- 濾紙 (ADVANTEC GF-75)



- 氣相層析儀 (SRI 310C, 宏睿科技有限公司)
- 土壤 (培養土, 花易購股份有限公司)  
培養土介質為壤土、椰土、椰纖、碳化稻殼
- 氮氣 (普通級, 純度: 99%, 谷芳氣體)
- 氫氣 (普通級, 純度: 99%, 谷芳氣體)
- 空氣 (普通級, 純度: 99%, 谷芳氣體)

## 3.2 培養基組成與配製

### 3.2.1 液態礦物培養基

微生物培養實驗中，液態礦物培養基(mineral salt medium, MSM)用來提供微生物生長所需的碳源、氮源、無機性養分及去離子水，表 3.2.1-1 詳列液態礦物培養基的配製條件及組成 (Kuyukina et al., 2001)。以下為各養分所扮演的角色：

#### (1) 碳源(carbon source)

碳源在微生物培養中主要提供細胞形成碳水化合物、脂質、蛋白質或是成為代謝產物的所需。本實驗以正十六烷(*n*-hexadecane)作為 NTU-1 的唯一碳源。由於 NTU-1 表面具有疏水性，能在降解代謝正十六烷的過程中產生聚集現象，所以不僅可利用代謝移除烷類，更可透過包覆移除剩餘的烷類，提升移除的效果。

#### (2) 氮源(nitrogen source)

氮源也是微生物生長的必要營養源之一，主要用於細胞合成蛋白質及核酸，另外亦會成為代謝產物。氮源分為有機氮化物或無機氮化物，本實驗以無機氮化物硫酸銨( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )來作為微生物生長所需氮源。

### (3) 無機性養分

微生物生長除了需要氮源與碳源外，也需要無機性養分包含了硫、磷、鉀、鎂、鈣、鐵、鈉、氯…等元素，用作微生物生長及作為酵素輔助因子。本實驗使用的液態礦物培養基中，無機性養分來源主要包含氯化鈉(NaCl)、硫酸鎂( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )及磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )等鹽類。其中，NaCl 還具有調節培養基的滲透壓，維持微生物良好的生長環境。 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  除了提供細胞生長所需磷、鉀來源外，也能提供礦物培養基的緩衝能力，避免微生物降解碳氫化合物時產生的代謝物造成酸鹼值劇烈變化而影響微生物的生長。

除了以上介紹的幾種無機性養分以外，培養基中也添加了微量元素，作為酵素的輔助因子。本實驗添加的三種微量元素分別為硫酸鐵( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、氯化錳( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )及硫酸鋅( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )，其配製組成如表 3.2.1-2 所示。

液態礦物培養基配置方法依序如下：

- (1) 秤取表 3.2.1-1 所列之化合物加入 1 L 的去離子水中，並加入表 3.2.1-2 所配製好的 trace salt 溶液 1 ml，均勻攪拌溶解。
- (2) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液(HCl)或 1 N 氫氧化鈉溶液(NaOH)調整培養基至酸鹼值為 7。



表 3.2.1-1 Mineral Salt Medium 組成表

| 藥品種類  | 濃度       |
|---|----------|
| NaCl  | 1.0 g/L  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 1.0 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.2 g/L  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.0 g/L  |
| Trace salt solution                             | 1.0 ml/L |



表 3.2.1-2 Trace Salt Solution 組成表

| 藥品種類                                 | 濃度      |
|--------------------------------------|---------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 1.0 g/L |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 1.0 g/L |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 1.0 g/L |

### 3.2.2 菌株保存培養基

本實驗以異十九烷作為固態菌株保存培養基的碳源，以維持 NTU-1 分解碳氫化合物的能力(張緯農，2003)。異十九烷固態保存培養基的組成如表 3.2.2-1 所示，配製方法如下：

- (1) 將表 3.2.2-1 中所示的化合物加入 1 L 去離子水後，均勻攪拌使其溶解。
- (2) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液(HCl)或 1 N 氫氧化鈉溶液(NaOH)調整培養基酸鹼值至 7，置入滅菌釜中以 121℃、15 psi 進行滅菌 20 分鐘。
- (3) 取出放入無菌操作台並加入異十九烷，搖晃使其分布均勻並分裝至直徑 8 cm 的培養皿中。
- (4) 待其冷卻並靜置約 2 小時後除去多餘霧氣水分，以 parafilm 密封，並置於 30℃培養箱中保存。

表 3.2.2-1 菌株保存培養基組成表

| 藥品名稱  | 濃度       |
|---|----------|
| Pristane  | 750 ml/L |
| Agar powder                                     | 24.0 g/L |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 1.0 g/L  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.2 g/L  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.0 g/L  |
| NaCl  | 1.0 g/L  |
| Trace salt solution                             | 1.0 ml/L |

### 3.2.3 菌株活化培養基

本實驗利用 Nutrient Broth(簡稱 NB，成分比例為 62.5%peptone 與 37.5%beef extract)營養液作為活化菌株的液態培養基(王詩雯，2014)。其配置方法依序為：

- (1) 1L 的去離子水中加入 8 g 的 NB 粉末，均勻攪拌使其溶解。
- (2) 量取 100 ml NB 菌株活化培養基，分別倒入 250 ml 的錐形瓶，置入高壓滅菌釜中以 121℃、15 psi 進行滅菌 20 分鐘。
- (3) 待其冷卻降溫後，置入無菌操作台進行菌株活化實驗。

### 3.2.4 計數平板培養基

本實驗使用的計數平板培養基成分為 Nutrient Agar (簡稱為 NA)(王詩雯，2014)，配製條件如下：

- (1) 於每 1 L 去離子水中加入 20 g 的 NA 粉末，攪拌溶解後置入滅菌釜以 121℃、15 psi 進行滅菌 20 分鐘。
- (2) 取出置入無菌操作台，在 NA 溶液因降溫而凝固前，分裝至直徑 8 cm 的培養皿中。
- (3) 靜置約 30 分鐘冷卻並除去多餘霧氣水分，接著以 parafilm 密封。
- (4) 接著將其放入 30℃培養箱中，經過 2 天後若沒有長出其他微生物的菌落，代表沒有被污染，即可保存或使用。

### 3.3 實驗方法

#### 3.3.1 菌株的活化及生長曲線

- (1) 取出存放於 4℃ 冰箱中的固態菌株保存培養基放入無菌操作台，利用以酒精燈消毒的白金接種環取出固態培養基上的 NTU-1 菌落，接種至 3.2.3 節中配置好的 NB 營養液中，NB 營養液體積為 100 ml。
- (2) 將接種好的 NB 營養液瓶口以酒精燈消毒，並塞上透氣塞，置放於 30℃ 迴旋式恆溫培養箱下培養，轉速為 100 rpm。
- (3) 開始培養後，每 1 個小時取出 2 ml 測量 OD<sub>600nm</sub> 值，以無菌的 NB 培養液作為對照組，將測得的 OD<sub>600nm</sub> 值相減後對培養時間作圖，此圖及為 NTU-1 的生長曲線圖，如圖 3.3.1-1 所示。

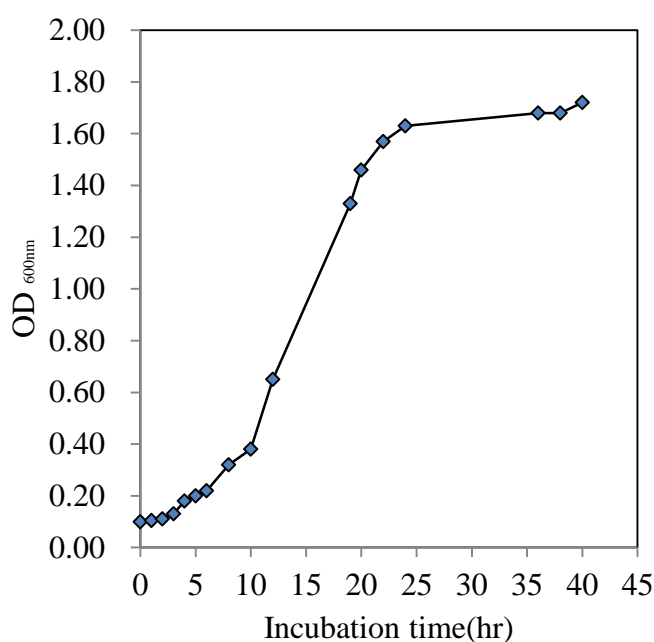


圖 3.3.1-1 NTU-1 菌株在 Nutrient Broth(NB)營養液中的生長曲線。

### 3.3.2 礦物培養基菌液製作

#### 礦物培養基菌液

- (1) 以白金接種環取出菌株保存培養基上的 NTU-1 菌落，接種至 NB 營養液中，在 30°C、100 rpm 的條件下進行活化培養。經過 24 小時，菌株生長至穩定期初期後停止培養。
  - (2) 將活化菌株後的 NB 培養液以 15°C、7000 rpm 的條件下離心 10 分鐘，之後在無菌操作台內移除離心後的上清液。
  - (3) 此時再加入相同體積滅菌過的液態礦物培養基，充分搖晃使底部細胞均勻散佈於溶液中，達到清洗的目的。接著以同樣條件離心 10 分鐘，離心完成後於無菌操作台移除上層礦物培養基。
  - (4) 最後在濃縮的 NTU-1 細胞中加入適量的無菌礦物培養基，充分搖晃使其均勻散佈，測量 OD<sub>600nm</sub> 吸收值，將 OD<sub>600nm</sub> 值控制在 1 左右即完成 NTU-1 液態礦物培養基菌液，此時 NTU-1 初始細胞密度約 0.035 g/L(劉志文，2007)。
- 本研究中即以此作為正十六烷生物復育實驗中的植菌來源。



### 3.3.3 正十六烷污染土壤的製備

#### 實驗前的土壤預清洗

- (1) 分別利用 8、20、50 mesh 的篩網區分土壤的粒徑大小，留下粒徑大小為 20/50 mesh 的土壤，收集此粒徑大小的土壤 100 g 並置於 50 mesh 的篩網上。
- (2) 接著以流速為 100 ml/s 的自來水沖洗篩網上的土壤 10 分鐘，沖洗完畢後將盛放土壤的篩網與土壤一併放入烘箱中，以 80°C 烘乾 24 小時。
- (3) 將烘乾 24 小時後的土壤取出，以土壤重量對去離子水體積為 50 g/500 ml 的比例將土壤與去離子水置於 1 公升燒杯內，以玻璃棒批次攪拌 5 分鐘，攪拌完後以 50 mesh 篩網分離土壤與去離子水，將盛放土壤的篩網與土壤一併放入烘箱以 80°C 烘乾 24 小時。
- (4) 取出烘乾後的土壤統一收集在乾淨的 500 ml 燒杯中，以便後續實驗使用。

#### 土壤的污染步驟

- (1) 秤取 0.5 g 預清洗過的土壤置於 250 ml 燒杯中。
- (2) 每一個裝有 0.5 g 土壤的燒杯均搭配一個 250 ml 乾淨燒杯，兩個燒杯為一組，以鋁箔紙封住杯口後，置入高壓滅菌釜中以 121°C、15 psi 進行滅菌 20 分鐘。
- (3) 待其冷卻降溫後，置入無菌操作台操作土壤污染的步驟。
- (4) 將 2 ml 正十六烷加入 0.5 g 土壤中並以刮勺適當攪拌，土壤因接觸到正十六烷而顏色變深，可以此判定土壤是否有接觸到正十六烷。
- (5) 利用以酒精消毒過的刮勺將燒杯中被污染的土壤刮取至另一個乾淨的 250 ml 燒杯中，以進行後續土壤清洗的步驟。

### 3.3.4 清洗正十六烷污染的土壤

#### 3.3.4.1 以液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 將底部加裝 60 mesh 篩網的玻璃過濾器、漏斗、100 ml 量筒的口均以鋁箔紙封住，並連同 1 L 酸鹼值為 7 的培養基與有裝透氣塞的 250 ml 錐形瓶一併置入高壓滅菌釜中以 121°C、15 psi 滅菌 20 分鐘。
- (2) 待其冷卻降溫後，置入無菌操作台操作清洗污染土壤的步驟。
- (3) 量取 100 ml 液態礦物培養基倒入裝有污染土壤的 250 ml 燒杯中以玻棒批次攪拌清洗土壤，攪拌清洗時間為 10 秒。
- (4) 攪拌清洗後利用底部加裝 60 mesh 篩網的玻璃過濾器過濾，清洗過的土壤會留在 60 mesh 的篩網上，培養基則是利用漏斗收集在 250 ml 錐形瓶中。
- (5) 以刻度吸管將 30 ml 乙酸乙脂加入裝有培養基的錐形瓶中，接著用不透氣矽膠塞將瓶口塞住並以 parafilm 密封後，均勻的搖晃以混合水相及有機相，接著放入 30°C 的培養箱中靜置萃取培養基中的正十六烷，約 20 分鐘後取出上層有機相溶液 2 ml 放入微量試管中保存。
- (6) 將玻璃過濾器篩網上的土壤以刮勺刮取至 250 ml 錐形瓶中，以刻度吸量管將 30 ml 乙酸乙脂加入錐形瓶中，接著用不透氣矽膠塞將瓶口塞住並以 parafilm 密封後，均勻的搖晃使土壤與有機相充分接觸，並以上述步驟(5)同樣的方式取樣並保存。



#### 3.3.4.2 以未使用的液態礦物培養基重複清洗污染土壤

- (1) 重複實驗方法 3.3.4.1 以液態礦物培養基清洗污染土壤步驟(1)到(4)，重複以未使用的 100 ml 培養基清洗同一批污染土壤 10 次，並保存每一次清洗後的培養基。
- (2) 重複實驗方法 3.3.4.1 以液態礦物培養基清洗污染土壤步驟(5)、(6)，萃取培養基中與土壤中的正十六烷。

#### 3.3.4.3 重複使用液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(1)到(4)以製備污染土壤並清洗。
- (2) 以酒精消毒過的刮勺將 60 mesh 篩網上的土壤刮取，放回至清洗用的 250 ml 燒杯中，並將 250 ml 錐形瓶中收集的培養基重新倒回燒杯中進行重複清洗，攪拌清洗時間為 10 秒，重複次數分別為 3、5、10 次。
- (3) 利用漏斗收集清洗過同一批土壤 3、5、10 次的培養基於 250 ml 錐形瓶中，並重複實驗方法 3.3.4.1 清洗污染土壤步驟(5)。
- (4) 將玻璃過濾器篩網上被清洗過 3、5、10 次的土壤以刮勺刮取至 250 ml 錐形瓶中，並重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(6)，萃取並保存樣本。



#### 3.3.4.4 以液態礦物培養基清洗污染土壤並增加攪拌清洗時間

- (1) 重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(1)到(2)。
- (2) 量取 100 ml 液態礦物培養基倒入裝有污染土壤的 250 ml 燒杯中以玻璃棒批次攪拌清洗土壤，攪拌清洗時間增加為 30、50、100 秒。
- (3) 攪拌清洗後利用底部加裝 60 mesh 篩網的玻璃過濾器過濾，清洗過的土壤會留在 60 mesh 的篩網上，培養基則是利用漏斗收集在 250 ml 錐形瓶中。
- (4) 重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(5)、(6)以萃取並保存樣本。



#### 3.3.4.5 以不同酸鹼值的液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液或 1 N 氫氧化鈉溶液調整配置好的 1 L 液態礦物培養基酸鹼值，分別調整成酸鹼值為 3、5、7、9 以探討培養基酸鹼值對清洗效果的影響。
- (2) 分別以酸鹼值為 3、5、7、9 的培養基，重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(1)到(6)。

#### 3.3.4.6 以不同溫度液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 將實驗方法 3.3.4.1 裝有污染土壤的 250 ml 燒杯，以及 100 ml 量筒、250 ml 錐形瓶與裝有液態礦物培養基的 500 ml 血清瓶，都放置在恆溫水槽直到實驗儀器與培養基均達到實驗條件的溫度設定，恆溫水槽依實驗條件分別設定在 25、50、75℃。
- (2) 在恆溫水槽中操作實驗方法 3.3.4.1 步驟(3)、(4)以清洗污染土壤並分離土壤與培養基。
- (3) 將收集到培養基的錐形瓶移出恆溫水槽，蓋上不透氣矽膠塞待其冷卻至室溫後，操作實驗方法 3.3.4.1 步驟(5)萃取並保存樣本。
- (4) 按照實驗方法 3.3.4.1 步驟(6)萃取並保存樣本。

#### 3.3.4.7 以沸騰的液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 量取 100 ml 液態礦物培養基以 250 ml 燒杯承裝，利用加熱板加熱至沸騰，倒入裝有污染土壤的 250 ml 燒杯中以玻棒批次攪拌清洗土壤，攪拌清洗時間為 10 秒。
- (2) 攪拌清洗後利用底部加裝 60 mesh 篩網的玻璃過濾器過濾，清洗過的土壤會留在 60 mesh 的篩網上，培養基則是利用漏斗收集在 250 ml 錐形瓶中。
- (3) 將收集清洗後培養基的錐形瓶蓋上不透氣橡皮塞冷卻至室溫。
- (4) 重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(5)、(6)萃取並保存樣本。

#### 3.3.4.8 以沸騰的液態礦物培養基清洗污染土壤(沸騰取代攪拌)



- (1) 重複實驗方法 3.3.4.1 步驟(1)到(2)，接著利用刮勺將燒杯中的污染土壤刮取至乾淨的 250 ml 三角瓶中。
- (2) 量取 100 ml 培養基倒入裝有污染土壤的三角瓶中，三角瓶瓶口裝上球型冷凝管並扣上塑膠扣環，冷凝管兩端開口與循環水槽相接，循環水槽水溫設定 20°C。
- (3) 將三角瓶與冷凝裝置架於加熱板上加熱，加熱至沸騰後計時 5 分鐘，利用培養基的沸騰取代攪拌清洗中的玻棒攪拌，5 分鐘後關閉加熱並將三角瓶移離加熱板。
- (4) 利用底部加裝 60 mesh 篩網的玻璃過濾器過濾，清洗過的土壤會留在 60 mesh 的篩網上，培養基則是利用漏斗收集在 250 ml 錐形瓶中。
- (5) 將玻璃過濾器篩網上的土壤以刮勺刮取放回至三角瓶中。
- (6) 將裝有培養基的錐形瓶靜置一分鐘後，以刻度吸管吸取錐形瓶底部培養基 80 ml 並重新注入三角瓶中
- (7) 將三角瓶裝接冷凝裝置後放回加熱板上加熱，重複實驗方法 3.3.4.8 步驟(3)到(6)，重複三次後將三角瓶移離加熱板。
- (8) 將三角瓶蓋上不透氣橡皮塞冷卻至室溫，接著重複實驗方法 3.3.4.1 以液態礦物培養基清洗污染土壤步驟(5)、(6)。

#### 3.3.4.9 以不同鹽類組成的液態礦物培養基清洗污染土壤

- (1) 重新配置 1 L 液態礦物培養基並將硫酸銨濃度提升至 0.5%(w/v)。
- (2) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液或 1 N 氫氧化鈉溶液調整培養基至酸鹼值為 7。
- (3) 重複實驗方法 3.3.4.1 以液態礦物培養基清洗污染土壤步驟(1)到(6)。

#### 3.3.5 氣相層析儀之條件設定

- 型號：SRI 310C 宏睿科技有限公司
- 管柱：填充物材質 fused 100 % dimethyl polysiloxane column、管長 30 m、內直徑 0.53 mm。
- 偵測器：FID、偵測器(detector)溫度：250°C、氣體流量：空氣 150 ml/min、氮氣 25 ml/min
- 載運氣體(carrier gas)：氮氣 25 ml/min
- 爐溫(oven temperature)變化：起始溫度 80°C，停留 2 分鐘後以 30°C/min 的速率升溫至 200°C 後停留 2 分鐘。
- 積分軟體：Peak-435, 宏睿科技有限公司



### 3.3.6 正十六烷校正曲線

- (1) 以刻度吸管取 10 ml 乙酸乙脂至血清瓶中，並利用微量滴管取 20  $\mu$ l 的正十二烷(*n*-dodecane)加入血清瓶中作為內標準品。
- (2) 以刻度吸管取 10 ml 乙酸乙脂至血清瓶中，並利用微量滴管取 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100  $\mu$ l 的正十六烷各加入含 10 ml 乙酸乙脂的血清瓶中。
- (3) 從含正十二烷的乙酸乙脂與含不同濃度正十六烷的乙酸乙脂中各取 0.5ml 至微量試管中，蓋上蓋子均勻搖晃。
- (4) 以微量注射針取出 2  $\mu$ l 溶液並以氣相層析儀進行分析正十六烷的含量，將積分面積與濃度作圖可即可得到正十六烷的校正曲線，如圖 3.3.5-1。

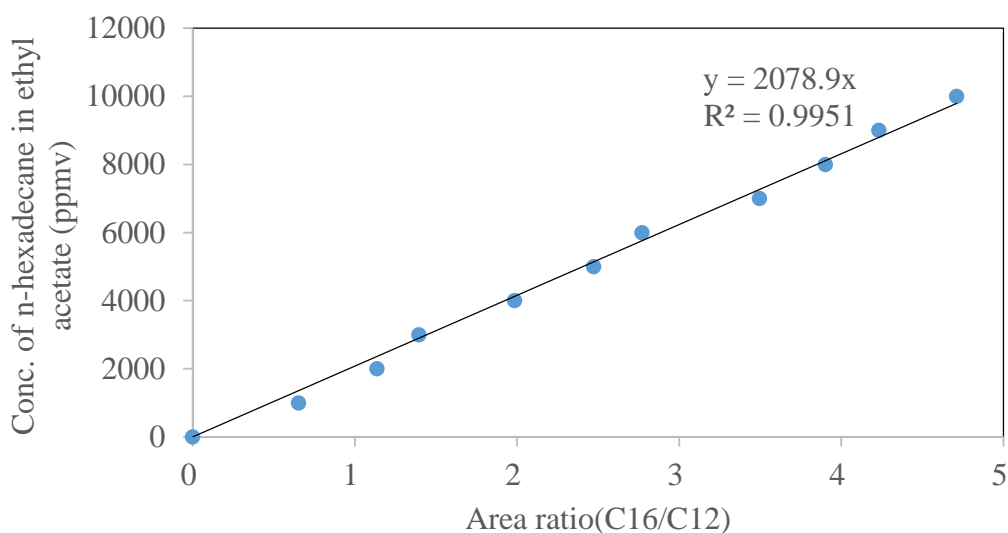


圖 3.3.5-1 正十六烷在氣相層析儀中之校正曲線

### 3.3.7 以 NTU-1 處理培養基中的正十六烷

為了提升 NTU-1 包覆正十六烷的效果，需在 250 ml 錐形瓶上加裝 10 mesh 篩網。而在 3.3.4 小節中用來收集培養基的錐形瓶因只用來萃取分析，故沒有加裝 10 mesh 篩網。接下來將詳列利用 NTU-1 處理培養基中的正十六烷，所以必須以加裝 10 mesh 篩網的錐形瓶代替沒有加裝篩網的錐形瓶，收集清洗後的培養基。

- (1) 將 10 mesh 篩網立在 250 ml 錐形瓶中，並以錐形瓶收集經過 3.3.4 小節不同清洗方式的培養基 100 ml，作為之後 NTU-1 培養之用。
- (2) 以酒精燈將錐形瓶口殺菌後，以微量滴管植入 NTU-1 液態礦物培養基菌液，初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)，此時 NTU-1 初始細胞密度約 0.035 g/L。
- (3) 完成植菌動作後同樣以酒精燈將瓶口殺菌，並以透氣塞封住瓶口。接著依不同實驗條件將培養錐形瓶放入迴旋式恆溫培養箱中，以溫度 30°C、轉速 100 rpm 的條件進行培養。
- (4) 實驗進行至 24、48、72 小時後，取出 3 瓶錐形瓶停止培養，測量培養基酸鹼值。
- (5) 若培養過程中 NTU-1 產生細胞聚集現象，則利用 60 mesh 的濾網分離菌塊與培養基，並測量培養基液體的酸鹼值。分離後的菌塊加入 100 ml 初始反應體積的去離子水。
- (6) 完成分離及酸鹼值量測後，以刻度吸管量取 30 ml 的乙酸乙酯並加入每組錐形瓶中，萃取殘餘培養基或細胞顆粒內包覆正十六烷。

- (7) 接著用不透氣矽膠塞將瓶口塞住並以 parafilm 密封後，均勻的搖晃以混合水相及有機相，接著放入 30°C 的培養箱中靜置萃取，約 20 分鐘後取出上層有機相溶液 2 ml 加入微量試管中保存。



#### 第四章 實驗結果與討論

在實驗室過去的研究成果中，利用不同的長碳鏈烷類培養 NTU-1，使用的烷類包含異十九烷、正十八烷、正十六烷、正十四烷…等。其結果顯示 NTU-1 除了對長碳鏈烷類有很好的降解能力外，還會在培養 40 至 44 個小時左右產生結塊現象，將未降解的烷類包覆(張緯農，2009)。而在錐形瓶中加入篩網可以有效增加正十六烷與 NTU-1 接觸碰撞的機會，幫助 NTU-1 移除正十六烷的效率可以達到 95% 以上，故能同時利用生物降解及物理撈除的方式在短時間內把烷類移除(謝惠敏，2011)。

本實驗延續之前的研究成果，討論如何應用土壤清洗的方式移除土壤中的正十六烷，並利用 NTU-1 生物降解與物理包覆的能力來移除培養基中的正十六烷。討論分成以下幾個部分：

- (1) 實驗前土壤的預清洗步驟。
- (2) 清洗污染土壤的步驟與步驟中的操作條件設定。
- (3) 利用 NTU-1 生物降解與物理包覆的能力移除培養基中的正十六烷。
- (4) 改變土壤清洗的步驟、培養基的物理性質與化學組成對培養基清洗效果的影響。



#### 4.1 土壤實驗前的預清洗

一般而言土壤當中的化學組成可以概分為礦物與有機質兩部分。礦物部分包含矽酸鹽類及其他組成比例較矽酸鹽低的無機鹽類。有機質部分則包含了活的生物體與死的生物體 (McCarty, 1982)。所以為了初步模擬土壤顆粒被正十六烷污染後，以培養基清洗的效果，所以先以自來水與去離子水預清洗實驗所使用的土壤，避免土壤中的水溶性物質影響清洗的效果與 NTU-1 的培養。

本實驗將實驗前對土壤的清洗步驟稱為預清洗，預清洗前先以 20 mesh 與 50 mesh 的篩網篩選土壤，取得 100 g 粒徑大小為 20/50 mesh 的土壤當作實驗對象。預清洗的步驟是將 100 g 粒徑大小為 20/50 mesh 的土壤置於 50 mesh 篩網上利用體積流速 100 ml/s 的自來水沖洗 10 分鐘，沖洗過程亦能將土壤二次過篩。沖洗後放入烘箱以 80°C 烘乾 24 小時。接著以土壤重量對去離子水體積為 50 g/500 ml 的比例攪拌 5 分鐘後，以 50 mesh 篩網分離去離子水與土壤，再將土壤放入烘箱以 80°C 烘乾 24 小時。經上述預清洗步驟的土壤才能夠作為實驗材料。而在後續討論如何移除土壤中正十六烷的實驗中，則是以批次攪拌清洗的方式清洗污染土壤，本實驗將此批次攪拌清洗污染土壤的步驟稱為土壤清洗，與對土壤實驗前的預清洗步驟的目的並不相同。

圖 4.1-1 與圖 4.1-2 都是利用清洗過污染土壤的液態礦物培養基培養 NTU-1，從兩張圖表的實驗結果可以得知土壤實驗前預清洗步驟的用途。圖 4.1-1 中的污染土壤在實驗前未經過預清洗步驟移除土壤中的水溶性物質，圖 4.1-2 中的污染土壤則有經過預清洗步驟。土壤未經過預清洗步驟的組別，NTU-1 並沒有出現物理包覆的現象，而土壤有經過預清洗步驟的組別，則可以觀察並計算出 NTU-1

對正十六烷的生物降解與物理包覆量。圖 4.1-3 與 4.1-4 則為兩組實驗在培養 NTU-1 達 72 小時後的照片。由此兩張圖可以發現，能夠在有經過預清洗土壤的組別觀察到 NTU-1 物理包覆正十六烷的現象，反觀未經過土壤預清洗的實驗組別則沒有觀察到 NTU-1 物理包覆的現象。

若以土壤重量對培養基體積為 0.5 g/100 ml 清洗未預清洗的污染土壤，再利用 60 mesh 篩網分離土壤與培養基，可測得培養基的酸鹼值約為 5.5 左右。反觀若污染土壤有經過預清洗處理，再利用 60 mesh 篩網分離土壤與培養基，培養基的酸鹼值約為 6.88 左右。此結果顯示預清洗步驟能移除土壤中的酸性水溶性物質。透過酸鹼值的測量與對 NTU-1 生物降解與物理包覆的分析結果可知本實驗所使用的預清洗程序能排除土壤中水溶性物質對 NTU-1 生長的影響。

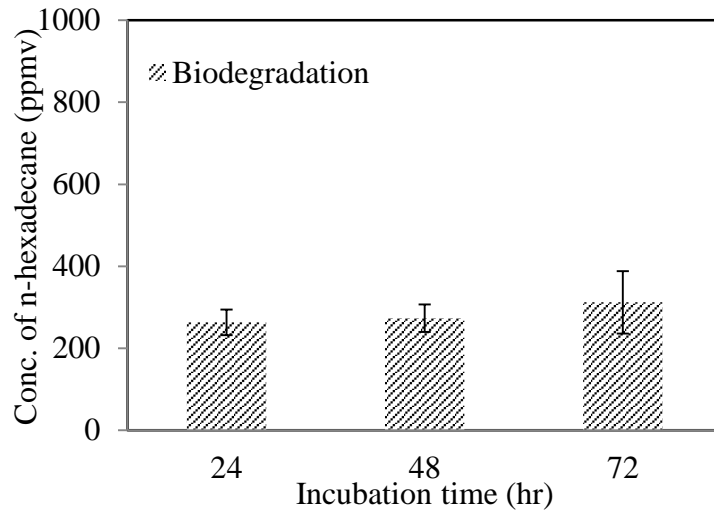


圖 4.1-1 用清洗過 0.5 g 污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤未經過預清洗程序。正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil、培養基體積：100 ml、培養基酸鹼值：5.5、初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液(OD<sub>600nm</sub> 約為 1.0)

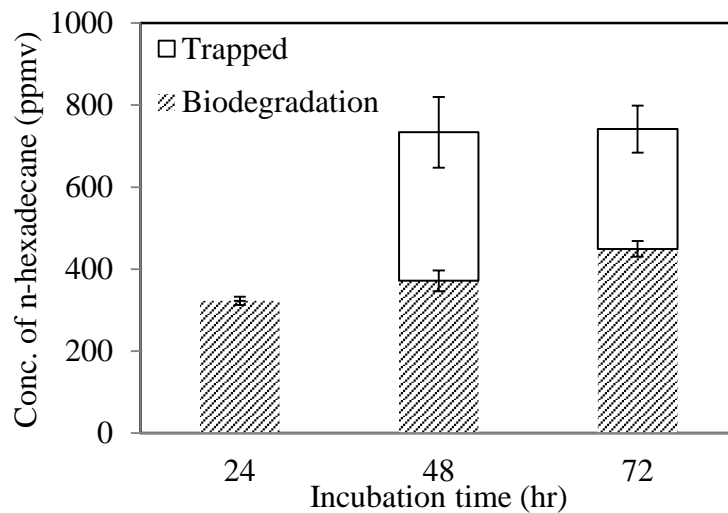


圖 4.1-2 用清洗過 0.5 g 污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤已經過預清洗程序。正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil、培養基體積：100 ml、培養基酸鹼值：6.88、初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液(OD<sub>600nm</sub> 約為 1.0)

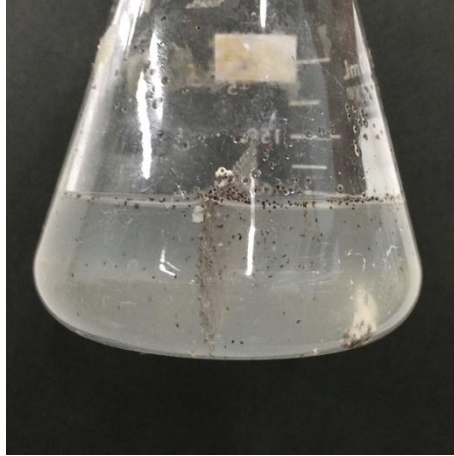


圖 4.1-3 利用清洗過污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤未經過預清洗。

經 72 小時培養時間後，拍照記錄 NTU-1 於培養基內的物理包覆現象。

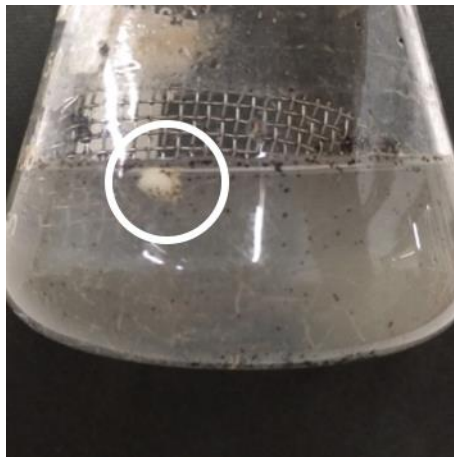


圖 4.1-4 利用清洗過污染土壤的培養基培養 NTU-1，污染土壤有經過預清洗。

經 72 小時培養時間後，拍照記錄 NTU-1 於培養基內的物理包覆現象。

## 4.2 清洗被正十六烷污染的土壤

本節實驗主要目的為設計步驟，清洗被正十六烷污染的土壤，清洗過後的溶液須能培養 NTU-1，透過 NTU-1 的生物降解與物理包覆能力移除溶液中的正十六烷。土壤清洗步驟的討論包含如何操作與步驟中的條件設定。條件設定分為土壤粒徑大小、土壤被污染程度、土壤清洗所使用的溶液與清洗方式四個部分。

### 4.2.1 篩選適合實驗的土壤的粒徑大小

由於未經篩選過的土壤粒徑大小不一，且其中除土壤外亦包含了小枯枝、細碎的落葉與小碎石。經篩網篩選後可將不屬於土壤的物質透過粒徑大小的不同予以分離。使用的篩網規格為 8 mesh、20 mesh、50 mesh，並得到兩組不同粒徑大小的土壤，其粒徑大小分別為：

- 通過 8 mesh 但無法通過 20 mesh，粒徑大小介於 0.85~2.36 mm 的土壤
- 通過 20 mesh 但無法通過 50 mesh，粒徑大小介於 0.3~0.85 mm 的土壤

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑：8/20 mesh(0.3~0.85 mm)、20/50 mesh(0.85~2.36 mm)
- 土壤重量：1.0 g
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml

各取兩組不同粒徑大小的土壤 1 g 於 250 ml 燒杯中，正十六烷添加量皆為 2 ml *n*-C16/g soil。加入正十六烷後，以刮勺攪拌土壤，土壤顆粒接觸到正十六烷後顏色會變深，可依此判定土壤是否都有接觸到正十六烷。接著以乾淨的刮勺將被污染的土壤刮取移至乾淨的 250 ml 燒杯中，準備清洗污染土壤。各以 100 ml 培養基清洗兩組污染土壤，分析培養基中正十六烷濃度的差異。本實驗所使用的土壤清洗程序是將 100 ml 培養基加入裝有污染土壤的 250 ml 燒杯中，以玻棒攪拌清洗 10 秒，接著利用 60 mesh 篩網分離土壤與培養基。從表 4.2.1-1 中可發現，100 ml 液態礦物培養基在清洗過粒徑大小為 20/50 mesh 的實驗組別後，培養基中約有 550 ppmv 左右的正十六烷。而在清洗過粒徑大小為 8/20 mesh 的實驗組別後，培養基中約有 325 ppmv 左右的正十六烷。此實驗結果的差異顯示同體積的液態礦物培養基經相同清洗程序對粒徑較大的實驗組別要較差的清洗效果。

表 4.2.1-1 利用酸鹼值為 7 的 100 ml 培養基攪拌清洗 1.0 g 土壤後，培養基中的正十六烷濃度。正十六烷添加量：2 ml *n*-C16/g soil，粒徑大小：8/20 mesh、

20/50 mesh

|                 | 20/50 mesh   | 8/20 mesh    |
|-----------------|--------------|--------------|
| 培養基正十六烷濃度(ppmv) | 556.84±82.06 | 325.61±50.88 |

#### 4.2.2 土壤的污染程度

確定實驗土壤的粒徑大小後，需要進一步確定土壤的污染程度，尋找適合的污染程度以進行後續的實驗。污染程度以不同重量的土壤接觸同體積正十六烷表示，共進行兩組不同正十六烷添加量的實驗，其添加量為如下：

- 4 ml *n*-C16/g soil、土壤粒徑 20/50 mesh、0.5 g 土壤
- 2 ml *n*-C16/g soil、土壤粒徑 20/50 mesh、1.0 g 土壤

將正十六烷添加量訂在 4 ml *n*-C16/g soil 與 2 ml *n*-C16/g soil，是因為在這兩種添加量下土壤顆粒均有接觸到正十六烷。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil、2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g、1.0 g
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml

從表 4.2.2-1 中可發現，以 100 ml 培養基經過相同土壤清洗步驟清洗不同污染程度土壤時。清洗過 4 ml *n*-C16/g soil 的實驗組，培養基中約有 800 ppmv 左右的正十六烷，清洗過 2 ml *n*-C16/g soil 的實驗組，培養基中約有 550 ppmv 左右的正十六烷。表示污染程度越低培養基的清洗效果越差。

參考過去本實驗室對 NTU-1 降解包覆正十六烷的實驗條件，在 100 ml 液態礦物培養基中添加 2000 ppmv 正十六烷做為唯一碳源，並植入 NTU-1 培養 96 小時，初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液(OD<sub>600nm</sub> 約為 1.0)，最終的生物降解量約在 400 至 500 ppmv 左右，詳細生物降解量與物理包覆量隨時間變化如圖 4.2.2-1 所示。為了之後進行 NTU-1 培養實驗時觀察其生物降解與物理包覆的表現，所以選擇培養基中正十六烷濃度較高，有約 800 ppmv 的實驗組別，將正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 當作後續實驗的操作條件。

表 4.2.2-1 利用酸鹼值為 7 的 100 ml 培養基攪拌清洗不同污染程度的土壤，液態礦物培養基中的正十六烷濃度。

|                 | 4 ml <i>n</i> -C16/g soil | 2 ml <i>n</i> -C16/g soil |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| 培養基正十六烷濃度(ppmv) | 823.16±68.53              | 556.84±82.06              |

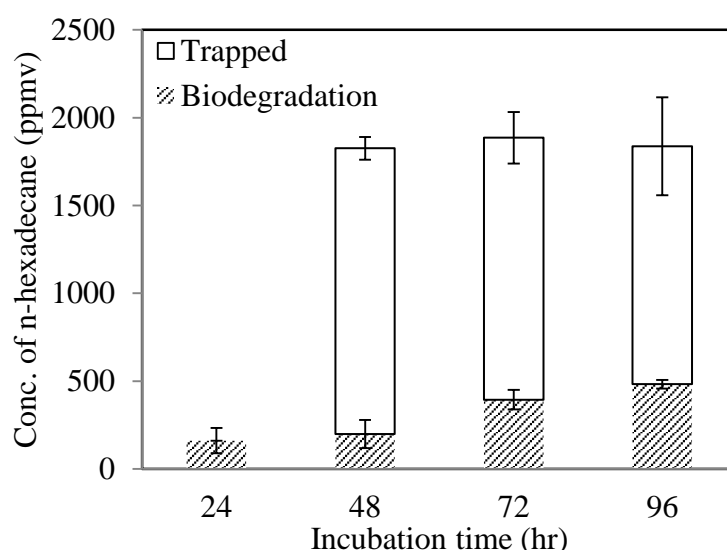



圖 4.2.2-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，NTU-1 經 96 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。





以正十六烷污染土壤的步驟是在 250 ml 燒杯中進行，將 2 ml 正十六烷加入燒杯中的土壤並以刮勺攪拌，過程中可以發現燒杯的壁面會殘留正十六烷，因為殘留在燒杯壁面的正十六烷並不被定義為污染土壤所含有的正十六烷含量，所以當直接在原燒杯中批次清洗受污染土壤，若是殘留在燒杯壁面的正十六烷被洗入培養基中，會高估培養基的清洗效果。為了進一步瞭解燒杯壁面殘留的正十六烷對實驗後續分析的影響，需要比較以下兩組不同的操作步驟。

- 在原燒杯中批次清洗污染土壤。
- 將污染土壤從原燒杯中以刮勺刮取至另一個乾淨的 250 ml 燒杯中再進行批次清洗。

表 4.2.2-2 為上述兩種清洗步驟所測得培養基中正十六烷濃度。在原燒杯批次清洗後的培養基，其正十六烷濃度較另一實驗組別高出約 4000 ppmv 左右，且同操作條件的實驗數據標準差高達 2500 ppmv 左右。表示燒杯壁面殘留的正十六烷會導致高估培養基的清洗效果，且培養基清洗效果的分析亦顯得非常不穩定。故需在實驗步驟中增加將污染土壤從原燒杯移至另一個乾淨的 250 ml 燒杯此步驟，再批次清洗土壤。經此修正後，每 100 ml 培養基清洗正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤，約含有 800 ppmv 正十六烷。

表 4.2.2-2 土壤清洗方式分別為 (1) 在原燒杯中批次清洗污染土壤 (2) 將污染土壤從原燒杯中以刮勺刮取至另一個乾淨的 250 ml 燒杯中再進行批次清洗。清洗後培養基中的正十六烷濃度。

|                 | (1)             | (2)          |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 培養基正十六烷濃度(ppmv) | 4888.49±2650.59 | 823.16±68.53 |

### 4.2.3 清洗被正十六烷污染土壤的方法

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
- 篩網規格：60 mesh

在確定實驗使用的土壤粒徑大小與土壤污染程度之後，接著探討清洗土壤所使用的溶液與清洗方法。清洗方法的設計以時間短暫以及能將清洗後溶液與土壤分開為主要方向。圖 4.2.3-1 所示的裝置是用來盛放污染土壤或分離土壤與培養基，其構造為將 60 mesh 的篩網放置在玻璃過濾器底部。

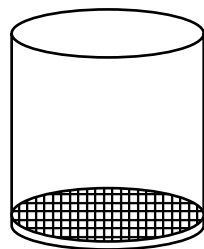


圖 4.2.3-1 玻璃過濾器底部為 60 mesh 篩網，用來盛放或過濾污染土壤。

本實驗以 100 ml 液態礦物培養基作為清洗溶液，清洗對象為粒徑大小 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤，分別討論了兩種土壤清洗方式如下：

- 將污染土壤置於如圖 4.2.3-1 裝置中 60 mesh 的篩網上，接著淋洗土壤，以同一批 100 ml 培養基重複淋洗，淋洗次數分為 5、8、10 次。
- 將 100 ml 液態礦物培養基倒入裝有污染土壤的 250 ml 燒杯中以玻棒攪拌批次清洗 10 秒，接著利用如圖 4.2.3-1 裝置過濾，分離清洗過後的培養基與土壤。

上述第一種清洗方式以 5 次為最低淋洗次數是因為土壤放置在篩網上會有一定的面積，一次淋洗無法完整淋洗到所有的土壤，需至少經過 5 次淋洗才能確保土壤有被完整淋洗過。

由圖 4.2.3-2 可發現淋洗次數的增加並不會提升培養基對土壤的清洗效果，三組不同淋洗次數的實驗結果皆顯示淋洗過後的培養基約含有 800 ppmv 左右的

正十六烷。另外也可以發現批次攪拌清洗的方式與淋洗方式的效果相似，攪拌清洗過後的培養基大約也含有 800 ppmv 左右的正十六烷。考量到後續 NTU-1 培養的實驗需在無菌操作台中進行土壤清洗，受限於無菌操作台的空間，為操作方便，故選擇以攪拌清洗的方式做為本實驗清洗污染土壤的操作步驟。

在土壤清洗所使用的溶液實驗中，分別使用了以下兩種溶液：

- 100 ml 去離子水
- 100 ml 液態礦物培養基

以攪拌清洗方式清洗污染土壤。此組實驗目的是為了瞭解液態礦物培養基與去離子水對污染土壤的清洗效果差異。因為清洗後的溶液將用於培養 NTU-1，利用 NTU-1 的降解與包覆能力移除正十六烷，若去離子水與培養基清洗污染土壤的效果相似，表示培養基中的鹽類組成與清洗效果無關，可以進一步降低液態礦物培養基中的鹽類濃度至不影響 NTU-1 生物降解與包覆的能力，便能夠作為未來此土壤清洗方法擴大應用時降低成本的一個選擇。

由表 4.2.3-1 可見液態礦物培養基比去離子水有更佳的清洗效果，同樣以粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤當作清洗對象，100 ml 培養基能清洗約 800 ppmv 左右的正十六烷，而同體積的去離子水則能清洗較少量的 500 ppmv 左右正十六烷。為了之後進行 NTU-1 培養實驗時能較容易同時觀察其生物降解與物理包覆的表現，故選擇以液態礦物培養基作為清洗污染土壤的溶液。

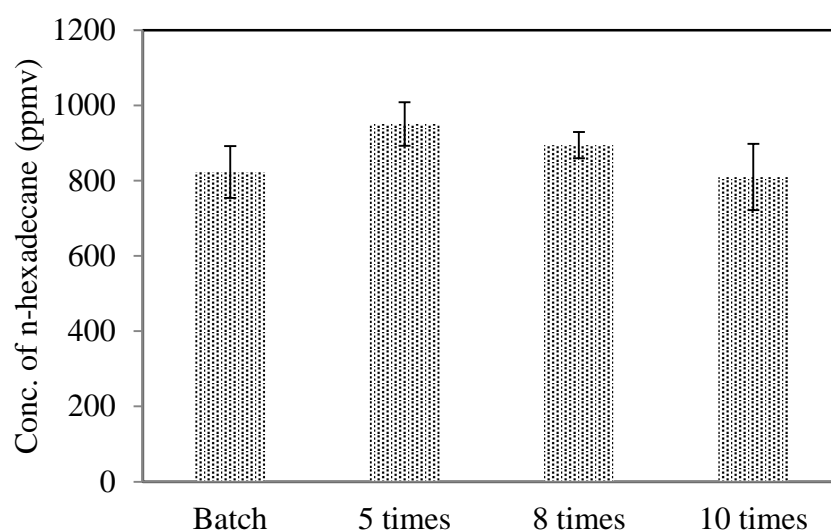


圖 4.2.3-2 利用培養基重複淋洗 5、8、10 次或以玻棒攪拌清洗 10 秒，培養基中的正十六烷濃度。清洗對象是粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤。

表 4.2.3-1 分別利用培養基與去離子水，以批次攪拌清洗粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤，溶液中的正十六烷濃度。

|                 | 100 ml 培養基   | 100 ml 去離子水  |
|-----------------|--------------|--------------|
| 溶液中正十六烷濃度(ppmv) | 823.16±68.53 | 471.91±19.57 |

### 4.3 以 NTU-1 處理培養基中的正十六烷

接著以 NTU-1 移除培養基中的正十六烷並觀察生物降解代謝與物理包覆的情形，在此之前先透過瞭解 NTU-1 在以 2000 ppmv 正十六烷為唯一碳源的培養基中的生長情形，以得知 NTU-1 降解與包覆的現象，並可依此作為實驗記錄的參考。在 100 ml 培養基中加入 2000 ppmv 的正十六烷並接種 NTU-1。

實驗條件如下：

- 培養基初始酸鹼值：7
- 培養基體積：100 ml
- 正十六烷濃度：2000 ppmv
- 初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)
- 培養方式：迴旋培養
- 培養溫度：30°C
- 培養箱轉速：100 rpm
- 分析時間點：24、48、72、96 hr

圖 4.3-1 為 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。由實驗結果可知在此培養條件下 NTU-1 的包覆現象約出現在培養開始後的第 40 至 44 小時之間，72 小時後的生物降解量約為 400 至 500 ppmv 左右，且生物降解量隨培養時間的變化程度趨緩。而由圖 4.3-2 可知培養基的酸鹼值在 72 小時後的變化趨緩，約在 4.5 左右。培養基酸鹼值隨培養時間下降是由於 NTU-1 在生物降解的過程中會產生有機酸，並在培養基當中累積  $H^+$  濃度。故隨著生物降解量的增加，液態礦物培養基的酸鹼值亦會下降。

然而過酸的環境並不利於 NTU-1 生長，所以在 72 小時之後因培養基的酸鹼值降低，限制了 NTU-1 的生長代謝，所以可以觀察到降解量的增加與酸鹼值下降量均趨緩的情形。另外，由圖 4.3-3 細胞乾重隨培養時間的變化也可以發現 NTU-1 的生長在 72 小時之後趨緩。由上述結果可知當 NTU-1 初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)，於正十六烷濃度為 2000 ppmv 的 100 ml 液態礦物培養基中主要的降解代謝情形發生於培養的 72 小時內。由於已知本實驗的土壤清洗方式，培養基的清洗效果約為 800 ppmv 正十六烷，在唯一碳源濃度較低的情況下，本小節中的實驗分析時間點設為 72 小時以前。

由 4.2 節討論結果已知每 100 ml 培養基攪拌清洗過粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤後，約含有 800 ppmv 左右的正十六烷。故設置兩組實驗以比較液態礦物培養基中的生物降解與物理包覆情形。兩組實驗的差異為培養基中正十六烷的來源。對照組實驗中，添加 800 ppmv 的正十六烷於培養基。實驗組實驗中，培養基內的正十六烷則來自於攪拌清洗粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤。



對照組實驗條件如下：

- 培養基初始酸鹼值：7
- 培養基體積：100 ml
- 正十六烷濃度：800 ppmv
- 初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)
- 培養方式：迴旋培養
- 培養溫度：30°C
- 培養箱轉速：100 rpm
- 分析時間點：24、48、72 hr

實驗組實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
- 培養基初始酸鹼值：7 (清洗土壤後 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
- 初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)
- 培養方式：迴旋培養
- 培養溫度：30°C
- 培養箱轉速：100 rpm
- 分析時間點：24、48、72 hr



將 NTU-1 分別植入對照組與實驗組的液態礦物培養基中，分析 NTU-1 於兩組實驗中對正十六烷的生物降解與包覆現象。最終分析時間點取 72 小時是因為 NTU-1 在碳源濃度更高的 2000 ppmv 正十六烷的培養條件下，72 小時之後的生物降解與細胞生長的情形趨緩，故觀察 72 小時以前，以每 24 小時為一個間隔。

圖 4.3-4 與圖 4.3-5 分別表示實驗組與對照組的 NTU-1 生物降解與物理包覆情形。結果顯示 NTU-1 於兩種實驗條件下的生物降解量大致相同，均在實驗進行的 72 小時後有 400 至 500 ppmv 左右的降解量。且經過實驗觀察兩組實驗條件下的 NTU-1 均會在實驗進行的 40 至 44 小時左右出現包覆現象。72 小時後 NTU-1 都能透過生物降解與物理包覆的方式移除培養基中約 95% 的正十六烷。

圖 4.3-6 為實驗組與對照組培養基酸鹼值的變化，可以發現雖然兩組實驗正十六烷的來源不同，但在濃度相近的條件下，有相似的酸鹼值變化，均在 72 小時後降到 4.5 至 5 之間。將圖 4.3-7 與圖 4.3-2 相比較，液態礦物培養基於 2000 ppmv 與 800 ppmv 中的酸鹼值變化量大約相等，NTU-1 於兩種條件中的生物降解量也約為 400 至 500 ppmv 左右。由於 NTU-1 於降解正十六烷的過程中，因產生有機酸而在培養基中累積的氫離子莫耳數與其降解正十六烷濃度成一次方線性關係 (Liu et al., 2012)，所以可知 NTU-1 於兩種不同濃度的正十六烷中的生長與降解能力是相當的。

所以由實驗組與對照組的對照結果可知，NTU-1 不僅能在液態礦物培養基的環境中處理 95% 左右額外添加的正十六烷，也能處理液態礦物培養基從污染土壤中清洗的正十六烷。

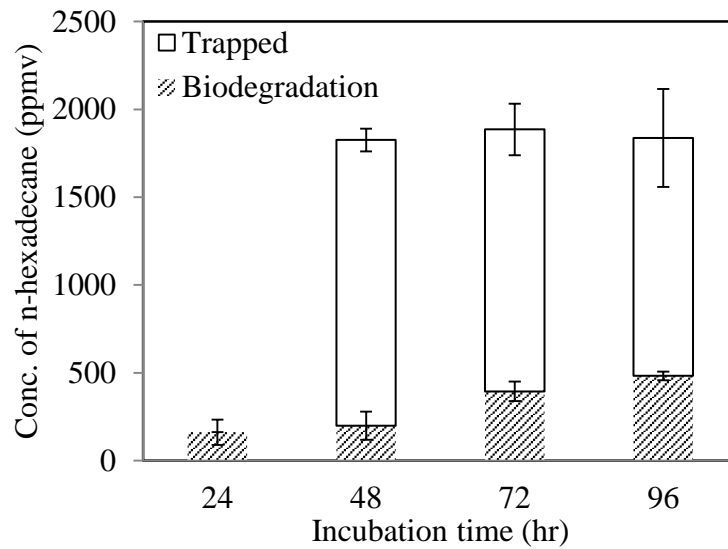


圖 4.3-1 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。

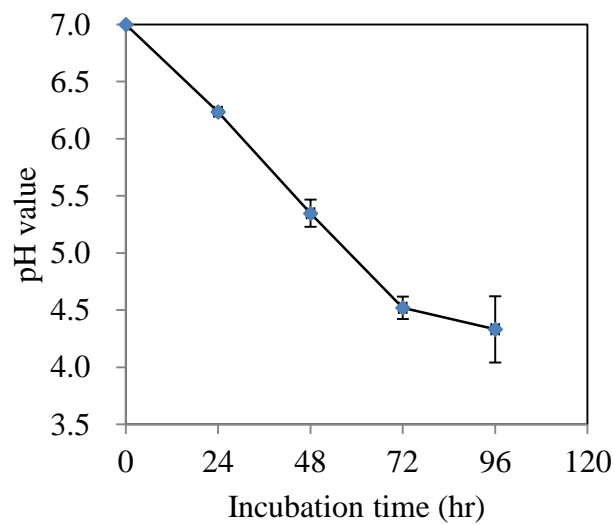


圖 4.3-2 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後酸鹼值隨時間的變化。

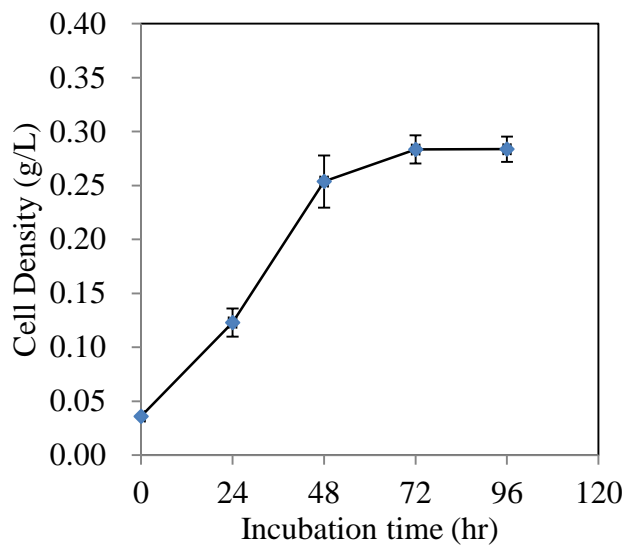


圖 4.3-3 NTU-1 以 2000 ppmv 正十六烷為碳源，經 96 小時培養後細胞乾重隨時間的變化。

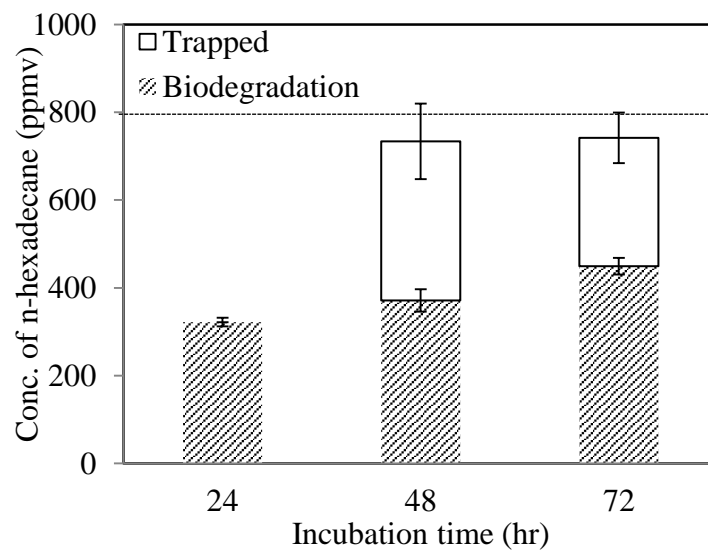


圖 4.3-4 實驗組：NTU-1 在清洗過污染土壤的培養基中經 72 小時培養，生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。虛線表示培養基初始正十六烷濃度。

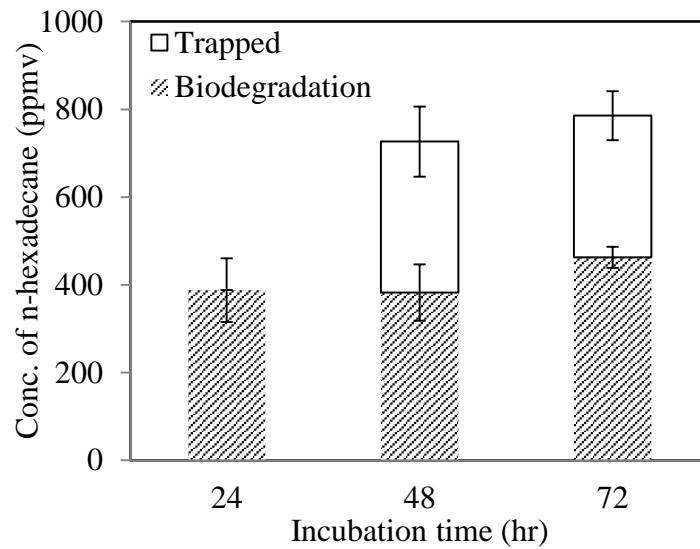


圖 4.3-5 對照組：NTU-1 以 800 ppmv 正十六烷為碳源，經 72 小時培養後生物降解量與物理包覆量隨時間的變化。

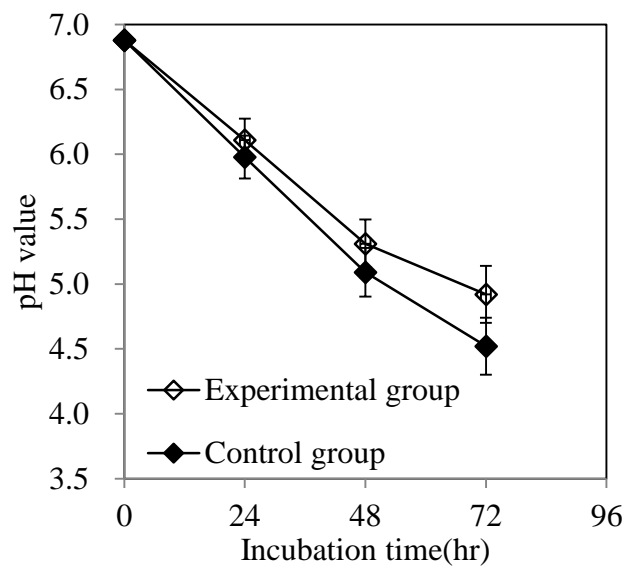


圖 4.3-6 實驗組與對照組培養基經 72 小時培養 NTU-1 後，培養基酸鹼值隨時間的變化。

#### 4.4 提升液態礦物培養基對污染土壤的清洗效果

由 4.3 節的結果可知，NTU-1 能夠利用從土壤中清洗出的正十六烷作為碳源，並利用清洗土壤所使用的培養基培養 NTU-1。但由 4.2.3 小節的結果也可以發現，每 100 ml 培養基只能從正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤中清洗出約 0.08 ml(於培養基中濃度為 800 ppmv)的正十六烷。所以本節將進一步討論如何提升液態礦物培養基清洗污染土壤的效果。在討論影響液態礦物培養基清洗效果的因素以前，須先了解土壤中正十六烷的總量、土壤中能被清洗的正十六烷含量與每 100 ml 培養基的清洗效果。接著再討論如何提升培養基清洗效果，討論的變因包含清洗的步驟、酸鹼值、溫度、額外添加的鹽類。

##### 4.4.1 正十六烷含量計算

在進一步提升培養基的清洗效果以前，須先了解污染土壤當中的正十六烷總量。分別以 30 ml 乙酸乙脂萃取未被清洗的污染土壤、被清洗一次的污染土壤、清洗一次污染土壤的培養基。經分析後可知，最初未被清洗土壤中正十六烷濃度約為 15742.96 ppmv，表示在正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤中，土壤的汙染程度約為 3.2 ml *n*-C16/g soil。液態礦物培養基中的正十六烷濃度在清洗一次污染土壤後約為 823.16 ppmv，經清洗一次後土壤中正十六烷濃度則約為 14065.71 ppmv。為了將土壤中的正十六烷含量與培養基中互相比較，所以將正十六烷含量當作在 100 ml 培養基中的濃度表示。

根據物質不滅定律，未被清洗土壤中的正十六烷應等於培養基中與土壤中剩餘正十六烷的和，但實際卻不相等，這是因為實驗操作中使用液態礦物培養基清洗，液態礦物培養基與正十六烷之間油水不互溶，所以當正十六烷被培養基移除

離開土壤中後，會在通過玻璃過濾器時殘留在玻璃壁面或篩網上，而沒有完全與培養基流入玻璃過濾器下方盛接的錐形瓶中。另外，在 4.2.3 節的實驗結果中，每 100 ml 培養基能夠清洗約 800 ppmv 左右的正十六烷，代表一次攪拌清洗能夠清除污染土壤中約 5% 的正十六烷含量。可知液態礦物培養基的清洗效果仍有許多需提升的空間。

#### 4.4.2 重複清洗污染土壤

由 4.4.1 節，乙酸乙脂萃取被清洗一次的土壤結果可知，經一次清洗後土壤中仍殘留有約初始總污染量 95% 的正十六烷。由此可見被液態礦物培養基洗去的正十六烷含量與土壤中的殘留量之間仍有很大的差距。為進一步了解經一次清洗後殘留在土壤中的正十六烷是否能夠繼續被清洗，設計實驗操作流程為重複清洗同一組 0.5 g 的污染土壤 10 次。每次取 100 ml 乾淨的培養基清洗，清洗後利用 60 mesh 篩網分離污染土壤與培養基，接著利用 30ml 乙酸乙脂萃取培養基內的正十六烷，並以刮勺將篩網上的污染土壤刮取至 250 ml 燒杯中進行下一次的清洗。計算每次清洗後液態礦物培養基中的正十六烷含量。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7（清洗土壤後為 6.88 左右）
- 培養基體積：100 ml

由圖 4.4.2-1 可以發現每次利用乾淨的培養基重複清洗同一批土壤十次的過程中，液態礦物培養基能夠不斷得從污染土壤中清洗出正十六烷，但隨著清洗次數的增加，液態礦物培養基中的正十六烷濃度下降。第一次清洗約含有 800 ppmv 左右的正十六烷，第十次清洗則約含有 400 ppmv 左右的正十六烷。由此可知污染土壤中的正十六烷仍有可被清洗的空間，但若每次只能清洗低於 5% 的污染量會需要大量體積的液態礦物培養基與清洗次數。

圖 4.4.2-2 為每次清洗後土壤中剩餘正十六烷佔未清洗前土壤中總正十六烷含量的百分比，若對土壤中剩餘正十六烷的百分比變化做一次線性回歸，並假設土壤中的正十六烷可被完全洗淨，可以計算得知，若要將土壤中的正十六烷完全移除，約需清洗 26 次，所以若未能提高液態礦物培養基的清洗效果，操作次數會太高。

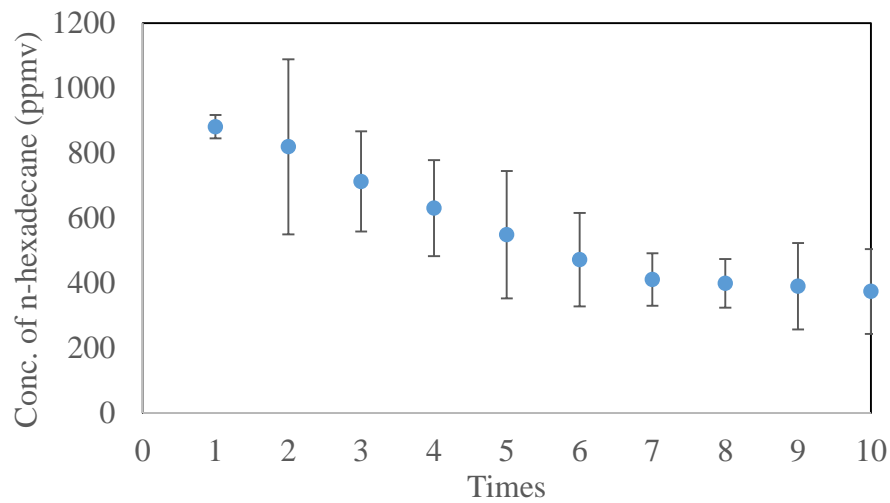


圖 4.4.2-1 每次利用乾淨的 100ml 培養基攪拌清洗污染土壤，每次清洗後液態礦物培養基中的正十六烷濃度。

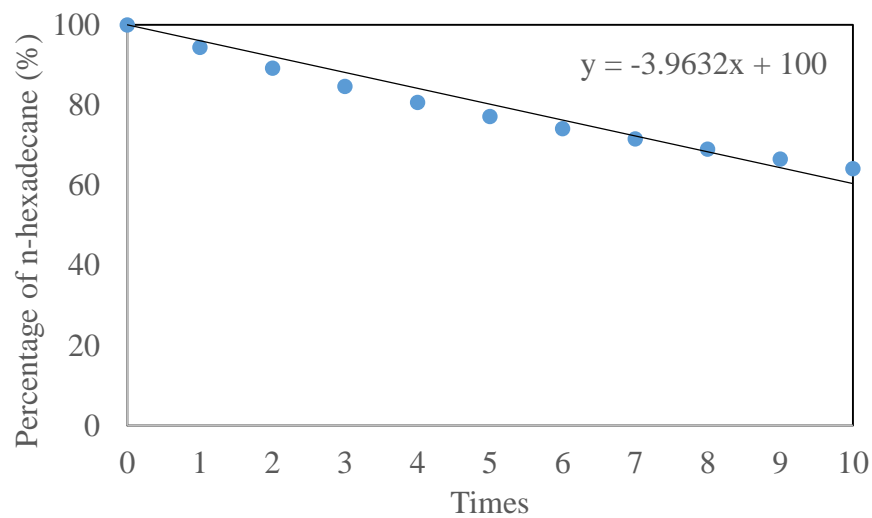


圖 4.4.2-2 每次利用乾淨的 100ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，每次清洗後，土壤中剩餘正十六烷佔清洗前總正十六烷含量的百分比變化。



#### 4.4.3 重複使用液態礦物培養基清洗污染土壤

由 4.4.2 的討論可知污染土壤中仍有許多可以被清洗的正十六烷，為了進一步了解培養基是否最多只能清洗 800 ppmv 左右的正十六烷，將清洗過污染土壤的液態礦物培養基再利用，清洗同一批粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤，且每次清洗均為批次攪拌清洗 10 秒。分析培養基中的正十六烷濃度與重複使用次數的關係。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7（清洗土壤後為 6.88 左右）
- 培養基體積：100 ml
- 液態礦物培養基重複使用次數：1、3、5、10 次

由圖 4.4.3-1 可知經一次清洗後的培養基約有 800 ppmv 左右的正十六烷，約佔土壤中總正十六烷的 5%。隨著培養基的重複使用次數增加，培養基中的正十六烷濃度會提高，重複 3 與 5 次的實驗組別約含有 1000 ppmv 左右，約佔土壤總含量的 6%，重複 10 次的實驗組別約含有 1700 ppmv 左右，約佔土壤總含量的 10%。隨重複使用的次數增加，培養基接觸污染土壤的時間也增加，也增加了與土壤顆粒碰撞的次數，故能移除土壤中更多的正十六烷。但即便重複清洗 10 次

有最高的清洗效果，仍只能清洗土壤中總正十六烷的 10%，是一個操作步驟多但效果並不顯著的方法。



重複使用培養基清洗土壤，也代表增加培養基與土壤的接觸時間，為比較重複使用培養基與增加攪拌清洗時間兩方法的差異，所以進行增加土壤與培養基攪拌清洗時間的實驗。為了與重複使用培養基次數 3、5、10 次的實驗數據互相比較，所以選擇增加攪拌清洗時間為本來 10 秒的 3、5、10 倍。

由圖 4.4.3-2 可以發現，增加土壤與培養基的攪拌清洗時間也能提高培養基所能移除的正十六烷含量，最長的攪拌時間 100 秒能夠清洗約 1270 ppmv 的正十六烷，但清洗能力仍比不上重複使用培養基，所以即便土壤與培養基接觸時間相同，操作手法上的差異仍會影響培養基的清洗效果。

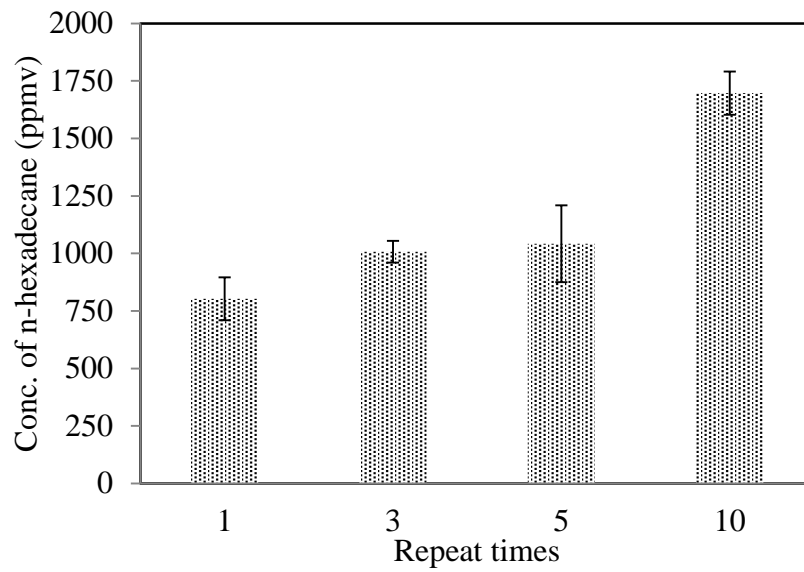


圖 4.4.3-1 重複使用 100 ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度隨重複使用次數的變化。

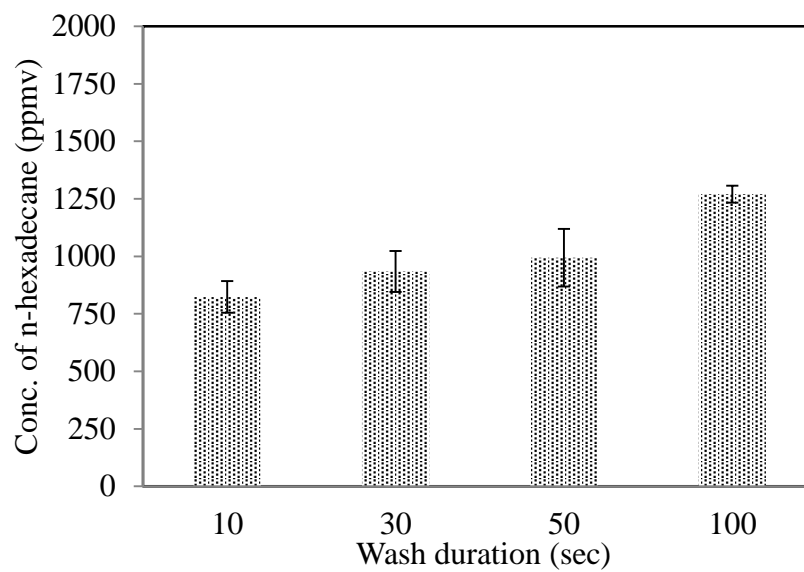


圖 4.4.3-2 增加 100 ml 液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤的時間，培養基中正十六烷濃度隨攪拌時間的變化。

#### 4.4.4 重複使用底部液態礦物培養基清洗污染土壤

由 4.4.2 與 4.4.3 節的討論可知土壤中的正十六烷可以不斷被清洗，增加液態礦物培養基與污染土壤之間的清洗次數可以提升清洗正十六烷的量。根據上述兩點，本節實驗進一步提出改善後的清洗方式以提升培養基的清洗效果。因油水不互溶的物理性質，利用正十六烷會與培養基分層並位於培養基之上的特性，將每次清洗後的培養基靜置 1 分鐘，接著利用刻度吸管吸取底部 60 ml 培養基，此目的是為了回收底部乾淨不含正十六烷的培養基，利用 60 ml 回收的培養基重複清洗污染土壤，共回收清洗 2 次。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
- 液態礦物培養基回收使用體積：60 ml
- 液態礦物培養基回收使用次數：2 次
- 每次清洗後培養基的靜置時間：1 分鐘

由表 4.4.4-1 可知，重複利用底部 60 ml 培養基兩次的組別約能清洗 1350 ppmv 的正十六烷，約能清洗總正十六烷含量的 8.5%。若與 4.4.2 小節的方法互

相比較，每次以乾淨的 100 ml 培養基清洗土壤，欲達到此正十六烷清洗效果需用到體積兩倍的液態礦物培養基。



表 4.4.4-1 利用培養基清洗污染土壤，培養基中的正十六烷濃度。清洗方式分為 (a) 1 次攪拌清洗 (b) 1 次攪拌清洗後，回收底部 60 ml 培養基重複清洗土壤，重複操作 2 次。

|                 | (a)          | (b)            |
|-----------------|--------------|----------------|
| 培養基正十六烷濃度(ppmv) | 823.16±68.53 | 1351.53±162.28 |
| 佔總正十六烷含量百分比(%)  | 5.23         | 8.58           |

#### 4.4.5 酸鹼值對液態礦物培養基清洗效果的影響

4.4 節前段透過改變清洗方式討論培養基清洗效果的變化，接下來透過改變培養基的物理與化學性質，討論培養基清洗效果的變化。本小節討論重點為培養基的物理性質，並不改變清洗的操作方法，攪拌清洗時間 10 秒並清洗一次。本小節討論改變培養基酸鹼值對培養基清洗效果的影響，酸鹼值改變的範圍是 3 至 9。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：3、5、7、9
- 培養基體積：100 ml



由於 NTU-1 適合生長的環境是酸鹼值 4.5 至 7 之間，但因為本實驗將清洗土壤與 NTU-1 培養分開操作，故可以嘗試利用不利 NTU-1 生長的條件清洗污染土壤，若能有效提升清洗效果，可以再調整回適合培養 NTU-1 的生長條件。

由圖 4.4.5-1 可以發現，培養基酸鹼值的改變對其清洗效果並沒有顯著的影響，不同酸鹼值條件下所清洗的正十六烷濃度，差距約在 100 ppmv 左右。

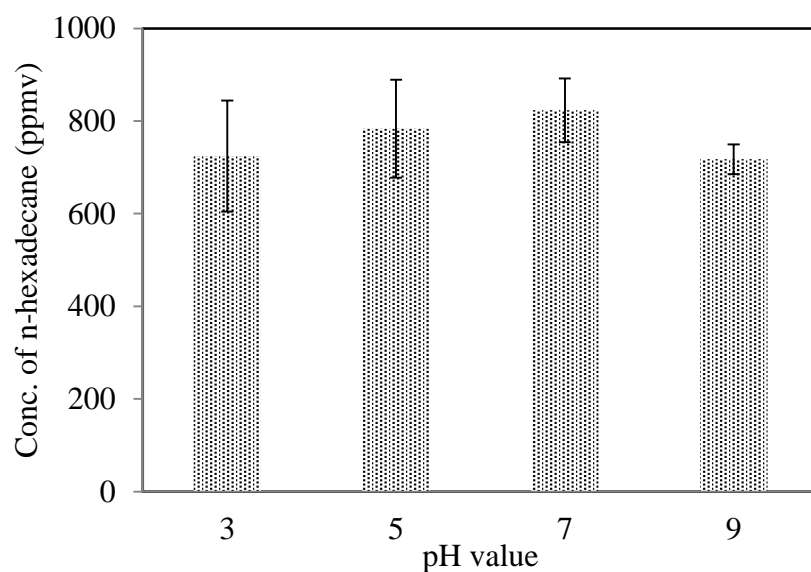


圖 4.4.5-1 酸鹼值分別為 3、5、7、9 的液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度變化。

#### 4.4.6 溫度對液態礦物培養基清洗效果的影響

4.2 節培養基清洗能力的實驗結果是在室溫 25°C 時操作實驗，本小節討論培養基溫度改變對其清洗效果的影響。由於正十六烷沸點為 286.8°C，所以在本小節實驗操作溫度範圍為 25 至 100°C 的範圍內，且操作時間短的設定下，合理忽略了因溫度提高而提高正十六烷的蒸發速率，進而造成正十六烷流失的影響。本節討論重點為培養基的物理性質，並不改變清洗的操作方法，攪拌清洗時間 10 秒並清洗一次。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
- 培養基溫度：25、50、75、100°C



由圖 4.4.6-1 可以發現隨溫度提高，培養基的清洗效果亦增加，表 4.4.6-1 詳列四組不同操作溫度下培養基清洗量佔總正十六烷含量的百分比。其中以最高操作溫度 100°C 有做好的清洗效果，約能清洗土壤中總含量的 18% 左右，約為室溫操作結果的 3.5 倍。

圖 4.4.6-1 的實驗結果是在恆溫水槽中操作實驗而得，包含培養基溫度、盛放土壤的燒杯與攪拌清洗的過程均維持在固定溫度，所以可以忽略整個實驗操作流程中因熱傳造成溫度改變的影響。但若考慮利用溫度提升培養基清洗效果，並應用在實際操作的情況時，勢必須考慮清洗過程中因熱傳所造成培養基溫度下降的問題。圖 4.4.6-1 中培養基清洗效果隨溫度變化的趨勢可以提供當溫度改變時，對清洗效果改變的預測。



由於 100°C 培養基具有最好的清洗效果，本實驗根據此結果進一步改善攪拌清洗的實驗步驟，詳列清洗步驟改善順序如下，並討論每一階段的改變對培養基清洗效果的影響。



- (1) 將粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤與 100 ml 培養基共置於三角瓶中一起煮沸 5 分鐘。
- (2) 於三角瓶上加裝冷凝管，接著將粒徑大小為 20/50 mesh、正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil 的 0.5 g 污染土壤與 100 ml 培養基共置於三角瓶中一起煮沸 5 分鐘。
- (3) 承上，煮沸清洗一次後，利用玻璃過濾器分離污染土壤與培養基，將培養基靜置 1 分鐘後，以刻度吸管吸取底部 80 ml 培養基，接著將已清洗過一次的污染土壤與 80 ml 培養基共置於三角瓶內，煮沸清洗 5 分鐘，重複操作 3 次。

表 4.4.6-2 詳列改善操作流程各階段的結果，以培養基中正十六烷含量佔土壤中正十六烷總含量百分比表示。將污染土壤與培養基一起煮沸除了是為維持操作溫度在 100°C 之外，也利用煮沸時沸騰水的流動取代原先的玻璃棒攪拌。加裝冷凝裝置是為了避免煮沸過程中培養基因沸騰而流失。吸取底部培養基用來重複清洗則是將 4.4.4 小節的實驗結果應用在溫度提升的操作上。

由表 4.4.6-1 可知以 100°C 培養基攪拌清洗土壤後，可清洗土壤中約 18% 的正十六烷，由表 4.4.6-2 隨清洗步驟改善順序的結果可知，以沸騰取代攪拌後，培養基可清洗土壤中約 20% 的正十六烷，所以在同樣為 100°C 的條件下，以沸騰取代攪拌並未降低培養基的清洗效果。且能得到較穩定的實驗結果，但所需時間

較長。最終吸取底部培養基重複清洗的操作方式則能清洗掉土壤中總含量的 95% 正十六烷，且再進一步分析土壤中剩餘的正十六烷後，可以得到清洗所得正十六烷濃度與土壤剩餘正十六烷濃度總和約為 16000 ppmv 左右，故可知沸騰過程中，因溫度提高造成正十六烷因為蒸發而離開的影響是可以忽略的。

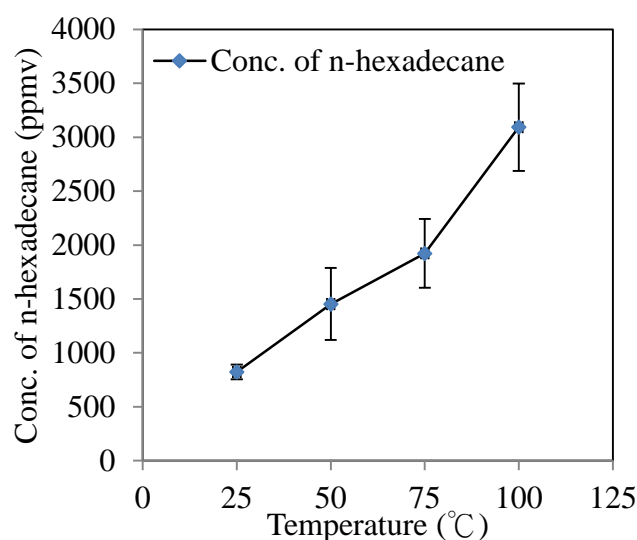


圖 4.4.6-1 溫度分別為 25、50、75、100°C 的液態礦物培養基攪拌清洗污染土壤，培養基中正十六烷濃度變化。

表 4.4.6-1 不同溫度培養基對正十六烷的清洗量佔土壤中總正十六烷含量百分比。

| 培養基溫度(°C) | 培養基中正十六烷佔土壤中總正十六烷含量百分比(%) |
|-----------|---------------------------|
| 25        | 5.23                      |
| 50        | 9.23                      |
| 75        | 12.21                     |
| 100       | 18.62                     |

表 4.4.6-2 清洗步驟改善順序各階段的結果，以培養基中正十六烷濃度佔土壤中  
正十六烷總含量百分比表示。

| 清洗步驟改善順序 | 培養基中正十六烷佔土壤中總正十六烷含量百分比(%) |
|----------|---------------------------|
| (1)      | 21.81                     |
| (2)      | 20.96                     |
| (3)      | 95.80                     |

#### 4.4.7 鹽類濃度對液態礦物培養基清洗能力的影響

由於氮肥為植物於生長期最重要的元素，若培養基的清洗能力能夠因為含氮鹽類的增加而提昇，則具有提供復育後土壤充分氮肥來源的優點。本小節實驗討論液態礦物培養基中的含氮鹽類 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度由 0.1% 提升到 0.5% (w/v) 時，培養基清洗能力的差異。本節討論重點為培養基的化學組成，並不改變清洗的操作方法，攪拌清洗時間 10 秒並清洗一次。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7 (清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度：0.1% (w/v)、0.5% (w/v)

由表 4.4.7-1 可以發現， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度提高 5 倍的實驗組別中，培養基對污染土壤的清洗能力也會提高，提升至 1200 ppmv 左右，約能清洗土壤中總正十六烷含量的 7.6%。

表 4.4.7-1 培養基中的含氮鹽類 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度由 0.1% (w/v)提升到 0.5% (w/v)

時，培養基中正十六烷濃度。

|                 | 0.1% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
|-----------------|---|---|
| 培養基正十六烷濃度(ppmv) | 823.16±68.53                            | 1200.04±156.26                          |
| 佔總正十六烷含量百分比(%)  | 5.23                                    | 7.62                                    |

#### 4.4.8 以溫度提升培養基清洗效果並利用 NTU-1 移除正十六烷

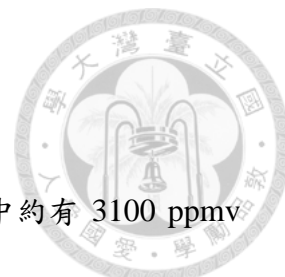
透過改變清洗步驟、培養基的物理性質與化學組成來提升培養基清洗污染土壤效果的實驗中，以培養基溫度的提升具有最明顯的幫助。於是進一步討論將此結果用於改善本實驗對污染土壤的清洗步驟。

實驗條件如下：

- 正十六烷添加量：4 ml *n*-C16/g soil
- 土壤汙染程度：3.2 ml *n*-C16/g soil
- 土壤粒徑大小：20/50 mesh
- 土壤重量：0.5 g
  
- 培養基初始酸鹼值：7(清洗土壤後為 6.88 左右)
- 培養基體積：100 ml
  
- 初始植菌量：5 ml 礦物培養基菌液(OD<sub>600nm</sub> 約為 1.0)
- 培養方式：迴旋培養
- 培養溫度：30°C
- 培養箱轉速：100 rpm
- 分析時間點：24、48、72 hr

利用 100 ml 培養基與 0.5 g 污染土壤共置於錐形瓶中加熱至沸騰 5 分鐘，接著利用底部為 60 mesh 篩網的玻璃過濾器分離土壤與培養基，將培養基靜置冷卻至室溫，接著植入 NTU-1 培養 72 小時，每隔 24 小時分析紀錄 NTU-1 降解與物

理包覆的現象。



由圖 4.4.8-1 可知，以上述方式清洗污染土壤後，培養基中約有 3100 ppmv 的正十六烷，在 NTU-1 培養 72 小時後，生物降解量約為 300 至 400 ppmv。而在培養 40 至 44 小時之後，NTU-1 細胞出現聚集並包覆正十六烷的現象，並於培養 72 小時之後物理包覆與生物降解共移除培養基中約 95% 的正十六烷。由於此組實驗中 NTU-1 的生物降解量並不如 NTU-1 於正十六烷濃度為 800 ppmv 左右的培養條件中來得高，可以從圖 4.4.8-2 的培養基酸鹼值隨培養時間變化中發現，培養 72 小時之後酸鹼值的下降量較少，約在 5.5 至 5.8 之間。由以上可知，將 100 ml 培養基與 0.5 g 污染土壤一併加熱至培養基沸騰後，培養基對污染土壤的清洗效果提升，而 NTU-1 仍能在 72 小時的培養時間中移除培養基中約 95% 的正十六烷。

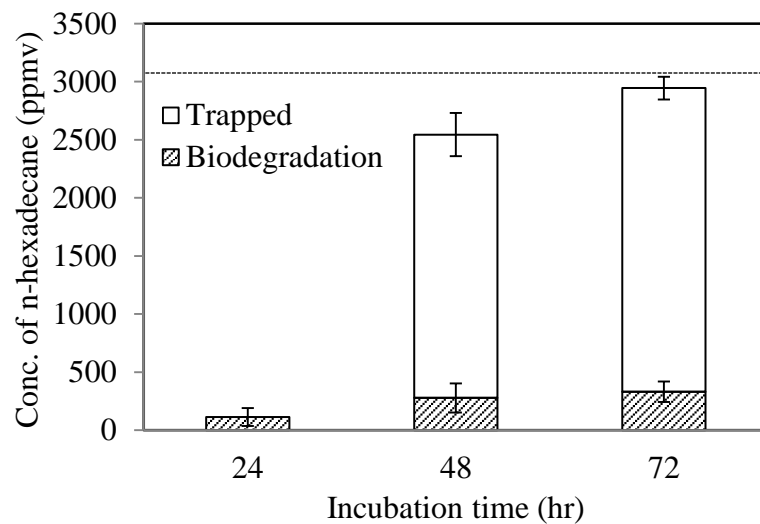


圖 4.4.8-1 培養基以沸騰方式清洗污染土壤，待培養基被分離與冷卻至室溫後，植入 NTU-1 培養 72 小時，NTU-1 生物降解與物理包覆隨培養時間的變化。

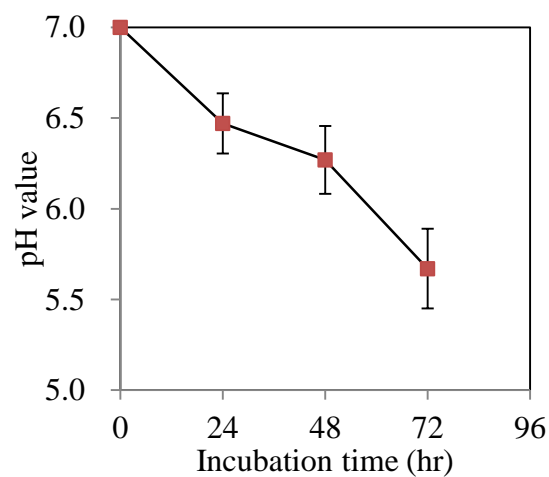


圖 4.4.8-2 培養基以沸騰方式清洗污染土壤，待培養基被分離與冷卻至室溫後，植入 NTU-1 培養 72 小時，培養基酸鹼值隨培養時間的變化。



#### 4.4.9 討論

由 4.4 節結果可知透過培養基溫度的增加對培養基清洗效果有最顯著的提升。將培養基與污染土壤共同煮沸，利用沸騰水的流動取代以手用玻棒攪拌清洗的方式，且利用回收底部培養基重複清洗，可以提升培養基的使用效率。經實驗可知以培養基與土壤加熱至沸騰的清洗方式，並回收底部 80ml 培養基重複加熱至沸騰清洗，重複三次，可移除土壤中達 95% 的正十六烷。充分達到土壤復育的目的。然而，透過改變培養基的酸鹼值、培養基內的鹽類組成、污染土壤的土壤清洗方式，對培養基清洗效果的提升並沒有顯著的幫助。改變培養基酸鹼值並不影響其清洗土壤的效果，改變鹽類組成與污染土壤的土壤清洗方式，均只能將土壤清洗的效果由原本約略 5% 土壤中總正十六烷含量提升至約 10% 土壤中總正十六烷含量。

## 第五章 結論

本實驗利用培養基清洗被正十六烷污染的土壤，清洗後，將土壤與培養基分離，利用清洗後的培養基培養 NTU-1，藉由 NTU-1 能夠降解代謝並包覆烷類的特性移除培養基中的正十六烷。將清洗土壤的步驟與 NTU-1 培養的步驟分開，可以在溫度較高或酸鹼值變化較大的情況下清洗污染土壤而不會影響到 NTU-1 降解代謝與細胞的生長。

在實驗進行前需先以自來水與去離子水預清洗實驗所使用的土壤，避免土壤中所含有的水溶性物質，在之後以培養基清洗土壤的過程中一併被清洗入培養基中，進而影響到 NTU-1 的培養。各取 0.5 g 粒徑大小為 20/50 mesh、污染程度為 3.2 ml *n*-C16/g soil 的污染土壤，一組土壤有經過預清洗處理，另一組則未預清洗處理，皆以 100 ml 培養基攪拌清洗並分離土壤與清洗後的培養基，將培養基用於 NTU-1 的培養。結果顯示土壤沒有經過預清洗的組別，NTU-1 並不會在培養基中出現細胞聚集並包覆的現象，且培養基在清洗過未經過預清洗的土壤後，其酸鹼值為不利 NTU-1 生長的 5.5。而土壤有經過預清洗的實驗組別，在後續的 NTU-1 培養中可以同時觀察到生物降解與物理包覆的情形，且培養基在清洗完土壤後酸鹼值並沒有明顯的變動，酸鹼值約為 6.8。

為了以固定的步驟清洗被正十六烷污染的土壤，本實驗所使用的步驟為，將實驗用土壤分別以 20 mesh 與 50 mesh 的篩網過篩，選擇以粒徑大小為 20/50 mesh 的土壤作為實驗對象，秤量 0.5 g 污染程度為 3.2 ml *n*-C16/g soil 的污染土壤。清洗方式是將 100 ml 液態礦物培養基加入放有污染土壤的 250 ml 燒杯中以玻棒攪拌 10 秒，接著利用底部裝有 60 mesh 篩網的過濾器分離土壤與培養基，

培養基以 250 ml 錐形瓶收集，以上為本實驗清洗污染土壤的方式。經分析此一清洗過程，100 ml 培養基中約含有 800 ppmv 的正十六烷，約佔土壤中總正十六烷含量的 5%。



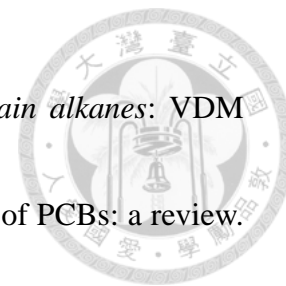
將 NTU-1 植入裝有清洗過後培養基的錐形瓶中，初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)，觀察 NTU-1 的生物降解與物理包覆現象。結果顯示在培養 72 小時後，NTU-1 能透過生物降解與物理包覆的方式移除約 95% 培養基中的正十六烷，生物降解量約在 400 至 500 ppmv 之間，培養基的酸鹼值也因 NTU-1 在生物降解過程中所產生的有機酸而降至 4.5 至 5 之間。

本實驗中土壤的正十六烷添加量為 4 ml *n*-C16/g soil，土壤污染程度為 3.2 ml *n*-C16/g soil，經 100 ml 培養基攪拌清洗 10 秒後，培養基能夠清洗土壤中約 5% 的正十六烷。若是透過改變清洗步驟、培養基的物理性質如溫度與酸鹼值、培養基的化學組成，來進一步改變培養基清洗土壤的效果。其結果顯示培養基溫度的改變對其清洗的效果有最顯著的影響。若是以 100°C 的培養基攪拌清洗土壤，能夠清洗土壤中約 18% 的正十六烷。若是將 100 ml 培養基與 0.5 g 污染土壤置於同一個錐形瓶中加熱至沸騰 5 分鐘，能夠清洗土壤中約 20% 的正十六烷，此時培養基中約含有 3000 至 3100 ppmv 的正十六烷，待培養基冷卻後植入 NTU-1，初始植菌量為 5 ml 礦物培養基菌液( $OD_{600nm}$  約為 1.0)，並培養 72 小時，NTU-1 能夠透過生物降解與物理包覆移除培養基中 95% 的正十六烷。

本實驗的成果仍處於以燒杯批次操作的階段，藉由燒杯批次操作土壤的清洗與 NTU-1 的培養，能夠初步了解將批次操作進一步發展成連續系統操作時可能

需要考量的變數。以目前的結果來看，清洗污染土壤的過程所需時間較 NTU-1 的培養短許多，一般而言 NTU-1 的培養時間為三天，而清洗步驟則是以秒或分鐘來計算，所以可以將連續系統概分為清洗與培養兩部分。藉由提升培養基的溫度並循環清洗污染土壤，累積培養基中正十六烷的濃度後，再將清洗過的培養基導入 NTU-1 的培養槽中，利用 NTU-1 的降解與包覆能力，移除培養基中的正十六烷。透過物理撈除方式移除培養槽中的 NTU-1 結塊，待培養基中的正十六烷被 NTU-1 所移除後，可以在培養基中添加因 NTU-1 生長所減少的鹽類組成，並回收再用於污染土壤的清洗，如此形成一個循環的操作系統。


## 第六章 參考文獻



- Abdel-Megeed, A. (2004). *Psychrophilic degradation of long chain alkanes*: VDM Verlag Dr. Muller Aktiengesellschaft & Co. KG.
- Abramowicz, D. A. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(3), 241-251.
- Aeckersberg, F., Rainey, F. A., & Widdel, F. (1998). Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology*, 170(5), 361-369.
- Aislabie, J., Saul, D. J., & Foght, J. M. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10(3), 171-179.
- Al-Araji, L., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., Salleh, A. B., Nasaruddin, N. M., Harikrishna, K., . . . Adnan, N. (2007). Microbial Surfactant. *Asia Pacific J. Molec. Biol. Biotechnol*, 15(3), 99-105.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Gulf Professional Publishing.
- Allard, A.-S., & Neilson, A. H. (1997). Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(4), 253-285.
- Alloway, B., & Ayres, D. (1998). Chemical principles of environmental pollution. *Water Air and Soil Pollution*, 102(1), 209.
- Alvarez, H. M. (2003). Relationship between  $\beta$ -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), 35-42.
- Ashraf, W., Mihdhir, A., & Colin Murrell, J. (1994). Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiology Letters*, 122(1-2), 1-6.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, 12, 287-338.
- Atlas, R., & Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213-221.
- Atteia, O., Estrada, E. D. C., & Bertin, H. (2013). Soil flushing: a review of the origin of efficiency variability. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*,

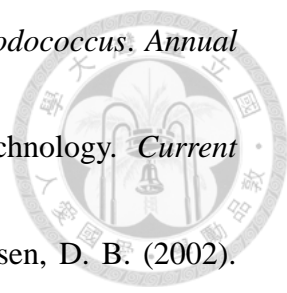
12(4), 379-389.

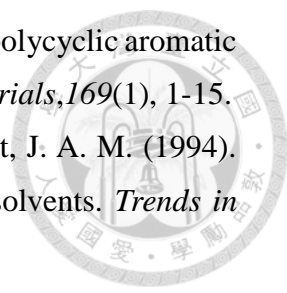
- Babel, W. (1994). Bioremediation of ecosystems by microorganism. Approaches for exploiting upper limits and widening bottlenecks. *Bioremediation: the Tokyo, 94*, 101-115.
- Bartha, R., & Atlas, R. M. (1977). The microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 225-266.
- Bell, K., Philp, J., Aw, D., & Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 195-210.
- Berthe-Corti, L., & Ebenhöh, W. (1999). A mathematical model of cell growth and alkane degradation in Wadden Sea sediment suspensions. *Biosystems*, 49(3), 161-189.
- Berthe-Corti, L., & Fetzner, S. (2002). Bacterial Metabolism of *n*-Alkanes and Ammonia under Oxidic, Suboxic and Anoxic Conditions. *Acta Biotechnologica*, 22(3-4), 299-336.
- Binazadeh, M., Karimi, I. A., & Li, Z. (2009). Fast biodegradation of long chain *n*-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 195-202.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63-67.
- Bossier, P., & Verstraete, W. (1996). Triggers for microbial aggregation in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1), 1-6.
- Bouchez-Naitali, M., Blanchet, D., Bardin, V., & Vandecasteele, J. P. (2001). Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology*, 147(9), 2537-2543.
- Bouchez-Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J. Y., & Vandecasteele, J. P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 421-428.
- Bouwer, E. J., & Zehnder, A. J. B. (1993). Bioremediation of organic compounds--putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11(8), 360-367.
- Bowen, W. R., Lovitt, R. W., & Wright, C. J. (2001). Atomic force microscopy study of the adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237(1), 54-61.
- Britton, L. N. (1984). *Microbial Degradation of Organic Compounds*: Marcel Dekker New York.

- 
- Busch, P. L., & Stumm, W. (1968). Chemical interactions in the aggregation of bacteria bioflocculation in waste treatment. *Environmental Science & Technology*, 2(1), 49-53.
- Bustamante, M., Durán, N., & Diez, M. C. (2012). Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(4), 667-687.
- Calabrese, E. J., P. T. Kostecki and E. J. Fleischer (1988). Soils contaminated by petroleum: environmental and public health effects. John Wiley and Sons Inc.
- Calleja, G. B. (1984). *Microbial Aggregation*: CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Callier, L., Clozel, B., & Nowak, C. (2002). Méthodes de recherche de l'origine de pollution (s) dans les sols ou dans les eaux souterraines. *BRGM RP-51260-Fr*.
- Camilli, R., Reddy, C. M., Yoerger, D. R., Van Mooy, B. A. S., Jakuba, M. V., Kinsey, J. C., . . . Maloney, J. V. (2010). Tracking Hydrocarbon Plume Transport and Biodegradation at Deepwater Horizon. *Science*, 330(6001), 201-204.
- Canter, L. W., and Knox, R. C. (1986). *Ground water pollution control*. Lewis Publishers, Chelsea, Mich.
- Carvalho, C. C. C. R., & Fonseca, M. M. R. (2004). Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(6), 361-375.
- Carvalho, C. C. C. R., & Fonseca, M. M. R. (2005). Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(3), 389-399.
- Carvalho, C. C. C. R., Parreno-Marchante, B., Neumann, G., da Fonseca, M. M. R., & Heipieper, H. J. (2005). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 383-388.
- Casella, S., & Payne, W. J. (1996). Potential of denitrifiers for soil environment protection. *FEMS Microbiology Letters*, 140(1), 1-8.
- Chang, M. C., Huang, C. R., & Shu, H. Y. (2000). Effects of surfactants on extraction of phenanthrene in spiked sand. *Chemosphere*, 41(8), 1295-1300.
- Chang, Y. I., & Su, C. Y. (2003). Flocculation behavior of *Sphingobium chlorophenicum* in degrading pentachlorophenol at different life stages. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 843-850.
- Chaudhry, G. R., & Chapalamadugu, S. (1991). Biodegradation of halogenated organic

- compounds. *Microbiological Reviews*, 55(1), 59-79.
- Christofi, N., Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., & Philp, J. C. (1998). Biological treatment of crude oil contaminated soil in Russia. *Geological Society, London, Engineering Geology Special Publications*, 14(1), 45-51.
- Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 915-929.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *Microbiology*, 128(11), 2503-2509.
- Coon, M. J. (2005). Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 378-385.
- Cooney, J. J., Silver, S. A., & Beck, E. A. (1985). Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes. *Microbial Ecology*, 11(2), 127-137.
- Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R., & Hirschler-Rea, A. (2005). Anaerobic *n*-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3458-3467.
- Deng, S., Bai, R., Hu, X., & Luo, Q. (2003). Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 588-593.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- Deshpande, S., Shiau, B. J., Wade, D., Sabatini, D. A., & Harwell, J. H. (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Research*, 33(2), 351-360.
- Dibble, J. T., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.
- Ehrenreich, P., Behrends, A., Harder, J., & Widdel, F. (2000). Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 173(1), 58-64.
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, 10, 208-217.



- 
- Finnerty, W. R. (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 193-218.
- Finnerty, W. R. (1994). Biosurfactants in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 291-295.
- Fraaije, M. W., Kamerbeek, N. M., van Berkel, W. J. H., & Janssen, D. B. (2002). Identification of a Baeyer–Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters*, 518(1), 43-47.
- Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2000). Aerobic degradation by microorganisms. In: Klein J, editor. *Environmental Processes- Soil Decontamination*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2000. pp. 146–155.
- Fujita, M., Ike, M., Tachibana, S., Kitada, G., Kim, S. M., & Inoue, Z. (2000). Characterization of a bioflocculant produced by *Citrobacter* sp. TKF04 from acetic and propionic acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(1), 40-46.
- Fukuda, K., Söderman, O., Shinoda, K., & Lindman, B. (1993). Microemulsions formed by alkyl polyglucosides and an alkyl glycerol ether. *Langmuir*, 9(11), 2921-2925.
- Gallego, J. L. R. (2009). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions. *The Geographical Journal*, 175, 323-323.
- Gibson, D. T. (1984). *Microbial Degradation of Organic Compounds*: Marcel Dekker New York.
- Golwer, A. (1983). Underground purification capacity. *Ground Water in Water Resource Planning*, 2, 1063-1072.
- Gong, X.-Y., Luan, Z.-K., Pei, Y.-S., & Wang, S.-G. (2003). Culture Conditions for Flocculant Production by *Paenibacillus polymyxa* BY-28. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 38(4), 657 - 669.
- Goswami, P., & Singh, H. D. (1991). Different Modes of Hydrocarbon Uptake by 2 *Pseudomonas* Species. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1), 1-11.
- Haines, J. R., & Alexander, M. (1974). Microbial Degradation of High-Molecular-Weight Alkanes. *Applied Microbiology*, 28(6), 1084-1085.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 63-70.

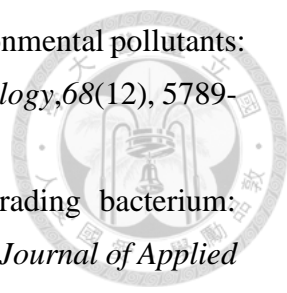
- 
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1), 1-15.
- Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., & de Bont, J. A. M. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, 12(10), 409-415.
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., & Wang, X. (2003). Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of *n*-alkanes. *Water Research*, 37(17), 4143-4150.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F., Liu, R. L., & Li, G. (2008). Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*, 56(10), 1714-1718.
- Huesemann, M. H. (1995). Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. *Environmental Science & Technology*, 29(1), 7-18.
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Morisaki, H., & Nakajima, M. (2003). Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2), 51-60.
- Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Ritchkova, M. I., Philp, J. C., Cunningham, C. J., & Christofi, N. (2001). Oleophilic biofertilizer based on a *Rhodococcus* surfactant complex for the bioremediation of crude oil-contaminated soil. *Contaminated Soil, Sediment and Water, 2001*, 20-24.
- Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Kim, I. S., Foght, J. M., & Gray, M. R. (2002). Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+ 14He. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(6), 650-659.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., & Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(6), 677-686.
- Koronelli, T. V. (1996). Principles and methods for raising the efficiency of biological degradation of hydrocarbons in the environment: review. *Applied Biochemistry*

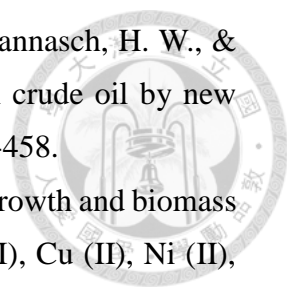
and *Microbiology*, 32(6), 519-525.

- Kurane, R., & Tomizuka, N. (1992). Towards New-Biomaterial Produced by Microorganism-Bioflocculant and Bioabsorbent. *Nippon Kagaku Kaishi*, (5), 453-463.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International*, 31(2), 155-161.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Philp, J. C., Christofi, N., Dunbar, S. A., & Ritchkova, M. I. (2001). Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 46(2), 149-156.
- Laha, S., Tansel, B., & Ussawarujikulchai, A. (2009). Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: a review. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 95-100.
- Lang, S., & Philp, J. C. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74(1), 59-70.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 282-290.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54(3), 305-315.
- Lendvay, J. M., Löffler, F. E., Dollhopf, M., Aiello, M. R., Daniels, G., Fathepure, B. Z., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2003). Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science & Technology*, 37(7), 1422-1431.
- Li, X.J., Li, P.J., Lin, X., Gong, Z.Q., Fan, S.X., Zheng, L., & Verkhovskaya, E.A. (2008). Spatial distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils from typical oil-sewage irrigation area, Northeast China. *Environ. Monit. Assess.* 143, 257–265.
- Lindtner, S., Kroiss, H., & Nowak, O. (2004). Benchmarking of municipal waste water treatment plants (an Austrian project). *Water Science and Technology*, 50(7), 265-271.
- Liu, C. W., Liang, M. S., Chen, Y. C., Sayavedra-Soto, L. A., & Liu, H. S. (2012). Biodegradation of n-alkanes at high concentration and correlation to the

- accumulation of H<sup>+</sup> ions in *Rhodococcus erythropolis* NTU-1. *Biochemical Engineering Journal*, 63, 124-128.
- Liu, C. W., & Liu, H. S. (2010). *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. *Process Biochemistry*, 46, 202–209.
- Logan, B. E., & Hunt, J. R. (1988). Bioflocculation as a microbial response to substrate limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(2), 91-101.
- Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55(2), 259-287.
- Ly, M. H., Naitali-Bouchez, M., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Le, T. M., Belin, J. M., & Wache, Y. (2006). Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 26-34.
- Madsen, E. (1991). Determining in situ bioremediation, facts and challenges. *Environ. Sci. Technol*, 25, 1663-1673.
- Malik, A., Sakamoto, M., Ono, T., & Kakii, K. (2003). Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* strains isolated from sewage activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(1), 10-15.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 419-435.
- Margesin, R. and Schinner, F. (1999), Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74: 381–389.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (1999). Soil lipase activity—a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques*, 13(12), 859-863.
- McCarthy, D. F. (1982). *Essentials of soil mechanics and foundations: Basic Geotechnics*. Reston, Va: Reston Pub. Co.
- McKenna, E., & Kallio, R. (1971a). Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(7), 1552.
- McKenna, E., & Kallio, R. (1971b). Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(7), 1552-1554.
- Mehling, A., Kleber, M., & Hensen, H. (2007). Comparative studies on the ocular and

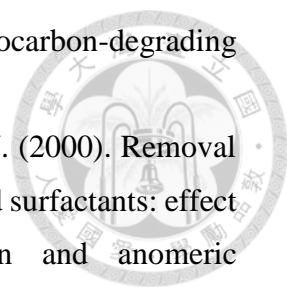
- dermal irritation potential of surfactants. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 747-758.
- Morgan, P., & Watkinson, R. J. (1989). Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 5(4), 277-299.
- Morgan, P., & Watkinson, R. J. (1994). Biodegradation of components of petroleum. *Biochemistry of Microbial Degradation*, 1-31.
- Mousset, E., Oturan, M. A., Van Hullebusch, E. D., Guibaud, G., & Esposito, G. (2014). Soil washing/flushing treatments of organic pollutants enhanced by cyclodextrins and integrated treatments: state of the art. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(7), 705-795.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60(1), 371-380.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198.
- Nakata, K., & Kurane, R. (1999). Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(12), 2064-2068.
- Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(1), 151-166.
- Nicholas, R. B. (1987). Biotechnology in hazardous waste disposal: an unfulfilled promise. *ASM News*, 53, 138-142.
- Nieder, M. A. T. T. H. E. W., & Shapiro, J. A. M. E. S. (1975). Physiological function of the *Pseudomonas putida* PpG6 (*Pseudomonas oleovorans*) alkane hydroxylase: monoterminial oxidation of alkanes and fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 122(1), 93-98.
- Niescher, S., Wray, V., Lang, S., Kaschabek, S. R., & Schlomann, M. (2006). Identification and structural characterisation of novel trehalose dinocardiomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(5), 605-611.
- Olofsson, A. C., Zita, A., & Hermansson, M. (1998). Flocc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology*, 144(2), 519-528.

- 
- Pandey, G., & Jain, R. K. (2002). Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5789-5795.
- Peng, F., Liu, Z., Wang, L., & Shao, Z. (2007). An oil degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C 9 and its biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1603-1611.
- Pignatello, J. J. (1998). Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76, 445-467.
- Pirnik, M., Atlas, R., & Bartha, R. (1974). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 868-878.
- Prak, D. J. L. (2007). Solubilization of nitrotoluenes in micellar nonionic surfactant solutions. *Chemosphere*, 68(10), 1961-1967.
- Ram, N. M., Bass, D. H., Falotico, R., & Leahy, M. (1993a). A decision framework for selecting remediation technologies at hydrocarbon-contaminated sites. *J. Soil Contam.*, 2(2), 167-189.
- Ram, N. M., Bass, D. H., Falotico, R., & Leahy, M. (1993b). A decision framework for selecting remediation technologies at hydrocarbon-contaminated sites. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 2(2), 167-189.
- Ratlidge, C. (1988). Products of hydrocarbon-microorganism interaction. *Biodeterioration*, 7, 219-236.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*: CRC.
- Roane, T. M., Josephson, K. L., & Pepper, I. L. (2001). Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3208-3215.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477-2490.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249-252.
- Rosenberg, E., & Ron, E. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(2), 154-162.
- Roudier, P. (2005). *Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués*. Ed. Techniques Ingénieur.

- 
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkest, H., Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. W., & Widdel, F. (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 372(6505), 455-458.
- Sannasi, P., Kader, J., Othman, O., & Salmijah, S. (2009). Physical growth and biomass characterization of bacterial cells exposed to Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Ni (II), and Pb (II). *Journal of Environmental Research And Development*, 4(1), 8-18.
- Santa Anna, L. M., Soriano, A. U., Gomes, A. C., Menezes, E. P., Gutarra, M. L., Freire, D. M., & Pereira, N. (2007). Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(7), 687-691.
- Sayavedra-Soto, L. A., Chang, W. N., Lin, T. K., Ho, C. L., & Liu, H. S. (2006). Alkane Utilization by Rhodococcus Strain NTU-1 Alone and in Its Natural Association with Bacillus fusiformis L - 1 and Ochrobactrum sp. *Biotechnology Progress*, 22(5), 1368-1373.
- Scholze, R. J., Smith, E. D., Bandy, J. T., Wu, Y. C., & Basilico, J. V. (1988). Biotechnology for degradation of toxic chemicals in hazardous wastes.
- Schunck, W. H., Mauersberger, S., Huth, J., Riege, P., & Müller, H. G. (1987). Function and regulation of cytochrome P-450 in alkane-assimilating yeast. *Archives of Microbiology*, 147(3), 240-244.
- So, C. M., Phelps, C. D., & Young, L. (2003). Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3892-3900.
- Sokatch, J. R., Bacterial Physiology and Metabolism, Academic Press, New York, 1969, 180.
- Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., & Matz, G. (Eds.). (2013). *Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications*. Springer Science & Business Media.
- Takagi, H., & Kadowaki, K. (1985). Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(11), 3151-3164.
- Takeda, M., Kurane, R., Koizumi, J., & Nakamura, I. (1991). A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(10), 2663-2664.
- Thomas, J. M., Yordy, J. R., Amadoy, J. A., & Alexander, M. (1986). Rates of

- dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl Environ Microbiol*, 52(2), 290–296.
- Ulrici, W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology*, 11, 5-42.
- Van Beilen, J., Li, Z., Duetz, W., Smits, T., & Witholt, B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*, 58(4), 427-440.
- Van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13-21.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549.
- Van Stempvoort, D., & Biggar, K. (2008). Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review. *Cold Regions Science and Technology*, 53(1), 16-41.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Vik, E., Bardos, P., Brogan, J., Edwards, D., Gondi, F., Henrysson, T., . . . Nathanail, P. (2001). Towards a framework for selecting remediation technologies for contaminated sites. *Land Contamination and Reclamation*, 9(1), 119-127.
- Villaverde, J., Maqueda, C., & Morillo, E. (2005). Improvement of the desorption of the herbicide norflurazon from soils via complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5366-5372.
- Volkering, F., Breure, A., & Rulkens, W. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8(6), 401-417.
- Von Lau, E., Gan, S., Ng, H. K., & Poh, P. E. (2014). Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution*, 184, 640-649.
- Vreysen, S., & Maes, A. (2005). Remediation of a Diesel Contaminated, Sandy-Loam Soil Using Low Concentrated Surfactant Solutions (5 pp). *Journal of Soils and Sediments*, 5(4), 240-244.
- Wang, W. H., Hoag, G. E., Collins, J. B., & Naidu, R. (2013). Evaluation of surfactant-enhanced in situ chemical oxidation (S-ISCO) in contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(12), 1-9.



- 
- Watkinson, R. J., & Morgan, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1(2), 79-92.
- Weerawardena, A., Boyd, B. J., Drummond, C. J., & Furlong, D. N. (2000). Removal of a solid organic soil from a hard surface by glucose-derived surfactants: effect of surfactant chain length, headgroup polymerisation and anomeric configuration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 169(1), 317-328.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6), 1209-1221.
- Westgate, S., Bell, G., & Halling, P. J. (1995). Kinetics of Uptake of Organic Liquid Substrates by Microbial-Cells - a Method to Distinguish Interfacial Contact and Mass-Transfer Mechanisms. *Biotechnology Letters*, 17(10), 1013-1018.
- Westlake, D. W. S., Jobson, A. M., & Cook, F. D. (1978). In situ degradation of oil in a soil of the boreal region of the Northwest Territories. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(3), 254-260.
- Whyte, L. G., Bourbonnière, L., Bellerose, C., & Greer, C. W. (1999). Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high Arctic. *Bioremediation Journal*, 3(1), 69-80.
- Whyte, L. G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonniere, L., Inniss, W. E., & Greer, C. W. (1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2578-2584.
- Whyte, L., Slagman, S., Pietrantonio, F., Bourbonniere, L., Koval, S., Lawrence, J., . . . Greer, C. (1999). Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2961-2968.
- Wodzinski, R. S., & Johnson, M. J. (1968). Yields of Bacterial Cells from Hydrocarbons. *Appl Microbiol*, 16(12), 1886-1891.
- Yadav, J. S., & Reddy, C. A. (1993). Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (Btex) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 756-762.
- Yang, K., Zhu, L., & Xing, B. (2006). Enhanced soil washing of phenanthrene by mixed solutions of TX100 and SDBS. *Environmental Science & Technology*, 40(13),

4274-4280.

王詩雯(2014)。利用 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 細胞破乳化(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

張緯農(2003)。利用混合菌株(TN-4)處理異十九烷之研究(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

張緯農(2009)。利用 *Rhodococcus erythropolis* 進行碳氫化合物生物降解與細胞聚集現象之研究(博士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

張蘭英、劉娜、孫立波(2007)。現代環境微生物技術(2 ed)。清華大學出版社。

梁茂實(2007)。微生物生物復育時細胞聚集與氫離子釋放的應用(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

黃武良(1999)。石油—大自然孕育千萬年的珍藏。地球科學園地。

劉志文(2007)。微生物生物復育過程中細胞聚集現象之研究(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

盧至人(2002)。現地生物復育技術。台灣土壤及地下水環境保護協會簡訊, 5, 3-5。

盧曉鳳(2000)。油品之生物分解—煉油廠廢水之實際應用(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。

謝惠敏(2011)。利用 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 細胞聚集現象移除正十六烷(碩士論文)。化學工程學系。國立台灣大學。