



## 行政院環境保護署

107 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

# 以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染 地下水：基質開發及現地模場試驗

期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署

專案執行單位：國立中山大學／環境工程研究所

專案主持人：高志明 教授

專案執行期間：107 年 01 月 10 日起至

108 年 11 月 30 日止

中 華 民 國 107 年 12 月 印製



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告  
☒修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
1. 建議評估宜 PGA 不同調配基質對地質水文條件之適用與限用條件及土壤孔隙通量影響。		1. 感謝委員指導，本計畫主要為基質改質前後應用於現地場址生物整治之基質適用性，本團隊亦期望可建立完整資料庫，以利於日後整治之基質選擇多樣性。	
2. 經費編列合理。		2. 感謝委員指導與肯定。	
委員 2 審查意見		計畫單位回覆	
1. 主持人(執行團隊)的學術研究能力與技術發展能力足以勝任本計畫。		1. 感謝委員指導，本團隊會以嚴謹原則執行計畫。	
2. 主持人(執行團隊)近五年研究與技術發展績效佳。		2. 感謝委員指導，後續將以此方向更深入探討。	
3. 本專案對未來土壤及地下水污染調查及整治工作推動的貢獻仍待本計畫未來執行成果的呈現與說明(本計畫屬於模場試驗計畫，補助經費較高，本計畫署延續性計畫，擬添加藥劑的研發已有初步成果，本年度為實場試驗，該實場也已執行數年試驗，監測井，注藥井等等均已完成，研究成果在實務應用性的說明應更著重於藥劑添加與實務監測值變化間的關係，藥劑添加與現場操作參數的關係，藥劑添加與傳輸的關係…等等)		3. 感謝委員指導，日後執行計畫會依照委員建議納入本團隊研究探討部分。	
4. 本專案預估之成果績效包含論文發表(研討會或期刊論文)(本計畫屬於模場試驗計畫，研究成果的實務應用性相對關鍵)		4. 感謝委員指導，本團隊亦期望可達到預期目標，日後撰寫相關期刊論文供各先進作為參閱。	
5. 本研究計畫書撰寫具體。		5. 感謝委員指導。	
6. 本研究計畫書所擬定的研究方法可行。		6. 感謝委員指導，本團隊會以計畫書內容執行進度。	
7. 本研究計畫書所擬定的研究內容與所預		7. 感謝委員指導，由於地下水中氯烯類污染物之整治是屬於長期性的工作，因此使用生物整治技術是較為經濟可行的整治方式。惟氯烯類污染物之生物降解需長期注入主要基質，目前國內業者使用之基質多以國外進口之基質為主。未來若能發展經濟有效、生物可分解且對環境友善之基質，將可提供業者更多選項。	
		8. 感謝委員指導，後續計畫執行階段會持續	



<p>期的研究成果，對未來土壤或地下水污染場址調查整治(或評估)的實場應用性仍待說明(計畫書中對研究成果的實務應用性的說明仍不具體，有待未來執行成果的說明)</p> <p>8. 本研究計畫書的文獻蒐集完整，對國內外本研究領域的現況了解。</p> <p>9. 本研究專案執行期限合理。</p> <p>10. 本研究計畫書中對研究的預期成果已說明。</p> <p>11. 本研究專案經費編列合理（現場相關設施已完成）</p> <p>12. 本計畫為延續性計畫。</p> <p>13. 本研究計畫對預期成果的呈現已說明。</p> <p>14. 本研究計畫已依原計畫構想書時的審查意見修正。</p>	<p>更新文獻與國內外相關領域研究現況。</p> <p>9. 感謝委員指導，本團隊會以計畫內容執行期限內完成。</p> <p>10. 感謝委員指導，若計畫成果達到預期成效，除將發表國內外文章外，亦將配合各單位進行技術宣導，以期達到技術外溢目的。</p> <p>11. 感謝委員指導，本團隊執行會依照計畫書內容執行。</p> <p>12. 感謝委員指導，本計畫主要以改質前後<math>\gamma</math>-PGA藥劑應用於同一場所之適用性，日後基質可應用於不同地質條件。本團隊亦期望可建立完整資料庫，以利於日後整治之基質選擇多樣性</p> <p>13. 感謝委員指導，本團隊會以嚴謹原則達到預期目標。</p> <p>14. 感謝委員指導，日後亦會針對委員建議之修正。</p>
---	--



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□申請計畫書□期中報告  
■修正計畫書□期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 3 審查意見		計畫單位回覆	
無		感謝委員指導與肯定。	
委員 4 審查意見		計畫單位回覆	
1. 本計畫第一年度為實驗室之基質改質試驗，第二年度方規畫進行模場試驗，建議期程應可縮短。 2. 本計畫合作單位為瑞昶公司，選擇之場址為永康工業區鹽行段，請合作單位確認相關場址是否已與其他學術單位簽訂合作意向書？並嘗試以不同分生技術探討含氯有機物之去除？！未免資源重複投入，應予以釐清。		1. 感謝委員指導，本計畫第一年為 $\gamma$ -PGA 基質改質前模場成效評估與實驗室 $\gamma$ -PGA 基質改質試驗，第二年為 $\gamma$ -PGA 改質後模場成效評估，針對同一場址不同之性質 $\gamma$ -PGA 整治效益評析。 2. 感謝委員指導，目前本計畫選定之場址是未與其他學術單位簽訂合作。過去研究常見以定量即時聚合酶鏈鎖反應偵測 <i>Dehalococcoides</i> spp. 進行研究探討，本計畫增加次世代定序（next generation sequencing, NGS）進行菌種分析，可評估場址整治過程整體菌種趨勢化。	
本署審查意見		計畫單位回覆	
1. 經費編列合理。 2. 差旅費編列太粗略。 3. 請於計畫書修訂中補充說明與協同主持人之合作方式。		1. 感謝貴署指導，經費使用會以嚴謹的原則進行經費使用。 2. 感謝貴署指導，增加差旅費說明，其主要參加貴署舉辦相關本計畫會議才使用本計畫差旅費支付， 3. 感謝貴署指導，本計畫內容 P:22 說明計畫邀請董天行經理(瑞昶公司)擔任本計畫的協同主持人。由於董天行經理對本團隊選定的場址水文地質及污染情況非常了解，因此可協助本計畫的模場試驗相關地質水文資料收集與井位設置相關工作規劃和研究。另，圖 2.5 為現場注藥的示意圖，本團隊將在三口注藥井進行灌注，評估用	



	<p><math>\gamma</math>-PGA 作為整治氯烯類污染物和邊界控制的可行性。</p>
--	---



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□申請計畫書■期中報告  
□修正計畫書□期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
1. 期中報告對計畫執行現況、流程及方法已具體說明。		1. 感謝委員指導，本團隊執行會依照計畫書內容執行。	
2. 本計畫無自籌款。		2. 感謝委員指導。	
3. 期中報告對本計畫後續執行工作項目已說明 (p. 46)。		3. 感謝委員指導，本團隊會以嚴謹原則達到預期目標。	
4. 計畫執行進度與預定進度相符，並未落後。		4. 感謝委員指導，本團隊會以計畫書內容執行進度。	
5. 期中報告顯示計畫研究內容與原計畫目的相符。		5. 感謝委員指導。	
6. 期中報告的初步成果顯示，依據原計畫設計與初步成果所提出之討論與建議合理。		6. 感謝委員指導，後續計畫執行階段會持續參閱國內外相關領域研究現況。	
7. 期中報告的初步成果顯示，目前的研究成果符合原計畫書所預期的成果。		7. 感謝委員指導和肯定。	
8. 期中報告的初步成果顯示，本計畫已有初步研究成果，報告中說明已有二位碩士與一位博士參與試驗，培育土水整治相關人才。		8. 感謝委員指導。	
9. 期中報告已有初步成果，本成果是否可獲得專利或技術轉移，尚待未來期末報告中說明。		9. 感謝委員指導，目前生物整治技術是較經濟可行的整治工法，惟氯烯類污染物之生物降解需長期注入基質。本計畫選用基質為高分子之綠色產品( $\gamma$ -PGA)，若未來實驗室相關試驗與現地試驗均有效去除目標污染物。日後加強式自然生物技術，以 $\gamma$ -PGA 作為基質參考選項之一。後續將申請發明專利以利於未來研究避免衍生爭議，並於期末報告進行說明。	
10. 期中報告已有初步成果，本研究可提升國內土壤與地下水污染整治技術與應用，符合政策。也可提升國內土水整治事業的發展，對社會經濟發展有助益。		10. 感謝委員指導，本計畫加強式自然生物技術，整治受 TCE 污染地下水之相關知識與技術提升。發展技術應用性對於處理受 TCE 污染之地下水具有經濟效益及環境友善之整治工法。	
委員 2 審查意見		計畫單位回覆	



<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本計畫期中報告成果符合預期，且相關數據分析與討論完整，執行成果值得肯定。</li> <li>2. 有關模場試驗部分，似仍未啟動。未來執行期程是否可如預期完成？請予以說明。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員指導，日後計畫將以嚴謹原則進行計畫成果評估。</li> <li>2. 感謝委員指導，由於計畫執行期間進行更換場址，故期中報告模場部份以原先場址初步規劃與設計進行說明，後續期末報告會以新場址詳細說明。</li> </ol>
委員 3 審查意見	計畫單位回覆
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 期中報告內容充實，進度掌握亦屬良好。</li> <li>2. TCE 經微生物代謝後之產物中是否含乙烯？其量如何？系統之氣平衡建議亦應加以掌握。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員指導，本團隊執行會依照計畫書內容執行。</li> <li>2. 感謝委員指導，目前批次試驗為 35 天左右，監測乙烯濃度未有顯著增加趨勢，後續會持續觀察乙烯生成量並進行探討濃度變化趨勢。</li> </ol>





# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□申請計畫書■期中報告  
□修正計畫書□期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 4 審查意見		計畫單位回覆	
1. 建議後續對其他含氯有機物評估以 $\gamma$ -PGA 其降解效果。 2. 建議於期末對於 $\gamma$ -PGA 添加不同碳源於不同質地或地下水境況適用性作相關適用性評估。		1. 感謝委員建議，日後亦會嘗試以 $\gamma$ -PGA 對其他含氯有機物降解成效可行性評估。 2. 感謝委員建議，委員建議會納入本計畫整體性之評估，再以此方向更深入探討。	
委員 5 審查意見		計畫單位回覆	
1. P.34 討論中應補充實際量測顆粒/基質之表面界達電位數值，及基質黏度與流動性/長效性之間的取捨決斷說明。 2. 報告無模場實驗結果，進度落後，請說明原因。 3. 為何非在實驗室完成基質優化後，才進行模場試驗？如此無法確認 lab 優化基質的實場應用性。		1. 感謝委員指導，委員建議後續會補上數據，基質流動性與長效性分段說明，基質可應用於不同地質條件。本團隊亦期望可建立完整資料庫，以利於日後整治之基質選擇多樣性。 2. 感謝委員指導，因本計畫有更換場址，故期中報告以原先場址進行說明，期末報告會以新場址進行詳細說明。 3. 感謝委員指導，本計畫第一年為 $\gamma$ -PGA 基質改質前模場成效評估與實驗室 $\gamma$ -PGA 基質改質試驗，第二年為 $\gamma$ -PGA 改質後模場成效評估，針對同一場址不同之性質 $\gamma$ -PGA 整治效益評析。	
委員 6 審查意見		計畫單位回覆	





<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 期中報告進度符合。</li> <li>2. P.32 微生物最適宜 C/N:P 比為 10~30:1，惟表 4.2 不同基質之營養鹽分析比例並非如此，何以結論為「本研究使用之基質應能有效提供微生物生長之營養鹽」。</li> <li>3. 目前流通性試驗已有初步成果，建議針對相關基質比例流通效果對應地質使用限制加以討論。</li> <li>4. 本計畫模場試驗場址之地質條件宜加以敘明，確認是否與原流通性試驗設定之地質條件相符。</li> <li>5. 未來基質如設定以形成透水性生物整治牆為目標，在比例上是否應調整，建議進行討論。</li> <li>6. 期中報告自評表已達成國內投稿 1 篇，發表日期、發表處、名稱、影響指數等請補充說明於備註。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員指導，本團隊執行會依照計畫書內容執行。</li> <li>2. 感謝委員指導，本團隊會再重新計算是否有誤，此部份論述會進行修正，日後報告數據會更加嚴謹論述。</li> <li>3. 感謝委員建議，委員建議會納入流通性部份進行討論。</li> <li>4. 感謝委員指導，期末報告會針對現地場址地質條件加以敘明，目前實驗室管柱流通性試驗土壤分配與現地場址地質條件是為一致。</li> <li>5. 感謝委員建議，委員建議後續期末報告，現地模場部份會納入討論。</li> <li>6. 感謝委員指導，備註部份會補充說明，目前投稿為第十屆地下水資源及水質保護研討會暨 2018 海峽兩岸地下水與水文地質應用研討會，發表日期 107/8/22，發表題目：以聚麩胺酸基質加強三氯乙烯污染地下水之生物復育成效：機制研究及模場試驗。</li> </ol>
---	--



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□申請計畫書□期中報告  
□修正計畫書■期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫■ 模場試驗
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
<div>1. <math>\gamma</math>-PGA 基質改質後在實驗室或現場試驗均呈現有效的效果，克服藥劑添加後產生的問題，成果值得肯定。</div> <div>2. 處理的成本可否再評估取代 <math>\gamma</math>-PGA 物質？</div> <div>3. 可否評估施用 <math>\gamma</math>-PGA 物質長期對地下環境菌群之改變？</div>		<div>1. 感謝委員指導和肯定。</div> <div>2. 感謝委員指導，目前生物整治技術是較經濟可行的整治工法，惟氯烯類污染物之生物降解需長期注入基質，藥劑成本為處理成本其中一部分，若減少藥劑灌注次數，其人事與機械成本可大幅降低，進而降低處理成本。目前本團隊針對 <math>\gamma</math>-PGA 基質流動性與長效性之評估，以利於可應用於不同地質條件與基質選擇多樣性。</div> <div>3. 感謝委員指導，過去永康場址進行 <math>\gamma</math>-PGA 基質模場試驗，經由次世代定序菌相結果發現，<math>\gamma</math>-PGA 基質菌群較顯著變化，其菌群變化有利於脫氯菌群快速生長，有效降解含氯有機污染物。日後加強式自然生物技術，<math>\gamma</math>-PGA 可作為基質參考選項之一。</div>	
委員 2 審查意見		計畫單位回覆	
<div>1. 本計畫在開發 TCE 污染場址之微生物促進劑，實場應用時要有「能傳輸」、「分佈均勻」、「能保留（存）」功能的同時解決，用許多試驗來證明。</div> <div>2. 宜參照 TRL 評估技術成熟度。</div> <div>3. 開發技術定位在客製化之技術服務，還是技術發展成商品化之產品。</div>		<div>1. 感謝委員指導，目前本團隊針對 <math>\gamma</math>-PGA 基質流動性與長效性之評估，以利於日後應用於不同地質條件，日後會推廣 <math>\gamma</math>-PGA 基質應用現地試驗證實基質可行性。</div> <div>2. 感謝委員指導，本團隊研究 <math>\gamma</math>-PGA 基質可行性，參照 TRL 評估技術成熟度，目前研究階段為 TRL 5-準系統於相似環境測試與 TRL 6-原型於相似環境測試階段，本團隊積極應用現地試驗進行證明，亦期盼 <math>\gamma</math>-PGA 基質日後可為 TRL 9-商業化階段。</div> <div>3. 感謝委員指導，本團隊目前構思為技術發展成商品化之產品，若能發展經濟有效、生物可分解且對環境友善之基質，將可提供業者更多選項因應不同地質條件。</div>	



委員 3 審查意見	計畫單位回覆
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 完成改變 <math>\gamma</math>-PGA 進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域改質後 <math>\gamma</math>-PGA 模場整治成效及成本效益評估。</li> <li>2. 有關目前批次實驗之菌量分析有發現有益菌的大量成長，是否有比較長期的觀測變化情形。</li> <li>3. 建議對聚麩胺酸基質加入在土壤地下水中，是否會吸附重金屬情形，長久的最終情形探討。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員指導，本計畫二年規劃為改質前後 <math>\gamma</math>-PGA 基質應用同一污染場址進行評估整治成效及成本效益。</li> <li>2. 感謝委員指導，先前本團隊實驗室管柱試驗觀測約 140 天菌量變化趨勢，其菌群生長較顯著變化，可證實 <math>\gamma</math>-PGA 有效作為微生物碳源，期盼實際應用現地可類似良好生長趨勢。</li> <li>3. 感謝委員建議，過去文獻指出 <math>\gamma</math>-PGA 基質可吸附重金屬，日後針對 <math>\gamma</math>-PGA 基質吸附重金屬進一步探討。</li> </ol>



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□申請計畫書□期中報告  
□修正計畫書■期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	107 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究計畫■ 模場試驗
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：高志明
計畫名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
委員 4 審查意見		計畫單位回覆	
<div>1. 研究進度符合規劃，期末報告撰寫品質良好，僅第 3 頁(2)與(5)重覆誤植。</div> <div>2. 改變 <math>\gamma</math>-PGA 與添加不同替代基質進行混煉，請問成品為物理性混合或發生化學性質變？</div> <div>3. 流通性實驗結果能否確認釋出之 TOC 在不同時間之組成，以確認 <math>\gamma</math>-PGA 非於初期即流逝，有提升其長效性，建議延長實驗監測時間以確認成效。</div>		<div>1. 研究進度符合規劃，期末報告撰寫品質良好，僅第 3 頁(2)與(5)重覆誤植。</div> <div>2. 改變 <math>\gamma</math>-PGA 與添加不同替代基質進行混煉，請問成品為物理性混合或發生化學性質變？</div> <div>3. 流通性實驗結果能否確認釋出之 TOC 在不同時間之組成，以確認 <math>\gamma</math>-PGA 非於初期即流逝，有提升其長效性，建議延長實驗監測時間以確認成效。</div>	
委員 5 審查意見		計畫單位回覆	
<div>1. 第一頁，advection→advection</div> <div>2. 本研究對 <math>\gamma</math>-PGA 進行改質，改質的目的是調整黏度，請補充說明除了黏度以外，改質劑對於 <math>\gamma</math>-PGA 其他性質的影響（例如酸化控制等）。</div> <div>3. 建議補充說明乳化型 <math>\gamma</math>-PGA 的基本結構</div> <div>4. 使用澱粉作為改質劑，建議補充說明澱粉本身受土壤中生物降解的影響。</div> <div>5. 建議補充說明 pH 值對於粒徑及介達電位的影響。</div>		<div>1. 感謝委員指導，有修正為 advection。</div> <div>2. 感謝委員指導，<math>\gamma</math>-PGA 基質具有酸化控制，添加改質劑主要為改變基質穩定性及顆粒大小，文顯指出當黏度愈大時，基質傳輸速度亦愈慢，可將 <math>\gamma</math>-PGA 基質更具長效性。</div> <div>3. 感謝委員指導，乳化型 <math>\gamma</math>-PGA 為乳化油與 <math>\gamma</math>-PGA 進行製備，由於乳化油特性可有效快速攔阻 TCE 包附於油滴顆粒中，形成水相與油相間之相轉移作用，<math>\gamma</math>-PGA 具有 pH-responsivity 之特性，微生物可利用碳源後迅速增長，而提高污染物降解效率，</div> <div>4. 感謝委員指導，澱粉是一種多糖類物質。澱粉結構通常有兩種：直鏈澱粉和支鏈澱粉，是聚合的多糖類物質。通常因為延展性大，粘結性能強、吸濕性能低及水溶性差，故嘗試將澱粉列為改質劑。</div> <div>5. 感謝委員指導，粒徑未受 pH 值變化之影響，介達電位受 pH 值影響相當大，通常電位值越高代表溶液狀態越穩定。若粒子間存在足夠斥力，可防止粒子相互連結，形成團聚現象。</div>	



本署審查意見	計畫單位回覆
<ol style="list-style-type: none"><li>1. 依據目前現地試驗水文地質條件與水質分析結果，補充說明未來預估改質後之成效。</li><li>2. 國外投稿對象與題目建請補充說明。</li><li>3. 第30頁第一年研究進度及預期完成工作項目包含改質前模場之成本效益評估，建請補充。</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 感謝貴署指導，目前試驗場址土壤性質為砂質壤土有利於本團隊研究<math>\gamma</math>-PGA基質改質後適用性，目前實驗室管柱流通性試驗土壤分配與現地場址地質條件是為一致，且實驗室改質後成效顯著變化，未來應用現地期盼有類似成效。</li><li>2. 感謝貴署指導，備註部份會補充說明，目前投稿期刊名稱：Chemical Engineering Journal，發表題目：Application of <math>\gamma</math>-PGA as the primary carbon source to bioremediate a TCE-polluted aquifer: A pilot-scale study。</li><li>3. 感謝貴署指導，由於今年進行更換場址，目前改質前整治成效正進行中，故評估第二年期中可提出改質前成本效益評估。</li></ol>





專案基本資料表

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別 (單選)	<input type="checkbox"/> 研究專案 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗	
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 其他				
申請機構系所	國立中山大學環境工程研究所				
機構地址	804 高雄市鼓山區蓬海路70號				
專案主持人	高志明	職等/職稱	西灣講座教授		
協同主持人	董天行	職等/職稱	經理		
專案名稱	中文	以聚結胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗			
	英文	Application of poly-γ-glutamic acid to enhance the in situ bioremediation of chlorinated-solvent contaminated groundwater: matrix development and pilot-scale study			
	關鍵字	三氯乙烯、現地生物復育、次世代定序、綠色整治			
執行期程	自民國	107 年	01 月	10 日起	
	至民國	108 年	11 月	30 日止	
專案主持人	姓名：高志明    E-mail：jkao@mail.nsysu.edu.tw		專線：07-5254413 手機：0935989780		
專任助理	姓名：    E-mail：		專線： 手機：		
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估總經費		第一年金額	第二年金額	編列說明
	1.	人事費用	\$28,000	\$28,000	(1-5項相加之50%為限)
	2.	貴重儀器使用含維護費	0	0	(與計畫實驗相關)
	3.	消耗性器材與主要費用	\$11,700	\$41,000	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	9,000	12,000	(差旅與租賃費用)
	5.	雜項費用	5,000	10,000	(1-6項相加之5%為限)
	6.	行政管理費	106,300	109,000	(1-5項相加之10%為限)
	專案計畫申請總金額		1,170,000	1,200,000	

專案主持人(簽名及蓋章)：

高志明

日期：2017/01/26





# 行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會 土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

## 107 年度專案成果績效自評表

### 一、專案基本資料

填表日期：107 年 10 月 25 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input type="checkbox"/> 研究專案 <input checked="" type="checkbox"/> 模場試驗
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 預防 <input type="checkbox"/> 其他		
申請機構系所	國立中山大學環境工程研究所	計畫主持人	高志明
專案名稱	以聚麩胺酸基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 期末		

### 二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於「結案達成數」欄位中。

#### (一) 學術面

項目		目標達成程度	申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表日期、發表處、 發表名稱、影響指數等)
A 學術 產出 及 活動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	1	0	1	100	應用聚麩胺酸基質加強三氯乙烯污染地下水之生物復育成效
		(2)研討會論文	1	1	1	100	第十屆地下水資源及水質保護研討會暨 2018 海峽兩岸地下水與水文地質應用研討會，發表日期 107/8/22，發表題目：以聚麩胺酸基質加強三氯乙烯污染地下水之生物復育成效：機制研究及模場試驗。
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1	100	期刊名稱：Chemical Engineering Journal 發表題目：Application of $\gamma$ -PGA as the primary carbon source to bioremediate a TCE-polluted aquifer: A pilot-scale study
		(2)研討會論文					
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告					
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
B 人 才	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2	100	
		(2)博士	1	1	1	100	
	8.研究團隊						



項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表日期、發表處、 發表名稱、影響指數等)
培育	(個數)	(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

## (二) 產業面

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、 技術轉移相關詳細資料)
A 智慧財產權	1.專利 (件數)	已核准發明					
		已核准新型/設計					
		已核准合計					
		申請中發明					
		申請中新型/設計					
		申請中合計					
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數					
		授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	3.技術移轉 (專利)	件數					
		授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	4.技術移轉 (應用技術)	件數					
		授權金(仟元)					
		衍生利益金(仟元)					
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)					
		(2)品種/系(件數)					
C 產學研合作	6.促成合作研究	件數					
		金額(仟元)					
	7.促成投資	件數					
		投資金額(仟元)					
	8.促成取得業 界科專	件數					
		業界投資金額(仟元)					



項目 \ 目標達成程度		申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、 技術轉移相關詳細資料)
9.其他指標 (請自行命名)	(請自填)					

## (三) 政策面

項目 \ 目標達成程度		申請預 估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或 其他詳細資料)
A 服 務 便 民	1.技術服務	次數				
		收入(仟元)				
	2.諮詢服務	次數				
		收入(仟元)				
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策				
		(2)法規				
		(3)規範				
		(4)標準				
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)					
	5.獲得獎項(件數)					
	6.提升能源效率(%)					
	7.節能減碳效率(%)					
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)				

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



含氯有機溶劑為造成土壤及地下水污染之主要污染來源之一，由於含氯有機溶劑污染場址需要較長之整治時程，且若採用傳統之物理化學整治方法，需要投入較高之整治經費。因此生物整治乃成為一種較為經濟且務實的整治方式，含氯有機溶劑之生物降解需長期注入主要基質，但基質之注入將造成阻塞及地下水酸化問題，且硫酸鹽還原作用亦會產生硫化物之臭味問題，造成基質傳輸效果和地下水質不佳以及操作維護費用增加。

針對含氯有機溶劑污染場址，本團隊結合微生物、分子生物及環境工程之理論，將學術與應用結合，實際將研發之技術應於污染場址實場驗證。目前已研發一系列的污染場址整治系統及基質，可有效整治含氯有機溶劑污染場址。本計畫主要之目的為評估以聚麩胺酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)為基質，以整治受含氯有機溶劑污染地下水之可行性。另外將改質基質，經由改質試驗預期將基質更加穩定性、緩釋性、可分解性與長效性，日後基質可應用於不同場址地形。

此基質將可有效降解含氯有機物及其降解副產物，達到污染場址整治及防止污染物擴散目的。因  $\gamma$ -PGA 具有同時帶正電及負電官能基之特性，使  $\gamma$ -PGA 在整治過程中，可同時鍵結氫離子及硫離子，從而可進行酸化控制及臭味抑制。所開發之技術符合目前國內外推動的現地、被動及生物之綠色整治要項，可有效降低整治成本，為一種更具經濟效益且突破傳統設計思維之節能及環境友善工法。



## 摘要

本計畫以三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)為目標污染物，研究發展處理重質非水相溶液(dense non-aqueous phase liquids, DNAPL)污染地下水之整治技術。由於 DNAPL 污染場址之整治是屬於長期性的工作，選擇生物整治工法是較為經濟可行的整治方式。惟 DNAPL 之生物降解需長期注入主要基質，但基質注入往往造成地下水阻塞及酸化問題。聚麩胺酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是一種經由生化作用合成之高分子聚合物，由於具有保濕性、無毒性、金屬螯合性、生物可分解性及生體相容性等特性，已在各工業領域上有廣泛之運用性。因此  $\gamma$ -PGA 具有發展做為加強含氯有機物污染地下水之厭氧生物整治基質之優勢和潛力。本計畫目的為評估以  $\gamma$ -PGA 為基質改質性質前後，整治 TCE 污染地下水之可行性。本計畫工作項目包括(1)以評估  $\gamma$ -PGA 改質試驗後基本特性分析與物化和生物特性；(2)改質後基質厭氧批次生物降解試驗，以評估  $\gamma$ -PGA 加強 TCE 還原脫氯之可行性；及(3)以  $\gamma$ -PGA 改質前後進行現地模場試驗，以獲得實場應用之成果並驗證實驗室數據。本計畫在改質  $\gamma$ -PGA 基本特性分析結果顯示，各組別粒徑均為 400 nm~5,500 nm 之間，粒徑分布於奈米到微米之間。推估改質組別粒徑大小有效分佈到粗細顆粒間(包括黏土到砂粒)，達到均勻分佈及增加生物可及性目標。改質後組別測量介達電位均為負電位，可使基質有效向下游傳輸，不會被主要帶負電的土壤顆粒吸附在注入點附近。管柱流通性試驗結果顯示  $\gamma$ -PGA 基質注入體積約 6~7 pore volume (PV)，總有機碳(total organic carbon, TOC)濃度達到平衡趨勢。添加羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose, CMC)之改質組別，約 11~13 PV TOC 濃度達到平衡趨勢，較  $\gamma$ -PGA 高出 5 PV 貫穿時間，顯示添加羧甲基纖維素之改質可提升其分佈係數(partition coefficient)，增加基質和土壤吸附性。 $\gamma$ -PGA 與乳化油混合組別，在注入體積約 13~15 PV 後，TOC 濃度可達到平衡，均較  $\gamma$ -PGA 更能達到緩釋 TOC 效果。以乳化油進行  $\gamma$ -PGA 改質，pH 則有緩慢降低情形，顯示乳化油之分解性較佳，因其生物降解產生有機酸而使 pH 降低。TCE 生物分解實驗結果顯示，各組別均迅速達到厭氧狀態，TCE 在 35 天降解率均可達 77% 以上，其中又以乳化型  $\gamma$ -PGA 基質組中之 TCE 降解產率最高(35 天達 85% TCE 去除率)。主要原因為 TCE 具有與油脂較高親和性，當乳化型基質注入地下水中可有效快速攔阻 TCE 包附於油滴顆粒中，形成水相與油相間之相轉移作用，此時微生物可利用碳源後迅速增長，而提高污染物降解效率。現地模場初步評估結果顯示，本場址地下水 TCE 濃度介於 0.439 至 5.89 mg/L 之間，水力傳導係數為  $3.9 \times 10^{-3}$  cm/s，地下水流向由東向西流動，土壤組成份以砂質壤土為主。現地模場試驗中設置一口  $\gamma$ -PGA 灌注井(IW)、2 口下游監測井(DW1 及 DW2) 及一口上游監測井(UW)。現地試驗中於 IW 注入 10 L  $\gamma$ -PGA 藥劑並稀釋 36 倍藥劑量的推進水。注藥 20 天後，各井 TCE 濃度有下降趨勢，而副產物濃度亦有上升情形，地下水未有酸化現象發生。實驗結果顯示上游注藥井降解效果顯著，後續將持續分析及評估污染物濃度、地質化學指標、脫氯菌群和優勢菌相。實驗室初步成果顯示以  $\gamma$ -PGA 結合乳化油或 CMC 作為基質，可有效控制 pH，加速 TCE 之還原脫



氯效率，並縮短整治期程。此外，改質基質並有緩釋及長效性效果。現地初步成果顯示：(1)以  $\gamma$ -PGA 基質具有極佳之傳輸性，並可釋出高濃度 TOC，達到還原脫氯目標；(2)  $\gamma$ -PGA 具有緩衝 pH 之效果，使 pH 維持中性，解決過去生物基質分解後造成水質酸化之問題；(3)  $\gamma$ -PGA 可有效促進現場 TCE 之生物降解，使  $\gamma$ -PGA 成為一種更具經濟效益及環境友善之綠色基質。

關鍵字：三氯乙烯、聚麩胺酸、還原脫氯、現地生物整治





## Abstract

Soil and groundwater at many existing and former industrial areas and disposal sites are contaminated by halogenated organic compounds that were released into the environment. When they are released into the subsurface, they tend to adsorb onto the soils and cause the appearance of dense-non-aqueous phase liquid (DNAPL) pool. In situ bioremediation of DNAPLs sites need to inject carbon substrates into the subsurface, which would cause the acidification and odor problems of the subsurface environment. This would deteriorate the groundwater quality and cause the increase in maintenance cost. The poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) is a biopolymer synthesized by biochemical processes. Due to its characteristics of moisture resistance, no toxicity, and chelating ability with metals, it has been widely applied by the industry. The objective of this proposed study is to evaluate the feasibility of applying the  $\gamma$ -PGA before and after the modified as the primary substrate to enhance the trichloroethylene (TCE) reductive dechlorination. The two-year project includes three major tasks: (1) analysis of modified basic physical, chemical, and biological characteristics of  $\gamma$ -PGA, (2) performance of anaerobic microcosm experiments, and (3) in situ pilot-scale study. This project results from the particle size distribution of modified group show that scope major diameters of modified group were observed, which were around 400 nm and 5,500 nm. Thus, the diameter of modified group globule was in nano to micro-scale ranges. These two different size ranges of modified group globule allowed it to distribute evenly in soil particles. The average zeta potentials of modified group was negative potential. This result implies that modified group globule was in a reduced state, and the reduced zeta potential would result in the increase in the repulsion and friction force between modified group globule and soil particles. This would promote modified group to migrate to farther downgradient area, and thus, the influence zone can be enlarged. The column flow test results show that the  $\gamma$ -PGA matrix injection volume is about 6~7 pore volume (PV). In the modified carboxymethyl cellulose (CMC) group, about 11-13 PV were observed. The trend of total organic carbon (TOC) concentration reached equilibrium. Compared with  $\gamma$ -PGA, there was about 5 PV breakthrough time. It is shown that the addition of carboxymethyl cellulose improves the partition coefficient and increases the matrix and soil adsorption. Subsequent observation of  $\gamma$ -PGA and emulsified oil mixed group injection volume of about 13 ~ 15 PV compared to  $\gamma$ -PGA about 7 PV breakthrough time. The sustained release TOC effect is better than  $\gamma$ -PGA. The  $\gamma$ -PGA was modified with emulsified oil, and the pH was slowly lowered, indicating that the decomposition property of the emulsified oil was better. The microcosm study was conducted to evaluate the feasibility and effectiveness of using modified group for the enhancement of TCE dechlorination. Each group quickly reached the anaerobic state, and the degradation rate of TCE in 35 days was over 77%. Among them, the



degradation yield of TCE in the emulsified  $\gamma$ -PGA matrix group was the highest (85% TCE removal rate at 35 days). The main reason is that TCE has higher affinity with grease. When emulsified matrix is injected into groundwater, it can effectively block TCE from being attached to oil droplets, forming phase transfer between water phase and oil phase. At this time, microorganisms can use carbon source. After rapid growth, the efficiency of pollutant degradation is efficiency. In this study, a DNAPL-contaminated site (TCE-contaminated site) is selected to apply  $\gamma$ -PGA as the primary substrate for field application. The TCE concentrations in groundwater at the selected site ranged from 0.439 to 5.890 mg/L. The site hydraulic conductivity is around  $3.9 \times 10^{-3}$  cm/s, and the groundwater flows to the west direction. One upgradient well(IW) and two downgradient wells(DW1 and DW2) are selected as the substrate injection and monitoring wells, respectively. Moreover, an upgradient well with TCE contamination is used as a control well for comparison. The soil composition is sandy loam. In-situ test, 10 L  $\gamma$ -PGA agent was injected into the IW and the 36-fold dose of propellant water was diluted. After the injection 20 days, the TCE concentration of each well decreased, and the by-products showed an upward trend. The water quality parameter pH did not acidification. The experimental results confirmed that the degradation of the upstream injection wells was significant, and from groundwater samples will be collected from these wells and analyzed for contaminant concentrations, geochemical indicators, *Dehalococcoides spp.*(DHC), and microbial diversity. The current implementation results of this project show: The preliminary results of the laboratory show that  $\gamma$ -PGA combined with emulsified oil or CMC as matrix can effectively control pH, accelerate the reduction and dechlorination efficiency of TCE, and shorten the remediation period. In addition, the modified matrix has a slow release and long-lasting effect. The preliminary in-situ remediation results show: (1) The  $\gamma$ -PGA matrix has excellent transmission and can release high concentration TOC to achieve the reductive dechlorination target; (2)  $\gamma$ -PGA has the effect of buffering the pH, solving the problem that the biological matrix will cause acidification of water in the past (3) The  $\gamma$ -PGA can effectively promote the biodegradation of TCE In site. The proposed treatment scheme would be expected to provide a more cost-effective alternative to remediate chlorinated-solvent contaminated aquifers.

Keywords: trichlorethylene; poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA); reductive dechlorination; in situ bioremediation



## 目錄

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	VIII
第一章：計畫前言與研究目的.....	1
1.1 計畫緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究重要性.....	3
第二章：文獻回顧.....	5
2.1 含氯有機物地下水傳輸與特性及危害.....	5
2.2 地下水污染物處理技術之種類.....	6
2.3 TCE 生物降解反應機制.....	9
2.4 不同基質於土壤地下水之應用性.....	12
2.5 地下水 PH 緩衝溶液與甲烷抑制劑探討.....	15
2.6 高分子聚合物之應用性.....	16
2.7 分子生物技術於污染整治上的重要性與應用.....	20
2.8 現地場址背景簡介.....	23
第三章：研究方法及步驟.....	24
3.1 $\Gamma$ -PGA 基本特性分析.....	25
3.2 以改質試驗探討基質於現地基質傳輸性.....	26
3.3 現地添加 $\Gamma$ -PGA 基質之設計.....	27
3.4 進行現地之模場試驗.....	27
3.5 現地微生物資訊分析.....	28
3.6 本計畫使用儀器使用廠牌.....	28
第四章：結果與討論.....	31
4.1 $\Gamma$ -PGA 改質後基本特性分析.....	31
4.1.1 基質配製黏度試驗.....	31
4.1.2 粒徑與界達電位分析.....	32
4.1.3 均質試驗.....	34
4.1.4 流通性試驗.....	36
4.4.5 pH 酸化試驗.....	37
4.2 微生物批次實驗.....	40



4.2.1 水質參數變化趨勢 .....	40
4.2.2 各組別降解三氯乙烯 .....	44
4.2.3 各組別降解效率比較 .....	45
4.2.4 各組批次試驗菌量分析 .....	47
4.3 模場試驗 .....	48
4.3.1 現地灌注試驗水質分析 .....	50
4.3.2 含氯有機物降解趨勢 .....	53
4.4 第二年模場試驗 .....	55
第五章 結論 .....	57
參考文獻 .....	1



## 圖目錄

圖 2.1 含氯脂肪組碳氫化合物現地生物復育之示意圖(本團隊繪製).....	9
圖 2.2 微生物利用電子供給者產氫及醋酸形成之主要代謝途徑(本團隊繪製).....	11
圖 2.3 聚麩胺酸( $\gamma$ -PGA)之結構物(Liguori and Faraco, 2016).....	17
圖 2.4 $\gamma$ -PGA 之鹽類結構(a)與一價金屬鍵結；(b) $\gamma$ -PGA 與二價金屬鍵結(Yang et al., 2017d).....	19
圖 2.5 前鎮區興邦段場址範圍示意圖 .....	23
圖 2.6 現場注藥的示意圖 .....	23
圖 3.1 $\gamma$ -PGA 基質流通性試驗裝置示意圖 .....	26
圖 4.1 不同組別監測黏度變化圖 .....	32
圖 4.2 管柱土壤與不同組別粒徑分布百分比圖 .....	33
圖 4.3 改質基質介達電位圖 .....	34
圖 4.4 不同組別靜置 48 小時後基質變化圖 .....	34
圖 4.5 不同時間各組別 TOC 濃度變化趨勢圖 .....	35
圖 4.6 不同基質於土壤管柱傳輸與 TOC 濃度之變化 .....	37
圖 4.7 不同組別 pH 與 TOC 變化趨勢圖 .....	39
圖 4.8 微生物厭氧批次實驗 pH 變化趨勢圖 .....	41
圖 4.9 微生物厭氧批次實驗 ORP 變化趨勢圖 .....	42
圖 4.10 微生物厭氧批次實驗 DO 變化趨勢 .....	43
圖 4.11 微生物厭氧批次實驗 TOC 濃度變化趨勢圖 .....	43
圖 4.12 各組別降解 TCE 濃度變化趨勢圖 .....	45
圖 4.13 各組別副產物濃度變化趨勢圖 .....	46
圖 4.14 批次實驗各組別 <i>DHC</i> 菌屬之變化圖 .....	48
圖 4.15 模場試驗井位示意圖 .....	49
圖 4.16 模場試驗之基本水質監測趨勢圖 .....	52
圖 4.17 模場試驗氨氮變化趨勢圖 .....	52
圖 4.18 模場試驗 TCE 濃度變化趨勢圖 .....	54
圖 4.19 模場試驗副產物變化趨勢圖 .....	54



## 表目錄

表 2.1 市售乳化基質種類及特性 (本團隊繪製).....	14
表 2.2 $\gamma$ -PGA 應用之工業類別(本團隊繪製).....	18
表 2.3 歷年學者在環境上應用 $\gamma$ -PGA 之彙整.....	19
表 2.4 應用於土壤及地下水脫氯微生物菌相之分子生物技術.....	22
表 3.1 彙整不同設備儀器之廠牌及型號.....	29
表 4.1 不同組別粒徑分析.....	33
表 4.2 不同基質組別之營養鹽分析.....	35
表 4.3 基質流通性試驗之管柱基本操作參數.....	37
表 4.4 場址土壤地質特性.....	49
表 4.5 場址各簡易井設置規格.....	50





## 第一章：計畫前言與研究目的

### 1.1 計畫緣起

過去數十年經濟發展帶來的高科技物品亦給人民帶來便利的生活，但背後亦產生大量有害污染物，使得環境污染問題層出不窮，造成污染之原因絕大部分是因工廠未妥善處理這些含氯脂肪族碳氫化合物(chlorinated aliphatic hydrocarbons, CAHs)與廢棄物，甚至是惡意非法棄置、掩埋或灌注等。造成地下水環境遭受破壞，近幾年來研究證實含氯有機物對健康具高風險及不良影響，在國內外皆備受重視。含氯有機溶劑為地下水中最常見之重質非水相溶液(dense non-aqueous phase liquids, DNAPLs)污染物，有低可燃、低沸點、高蒸氣壓及對脂類有高溶解力，其比重大於水，對水溶解度較低。溶劑亦緩慢釋出至地下水體中，導致地下水長期遭受嚴重污染，又因黏滯性大、密度高且溶解性低等特性，在地下水層內不容易隨水移動，因此傳統的土壤與地下水整治技術難以有效處理(Sheu et al., 2015; Wang et al., 2016; Field, 2018)。目前已被國際癌症研究局(international agency of research on cancer, IARC)歸類為極可能導致人體致癌之物質，若人體長期暴露時，則會對肝、腎等臟器及神經、血液方面造成損害。

四氯乙烯(tetrachloroethene, PCE)、三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)及 1,2-二氯乙烷(1,2-dichloroethane, 1,2-DCA)為國內外最具代表性之含氯有機溶劑，此污染物於地下水中因其特性而常以比水重之非水相液體存在，此類型污染物極可能因受重力與毛細壓力影響逐漸滲透至未飽和含水層而污染地下水，尤其是疏水性之含氯有機物，容易吸附在土壤中並緩慢脫附而形成長期污染源，對地下水之水質造成長期危害，且增加生物整治之困難度(Dolinová et al., 2017)。現今國內外學者運用加強式生物整治技術(enhanced bioremediation)處理受污染場址之案例已十分普遍(Huang et al., 2016; Ziels et al., 2016; Mayer-Blackwell et al., 2017; Němeček et al., 2018)，其中以自然生物復育作為整治優先之選擇，是綠色整治概念及對環境友善之目標。此方法可經由基質及營養鹽添加的方式，達到促進現地微生物生長、加強生物降解反應及達到分解污染物的目的，此技術藉由微生物代謝污染物之能力，來轉換或礦化污染物，以達到降低或去除目標場址中污染物濃度與毒性、控制污染擴散及降低污染範圍之目的。由於地下水中 DNAPLs 污染物傳輸流佈包含移流(advection)與延散(dispersion)/擴散(diffusion)作用機制，其主要受到土壤結構及地下水層孔隙之影響，大部分 DNAPLs 傳輸以移流及擴散作用為主，在低滲透性地層可視為地下水停滯區或非移動區域(immobile zone)，此地層將影響污染物及生物基質之傳輸(Badin et al., 2016; Schaefer et al., 2018)。目前主要加強生物分解的方式可分為以下三點：(1)添加生物可分解之營養鹽或電子接受者於污染場



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

址，其活化場址內既有的微生物族群；(2)於污染場址額外添加對污染物具有分解能力的特殊菌種，或利用基因工程技術，發展具特定污染物分解能力之基因重組微生物；(3)利用生物處理工法將污染物經通氣或土壤洗滌後送至特殊生物反應器或是生物濾床、生物洗滌塔去除污染物，或改用地耕法、堆肥處理法(Yang, 2015; Guo and Brusseau, 2017; Ye et al., 2017)。

近年來國內外發展許多土壤與地下水整治的技術，整治工法主要可分為現地處理及離地處理兩大類，由於離地處理方式需要的費用及時間比現地處理方式更高，故目前均趨向於現地處理。現地處理目前發展出多項技術，生物整治為現今整治工法方式中較為經濟實惠且對環境衝擊較小的技術(Kwon et al., 2016; Lien et al., 2016; Akash et al., 2018)。微生物在厭氧的環境下，可藉由添加營養基質促進微生物生長加強還原脫氯作用而降解目標污染物。當基質經微生物代謝分解後，可將有機物降解或轉化成其他產物如甲烷及二氧化碳之最終產物，以提供微生物生長所需之能量。過去研究發現，於整治期間，常常會遇到甲烷化階段，此時甲烷生成菌(methanosarcina)生長會抑制脫氯菌之生長，抑制脫氯菌將會導致無法完全還原脫氯或降低還原脫氯效率(Nobre et al., 2017; Scalzi et al., 2018)。近年來研究聚麩胺酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)廣泛應用於不同領域如食品品質改良、醫藥、化妝品及農業等，各領域當中亦有良好成果，係利用微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)將麩胺酸經由生化過程中聚合而成的一種生物可分解高分子材料，具有保濕性、無毒性、金屬螯合性、生物可分解性及生體相容性等多項特性。其結構上功能性具經濟價值，具有跨領域應用之可行性，於環境領域應用上可藉由  $\gamma$ -PGA 含多價陰離子之特性(Luo et al., 2016)，亦是一種良好的生物絮凝劑具有吸附去除水中重金屬之效果，對於目前化學合成高分子具有較優異的取代性。因此，本計畫將以此區域為模場試驗區，第一年將有評估以  $\gamma$ -PGA 做為加強 TCE 還原脫氯基質之可行性，以生物還原脫氯技術整治本區域之 TCE 污染，並評估其成效及成本效益。此外，本計畫第二年將以不同的改質技術改質  $\gamma$ -PGA，使其除發揮本身的特性外，並可提升改質後的  $\gamma$ -PGA 在長效性方面的優勢，使其更具應用潛力，以提升整治成效。本團隊將利用模場試驗區進行改質前後的  $\gamma$ -PGA 的測試，驗證改質前後的  $\gamma$ -PGA 對 TCE 污染場址的整治成效與效益評估。

## 1.2 研究目的

整治場址中 DNAPLs 之處理具有相當高之難度及挑戰性，TCE 為地下水中最常見 DNAPLs 污染物，法規規範 TCE 濃度在地下水為 0.050 mg/L 及飲用水為 0.005 mg/L。 $\gamma$ -PGA 為一生物合成之高分子聚合物，具有生體相容性、無毒性，加上生物學上之多功能性，已開始應用在各個領域之研究，目前在環境上處理重



金屬具有相當良好之成效(Yang et al., 2018c)亦應用生物整治作為基質良好成效(Sheu et al., 2018a)。 $\gamma$ -PGA 具有可生物分解之特性，故本計畫將  $\gamma$ -PGA 作為基質針對降解 TCE 進行規劃設計。藉由添加  $\gamma$ -PGA 作為電子提供物質及營養基質，加強現地微生物對三氯乙烯之厭氧還原脫氯。由於  $\gamma$ -PGA 為一生物性聚合產品，在環境中無毒及可生物降解之特性，故可作為豐富碳源供給微生物利用，因此本計畫目的如下：

- (1) 場址地質水文資料收集外，並將規劃設計模場試驗區
- (2)  $\gamma$ -PGA 進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域改質前  $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估
- (3) 實驗室  $\gamma$ -PGA 基質改質試驗。
- (4) 改質後  $\gamma$ -PGA 管柱流通性試驗與其他相關試驗了解  $\gamma$ -PGA 物化及生物特性。
- (5)  $\gamma$ -PGA 進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域改質後  $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估
- (6) 完成以整治牆的概念，發展出以被動式現地生物還原脫氯法整治 TCE 污染之地下水之設計準則。
- (7) 研究即時定量聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction, qPCR) 搭配次世代定序(next generation sequencing, NGS)分析技術以瞭解特徵基因和優勢菌之變化，做為應用  $\gamma$ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。
- (8) 改良式基質，突破過去基質衍生之影響，日後生物復育選定基質灌注更具多樣性。

### 1.3 研究重要性

含氯有機溶劑為造成土壤及地下水污染之主要污染來源之一，由於含氯有機溶劑污染場址需要較長之整治時程，若採用傳統之物理化學整治方法，需要投入較高之整治經費。現今以生物整治乃成為一種較為經濟且務實的整治方式，含氯有機溶劑之生物降解需長期注入主要基質，過去研究發現基質注入將造成阻塞及地下水酸化問題產生，且硫酸鹽還原作用亦會產生硫化物之臭味問題，造成基質傳輸效果和地下水質不佳以及操作維護費用增加。針對含氯有機溶劑污染場址，本團隊結合微生物、分子生物及環境工程之理論，將學術與應用結合，實際將研發之技術應於污染場址實場驗證。目前已研發一系列的污染場址整治系統及基質，可有效整治含氯有機溶劑污染場址，本計畫主要之目的為評估以聚麩胺酸為



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

基質，以整治受含氯有機溶劑污染地下水之可行性。 $\gamma$ -PGA 具有胺基，胺基釋放後為和水反應產生氨，由於氨為鹼性物質，因此可中和有機碳在厭氧反應後產生的酸，解決以往生物基質會造成水質酸化之問題。所開發之技術符合目前國內外推動的現地、被動及生物之綠色整治要項，可有效降低整治成本，為一種更具經濟效益且突破傳統設計思維之節能及環境友善工法。





## 第二章：文獻回顧

### 2.1 含氯有機物地下水傳輸與特性及危害

CAHs 具有沸點低、可燃性低、高脂溶性、蒸氣壓密度高以及高化學穩定性等特殊物化性質，是工業上大量被使用的有機溶劑常廣泛的被作為金屬脫脂溶劑，常用在金屬電子零件之清洗、去油等製造過程、稀釋劑或零件洗滌劑及乾洗店的去漬劑等(Lai et al., 2017; Dumas et al., 2018; Lin et al., 2018; Liu et al., 2018b) 當 CAHs 污染源釋出而侵入地下環境後，首先到達通氣層土壤，此層土壤之孔隙中，同時含有空氣及吸附水，TCE 在通氣層時可能揮發成蒸氣相、溶解於水中形成溶解相、殘留於所通過之路徑而形成殘留量、或受重力影響而形成向下沉降的移動相。當 CAHs 穿過毛細作用帶及地下水位面，進入飽和含水層後，由於飽和含水層的土壤孔隙完全為水所充滿，因此 CAHs 無法揮發成氣相，而以溶解相，殘留量及移動相存在於此飽和含水層中，且在飽和含水層會繼續向下沈陷(Srirattana et al., 2017)。CAHs 於地表下之分佈極其複雜，使得部分污染場址，並無法以現有技術整治達到特定之水質標準，其整治困難度亦較一般地下水污染為高，因此其相關技術之研究，持續有相當高的需求。

地下水中常見的污染物種類包括有機溶劑、重金屬及油品污染物等。其中有機溶劑可分為溶於地下水而分為水相液體(aqueous phase liquid, APL)與非水相液體(non-aqueous phase liquid, NAPL)兩種類型，其兩種類型有機溶劑的物化性質並不相同，對環境傷害及人體健康有不同程度的影響，於含水層中與地下水共存的情況亦全然不同。NAPL 呈現難溶解的情況，依密度特性又可分為密度小於水( $1 \text{ g/cm}^3$ )，稱之為輕質非水相液體(light non aqueous phase liquid, LNAPL)，以及前述密度大於水之 DNAPL，其中以 DNAPL 污染物對環境影響最嚴重。若 DNAPL 傳輸至地表下，在不同的地質條件下(土壤層或岩層)，殘留相 DNAPL 溶出分布於地下水中欲將所有的殘留相回收相當困難的，而這些殘留物在土壤孔隙中的 DNAPL 即成為地下水之污染源。過去知名的案例如美國 RCA 桃園廠的含氯碳氫化合物污染、中石化台南安順廠之五氯酚、汞及戴奧辛污染、彰化裕台化工之有機氯農藥污染、桃園中油煉油廠之燃料油外洩及觀音鄉高銀化工之鉛及鎘污染等，這些污染事件的發生不但對環境與自然資源造成直接的衝擊，相對的使人體的健康受到威脅，民眾的大規模抗爭不僅浪費社會成本，間接的造成社會的動盪與不安。

當地下水中發現之有機化合物多為非水相液體，非水相液體因為與水不相溶解或僅微溶於水，進入地下水層，而形成獨立之液相。由於 CAHs 具有密度大、難溶於水、低黏滯性與高移動性等特性，因此當 CAHs 進入地表下時會迅速向下



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

移動，而在沈移過程中將形成蒸氣相(vapor phase)、自由相(mobile phase)、殘留相(residues phase)及溶解相(dissolved phase)之不連續分布層。NAPLs 和水交界處會形成一界面，於此二種液體交界面上有「界面張力」，促使 NAPLs 和水相互不混合互溶。當 NAPLs 污染量大時，未溶於水且未揮發的部分，即以液相存在，被稱為自由相物質，NAPLs 會因為重力及毛細作用而在土壤顆粒孔隙中移動。當 NAPLs 以液態在土壤顆粒的孔隙中移動時，一部分的 NAPLs 會在極小的孔隙中被侷限住，而未能隨著主要的 NAPLs 物質持續移動，而形成土壤中的 NAPLs 的非移動性物質，此殘留物質會因土壤含水量的改變而再度溶於水中、再度揮發或再進入更細緻的孔隙內。不論是以何種型態存在，只要有 NAPLs 的自由相存在，該區域即存在著氣、液、固相的污染與 NAPLs 自由相的污染源(Dafny, 2017)，NAPL 殘留量將緩慢地溶於水，形成溶解相的 DNAPL，完全溶解可能需要數十年至數百年之久，造成土壤與地下水環境嚴重之危害。此外，DNAPL 可以穿透黏土層或岩盤極細的裂隙，經由這些裂隙而向下滲透污染很深的含水層，此將增加整治上的困難度(Buckley, 2017; Maire et al., 2018; Parker et al., 2018)。DNAPLs 的物質具有特殊的物化特性，例如高密度、低黏滯性、高揮發性、低溶解度及低吸附性等，因此，以工程技術而言，DNAPLs 污染的整治就更具挑戰性。由於 TCE 具滲透、揮發、脂溶等特性，且具致基因突變性、致癌性等毒性特徵，故經由人體直接接觸或呼吸道吸入，會對呼吸、消化、造血系統及中樞神經、皮膚、肺、肝、腎、心臟等器官造成危害(Lerner et al., 2018)。

## 2.2 地下水污染物處理技術之種類

土壤及地下水污染場址整治技術種類繁多，以整治結果而言，可分為三類：一是移除污染物或使其轉化為無害物質，二是防止污染物釋出，三是減少污染物釋出(Wang et al., 2016)。但主要原理可分為物理、化學與生物等三種，每種方法必須依據整治場址的需求與現地情況，找尋最適的方法加以整治才能獲得最大的效益(Lin et al., 2017)。

物理化學處理方法(physical/chemical treatment)具整治時間較短、設備普及等優點，惟無法將污染整治至完全無害，有增加整治計畫成本之虞慮(Cerqueira et al., 2014)。物化處理技術可分為現地(in situ)處理及離地(ex situ)處理兩大類，現地整治技術是在污染場址現場直接將污染物加以處理，或將污染物加以固定以避免污染物擴散，例如：土壤氣體抽取法(soil vapor extraction, SVE)、現地化學氧化法(in-situ chemical oxidation, ISCO)和透水性反應牆法(permeable reactive barrier, PRB)，化學氧化處理技術(chemical oxidation)被廣泛的運用於土壤及地下水污染的場址，其原理是將化學氧化劑注入地下污染區，經由破壞或轉化污染物，並降低其質量、





移動性及毒性的方法(Liao et al., 2018)，往往可快速降解污染物及符合經濟成本之效果，以往常用之氧化劑有過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、高錳酸鉀( $\text{KMnO}_4$ )及臭氧( $\text{O}_3$ )。

生物整治技術又稱作生物復育技術生物復育(bioremediation technology)是利用微生物分解土壤或地下水中之污染物，為一最自然的淨化程序 (Srivastava, 2015; Wong et al., 2017; Parween et al., 2018)。整治與復育經常交替使用，但整治較著重於污染物的去除，以降低污染風險為主要目標；而復育著重的不只是污染物的去除，更期望能恢復受污染場址的原有用途。相對而言，生物復育技術因其本身特性而較能符合後者的需求。對於物化整治程序而言，生物復育程序的整體反應速率較低，但長期而言，生物復育對場址的破壞性較小，較符合復育的需求。在現地應用上，由於自然衰減之整體反應速率較低，因此加強式生物復育技術備受重視，加強式生物復育是將生物復育技術加以改善、強化，使其反應速率更合於工程化的需求。目前常見加強生物分解的方式大致可分為以下：(1)添加生物可分解之營養鹽或電子接受者於污染場址，活化場址內既有的微生物族群；(2)在污染場址內直接添加對污染物具有分解能力的特殊菌種，或利用基因工程技術，發展具特定污染物分解能力之基因重組微生物；(3)利用生物處理將污染物經通氣或土壤洗滌後送至特殊生物反應器或是生物濾床、生物洗滌塔去除污染物，或是採用地耕法、堆肥處理。復育法(phytoremediation)、監測式自然衰減法(monitored natural attenuation, MNA)、現地地下水整治法及生物整治牆(emulsified biobarrier)(Kwon et al., 2016; Dong et al., 2018)。MNA 定義在無人為作用介入下，因現地自然發生的物理化學及生物作用，使得污染物的移動性、體積、毒性、質量或濃度，降低到足以保護人體健康和自然環境的水準。在地下自然環境之中，可將自然衰減分為吸附、稀釋、延散、生物降解及化學反應等五個主要作用，前三項為非破壞性的作用後兩項為可對污染物進行破壞性作用，其中最重要的降解因子為生物降解作用，然而，自然衰減依據污染源位置與地下水流方向判定區域不同，可能有不同的機制存在。含氯化合物污染場址之現地生物復育方式又可分為好氧生物復育、厭氧生物復育二種，則以生物性的厭氧還原脫氯反應為最重要。進行現地生物復育時污染場址需具備有生物生長必須之營養鹽、碳源、電子供給者、電子接受者以及適當之生長環境，否則需額外提供以刺激微生物生長。污染物在不同的條件下(例如：好氧或厭氧)，有不同的反應途徑，在厭氧的環境下，含氯碳氫化合物是作為電子接受者(electron acceptor)，氯離子將逐漸被氫離子取代。TCE 會依序降解成二氯乙烯(dichloroethene, DCE)及氯乙烯(vinyl chloride, VC)，環境如持續維持在厭氧的條件下且有足夠電子供給者，則可能依序降解為乙烯及乙烷，但若環境轉變為偏好氧的條件時，則會以好氧直接共代謝反應成二氧化碳(Sheu et al., 2015; Chang et al., 2018)。在厭氧還原脫氯程序中，由於含氯碳氫化合物



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

物是扮演著電子接受者的角色，若環境中無持續性提供碳源及電子供給者，則厭氧還原脫氯程序難以將 VC 分解完全，所以環境中必需要有適當的碳源，以做為微生物生長所需持續還原脫氯降解之程序，避免中間產物之毒性較原污染物更高。現地生物整治技術近年來已成為 DNAPLs 污染場址熱門的選擇，TCE 在厭氧下進行還原脫氯生物降解反應下，產生之低氯數副產物例如順式-1,2-二氯乙烯(cis-1,2-dichloroethene, c-DCE)、反式-1,2-二氯乙烯(trans-1,2-dichloroethene, t-DCE)、1,1-二氯乙烯(1,1-dichloroethene, 1,1-DCE)與 VC。證實現地生物整治技術可行，而現地生物整治可藉由基質藥劑的注入提高其還原能力與脫氯速率例如乳酸(lactate)、糖蜜(molasses)或食用油 (Yang et al., 2018b)或固態基質例如堆肥(compost)或稻殼(rice husk) (Jawaid et al., 2017)。然而，過程中需要頻繁的注入可溶性基質以保持其在地下水中符合一定量之濃度，這導致在整治執行和維護成本顯著增加。至於固態基質，被限制於淺層地下水整治與可開挖空間。此外，處理系統堵塞亦可能導致現場應用維護問題與經費增加 (Tsai et al., 2014)。

生物整治技術是添加、植入或自然發生的過程促進微生物生長，將受污染的土壤或污泥中的有機物經共代謝或氧化還原作用，降解或轉化成較低毒性或是二氧化碳及水等無毒性之產物，以達到整治之目標。目前新穎整治技術方面，應優先採用現地(in situ)、被動式(passive)及生物(bio)為主之整治系統 (Jeon et al., 2016)，而美國環保署認為較符合現地、被動及生物整治概念之技術即包括現地生物復育(in situ bioremediation, ISB)結合透水性反應牆(permeable reactive barrier, PRB)。PRB 進行地下水整治時，可在污染源的下流設立一道垂直於地下水水流方向之溝渠或反應牆、一排垂直式或水平式之整治井、或一個漏斗式及水處理系統，溝渠、整治井或漏斗式集水處理系統內置反應物質，這些系統統稱被動式現地透水性反應牆(圖 2.1)。當污染之地下水流過此透水性之反應牆時，污染物和反應牆內之反應物質發生生物或物理吸附反應而被分解或移除，流過反應牆地下水即為整治過之地下水。在透水性反應牆內可能包含某些物質，以利用生物及物理的處理程序處理污染物，當污染帶隨地下水通過反應牆時，反應牆中之反應物質會對污染物產生生物性降解，使污染物被分解成較無害之副產物，進而阻止污染物穿過污染場區邊界或切斷污染帶來源，再由自然衰減過程之侷限污染帶 (Lee et al., 2015)。對於含氯碳氫化合物整治而言，可分為植生復育法、透水性整治牆、監測式自然衰減法、現地地下水整治法及乳化油生物屏障(emulsified biobarrier)，其中以緩釋型聚合膠體基質生物屏障整治技術較為經濟實惠，因注入緩釋型聚合膠體基質不僅提供微生物所需之生長基質，能快速使 TCE 包覆於油滴中，並阻攔其擴散範圍，且對環境衝擊較小。目前利用生物可分解之有機基質注入整治區，藉以刺激現地厭氧生物降解整治受污染之地下水，現已有多個案例 (Jochum et al.,



2015; Jeon et al., 2016; Cecchin et al., 2017)。

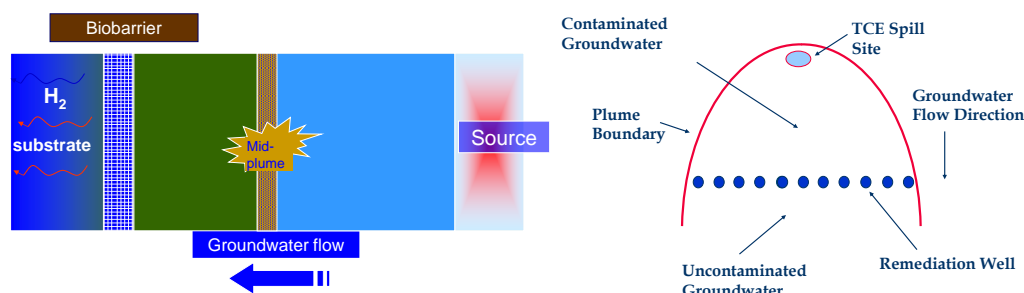


圖 2.1 含氯脂肪組碳氫化合物現地生物復育之示意圖(本團隊繪製)

## 2.3 TCE 生物降解反應機制

含氯脂肪族化合物的生物復育法有兩種；(1)是透過天然的機制，污染物以自然衰減的方式，降解為毒性較小或是無毒性的物質；(2)生物復育方式，是透過添加有利的物質，活化生物系統中的微生物，以達到強化天然衰減的目的。許多生物降解的機制已經經過理論和實驗的驗證，而且根據文獻資料整理的結果，大概可將含氯脂肪族化合物在生物系統中的降解機制，區分為兩大類；(1)好氧氧化作用 (aerobic oxidation)：又可分為好氧直接氧化作用 (direct) 與好氧共代謝 (cometabolic) 氧化作用；(2)厭氧還原脫氯作用 (anaerobic reductive dechlorination) 又可分為厭氧直接還原脫氯 (direct) 與厭氧共代謝 (cometabolic) 還原脫氯。若提供生物系統適當的條件，不管好氧氧化或是厭氧還原脫氯都會自然的發生，例如添加電子供給者，添加電子接受者或是添加營養鹽。TCE 由於含氯數較高，其降解方式是以還原反應為主，而 VC 含氯數較低，其降解方式則是主要以氧化反應 (Johansson, 2017; Chang et al., 2018; Saiyari et al., 2018)。

### (1) 好氧氧化與好氧共代謝作用

好氧直接氧化作用，是將污染物利用生物分解的方式降解，此時，污染物同時作為電子供給者和主要生長基質，在這當中，需要有微生物來驅動反應的發生。電子由污染物傳遞至電子接受者，此時的電子接受者為氧。VC 被氧化成二氧化碳，同時將氧還原為水。地表下有氧存在的好氧區，CAHs 污染物中，僅VC 可以直接氧化的方式，被氧化成無毒害性的二氧化碳與水(Kumar et al., 2018)。但在環境微生物中，具有直接氧化至VC的菌株卻很少，文獻彙整迄今，僅 *Mycobacterium aurum* L1、*Mycobacterium* sp. E20、*Xanthobacter* sp. 和 *Pseudomonas aeruginosa* MF1 (Stroo et al., 2014)。在好氧狀態下藉由好氧共代謝使主要生長基質所誘導產生的氧化酵素，藉以分解TCE的處理方式。雖然TCE能夠藉由氧化酵素加以分解，但其無法做為微生物的能量及碳源；且在TCE的分解過程中，不僅





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

無法如分解主要生長基質時具有再生還原能的能力，其分解過程所產生的有毒中間產物亦可能會對微生物產生毒性抑制的作用，一旦微生物無法持續獲得主要生長基質，微生物活性會逐漸衰減，同時，氧化酵素還原能無法再生，以及中間產物毒性抑制的作用下，微生物共代謝分解TCE的能力將會逐漸消失。因此，適當添加營養基質可持續提供微生物利用行共代謝，不但可提升微生物活性，還可以降低中間產物毒性抑制的作用，使污染物有效被微生物共代謝降解。在好氧狀況下，TCE 和VC 均可以利用此種共代謝機制降解。VC 的共代謝作用，已有相當多的研究，可作為其共代謝初級基質的物質，包括乙烯、丙烯、異戊二烯、甲烷、乙烷、丙烷、3-氯丙醇和氨(Luo et al., 2014)。另外，研究證實以間歇的供給氧和甲烷到地表下的方式，可以刺激含水層中TCE、c-DCE 和VC 的生物降解(Frascari et al., 2015)。過去研究結果顯示，甲烷的添加對促進共代謝生物降解非常好，但是其他的研究結果卻認為添加甲苯與酚作為電子供給者，比添加甲烷更能有效的促進地下水中TCE、c-DCE 和VC 的共代謝生物降解 (Chheda and Sorial, 2017)。可共代謝TCE 之菌株及其使用之生長基質如 *Pseudomonas cepacia* strain G4 (phenol, toluene, o-cresol), *Pseudomonas putida* F1 (toluene), *Methylosinus trichosporium* OB3B (formate, methanol), *Methylocystis* sp. strain M (methane), *Mycobacterium vaccae* JOB5 (propane), *Nitrosomonas europaea* (ammonia), *Xanthobacter* strain Py2 (propylene)和 *Eschlorichia coli* (toluene) (Mao et al., 2015)。

## (2) 厭氧還原脫氯作用

受污染之地下水場址中已被發現涉及到生物還原脫氯作用有幾個重要因素：在場址內有無脫氯菌種，有無產氫菌的存在與活動，提供足夠的電子接受者使脫氯、硫酸鹽還原和甲烷菌所需的營養維持其活性 (Mao et al., 2017; Shapiro et al., 2018; Sheu et al., 2018a)。而厭氧性的程序是使用不同的生物降解機制，於厭氧分解過程可包含三階段，分別為水解酸化、醋酸形成及甲烷化，以提供之後的還原脫氯作用所需的電子接收者及電子供給者(如乳酸鹽、糖蜜、醇類、氫氣及砂糖等)。利用硝酸鹽、硫酸鹽、三價鐵、氫離子及二氧化碳當作最終電子接受者。此時氯原子會被氫原子所取代，慢慢由 PCE 降解成 TCE、c-DCE、t-DCE、VC 及乙烯(ethene)，接著再進行礦化作用，將化合物轉變為成  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cl}^-$  等無機物，此過程稱為直接代謝還原脫氯又稱為鹵化呼吸作用(Yang et al., 2017c; Liu et al., 2018a)，微生物利用電子供給者產氫及醋酸形成之主要代謝途徑(本團隊繪製)如圖 2.2。微生物直接利用 TCE 和 VC 作為電子接受者，驅動氧化還原反應的發生，在這個過程中，伴隨著能量的產生。在共代謝還原脫氯反應中，微生物利用其他物質作為電子接受者，驅動氧化還原反應的發生。理論上，在大部分的厭氧狀況下，還原脫氯作用都會發生，但是研究發現，最有效的厭氧還原脫氯作用，是透



過還原硫酸並生成甲烷的方式，而且如同好氧氧化作用，直接還原脫氯比共代謝還原脫氯快。每一階段之還原脫氯產生時，其反應所生成之能量則可被微生物所利用生長，當添加營養基質促進微生物生長而降解污染物效率最佳(McLean et al., 2015; Varjani, 2017)。過去研究發現受污染之地下水不僅體積龐大且大多屬於無氧狀態，且地表下厭氧性之微生物可轉化不同種類之有機及無機污染物，因此厭氧之微生物降解對現地生物整治十分重要(Ni et al., 2018)。由過去現場量測數據顯示，污染源存在於地下水中一段時間後，有機污染物之厭氧降解反應將自然發生，換言之，厭氧反應可以有效的整治政府所表列優先處理之污染物，如氯化乙烯類化合物等嚴重污染之含水層，亦可經由厭氧處理將高毒性氧化價位型態轉化為低毒性還原價位型態。因此，現地厭氧生物處理已成為地下水污染整治之主要替代方案。另外，在某些情況下，硝酸還原菌或是硫酸還原菌與甲烷生成菌競爭的結果，會抑制甲烷生成菌的活性和厭氧還原脫氯作用的程度。研究發現，*Dehalorespiring* 菌屬之微生物可進行還原脫氯反應，另外被發現亦可進行還原脫氯之菌群如 *Anaeromyxobacter*, *Desulfitobacterium*, *Trichlorobacter* 和 *Dehalobacter*。除此之外，已被發現相關菌株可針對 PCE 和 TCE 進行還原脫氯產生 c-DCE 如 *Sulfurospirillum multivorans*, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfuromonas michiganensis*, *Desulfitobacterium* spp. PCE-1(Xiu et al., 2010)，*Geobacter* strain SZ (Mészáros et al., 2013)，若脫氯不完全會產生二氯乙烯、氯乙烯的累積，其中氯乙烯屬於致癌物且毒性較 TCE 更高(Pérez-de-Mora et al., 2018)，近年來多數研究發現脫氯菌屬(*Dehalococcoides* spp., DHC)，該菌屬可完全使氯化乙烯完全脫氯形成乙烯(Shapiro et al., 2018)。目前已知有五種 *Dehalococcoides* 菌種如 strain 195, strain CBDB1, strain BAV1, strain FL-2, and strain GT (Matturro et al., 2016)，這些 *Dehalococcoides* 菌種皆可將 PCE 和 TCE 還原脫氯形成 VC。然而，僅有 BAV1 和 GT 可將 VC 完全脫氯形成乙烯(Kranzioch et al., 2015)，且不同之菌種其脫氯步驟亦不相同。若整治場址中並無存在相關微生物菌群時，則需要生物刺激促使現地微生物生長降解污染物。

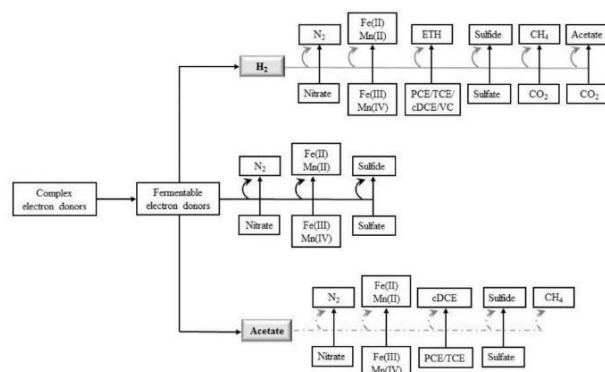


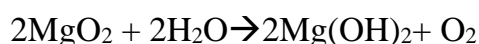
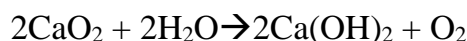
圖 2.2 微生物利用電子供給者產氫及醋酸形成之主要代謝途徑(本團隊繪製)



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

## 2.4 不同基質於土壤地下水之應用性

近年針對含氯有機物污染整治所使用之基質多選擇具緩慢釋放有機基質特性之產品，因可長期促進厭氧生物降解目標污染物。緩慢釋放基質包括纖維素、幾丁質、釋氫物質(Hydrogen Release Compound, HRC®)及乳化油。釋氫物質為聚合酯合成物，可在水中長期釋放乳酸物質維持厭氧生物降解含氯溶劑或其他污染物(Harkness and Fisher, 2013; Chen et al., 2014; Yang et al., 2018b)，滲透性反應牆除了對有機物之去除，常用來以吸附和沉澱等方式去除地下水中之重金屬及營養鹽等物質(Shoji et al., 2016)。因此，現地整治牆之技術並不侷限在某一種反應，廣義來說，任何能在現地以被動之方式造成污染物濃度降低之方法均可稱之為現地整治牆技術。由於整治牆是符合經濟效益之整治技術，因此受到美國環保署之推動和鼓勵，根據美國環保署對地下水整治之研究報告指出，釋氧物質(oxygen release compound)的添加是適合增加地下水中溶氧之方法之一。近年許多研究報告指出，在污染區添加該物質，確實可達到釋氧的效果，並能夠節省設備成本及操作費用，而釋氧物質能長期提供有氧分解所需之氧氣。釋氧物質主要使用原理是添加  $\text{CaO}_2$  或  $\text{MgO}_2$  等過氧物質，其中  $\text{CaO}_2$  或  $\text{MgO}_2$  將被用為釋氧化學物質。使用水泥或粉狀黏土凝結其他組成以製做塊狀釋氧物質，可將設計之釋氧物質放入整治井、整治渠、或 funnel and gate system 內以處理污染之地下水。 $\text{CaO}_2$  或  $\text{MgO}_2$  和水接觸後將產生以下的反應：



經由相關文獻指出，當注入乳化油至受污染之地下水層時，可有效處理污染物評估注入食用油基質(Edible Oil Substrate, EOS®)進行現地生物整治技術處理受過氯酸鹽及 1,1,1-三氯乙烷(1,1,1-trichloroethane, 1,1,1-TCA)污染之地下水。研究中，於 2 天內將 EOS®連續注入 10 口注入井中，建立一個 15 m 長的生物透水性整治牆(bio-barrier)。經由 2.5 年監測發現，在 EOS®注入處發現強還原反應區，區域間之溶氧、硝酸鹽及硫酸鹽皆被消耗殆盡，同時發現溶解性鐵錳及甲烷濃度增加，而注入井之過氯酸鹽在注入 EOS®約 5 天後由原本濃度約 3,100-20,000 降解至  $<4 \mu\text{g/L}$ ，2 年後注入井下游之過氯酸鹽濃度約  $6 \mu\text{g/L}$ ，遠低於注入井上游濃度  $13,100 \mu\text{g/L}$ 。因此得知注入 EOS®後可大量轉移氯化溶劑及生物菌落轉移適應情形發生。其所加入之乳化油可以經由發酵後產生之氫氣及低分子量之脂肪酸(醋酸鹽、乳酸鹽、丙酸及丁酸)，用以提供厭氧生物降解污染物時所需之碳源及能量。目前常見之市售乳化基質：RS™ Emulsified Vegetable Oil Substrate(C)、LactOil® Soy microemulsion、EOS®、EHC®、Newman Zone®及 CAP-18™...等皆具有生物





可降解性，並可以完全促使污染物還原脫氯，可緩慢釋放有機基質，長期促進厭氧生物降解目標污染物(Watson et al., 2013; Sharma et al., 2017)。

若使用食用油以乳化型態注入時，其液滴細小且均勻，因此更容易擴散至不同種類之土壤孔隙間(Muller et al., 2018)。當食用油注入至地下含水層時，三酸甘油酯會經由厭氧發酵水解出甘油(醇類)和多鏈脂肪酸(Long-Chain Fatty Acids, LCFAs)，由於甘油具有生物分解性且易溶於水，因此當甘油存在於系統中時，則會被快速分解或刺激微生物。因 LCFAs 水溶性較差則吸附於土壤孔隙間，並緩慢氧化成短鏈脂肪酸、醋酸鹽( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )及氫氣( $\text{H}_2$ )，其持續生成氫氣及醋酸鹽有助於污染物削減。另外這些脂肪酸通常以亞麻油酸(linoleic acid)型態存在於蔬菜油中(Salman et al., 2015)，亞麻油酸可用於生物整治之化學平衡計量表示之，1 mole 亞麻油酸經生物分解可產生 9 mole 醋酸及 14 mole 氫氣，當醋酸完全氧化分解產生  $\text{CO}_2$  時，則產生 28 mole 氫氣；但醋酸鹽並無法作為還原脫氯之電子供應者(Lyon and Vogel, 2013)，市售乳化基質種類及特性如表 2.1 所示。綜觀上述市售乳化基質，其特點多為緩釋碳源、可食用油與部分生物生長刺激元素，其中多數藥劑皆會釋放脂肪酸、乳酸鹽、醋酸鹽等有機酸，易使得水體酸化，而乳化油品亦因油滴吸附與黏滯度較高之特性而不易於地下水中之土壤層移動；另一方面，氣候變遷與糧食危機的全球化議題，持續發展食品級蔬菜油、大豆油等乳化基質產品勢必暫緩腳步，轉換為更多元化之生物基質發展空間， $\gamma$ -PGA 為全天然生物可分解性高分子，由於其構成成份相當奇特，因而具有許多一般意想不到的結構特性和多功能特性，極適合於跨領域的工業應用，具高度經濟價值。 $\gamma$ -PGA 的工業化生產技術平台已在台灣成形，但其特殊的化學、生化、營養、生醫、農業和工業上應用則有待積極開發和進一步加以商業化推廣應用。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

表 2.1 市售乳化基質種類及特性 (本團隊繪製)

名稱	成分	特點
RS <sup>TM</sup> Emulsified Vegetable Oil Substrate (C)	food oil: 45-60% lactic acid: 4% food Additive/Emulsifiers/ preservatives: 10%	緩釋基質 (Slow Release Substrates, SRS <sup>®</sup> ) 亦稱乳化植物油基質 (Emulsified Vegetable Oil Substrate, EVO)，於還原脫氯或厭氧降解過程中可當作電子供給者，以緩慢釋放營養物質長達3-5年供給微生物利用
LactOil <sup>®</sup> Soy microemulsion	food oil: 30% lactic acid: 35% emulsifier: 10%	LactOil <sup>®</sup> 是利用穩定熱力學所配製而成的微乳液配方，方便於現場混合注入使用，以提高於含水層內的分佈，成本較於其他市售乳化植物油便宜。
3-D Microemulsion (3DMe <sup>TM</sup> )	glycerides	3DMe <sup>TM</sup> 可長期釋放乳酸並產生氫氣，使得厭氧生物降解含氯有機物和脂肪酸，提高還原脫氯之效率。3DMe <sup>TM</sup> 結合 Hydrogen Release Compound (HRC <sup>®</sup> )技術，其產氫可長達3-4年。
EOS <sup>®</sup>	soybean Oil: 59.8% soluble Substrate: 4% Emulsifier: 10%	EOS使用天然無害的植物油及食品級界面活性劑，黏性低易於注入與傳輸，注入後效果可持續3-5年。
EcoClean /EcoClean-E <sup>TM</sup>	食品級高分子量碳氫化合物	EcoClean /EcoClean-E為乳膠狀，可當作微生物的營養源，能緩慢並持續的維持淨化環境。針對難透水性的土壤和VOCs濃度高的污染有效，整治時間約3-12個月。
EHC <sup>®</sup>	organic amendment: 52-82% iron: 18-48%	EHC <sup>®</sup> 以食品級之碳源及營養物質包覆零價鐵(zero valent iron, ZVI)，利用生物與非生物還原脫氯機制刺激厭氧環境下生物降解能力，可減少副產物的產生，並可調整地下水中pH值避免酸化。
Newman Zone <sup>®</sup>	vegetable oil: 46% sodium lactate: 4%	Newman Zone <sup>®</sup> 為具有快速分解(乳酸鹽)及緩慢分解(蔬菜油)之產品，此外具有能有效刺激微生物生長，並且長期提供還原脫氯降低化有機物濃度。快速分解機質可短時間內建立厭氧條件，此緩釋機質可提供長達5年。
CAP-18 <sup>TM</sup>	天然蔬菜油	CAP-18 <sup>TM</sup> 產品應用於厭氧生物復育環境，如土壤復育和地下水等相關環境。此產品可用於降解多種污染物之地下水，包括氯化溶劑，硝酸鹽，硫酸



		鹽，高氯酸鹽，爆炸物和其它化合物。此生物激活劑提供了100%的天然碳源，可使脂肪酸長期釋放，並創造厭氧生物復育所需要的環境條件。
--	--	--

## 2.5 地下水 pH 緩衝溶液與甲烷抑制劑探討

pH 值被認為是對微生物進行還原脫氯反應的一個強烈影響因素；c-DCE、VC 到 ethene 已經有研究顯示，當 pH 值低於 6.2 時能夠被抑制(Philips et al., 2013; Meckenstock et al., 2015; Yang et al., 2017b; Yang et al., 2018b)，當進行 TCE 厭氧還原脫氯時，維持地下水中的 pH 對還原脫氯是一個重要之影響因素，每一種微生物都有專屬最適生長之 pH 值環境，雖然在低(高)pH 值環境中之嗜酸(鹼)菌已被篩出，但大多數之微生物皆適於中性環境，有利於微生物生長反應(Yang et al., 2017a)。許多可進行還原脫氯之重要菌群皆適於中性生長環境，如 *Dehalococcoides* 菌群，目前唯一已知能夠完整還原乙烯，四氯乙烯脫氯菌群之生長 pH 值為 6.8-7.5 之間。可進行還原脫氯氯化乙烯和乙烷之 *Desulfitobacterium* 菌群之最適 pH 值範圍亦接近中性的，維持穩定的 pH 環境是促進脫氯反應一個重要的環節。快速的脫氯反應將會產生出大量的鹽酸(HCl)和碳酸(H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)，是可能會導致 pH 值下降原因之一，相關研究證實 pH 值酸化會導致脫氯之效率變差或抑制之可能性(Yang et al., 2017b)。由過去文獻顯示一個富集培養實驗，於現場利用乳化油基質(EOS®)，其中包含了新型的 *DHC* 菌株進行生物整治處理，最後可能使 PCE 降解到 ethene。EOS® 以乳酸作為電子提供者為最優異的，其可促進更快的脫氯反應，使較少 c-DCE 和 VC 的累積。不同 pH 值的影響(5.5、6.0、6.5、7.0、8.5 和沒有 pH 緩衝液)在 VC 脫氯成 ethene 情況下，在緩衝介質保持 pH 6.5-7.5 時進行富集培養。最高 ethene 的產生發生於緩衝介質到 pH 7 時。當 pH 值下降到 6 或更低時 ethene 的產量最少，發現 c-DCE 的脫氯反應在 pH 5.5 時完全被抑制。然而，在低 pH 值下仍然有顯著的甲烷化產生。在 pH 8.5 的培養中有較強的抑制作用，使得 TCE 的產量最少，但持續產生甲烷。當培養物產生鹽酸而沒添加 pH 緩衝液時，pH 值會下降且低於 6 造成 ethene 的產生但利於硫酸鹽、甲烷及脫氯菌還原反應(Liang et al., 2013)。於還原脫氯反應時，鹽酸的產生使重碳酸鹽生成二氧化碳(碳酸)，且不易逸散致大氣而殘留於水體中。當厭氧還原脫氯菌群需要與其他非氯化電子接受者(如硫酸鹽及三價鐵)競爭氫，這些非氯化電子接受者不僅使基質使用量增加，更影響還原作用中酸化反應的生成。為確保厭氧還原脫氯作用的產生，土壤緩衝能力是維持 pH 穩定之必要的考量。而反應中 DNAPL 還原脫氯需要大量的鹼度，其反應產生的酸化物質可能使現地緩



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

衝能力飽和，因此在現場施作時常需要添加大量的化學品維持 pH 穩定(Harkness and Fisher, 2013; McLean et al., 2015)。地下水提高緩衝能力通常以注入高溶解性基質或鹼(酸)性物質，提高地下水之鹼(酸)度，因此，必須克服維持地下水中之緩衝能力維持一個相對穩定 pH。目前提高地下水之緩衝能力，有兩種普遍被接受的方法用於提高含水層中 pH，第一種最常用之方法為，利用循環式抽取將鹼性水溶液通過注基質區，以提高地下水之鹼(酸)度，常用的藥劑包括氫氧化鈉水溶液、氫氧化鉀(KOH)、碳酸鈉( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、碳酸氫鈉( $\text{NaHCO}_3$ )及矽酸鈉( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ )。以循環抽取方式灌注鹼性溶液可有效提高水中 pH，但水體中酸性礦物質會消耗鹼性溶液，避免鹼性溶液被大量消耗，必須再灌注大量緩衝溶液以提高地下水 pH 值，注入過量緩衝溶液會超過地下水體所能負荷之酸鹼值，且增加整治成本，亦會造成環境與現場操作之隱憂。第二種提高水中鹼度之方法為，透過鑽井機以重力流或是壓力流的方式，將鹼性泥漿相的物質灌入含水層中，pH 調整藥劑為氧化鎂( $\text{MgO}$ )、氫氧化鎂( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ )、碳酸鎂( $\text{MgCO}_3$ )、氧化鈣( $\text{CaO}$ )、氫氧化鈣( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )和碳酸鈣( $\text{CaCO}_3$ )但鹼性藥劑，須額外支出機具費用進而增加整治成本(McLean et al., 2015; Kissell, 2017)。鹼度亦可由硝酸鹽還原、硫酸鹽還原和氫氧化鐵  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  來產生，黏土中的離子交換和氫氧化鐵可提供強烈的緩衝 pH 能力。在 pH 值接近中性時， $\text{H}^+$  會往黏土和鐵的氧化物有吸附的作用，可以限制 pH 值的下降。如果含水層中的 pH 值很低時，便要加入大量的鹼來提供它的鹼度，使地下含水層維持在中性的條件下，以利微生物生長。

## 2.6 高分子聚合物之應用性

### (1) 聚麩胺酸簡介

聚麩胺酸( $\gamma$ -PGA)是以麩胺酸(glutamic acid, GA)為基礎原料，經由微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)並結合有機碳源、氮源及礦物質以液態發酵行生物聚合而成的一種生物可分解性的高分子材料(Gates-Hollingsworth et al., 2015; Sheu et al., 2018a; Yang et al., 2018a)，本計畫使用味丹公司開發之 PGA 發酵液產品，係以麩胺酸(L-glutamic acid)為原料加入納豆菌(*Bacillus subtilis* var. natto)進行液態發酵而成(Pang et al., 2018; Wang et al., 2018)內含豐富的  $\gamma$ -PGA，以及麩胺酸、葡萄糖、蛋白質、礦物質、維生素及多種生化活性物質，是取之天然、有機、用之環保的植物營養促進劑。其結構(如圖 2.3)，內含豐富的聚麩胺酸是一種高分子之綠色產品。



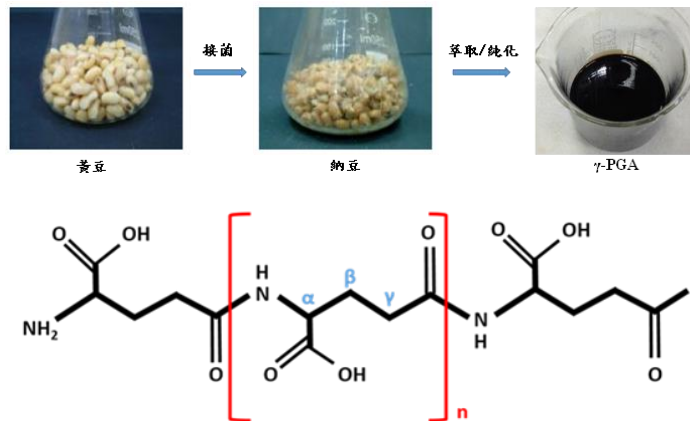


圖 2.3 聚麩胺酸( $\gamma$ -PGA)之結構物(Liguori and Faraco, 2016)

最早  $\gamma$ -PGA 被發現於 *Bacillus anthracis* 的莢膜，在日本傳統發酵食品納豆的黏性物質中亦發現含有大量的  $\gamma$ -PGA。聚麩胺酸為生物性高分子聚合物，其化學結構特殊，因此已廣泛的應用於食品工業、健康食品、化妝品、醫藥工業、農業應用及環境保護等領域(陳氏，2014)。 $\gamma$ -PGA 主要是經由二種不同的生物化學轉化機制聚合而成。一種為 *de novo* Bioconversion Pathway，此為固態發酵生產所進行者，不需要 L-GA (L-Glutamic acid) 作誘導物質。另一種方法為液態發酵生產，以 L-GA 當作誘導物質進行的生化轉化聚合機制為 *Salvage Bioconversion Pathway*。

液態發酵方法適用於大量生產  $\gamma$ -PGA，所以也是工業上大量生產唯一之選擇製法， $\gamma$ -PGA 的分子式為  $(-[-NH-CH(COOH)-(CH_2)_2-CO-])_n-$ ，其結構組成為  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折疊，其分子鏈上具有活性較高的側鏈羧基(-COOH)、胺基(-NH)及羰基(-CO)等多種官能基團。三個官能基的  $H^+$  解離常數各為  $pK_\alpha = pK_1 = 2.13 \sim 2.2$ 、 $pK_\gamma = pK_2 = 4.25 \sim 4.32$ 、 $pK_3 = 9.7 \sim 9.95$ ，其各官能基活性依序為  $\alpha-NH_2 > \alpha-COOH > \gamma-COOH$ ，這些官能基團提供聚麩胺酸進行化學或生物反應的活性(Hisada and Kawase, 2017)。在  $\gamma$ -PGA 分子結構中， $\alpha-COOH$  與  $\alpha-NH_2$  縮水結合成為  $\alpha$ -peptide bond ( $\alpha$ -蛋白鍵)； $\gamma-COOH$  與  $\alpha-NH_2$  縮水結合成為  $\gamma$ -peptide bond ( $\gamma$  蛋白鍵)。由於強力  $\alpha-COOH$  與  $\gamma$ -peptide 鍵之  $-NH_2$  所形成的氫鍵(hydrogen bonding)，再加上分子結構上之外在形態改變(conformational change)，使得  $\alpha-COOH$  基變成不解離狀態以至  $pK_\alpha = pK_1 = 0$ ，使整個  $\gamma$ -PGA 分子成為極緊密而收縮的  $\alpha$ -helix conformation，因而呈現強烈的疏水性(hydrophobic)。由於  $\gamma$ -PGA 為全天然生物可分解之分子材料，可以工業化大量生產。天然的  $\gamma$ -PGA 之分子量約為  $10000 \sim 1000000$  Da，其分子大小取決於發酵時間及水解酶等因素(Zeng et al., 2016)，聚合度(degree of polymerization)約為 1,000 至 15,000 個麩胺酸，在醫藥、農業和化妝品工業及環境等應用效果非常顯著。由此可知  $\gamma$ -PGA 所具有的結構上功能性其極具經濟價值，



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

可以其在跨工業領域地方的應用(Chen et al., 2014)。表 2.2 列述  $\gamma$ -PGA 在各種工業上的潛在應用，由於用途廣泛，對於目前化學合成高分子具有較優異的取代性，且在安全及環保上有其絕對的必要性，展望未來  $\gamma$ -PGA 將成為全球最重要的高分子素材之一。

表 2.2  $\gamma$ -PGA 應用之工業類別(本團隊繪製)

工業別	產品別	化學與生化功能特性
食品工業	增粘劑/安定劑	改進液體食品之粘性，改進食品質地及口感等。
	動物飼料營養助劑	促進鈣吸收與骨質成長，增加蛋殼硬度，改善蛋白及蛋黃品質。
	抗凍劑	提昇冷凍食品之抗凍性。
健康與保健食品	健康營養助劑	促進鈣吸收，改善骨質疏鬆問題。
化妝品工業	保溼劑	改善保養皮膚，減少皺紋。
淨水處理/都市用水	吸附重金屬	去除水中重金屬和放射性金屬離子。
污水處理工程	生物可分解性絮凝劑	可代替 polyacrylamide 或 PAC。
醫藥工業	緩釋藥物載體	眼用藥劑、癌症藥劑或基因療法之生物相容性的載體。
農業應用	土壤改良，種子被覆	高吸水/保水功能。
衛生器材製品	尿布，衛生棉	高吸水劑。
特種功能性製品	生物晶片，LCD 面板	生物體相容性。

## (2) $\gamma$ -PGA 在環境上之應用

$\gamma$ -PGA 於水處理之應用上，因  $\gamma$ -PGA 為多價陰離子聚合物，其 COOH 官能基所帶的靜電會與金屬離子相互影響，故具有可螯合重金屬之特性，對於二價、三價金屬離子( $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cr^{2+}$ )具有相當良好之處理效果(Yang et al., 2017d)，其結合後所形成之鹽類結構如圖 2.4 所示。所以  $\gamma$ -PGA 除了應用於吸附土壤、海洋、垃圾以及廢水重金屬外，亦逐步應用在生物膜(biofilm)上來處理水中重金屬之成效，表 2.3 為過去學者將  $\gamma$ -PGA 應用在環境上處理污染物之整理，均有不錯之成效。

另有學者研究發  $\gamma$ -PGA 具有 pH-responsivity 之特性，當環境中之 pH 值產生變化時， $\gamma$ -PGA 能與溶液中之氫離子( $H^+$ )結合或分離達到平衡之狀態，在這種結合和分離中，其微觀分子結構的變化會導致其體積、形態或結構的變化(Khalil et al., 2016; Luo et al., 2016)。因此  $\gamma$ -PGA 在農業肥料使用上具有緩衝之作用，能夠





有效平衡土壤之酸鹼性，避免長期使用化學肥料所引起之土壤酸化問題(張等，2014)。綜觀上述， $\gamma$ -PGA 應具有提供電子之功能促進氯乙烯還原脫氯成乙烯之功能，因  $\gamma$ -PGA 為高分子聚合物，本身可做為一豐富碳源供給微生物利用，因此其應用於現地地下水厭氧生物處理技術應有其適用性與優勢。 $\gamma$ -PGA 與其他基質比較，在處理 TCE 污染物時具備以下之優勢：(1)整治時程短，不須大量之灌注量即可達到法規標準；(2) $\gamma$ -PGA 本身具備有緩衝地下水酸鹼值之能力，可以解決以往釋碳基質經微生物利用後會有逐漸酸化之情形。

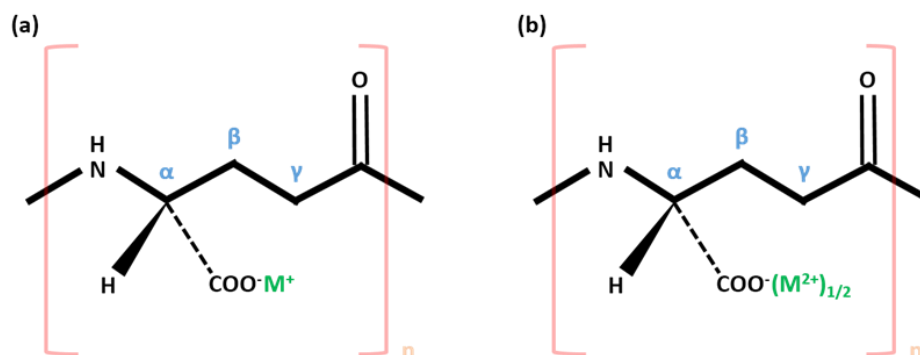


圖 2.4  $\gamma$ -PGA 之鹽類結構(a)與一價金屬鍵結；(b) $\gamma$ -PGA 與二價金屬鍵結(Yang et al., 2017d)

表 2.3 歷年學者在環境上應用  $\gamma$ -PGA 之彙整

作者	$\gamma$ -PGA 研究內容	處理對象	結果摘要
陳氏，2011	$\gamma$ -PGA 與天然棉絮進行聚合物的交聯，在不同之條件下處理重金屬。	鐵離子	當樣品水溶液 pH=6 時經過抽濾，其去除水中鐵離子效果最佳。
王等，2011	$\gamma$ -PGA 溶液與明膠交聯製成明膠膜處理重金屬。	銅、鈷離子	$\gamma$ -PGA 與明膠交聯製成的明膠膜具有吸附重金屬( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ )的能力。
Inbaraj et al., 2009	$\gamma$ -PGA 不同參數下對重金屬汞之吸附效應。	汞離子	使用鹽酸調節 $\gamma$ -PGA 之 pH 值至 2，可回收 98% 汞。
WANG et al., 2011	銅、鈷離子	$\gamma$ -PGA 與明膠交聯製成明膠膜處理重金屬。	$\gamma$ -PGA 與明膠交聯製成的明膠膜具有吸附重金屬( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ )的能力。
Chiu, 2015	三氯乙烯	以 $\gamma$ -PGA 為	$\gamma$ -PGA 具有 pH 衝能力避免酸



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

		生長基質，瞭解生物降解污染物能力。	化現象，可營造適合脫氯菌生長之環境，達到降解 TCE 目的。
Yang et al., 2017d	以三種形式的 $\gamma$ -PGA 作為清洗劑探討土壤中重金屬去除效率。	鉻、鎳、銅及鋅離子	三種聚麩胺酸(RB、NHP 以及 NLP)清洗土壤中 Cr、Ni、Cu、Zn 等金屬之結果顯示，RB 對目標金屬有最佳之去除效果。
Wang et al., 2018	鎘、銅、鎳離子	試驗各種 pH 值、接觸時間和初始離子濃度下吸附溶液中的鎘、銅、鎳離子的濃度。	混合吸附劑可以作為吸附各種重金屬離子的吸附材料，並且在 pH 2~10 的範圍內表現出更高的吸附能力。
Sheu et al., 2018a	$\gamma$ -PGA 作為基質針對降解 TCE	三氯乙烯	添加 $\gamma$ -PGA 使 <i>DHC</i> 的生長從 $1.03 \times 10^4$ 增加到 $2.6 \times 10^6$ gene copies/g soil，三氯乙烯脫氯率提高。 $\gamma$ -PGA 可以作為碳底物來提高氯化物的還原脫氯效率。

## 2.7 分子生物技術於污染整治上的重要性與應用

過去分子生物利用分析核酸、磷脂、或其他的生物指標(microbial biomarker)來提供何種菌種及其數量能使污染物有效分解。因此，分子生物之監測技術可用以做為評估現地生物分解之方法之一(Lien et al., 2016)。為了評估環境微生物是否有降解污染物的潛能，利用分子生物技術偵測環境中的特定微生物、基因或酵素活性。使用DNA 探針與環境DNA或RNA雜合，可了解場址中酵素的分布、改變。另有酵素活性探針，這種探針為非螢光化合物，經過降解酵素轉化後變成螢光物質，偵測螢光量，便可知道降解酵素的活性(Kuo et al., 2013)。萃取環境微生物RNA或DNA，以即時定量聚合酶連鎖反應qPCR降解基因或16S rRNA 之保留區片段，定量環境中降解基因套數或微生物數量，藉以監測環境微生物降解污染物潛能。

目前微生物演化分類上最被廣泛使用的親源標記分子是rRNA 的基因，rRNA 的基因是由高度保留性區域和變異性區域所組成。最初是以5S rRNA 的基因為分類依據，然而5S rRNA 的基因長度卻只有120 bp，所包含的資訊不足，無法分析眾多且複雜的細菌種類，23S rRNA 的基因長度約為2900 bp，其長度過長



分析不易。而16S rRNA 的基因長度約為1500 bp，長短大小較為適合，因此16S rRNA 的基因最常運用於細菌演化分類與鑑定的研究。16S rDNA 是原核生物細胞中內特有的基因，其轉錄、轉譯後為核糖體的次小單位體 (small subunit)，是核糖體合成蛋白質時辨認及容納 tRNA 的場所。16S rDNA 所產生的16S rRNA 對於原核生物親緣關係(phylogenetic relationship)，是一個非常良好的演化分類的依據，主要是此段基因的保守性高，可作為生物演化的分子時鐘，16S rDNA 因為具有演化上獨特性的優點，已被為微生物學界廣泛的研究(Ortiz-Estrada et al., 2018)。近年分子生物定序技術蓬勃發展，NGS輔助方式可獲得高輸出量及精確之基因序列，其短時間內以相對低廉的價格產生大量的DNA 定序資料，提供了分子生物學家探究基因體、轉錄因子和分子間交互作用等領域的有效工具(林等，2013)。NGS可以同時分析成千上萬條序列，有別於傳統的定序法(Sanger sequencing)一次只能定序一種序列。因為NGS是由電腦操作，所以相較於傳統方法，NGS具有便宜又快速的優點(Pabinger et al., 2014)。於國內外現地整治案例中，菌種鑑定調查結果能判斷優勢菌群具有降解何種污染物之功能，其中針對目標污染物-含氯有機物之研究發現脫鹵球菌屬具有還原脫氯之功能(Liang and Hsieh, 2015)，故現地環境中可作為含氯有機物生物降解之指標微生物。本計畫將利用NGS分析技術結合qPCR於整治期間將挑選重要井位與時間進行菌相分析，以瞭解特徵基因和優勢菌之變化，做為應用 $\gamma$ -PGA整治TCE之成效佐證參考依據。

總體基因體(Metagenomics)是近年來才發展出來的興新學門，主要是透過研究分析環境基因體，進而描繪環境生物的代謝特性。一個完整的環境系統，是由許多種生物所組成，除了看的見的生物之外，當然也包括看不見的微生物族群，這些族群的數量遠比動植物多，然而，如要描繪一個真實的環境生化代謝圖譜，最有效的方式就是直接萃取環境中的總DNA或RNA加以分析，藉由基因體的資訊，對環境做全面性的了解。環境基因體具有高多樣性及複雜度，最著名的例子是Craig Venter在一桶海水中萃取細菌DNA，經NGS分析後，發現含有高達150,000,000 bp非重複性的鹼基對，1,800個genotype以及1,200,000個過去沒有被記錄過的基因，因此，要描繪出真實完整的環境基因體特性，需要大量的資料(Tatusova et al., 2014)。一般來說，一群微生物可能是相互合作降解環境污染物。然而，不是所有菌種可降解各種各樣的污染物，可藉NGS測定在污染廠址內具有分解污染物潛力菌種種類和其在所有菌種種類分佈比率，然而透過分析工業污染場地的微生物群落基因序列，並經由生物分類資訊軟體分析，可提供污染物及其化合物存在的污染場址，其微生物群落組成。這種做法將有利於鑑定是否具有特定微生物，參與降解途徑的關鍵生化反應步驟。這項研究的目的是評估內生性土壤及水體微生物群落，並預測受污染的場址之微生物復育前和後的菌相分析，



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

當我們對於環境中菌相的分佈以及優勢菌種可以有非常完整瞭解後，便可有利於特定菌種的分離、純化與培養，並進而利用這些菌種來進行各類環境污染的生物復育。利用PCR的方式放大16S rDNA之後，搭配NGS來獲得微生物的組成群落，是目前最有效率且精準的方式(Dudhagara et al., 2015; Krachunov et al., 2015)。

表 2.4 應用於土壤及地下水脫氯微生物菌相之分子生物技術

技術	訊息	文獻
直接巢式聚合酶連鎖反應 direct and nested polymerase chain reaction (PCR)	定性：微生物 DNA 定性和檢測	Chang et al., 2017
定量即時聚合酶連鎖反應 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	定量：目標菌種之 16S rRNA、mRNA 及功能基因	Men et al., 2017
生物複製資料庫 clone library (phylogenetic analysis)	定性：生物基因多樣性資料庫 (16S rRNA 基因及功能基因)	(Alfán-Guzmán et al., 2017)
次世代定序 next-generation sequencing (NGS)	定性：生物基因多樣性資料庫 (16S rRNA 基因、功能基因及基因定序)	Němeček et al., 2018
磷脂脂肪酸法 phospholipid fatty acid (PFLA)	定性及定量：微生物菌落多樣性，與其他技術結合可分析營養狀況及代謝活性	Majone et al., 2015
變性梯度膠體電泳 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	定性：微生物菌相分析	Chang et al., 2017
螢光原位雜合技術 fluorescent in situ hybridization (FISH)	定量：生物活性、空間分佈及整個生物多樣性訊息	Kleindienst et al., 2017
訊號增幅螢光原位雜合技術 catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH)	定量：生物活性、空間分佈及整個生物多樣性訊息	Leitão et al., 2018





## 2.8 現地場址背景簡介

原先申請計畫場址位於台南永康工業區以鹽行段永安路 12 巷道路區為模場試驗區為主並已獲得台南區公所同意，因場址目前施工中不便作為現地試驗，後續本團隊改為高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號作為本計畫現地試驗如圖 2.5 所示，目前已獲得各單位同意函，圖 2.6 為預定現場注藥的示意圖。預設規劃設置三口注藥井，每口間距 1 至 3 公尺，下游設二至三口監測井，每口間距 1 至 3 公尺，以進行灌注與監測，後續依現場水文與地質狀況進行調整，此外選擇一口上游監測井作為背景監測井。模場試驗階段將在注藥( $\gamma$ -PGA)前後，進行監測井的採樣分析，以作為驗證整治成效的依據。分析項目將包括含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析以及 NGS 評估  $\gamma$ -PGA 注入，對現地菌相改變的影響(Kao et al., 2016)。

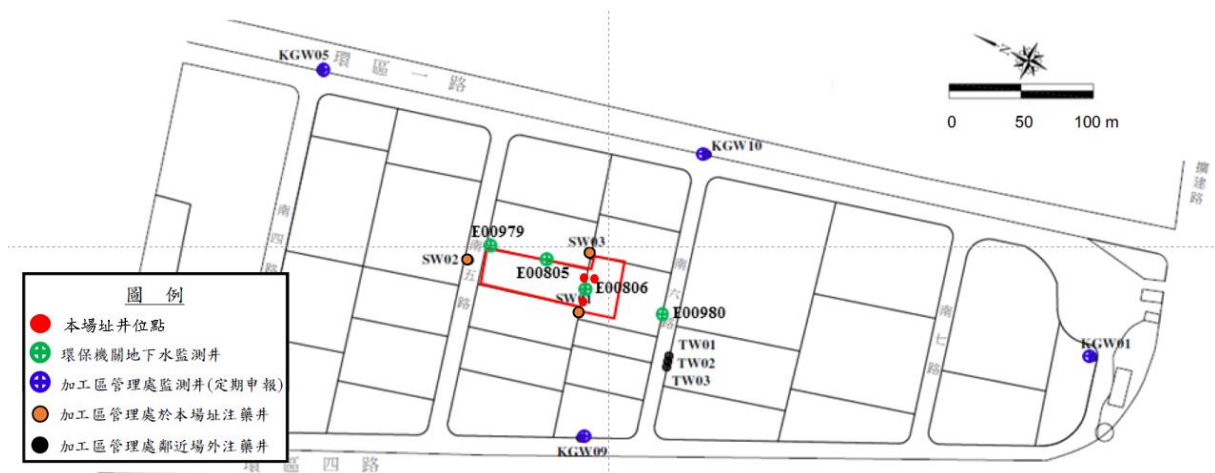


圖 2.5 前鎮區興邦段場址範圍示意圖

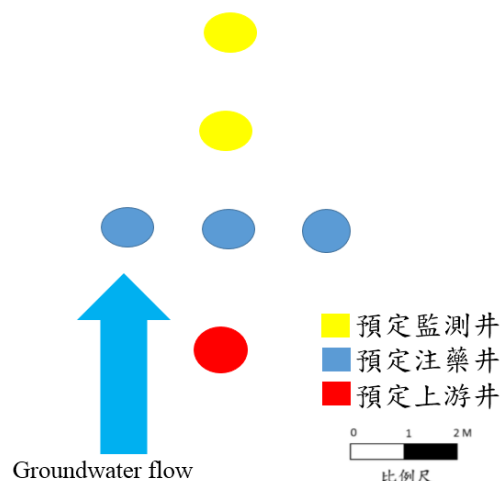


圖 2.6 現場注藥的示意圖



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

### 第三章：研究方法及步驟

本計畫工作包含蒐集國內外  $\gamma$ -PGA 相關研究文獻、利用  $\gamma$ -PGA 作為生物生長基質及現地 pH 緩衝溶液，並實際將  $\gamma$ -PGA 在高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號進行模場試驗，將  $\gamma$ -PGA 作為 TCE 污染擴散控制的基質。此外，本計畫將  $\gamma$ -PGA 進行改質，擴大  $\gamma$ -PGA 之應用層面及效益，並將之改質之  $\gamma$ -PGA 進行模場測試。本計畫之工作內容主要包含  $\gamma$ -PGA 原液及改質之  $\gamma$ -PGA 進行基本特性分析及現地生物復育試驗成效評估。

本計畫之工作內容包括四個階段，各階段的主要工作如下：

#### 第一階段

第一階段為  $\gamma$ -PGA 現地模場試驗。在此階段中，本團隊將以高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號作為試驗區，除了進行相關地質水文資料收集外，並將規劃設計模場試驗區，將  $\gamma$ -PGA 進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域的整治，並評估整治成效。此外，本計畫將依現場之微生物反應速率，做必要之整治技術之調整，以提高微生物活性及數量，地下水之分析項目將包含含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析。此外，本計畫邀請董天行經理(瑞昶公司)擔任本計畫的協同主持人。由於董天行經理對本區域的水文地質及污染情況非常了解，因此可協助本計畫的模場試驗規劃和研究。本團隊注藥井進行灌注藥劑，評估用  $\gamma$ -PGA 作為整治高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號 PCE 及 TCE 污染和邊界控制的可行性。

#### 第二階段

第二階段將進行  $\gamma$ -PGA 改質試驗，使改質後的  $\gamma$ -PGA 具有長效及緩釋的功能，並使  $\gamma$ -PGA 具有更廣泛的應用性，以適用不同的地質水文條件。在此階段中，將進行厭氧還原脫氯之生物分解試驗，評估以改質後的  $\gamma$ -PGA 做為加強 TCE 還原脫氯基質之可行性。生物分解試驗將探討在不同環境及控制條件下(包括  $\gamma$ -PGA 濃度、硫酸鹽濃度、污染物濃度及 pH 值)TCE 之分解效率。此外，亦將進行管柱流通性試驗，以及改質後  $\gamma$ -PGA 的特性分析，以黏度試驗、粒徑分析、元素分析、成分分析、吸附試驗、均質試驗、流通試驗及分配係數批次實驗等評估改質後  $\gamma$ -PGA 之物化及生物特性。

改質試驗主要為  $\gamma$ -PGA 基質以不同比例和不同混煉方式添加不同性質(包括羧甲基纖維素、澱粉、瓊脂、明膠、大豆油和界面活性劑等)，以改變  $\gamma$ -PGA 物理化學及生物特性。此外，並以管柱流通性試驗、批次生物分解實驗、黏度試驗、





粒徑分析、元素分析、成分分析、吸附試驗、均質試驗、分配係數批次實驗等評估  $\gamma$ -PGA 之基本特性。改質試驗中將以上述之不同性質藥劑以不同比例(1~5%)和不同的混煉和配置方式製備固定比例  $\gamma$ -PGA 基質，以進行  $\gamma$ -PGA 基本特性改質，後續以上述之不同試驗，評估形成性能穩定性、緩釋性、可分解性與長效性。此外，在第二階段中，將進行厭氧還原脫氯之生物分解試驗，評估以改質後的  $\gamma$ -PGA 做為加強 TCE 還原脫氯基質之可行性。生物分解試驗將探討在不同環境及控制條件下(包括  $\gamma$ -PGA 濃度、硫酸鹽濃度、污染物濃度及 pH 值)對 TCE 之分解效率。第二階段的成果將作為設計第三階段模場試驗的依據。

### 第三階段

第三階段將利用第一階段的模場試驗區進行改質後的  $\gamma$ -PGA 的測試，驗證改質後的  $\gamma$ -PGA 對 TCE 污染場址的整治成效。模場試驗的程序和監測及評估方式與第一階段相同。本團隊將比較兩個階段的模場試驗結果，評估改質後的  $\gamma$ -PGA 的適用性以及整治成效提升的程度。

### 第四階段

第四階段將進行經濟效益分析，評估應用  $\gamma$ -PGA 以及改質後的  $\gamma$ -PGA 作為厭氧脫氯基質之操作成本，並和其他常用之基質進行成本分析，評估  $\gamma$ -PGA 以及改質後的  $\gamma$ -PGA 之市場競爭力。

本計畫在各階段中，將利用 NGS 分析技術結合即時定量聚合酶連鎖反應 qPCR 於實驗中進行菌量分析，以瞭解特徵基因和優勢菌之變化，做為應用  $\gamma$ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。

## 3.1 $\gamma$ -PGA 基本特性分析

聚麩胺酸( $\gamma$ -PGA)是以麩胺酸(GA)為基礎原料，經由微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)並結合有機碳源、氮源及礦物質以液態發酵行生物聚合而成的一種生物可分解性的高分子材料。

### (1) 黏度試驗

添加  $\gamma$ -PGA 基質與不同性質藥劑組別，利用粘度分析儀於轉速 20 rpm 下，分析  $\gamma$ -PGA 基質不同性質藥劑組別變化。

### (2) 粒徑分析

土壤樣品經充份攪拌混合後經風乾、破碎後，先以 10 mesh，孔徑 2 mm 的篩網篩除石礫及雜質。土壤有機質含量與  $\gamma$ -PGA 基質作研究，主要先建立不同粒徑



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

土壤特性的資料，提供做為後續研究之基本參考。

### (3) 流通性試驗

針對流通性試驗主要評估改質試驗最適操作條件，於土壤孔隙間之吸附能力。因此，本計畫所採集之土壤為南部某工業場區內之現地土壤含水層，採集後之土壤樣品於現場經破碎及充分混篩，並去除大型荳石及雜質後。並添加  $\gamma$ -PGA 進行管柱傳輸流通性之試驗評估，以一管柱長 (cm)  $\times$  寬 (cm) = 25(cm)  $\times$  5 (cm) 填充現地土壤並模擬基質灌注於地下含水層土壤中之傳輸情形(如圖 3.1)。首先，實驗進行時先將管柱內注入超純水測定其流量，之後注入  $\gamma$ -PGA，並於出水端測定該物質之總有機碳(total organic carbon, TOC)出流濃度及出流量，觀察基質於土壤孔隙間之傳輸情形，並於進出流濃度達平衡時，再以超純水注入，觀察基質釋出情形。

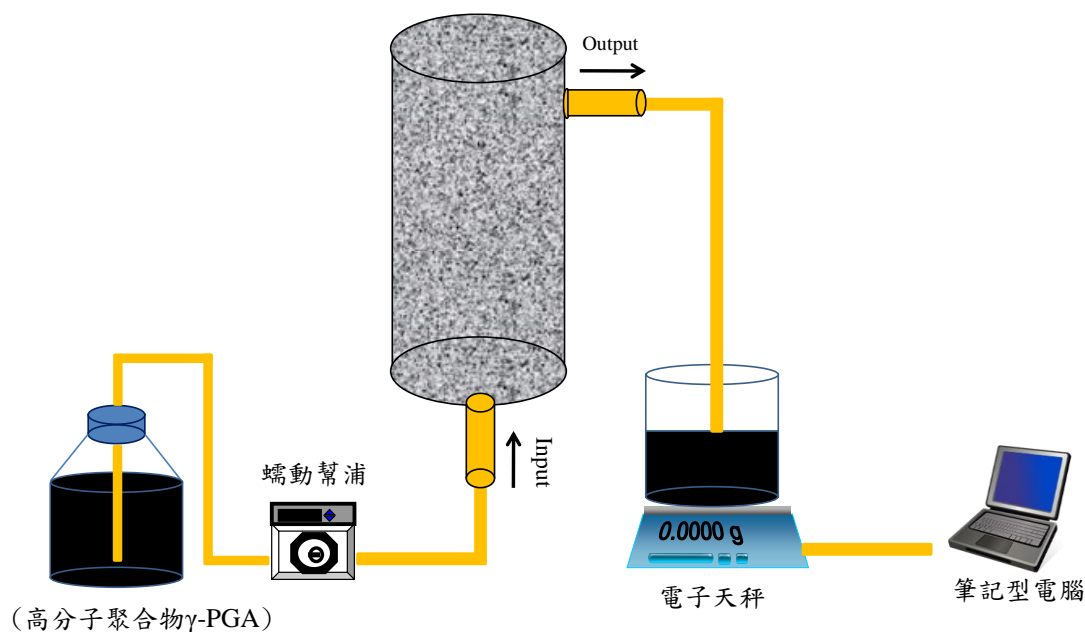


圖 3.1  $\gamma$ -PGA 基質流通性試驗裝置示意圖

## 3.2 以改質試驗探討基質於現地基質傳輸性

改質實驗主要目的探討現地試驗中提供  $\gamma$ -PGA 基質下，其基質傳速率與目標污染物降解速率。改質試驗主要為  $\gamma$ -PGA 基質添加不同性質藥劑組別(分別為羧甲基纖維素組、澱粉組、瓊指組、明膠組、大豆油和界面活性劑組)，再以流通性試驗評估最適黏稠條件以利於後續現地生物復育技術之設計參考依據。

第一組：羧甲基纖維素組，將水與  $\gamma$ -PGA 基質混合，調配 TOC 約 2000 mg/L，再以添加不同比例(1%~5%)羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose, CMC)進行改



質試驗，後續監測不同比例之黏度，評估形成性能穩定性與黏稠度。

第二組：澱粉組，將水與  $\gamma$ -PGA 基質混合，調配 TOC 約 2000 mg/L，再以添加不同比例(1%~5%)澱粉進行改質試驗，後續監測不同比例之黏度，評估形成性能穩定性與黏稠度。

第三組：瓊指組，將水與  $\gamma$ -PGA 基質混合，調配 TOC 約 2000 mg/L，再以添加不同比例(1%~5%) Agar 進行改質，後續監測不同比例之黏度，評估形成性能穩定性與黏稠度。

第四組：明膠組，將水與  $\gamma$ -PGA 基質混合，調配 TOC 約 2000 mg/L，再以添加不同比例(1%~5%)明膠進行改質試驗，後續監測不同比例之黏度，評估形成性能穩定性與黏稠度。

第五組：大豆油和界面活性劑組，將水與  $\gamma$ -PGA 基質混合，再以添加不同比例進行改質試驗，後續監測不同比例之黏度，評估形成性能穩定性與黏稠度。

以上試驗皆進行改質後續進行流通性試驗，評估本場址最適基質改質參數，以利於日後藥劑於土壤中之維持性，且評估藥劑改質後所衍生相關問題。

### 3.3 現地添加 $\gamma$ -PGA 基質之設計

本計畫將擬定以現地受含氯污染之地下水中進行添加  $\gamma$ -PGA 基質作為設計，包括(1)灌注  $\gamma$ -PGA 基質時，可能面臨到的問題；(2)先期評估；(3)反應性物質之選擇；(4)成效評估；(5)後續之監測；(6)所需之反應時間；(7)經費評估等。此設計將可作為實場應用前之設計依據。由於  $\gamma$ -PGA 基質添加之位置應在含氯有機物污染團的範圍中，且不致影響地下水之自然流動坡度。但影響反應牆之因子如下：(1)污染物種類、特性、濃度及污染團分布；(2)地下水流向及流速；(3)提供電子接受者反應情形及(4)含水層之地質、化學、微生物及水文特性，因此模場之現場水文水質調查極具重要性

### 3.4 進行現地之模場試驗

本計畫目前規劃於場址選擇一口控制井、三口灌藥井及二口監測井，並於灌注井添加  $\gamma$ -PGA 基質，研究將 2~3 周進行採樣及監測工作，以評估其成效。若場址中監測井不足或位置不適當，本團隊將視場址狀況，增設數口臨時監測井作為整治井。此外，本計畫將依現場之微生物反應速率，做必要之整治技術之調整，以提高微生物活性及數量。地下水之分析監測項目包括含氯有機污染物濃度、生物降解後產生之副產物、溶氧、pH 值、導電度、氧化還原電位、總有機碳、硫酸鹽、硫化氫、氯鹽、氨氮、氫氣、甲烷等。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

### 3.5 現地微生物資訊分析

為了瞭解實驗過程中其微生物之生長情形，故以分子生物技術分析其各組實驗之菌相變化，本計畫利用 NGS 分析技術結合 qPCR 等分子生物分析技術，分子生物分析實驗包含 DNA 萃取、PCR 放大、qPCR 微生物定量分析、現地微生物定序分析。

- (1) DNA 萃取及聚合酶連鎖反應：將樣品加入酚及氯仿(phenol/chloroform)除去蛋白質及其他成分，使蛋白質變性來進行 DNA 萃取之步驟。將萃取 DNA 進行聚合酶連鎖反應(PCR)，利用溫泉菌(Taq polymerase)耐高溫特性，以升降溫度的循環方式來控制 DNA 聚合酶的酶活性，針對細菌的 16SrDNA 中變異的區段序列所設計的 V6-V8 region 的 primer：968fgc、1401r，大量複製目標 DNA 序列的方法。
- (2) 定量即時聚合酶連鎖反應 qPCR：偵測 *Dehalococcoides* spp.以 TaqMan probe 法分析，使用的 primer 與 probe 參考 Ritalahti 等人(2006)發表研究中選用引子 1200 f 與 1271 r 進行 PCR 放大 *Dehalococcoides* spp.16S rDNA 基因片段。將此 PCR 產物接合到 pGEM-T Easy Vector (50ng/μL)上，進行定序確認物種，當確定為 *Dehalococcoides* spp.的質體做為標準品進行後續的標準曲線建立。依下方公式(1)，將序列稀釋的各種濃度換算成 gene copies，做出一條標準曲線(gene copies 對 Ct 值做圖)。此實驗進行二重複的反應以做出較為準確的標準曲線，配製好後以 StepOnePlus™ Real-time PCR system (Applied Biosystem) 進行實驗反應，反應中 annealing 溫度為 58℃，時間為 1 分鐘，進行 40 個 cycles 的反應。
- (3) 次世代定序分析：次世代基因定序技術已然發展 10 年，次世代定序是新的核酸定序技術，本計畫將利用 illumina HiScan 平台，每日最多可以得到 15 Gb 的數據，每批次實驗可獲得的資料總量為 150 Gb。在完成實驗取得資料後能藉由專業生物資訊團隊依照實驗目的需求進行分析與探討。

### 3.6 本計畫使用儀器使用廠牌

本計畫主要以氣相層析/電子捕捉偵測器進行 TCE 與副產物之分析(如表 3.1 所示)，並將以貴儀中心之掃描式電子顯微鏡及 X 光繞射分析觀察分析批次瓶沉澱物及填充土壤於實驗過程之型態及種類變化，並以 NGS/qPCR 分析技術與設備進行相關分子生物技術之研究。





表 3.1 彙整不同設備儀器之廠牌及型號

編號	設備名稱	用途說明	廠牌/型號/備註
1	冷凍乾燥機	樣本預備	台灣泛群科技有限公司，型號 FD-5030
2	GC-ECD 氣相層析/ 電子捕捉偵測器	氣態產物 分析	Agilent，型號 6890 (層析管柱： Agilent MXT-5，0.53 mm，30 m)。
3	吹氣捕捉裝置 (Purge and Trap concentrator)	樣本預備	Tekmar，型號 3000。
4	GC-TCD 氣相層析 儀	氣態產物 分析	Agilent，6890N
5	GC-FID 火焰離子偵 測儀	液態產物 分析	Agilent，6850
6	掃描式電子顯微鏡 (SEM)	觀測材料 型態	中山大學貴儀中心
7	高速離心機	樣本預備	-
9	黏度分析儀	材料型態 特性分析	Brookfield，型號 DV3T
10	粒徑分析儀	材料型態 特性分析	-
11	變性梯度電泳槽	分子生物 分析	BIO-RAD
12	照膠分析系統	分子生物 分析	Major Science
13	聚合酶連鎖反應器	分子生物 分析	eppendorf

#### 可能遭遇之困難及解決途徑

如前所述，較可能遭遇之困難為(1)場址之選擇及業者之配合及(2)反應速率無法達到預期成效。由於本計畫團隊曾參與相關污染場址之先期調查，未來有可能以這些場址為研究對象。另外，現場狀況不易掌握，故本團隊將盡可能收集現有之先期資料，以作完整之先期評估，以減低此部分之風險。此外，並將以基質添加量增加或脫氯菌種之添加等方式作為應變方式，以減低此部分之風險。

#### 重要儀器之配合使用情形

在本工作計畫中，本團隊將需要地下水之採樣及現場分析設備。另外，若需增設數口臨時監測井，則需鑽井設施本團隊將向其他單位洽借。此外，將以本校





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

貴儀中心之掃描式電子顯微鏡及 X 光繞射分析觀察分析現地土壤中微生物型態及種類。本年度仍將以 GC/purge and trap 進行污染物之分析，並將以 GC/MS 檢測生物降解後產生之副產物。

預定進度甘特圖第一年

工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
文獻蒐集													
場址背景調查與整治井及監測井設置													
灌注 $\gamma$ -PGA 基質													
含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析													
改質前 $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估													
$\gamma$ -PGA 改質試驗													
工作進度估計百分比 (累積數)	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	100%	
預定查核點	第 6 個月完成；場址背景調查與評估，初步現地灌注 $\gamma$ -PGA 基質以及含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析。												
	第 12 個月完成；改質前 $\gamma$ -PGA 模場成效評估以及完成實驗室 $\gamma$ -PGA 改質試驗。												



## 第四章：結果與討論

### 4.1 $\gamma$ -PGA 改質後基本特性分析

#### 4.1.1 基質配製黏度試驗

過去文獻顯示添加乳化型釋碳基質(emulsified carbon-releasing substrate, ECS)於土壤傳輸為良好緩釋性基質，且具有長時效供應現地微生物生長時所需之營養鹽但 ECS 需額外添加緩衝藥劑才有效控制 pH 維持中性範圍(Liang et al., 2013)。文獻顯示  $\gamma$ -PGA 基質具有 pH-responsivity 之特性，當環境中之 pH 值產生變化時， $\gamma$ -PGA 能與溶液中之氫離子( $H^+$ )結合或分離達到平衡之狀態，在這種結合和分離中，其微觀分子結構的變化會導致其體積、形態或結構的變化(Khalil et al., 2016; Luo et al., 2016; Sheu et al., 2017)。本研究黏度試驗為改質實驗測試不同性質藥劑與  $\gamma$ -PGA 結合，提升  $\gamma$ -PGA 基本特性。其改質試驗為  $\gamma$ -PGA 基質添加不同性質藥劑組別(分別為 CMC 組、澱粉組、瓊指組、明膠組、 $\gamma$ -PGA 與乳化油混合組)，測試最適參數再以流通性試驗評估最適黏稠條件以利於後續現地生物復育技術之設計參考依據。

實驗分析結果如圖 4.1 不同組別黏度監測值。 $\gamma$ -PGA 原始黏度為 1.2 cp，乳化型釋碳基質黏度為 520 cp，以乳化型釋碳基質作為基準嘗試不同配製，以黏度試驗搭配管柱流通性試驗，評估最適配比參數。本研究實驗 CMC 組別  $\gamma$ -PGA 添加 0.3~0.5% CMC 藥劑量，監測黏度為 200~330 cp，CMC 藥劑往上增加發現 CMC 與  $\gamma$ -PGA 無法完全混合，故添加 CMC 藥劑 1~3% 之組別黏度數據無法測出。明膠組別分別添加 1、3 與 5% 明膠藥劑，測出黏度最高約 300 cp，澱粉組別分別添加 5、10 與 15% 澱粉藥劑，測出黏度最高為 250 cp，瓊指組別分別添加 0.5、1、3% 瓊指藥劑，測出黏度最高約 300 cp，實驗發現瓊指性質關係於室溫狀態下瓊指會呈現凝固現象，推測瓊指組別流通性試驗會發生阻塞現象。乳化型  $\gamma$ -PGA 以不同比例配製，監測黏度範圍為 120~450 cp。後續乳化型  $\gamma$ -PGA 以(1:20)比例進行流通性試驗，其評估改質組別於土壤中維持之差別，且評估藥劑改質後造成阻塞等問題衍生。不同藥劑組別基質黏度值範圍約 250~300 cP，黏度值由高至低分別為：CMC 組別>乳化型  $\gamma$ -PGA>明膠組別>瓊指組別>澱粉組別，推估澱粉與明膠組別流動性為最佳，推測其應可快速傳輸於土壤孔隙間，若需要長時效供應基質選擇 CMC 組別或是乳化型  $\gamma$ -PGA，並於後續管柱流通性試驗中進行探討。基質灌注於地下水中之傳輸，不僅受限於基質穩定性及顆粒大小，當黏度愈大時，基質傳輸速度亦愈慢(Tsai et al., 2014; Tang et al., 2017)。後續會以 CMC(0.5%)組別、明膠(5%)組別、澱粉(15%)組別、乳化型  $\gamma$ -PGA(1:25)比例組別進行流通性試



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

驗，評估改質藥劑應用現地場址之適用性。

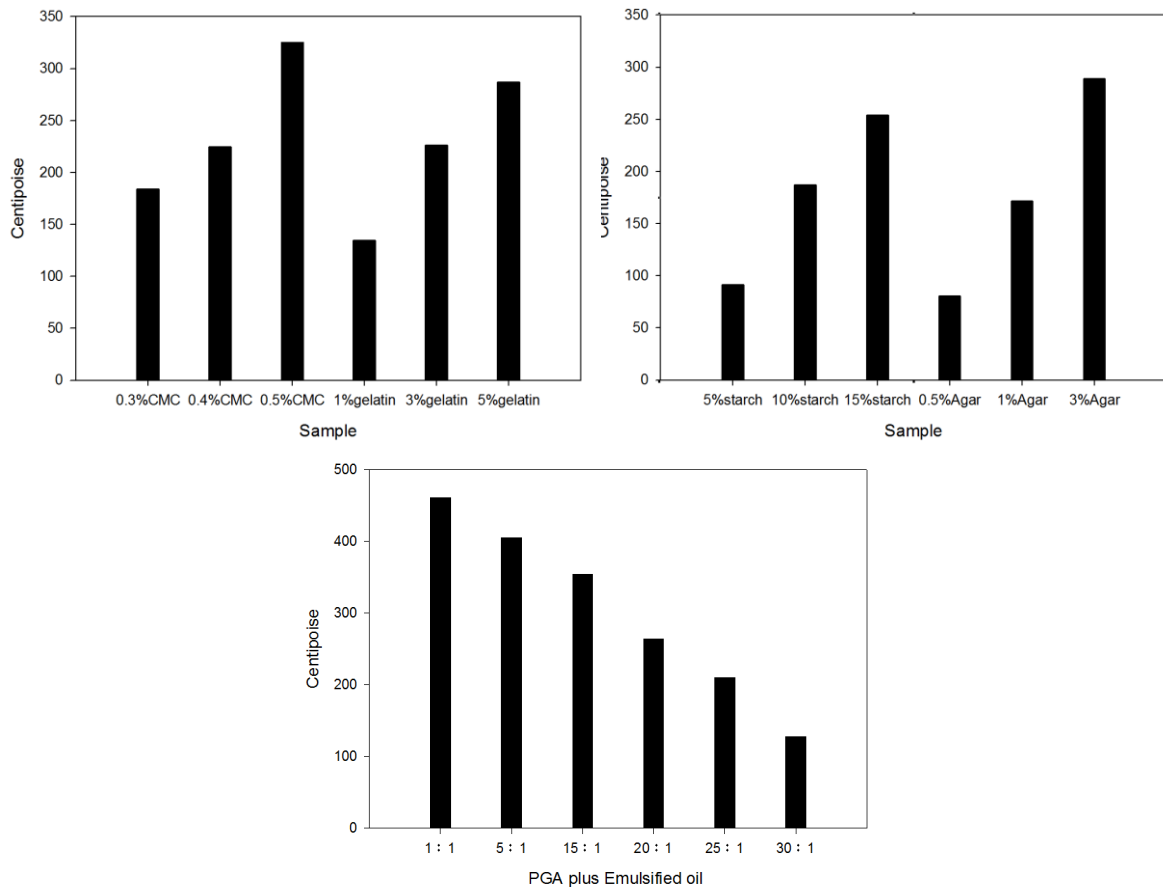


圖 4.1 不同組別監測黏度變化圖

#### 4.1.2 粒徑與界達電位分析

流通性試驗土壤進行顆粒組成份分析以黏粒( $<2\ \mu\text{m}$ )、粉粒( $2\sim 63\ \mu\text{m}$ )及砂粒( $>63\ \mu\text{m}$ )所佔的百分比如圖 4.2 所示。土壤黏粒、粉粒及砂粒所佔的百分比分別介於 0.8%、10.2% 及 89%，其本試驗土壤組成份以砂質壤土為主。近年推動加強式生物整治廣泛應用於處理受污染之地下水，不僅可省下大筆整治費用，對於現地環境衝擊亦較小，且可有效降解污染物。本研究針對改質後基質，進行粒徑分析如表 4.1 所列。經由此結果得知， $\gamma$ -PGA 之二個主要粒徑包含 437 nm 及 5,423 nm，明膠組別為 3075 nm、CMC 組別為 1568 nm、澱粉組別 1994 nm、乳化油組別 5843 nm，各基質性質介於奈米到微米之間。改質組別粒徑大小可有效分佈到粗細顆粒間(包括黏土到砂粒)，可達到均勻分佈及增加生物可及性目標。另外，本研究改質後基質監測界達電位皆為負值介於(-9.8 mV 到 -95.5 mV)如圖 4.3 所示，過去研究顯示大多數土壤多帶負電(Sairam et al., 2016; Barrow, 2017)，故基質之電位值越低，可有效傳輸至下游，若運用於地下水污染整治上，應皆可有良好之傳輸性。

第四章：結果與討論

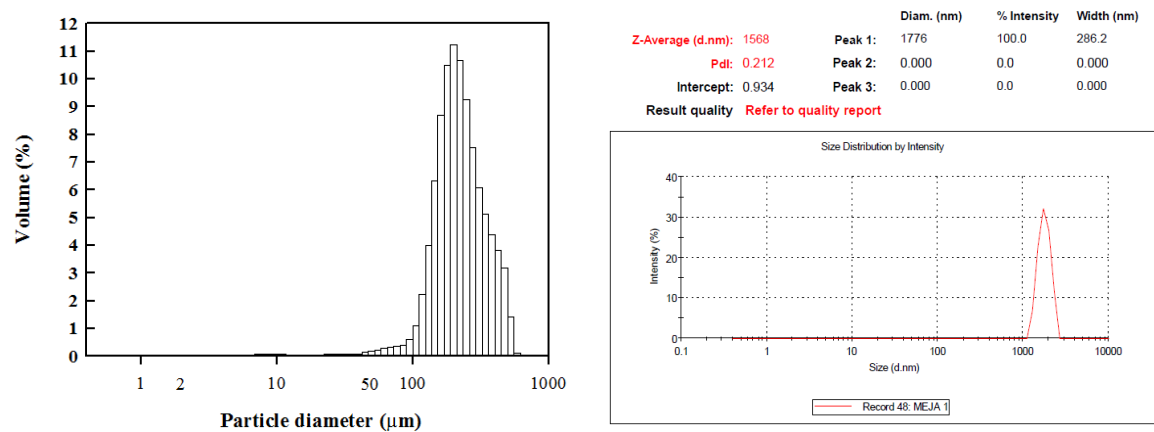
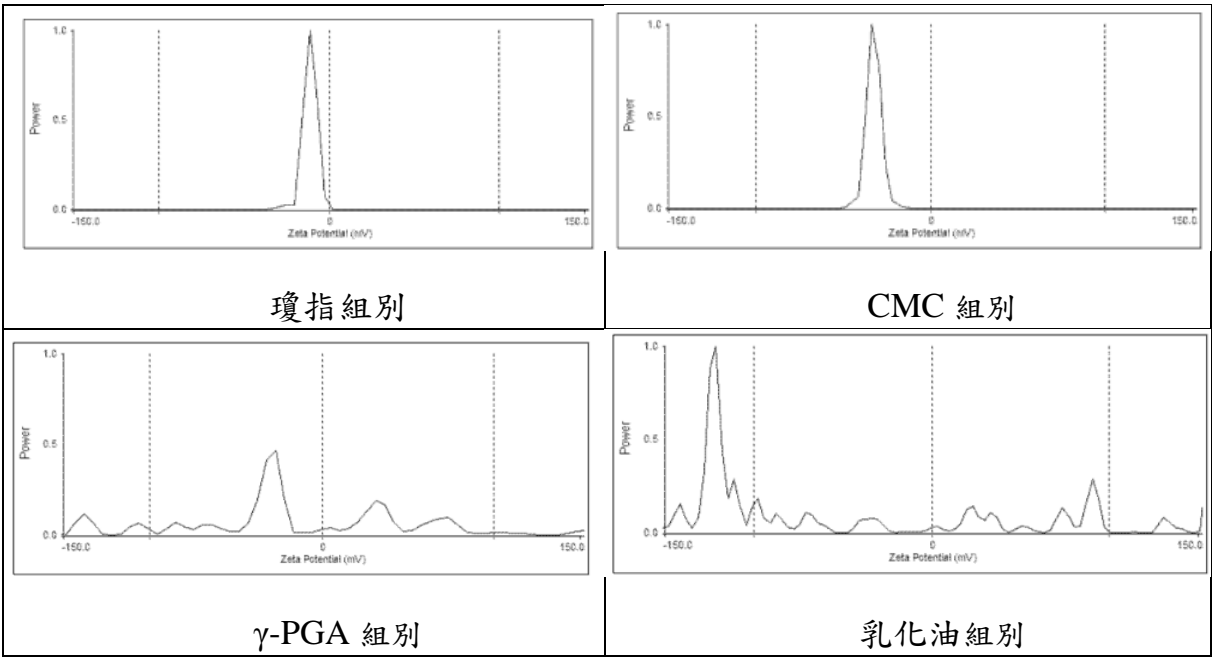


圖 4.2 管柱土壤與不同組別粒徑分布百分比圖

表 4.1 不同組別粒徑分析

Sample	γ-PGA	CMC	明膠	澱粉	瓊指	乳化油
Intensity(%)	25	28	29	30	28	24
Particle size	437、5,423	3,075	1,568	1,994	340	5,843





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

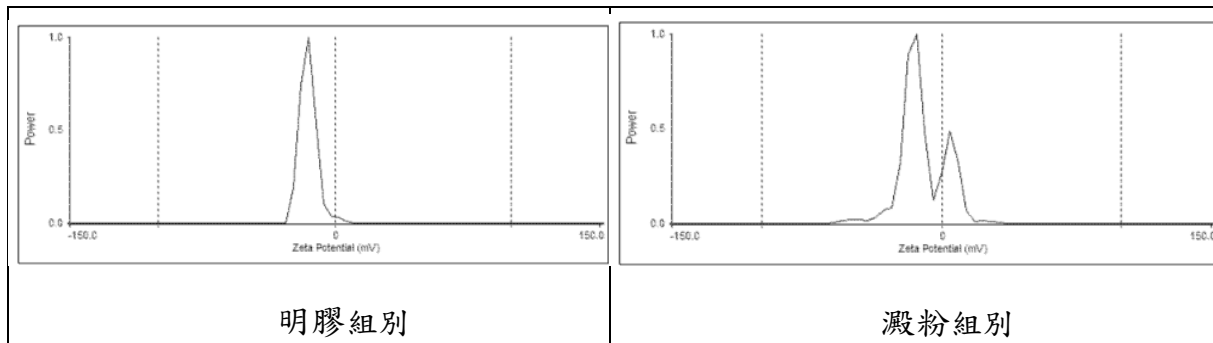


圖 4.3 改質基質介達電位圖

### 4.1.3 均質試驗

本研究使改質後基質進行均質試驗，目前適用於土層之生物基質皆為水溶性反應物質，以量筒測試不同高度(0、15 及 30 公分)，分析不同小時之 TOC 濃度變化趨勢，藉此可評估  $\gamma$ -PGA 經由改質後基質之均質穩定度。由圖 4.4 顯示改質組別經靜置 48 小時後基質均未有分層之情形，可有效維持基質穩定性。另外，以不同小時分析 TOC 濃度變化趨勢數據顯示如圖 4.5 所示。 $\gamma$ -PGA 改質試驗經 48 小時試驗，各組別 TOC 濃度均維持初始濃度之間，並未有明顯 TOC 濃度改變趨勢，可證實未有分布不均之現象發生，由試驗結果得知改質組別均質穩定為一致性。使用不同生物基質時，需考量藥劑有效傳輸距離外，營養鹽濃度是否足以提供微生物新陳代謝所需之能量，亦為現地整治時需考量之因素之一。地層中碳及氮含量是限制微生物生長之重要因子，碳源主要提供微生物能量，而氮源為微生物合成蛋白質之來源，故 C/N 比不僅可代表基質富含的養分，亦可作為了解現地土壤及地下水中之碳/氮/磷循環及礦化作用等機制之參考(Ghaly and Ramakrishnan, 2015)。本研究使用之基質應能有效提供微生物生長之營養鹽，可有助於提升微生物生長及代謝功能。



圖 4.4 不同組別靜置 48 小時後基質變化圖





## 第四章：結果與討論

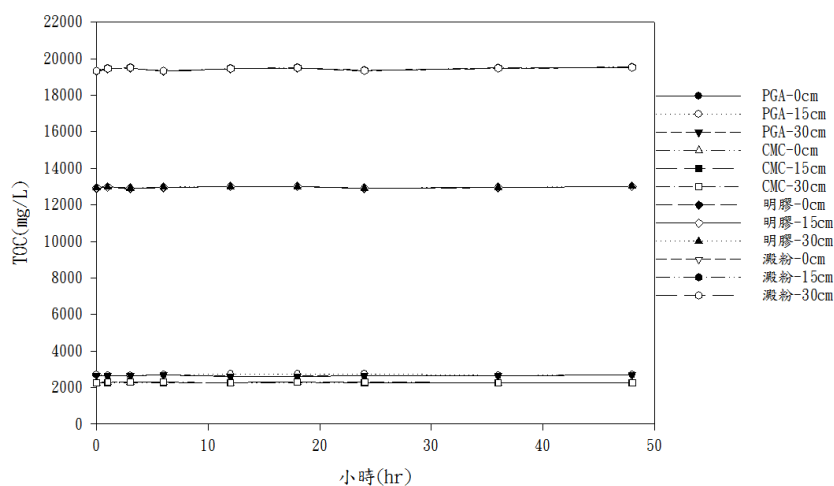


圖 4.5 不同時間各組別 TOC 濃度變化趨勢圖

表 4.2 不同基質組別之營養鹽分析

基質	碳 (mg/L)	氮 (mg/L)	磷 (mg/L)	乳化型 $\gamma$ -			
				PGA 基質 組別 (比例)	碳 (mg/L)	氮 (mg/L)	磷 (mg/L)
ECS	40,710	2,880	307	(1:1)	16,855	47	1,251
CMC	2,672	76	10	(15:1)	3,650	73	1,151
明膠	19,590	165	29	(20:1)	4,047	74	1,098
澱粉	13,060	74	862	(25:1)	4,041	78	1,055
-	-	-	-	(30:1)	4,063	74	1,057



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

#### 4.1.4 流通性試驗

本試驗用以評估改質後基質組別模擬於地下水之傳輸性，本計畫選用  $\gamma$ -PGA 改質前後進行管柱試驗來模擬基質注入地下水中傳輸成效。由於改質前作為示蹤劑可有效作為判別管柱中與基質後傳輸差異上之依據。 $\gamma$ -PGA 基質進行管柱傳輸試驗，以一填充管柱模擬地下含水層土壤，實驗進行時先將管柱內注入超純水測定其流量，之後將改質後基質注入，並於出水端測定該物質之出流 TOC 濃度及出流量，當進出流量濃度達平衡時，再以超純水注入，觀察不同基質於土壤孔隙間之傳輸與 TOC 濃度之變化如圖 4.6 所示。基質流通性試驗之管柱基本操作參數如表 4.3 所列，流通性試驗可作為後續現地模場基質注入量與時間性參考之依據，經由實驗試驗管柱每日出流量為 144 mL/day，計算管柱 1 pore volume (PV) 約 178 mL。

各物質出流濃度如圖 4.6 所示， $\gamma$ -PGA 基質其出流 TOC 濃度與入流 TOC 濃度達平衡時之注入體積約 6~7 PV。當基質注入體積達 11 PV，再注入超純水出流體積約 14 PV 時  $\gamma$ -PGA 基質實驗組 TOC 已流出 85%，其原因由  $\gamma$ -PGA 為水溶性基質，其易容易流失基質，由管柱流通性使用之現地土壤顆粒為砂質壤土為主，可證實  $\gamma$ -PGA 基質注入於地下水可有效的傳輸至下游。因此  $\gamma$ -PGA 基質可應用於地下水流速較緩慢之場址，其地下水流速緩慢配合水溶性基質，可有效將基質均勻分散土壤顆粒間。本研究嘗試使用瓊指組別進行流通性試驗發現瓊指特性，室溫狀態下呈現凝固現象，後續瓊指組別未進行流通性試驗測試。CMC 組別、澱粉組別與明膠組別數據明顯發現，添加澱粉與明膠對於 TOC 濃度有大幅度提升，因明膠與澱粉含有豐富碳源，故添加藥量越高整體 TOC 濃度越高。管柱流通性試驗顯示，明膠與澱粉組別注入體積約 6~7 PV，TOC 濃度已達到 90% 與  $\gamma$ -PGA 基質一樣約 6~7 PV 情況下 TOC 濃度達到平衡。CMC 組別觀察約 11~13 PV 情況 TOC 濃度達到平衡，明顯相較原先基質多約 5 PV 貫穿時間較原先多出約 6 天時間，顯示添加羧甲基纖維素之改質可提升其分佈係數(partition coefficient)，增加基質和土壤吸附性。乳化型  $\gamma$ -PGA 組別，注入 9~11 PV 體積 TOC 濃度達到平衡，顯示乳化油與  $\gamma$ -PGA 結合有效將基質停流於土壤顆粒不易流失，推測可能原因為基質內皆含有油與界面活性劑(親水及親油)特性，有助於降低基質與土壤間吸附之物理作用。此外，利用黏度計量測乳化型  $\gamma$ -PGA 組別黏度值 250 cp。由此結果顯示，基質可相較長效於土壤孔隙，其出流與入流 TOC 濃度達平衡時之注入體積約 9~11 PV，顯示基質之殘餘有機質含量較其他組別高，約 25 PV 測出 TOC 濃度約 300 mg/L，其原因可能與注入基質部分附著於土壤顆粒表面，並無法完全沖排。由相關研究成果顯示，當油滴粒徑小有助於土壤孔隙間之傳輸性 (Sheu et al., 2015; Zhong et al., 2015; Muller et al., 2018)。綜合上述結果得知，因各



組別基質與土壤顆粒表面之界達電位皆為負值，故吸附於界達電位為正值之部分土壤顆粒上，亦不易於土壤顆粒表面累積，因此傳輸性較佳(Liang et al., 2013)。另外，改質基質黏度值較高則有效將基質更長效分佈土壤顆粒間，其基質吸附於土壤中之可能性，上述試驗中得到證實改質基質具長效性。

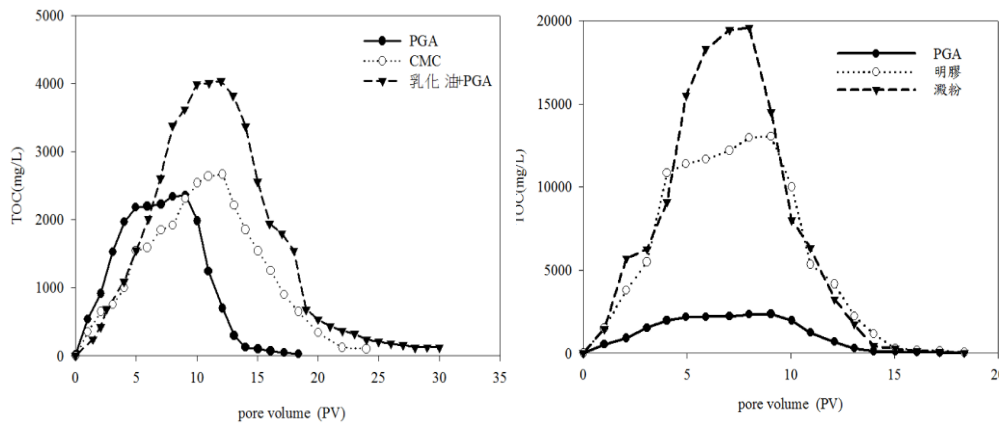


圖 4.6 不同基質於土壤管柱傳輸與 TOC 濃度之變化

表 4.3 基質流通性試驗之管柱基本操作參數

管柱基本操作參數	數值	土壤基本性質	數值
管柱土壤填充量 (g)	1000	pH 值	6.25
管柱尺寸 (cm)	Φ6.5、L 30	砂粒(%)	89
土壤密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1.6	粉粒(%)	10.2
孔隙體積 (mL)	178	黏粒(%)	0.8
流量 (mL/min)	0.1	-	-

#### 4.4.5 pH 酸化試驗

本實驗主要是以改質後組別進行酸化試驗，評估改質後各組別是否造成酸化現象發生。由於環境微生物在工業發展應用上為一重要之工具，主要探討不同環境中族群分佈及生物多樣性，當微生物利用現地微量元素(碳源與氮源)，作物養分攝取，物質分解與轉換等不同機制，可產生具有降解污染物功能之還原酵素基因。因此，本研究於實驗進行前蒐集相關文獻得知，多數營養基質如大豆油、蔬菜油及其他食用油皆可提供長效且增進厭氧生物降解(Kuo et al., 2013)。以加強式生物復育添加基質作為微生物碳源外，在厭氧發酵過程會產生大量 H<sub>2</sub> 有效提供



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

電子可供給微生物利用，當微生物分解後產生有機酸(乙酸、丙酸、丁酸及醋酸)，進而導致地下水質 pH 酸化情形，間接抑制微生物生長環境。本研究針對改質後基質進行生物可利用性進行相關試驗，評估基質添加於地下水中之 pH 及 TOC 消耗率變化，且試驗結果可作為後續微生物批次試驗設計添加量之參考依據。

本研究利用現地地下水設計不同基質進行批次酸化試驗評估，組別分別為 CMC 組別、澱粉組別、明膠組別、乳化型  $\gamma$ -PGA 組別(1:1、1:20、1:25、1:30)，由 pH 監測結果顯示圖 4.7 所示，反應初期 pH 值為 6.0~6.5，反應期間改質後基質 pH 值均有上升趨勢，其中 CMC 組別、澱粉組別、明膠組別、乳化型  $\gamma$ -PGA 組別(1:25、1:30)這幾種組別經過 30 天監測 pH 為 6.8~7.2 之間。推估提高乳化型  $\gamma$ -PGA 組別劑量為 1:15 以上， $\gamma$ -PGA 氨基可平衡酸化現象。微生物在代謝過程中可緩慢分解油滴後持續提供營養源，並達到具有長效緩慢釋碳之特性。由相關文獻指出，當基質在反應過程中因發酵作用產生  $H_2$  及微生物分解後產生有機酸(乙酸、丙酸、丁酸及醋酸...等)易導致地下水中緩衝鹼度能力受限，便會造成 pH 值下降情形(Detman et al., 2018)，若將  $\gamma$ -PGA 替代緩衝試劑使用可大幅度降低成本，亦證實添加基質可作為微生物反應碳源與電子供給。由乳化油組別顯示若沒有添加緩衝溶液，反應期間觀察 pH 為持續下降，推估微生物在初期生長過程中可快速分解水中有機物質及營養鹽所產生有機酸、脂肪酸等機制作用下造成 pH 降低。

由不同基質組別觀察其 TOC 變化由圖 4.7 所示，初始 TOC 的濃度有所差異，監測第 30 天 TOC 消耗率 CMC 組別為 21%、澱粉為 8%、明膠為 17%。乳化型  $\gamma$ -PGA 組別組別(1:15)為 32%、(1:20)為 11%、(1:25)為 10%、(1:30)為 10%。亦發現乳化油組別未添加  $\gamma$ -PGA 或是緩衝溶液監測於 30 天 pH 低於 6.0 有酸化現象發生，推估為反應期間因基質快速產氫導致 pH 酸化，間接影響微生物活性，而造成 TOC 消耗率不佳。如當現地 TOC 能維持一定濃度於地下水中可作為微生物生長及電子提供者，並維持生物反應進行達到降解污染物之潛勢(Kwiatkowska-Malina, 2018)。綜合上述實驗結果可得知，藉由添加不同基質供給皆可被微生物所消耗，而在生物反應過程中 pH 值明顯產生變化趨勢，改質後試驗結果能維持在中性環境下，而乳化油組別酸化程度較為明顯。後續為瞭解不同基質對 TCE 降解效率之比較。後續會以改質組別進行批次試驗，探討改質前後組別對 TCE 還原脫氯成效。

由於每一種微生物都有專屬最適宜生長之 pH 值環境，雖然在低(高)pH 值環境中之嗜酸(鹼)菌已被篩出，但多數之微生物皆適於中性環境(pH 值 6~8)。相關研究指出，厭氧生物反應中扮演重要指標性脫氯菌種為 *DHC*，此株菌種為目前唯





## 第四章：結果與討論

一已知能將 PCE 與 TCE 完全脫氯至乙烯過程(Sudheesh, 2018)，而 *DHC* 菌種適宜生長 pH 環境為 6.8~7.2 之間。研究控制地下水質 pH 來維持微生物適營性與所需添加鹼劑選擇極為相當重要設計之準則。然而，當添加高鹼度物質若使用劑量不當會造成地下水層 pH 值過高，抑制微生物生長反應而間接影響生物復育效率降低，可提供未來應用於現地生物整治場址中提升污染物降解與生物可行性。由於電子供體發酵和增強的脫氯活性，生物復育常常有地下水酸化現象，微生物還原脫氯過程在環境中性 pH 下穩定，但在地下水 pH 值低於 6.0 時活性會下降。文獻顯示 PCE 降解至乙烯，在 pH 7.2 可脫氯至乙烯，但在 pH 5.5 時不產生乙烯，而是 PCE 脫氯至 c-DCE 作為最終產物(Yang et al., 2017b)。如當採用加強式生物復育處理 DNAPLs 含氯溶劑時，pH 問題通常難以解決。因此，必須克服維持地下水中之緩衝能力保持 pH 穩定。當環境中微生物分解基質後可快速增長，且相對發酵作用持續進行，將導致地下水中鹼度消耗殆盡，而造成水質酸化情況之發生。綜合以上所述，要維持地下水中 pH 值平衡不僅需依靠現地地殼元素所提供鹼性離子外，須適宜緩衝溶液輔助搭配下，亦能夠長期維持地下水中性條件且適宜微生物生長環境。因此以乳化油搭配  $\gamma$ -PGA 形成乳化型  $\gamma$ -PGA 具長效性且緩衝溶液成效。

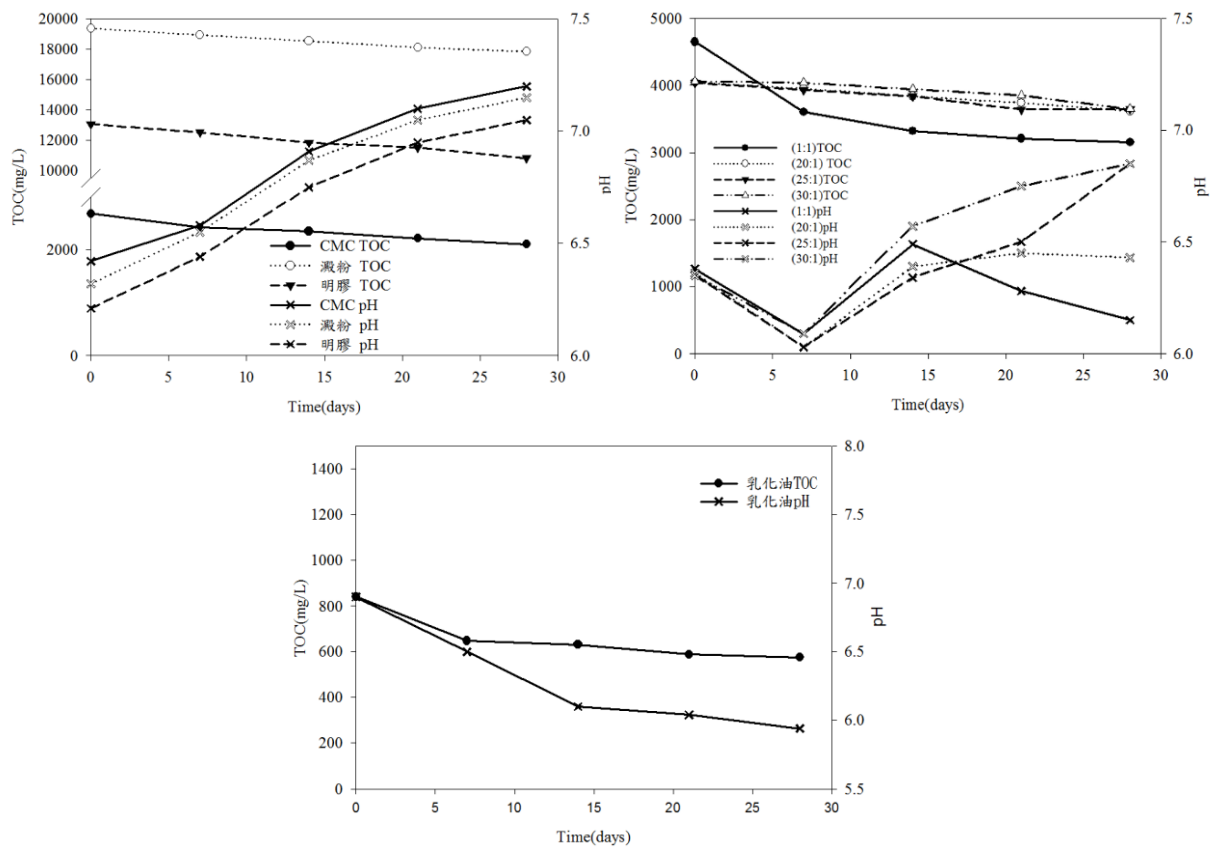


圖 4.7 不同組別 pH 與 TOC 變化趨勢圖





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

## 4.2 微生物批次實驗

### 4.2.1 水質參數變化趨勢

批次試驗為瞭解現地地下水添加改質後基質與未添加基質情況下，微生物利用自然環境代謝 TCE 之可行性。因此，以微生態批次系統模擬現地環境，分別批次試驗分別為：自然降解組(代號 A)、CMC 組別(代號 B)，乳化型  $\gamma$ -PGA 比例 1:1(代號 C)，乳化型  $\gamma$ -PGA 比例 1:5 (代號 D)，乳化型  $\gamma$ -PGA 比例 1: 25 (代號 E)，作為評估現地自然環境對污染物降解效率。

各組別 pH 值實驗結果如圖 4.8 所示，自然降解組(A)初期測得 pH 值 7.35 反應 14 天 pH 下降至 7.21，此組別無額外添加基質，推測初期 pH 下降主因為土壤中微量營養鹽供微生物利用後將污染物代謝過程產生 HCl 所致，反應後期地下水中 pH 並無明顯變化。CMC 組別(代號 B)初期測得 pH 值 6.77，反應 14 天 pH 上升至 6.91，此組別添加  $\gamma$ -PGA 與 CMC 監測 70 天 pH 未有酸化現象，與過去  $\gamma$ -PGA 數據比較發現類似成效。當環境中之 pH 值產生變化時， $\gamma$ -PGA 能與溶液中之氫離子( $H^+$ )結合或分離達到平衡之狀態，在這種結合和分離中，其微觀分子結構的變化會導致其體積、形態或結構的變化(Khalil et al., 2016; Luo et al., 2016; Sirisansaneeyakul et al., 2017; Anju et al., 2018)。因此  $\gamma$ -PGA 當作基質具緩衝 pH 值之作用，能夠有效解決地下水水質參數 pH 酸化現象，乳化型  $\gamma$ -PGA 不同比例組別(C、D、E)。C 組別初始 pH 值為 6.7 反應期間 pH 逐漸下降，D 組別初始 pH 值為 7.05 反應期間亦逐漸下降趨勢，其推估原因基質可快速供微生物利用產生有機酸，以  $\gamma$ -PGA 當作緩衝 pH 值與地殼環境緩衝鹼度無法綜合微生物所產生之有機酸。E 組別初始為 6.64 實驗前期下降至 6.42 但第 14 天後開始上升趨勢，此組別為 25 mL  $\gamma$ -PGA 加入 1 mL 乳化油，數據顯示增加  $\gamma$ -PGA 藥劑量對於 pH 上升是正相關性。顯示  $\gamma$ -PGA 與乳化油混合作為碳源比較，本身具有緩衝 pH 之效果。因此  $\gamma$ -PGA 當作基質有緩衝 pH 值之作用，能夠有效解決基質導制 pH 酸化問題環境中 pH 的變化決定微生物行還原脫氯的效率，一般脫氯是最佳 pH 值為 6.8~7.2，但 pH 值低於 6.2 會受到抑制之情形(Philips et al., 2013; Meckenstock et al., 2015; Yang et al., 2018b)。因此，控制酸化現象即為相當重要之因子。於生物基質反應期間因微生物生長過程中可快速分解水中有機物質及營養鹽所產生有



## 第四章：結果與討論

機酸、脂肪酸等機制作用下而造成 pH 值降低，由相關文獻指出，當基質在反應過程中因發酵作用產生  $H_2$  及微生物分解後產生有機酸(乙酸、丙酸、丁酸及醋酸等)易導致地下水質酸化程度大於地殼環境緩衝鹼度，便會造成 pH 值下降情況 (Detman et al., 2018)。

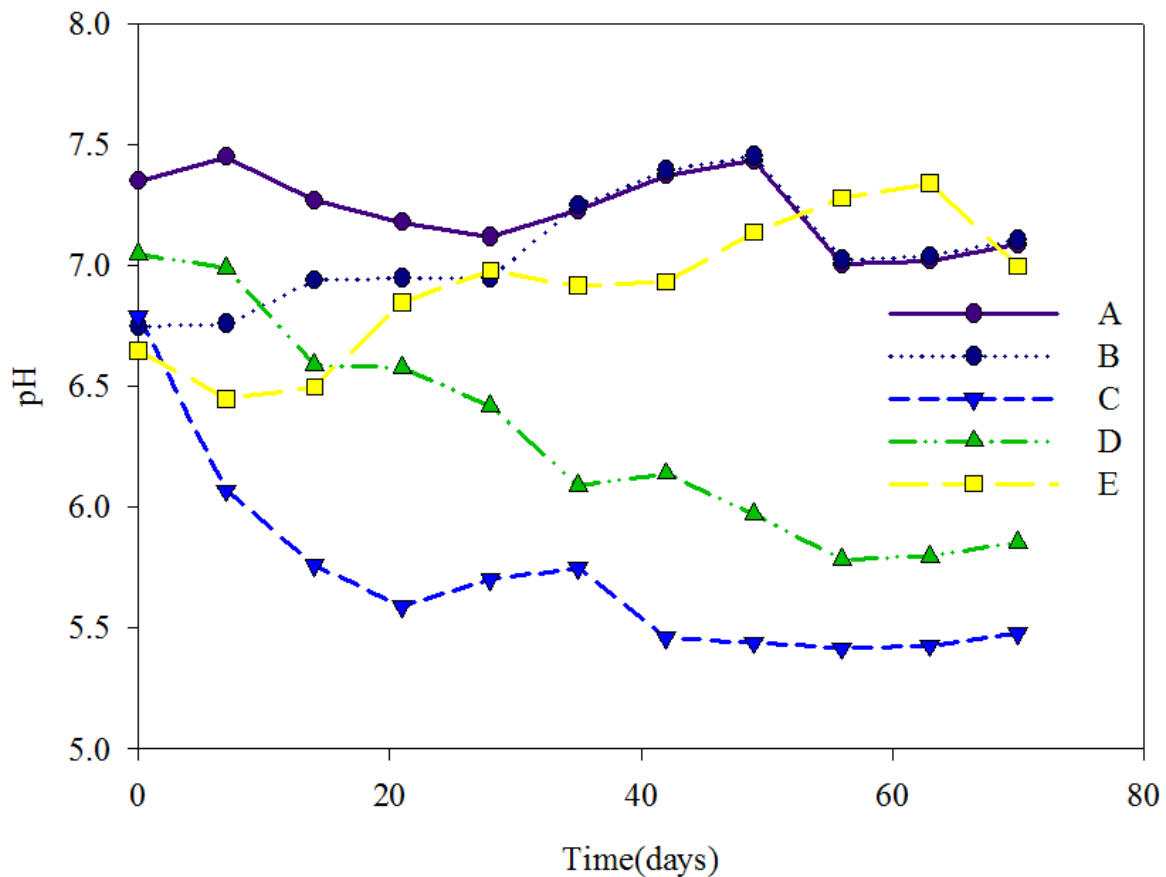


圖 4.8 微生物厭氧批次實驗 pH 變化趨勢圖

由氧化還原電位(oxidation reduction potential, ORP)監測結果如圖 4.9 所示，自然降解組(A)初始測得 ORP 為 245 mV，並於反應 70 天測得 ORP 為 185 mV 主要於微氧型態。CMC 組別(B)、 $\gamma$ -PGA 與乳化油混合組別(C、D、E)反應期間 ORP 下降趨勢，於第 35 天皆維持在負值介於-175 到-230 mV 之間。證實添加基質將有助於快速營造地下水中環境由微氧型態轉換為厭氧還原態。各組別溶氧(dissolved oxygen, DO)監測結果如圖 4.10 所示，自然降解組(A)初期測得 DO 為 1.65 mg/L，反應過程中因微生物反應消耗地下水中 DO 濃度，監測 DO 皆維持在 1.55~1.95 mg/L 之間並無明顯改變。CMC 組別(B)、 $\gamma$ -PGA 與乳化油混合組別(C、D、E)初期測得 DO 為 0.68~1.2 mg/L，反應過程中監測 DO 皆維持在 0.5 mg/L 左右，顯示  $\gamma$ -PGA 添加乳化油提供豐富營養基質與產氫作用下可刺激微生物生長，快速消耗水中 DO，進而形成穩定性且均維持厭氧環境之狀態。故從 DO 及 ORP



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

水質參數數據顯示，各組別皆為厭氧環境有利於微生物在厭氧的環境還原脫氯降解 TCE 污染物之效率。各組別 TOC 濃度結果如圖 4.11 所示，數據顯示各組別反應 70 天均有較豐富碳源，表示為生物能夠有效利用基質且反應期間可持續提供碳源。厭氧性生物降解機制過程中，二氧化碳當作最終電子接受者而形成甲烷，因此甲烷的生成亦可顯示此環境為厭氧環境評估。可估微生物利用碳源之情形，批次試驗反應期間，添加基質組別(B、C、D、E)均有微量甲烷之生成，表示厭氧微生物降解成效。綜合各組別基本水質參數顯示，含微生物分解後所產生有機酸產物及污染物降解過程產生 HCl 等機制作用會導致地下水中 pH 值微幅下降。於反應期間有添加適量  $\gamma$ -PGA 基質可維持 pH 中性範圍。自然降解組之水中碳源濃度不足亦是受限微生物生長主因，添加基質組別將明顯提高生物降解可行性。

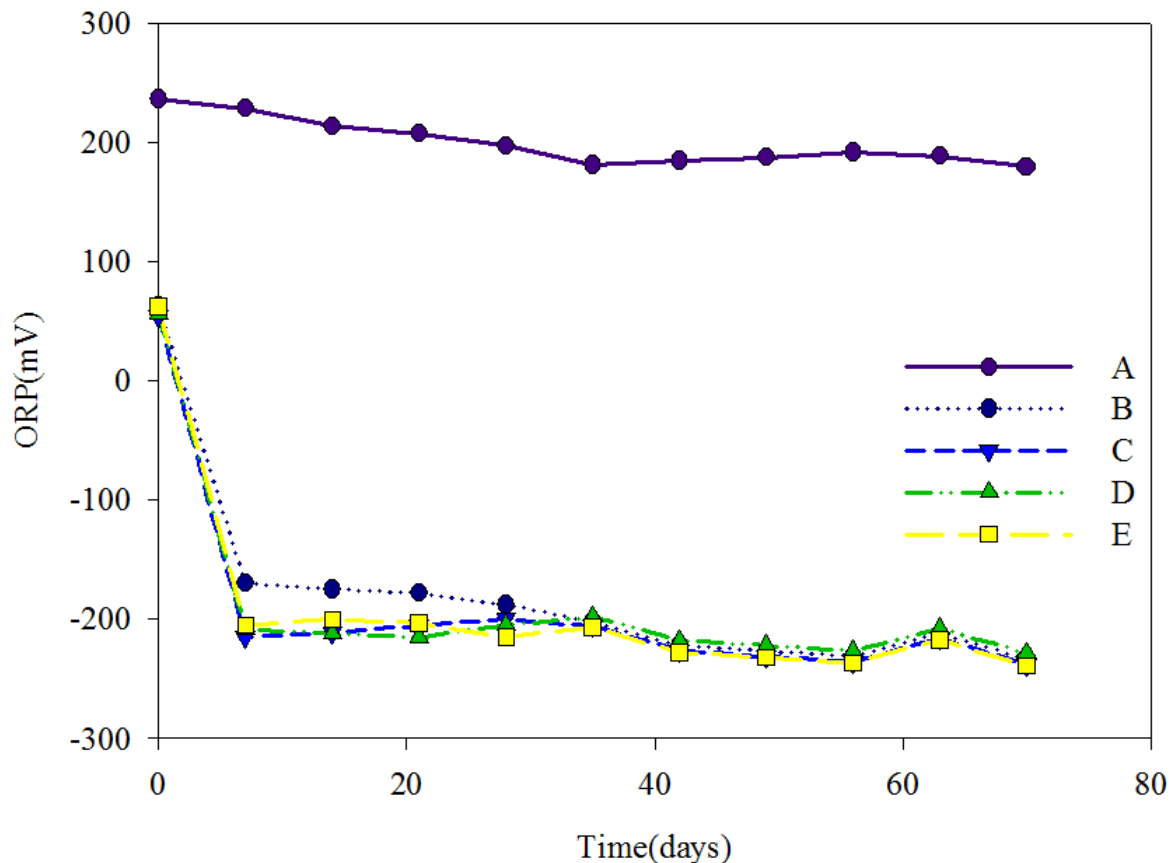


圖 4.9 微生物厭氧批次實驗 ORP 變化趨勢圖



第四章：結果與討論

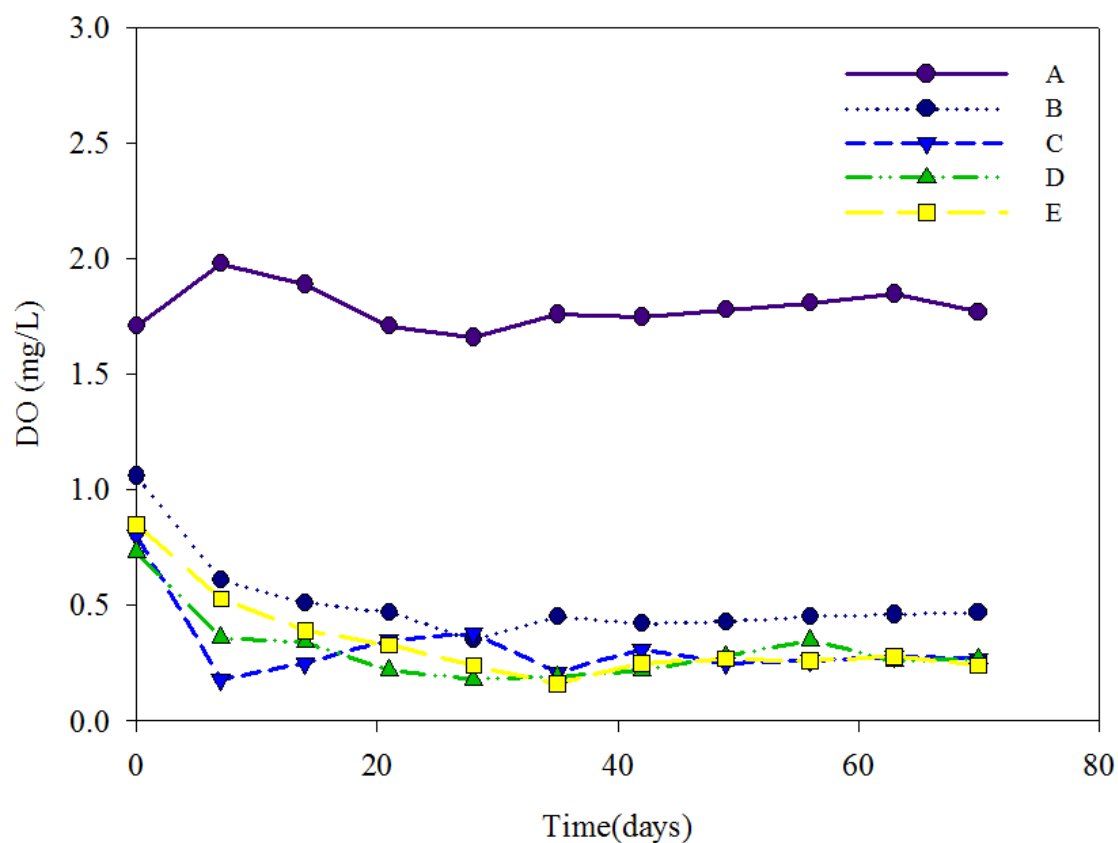


圖 4.10 微生物厭氧批次實驗 DO 變化趨勢

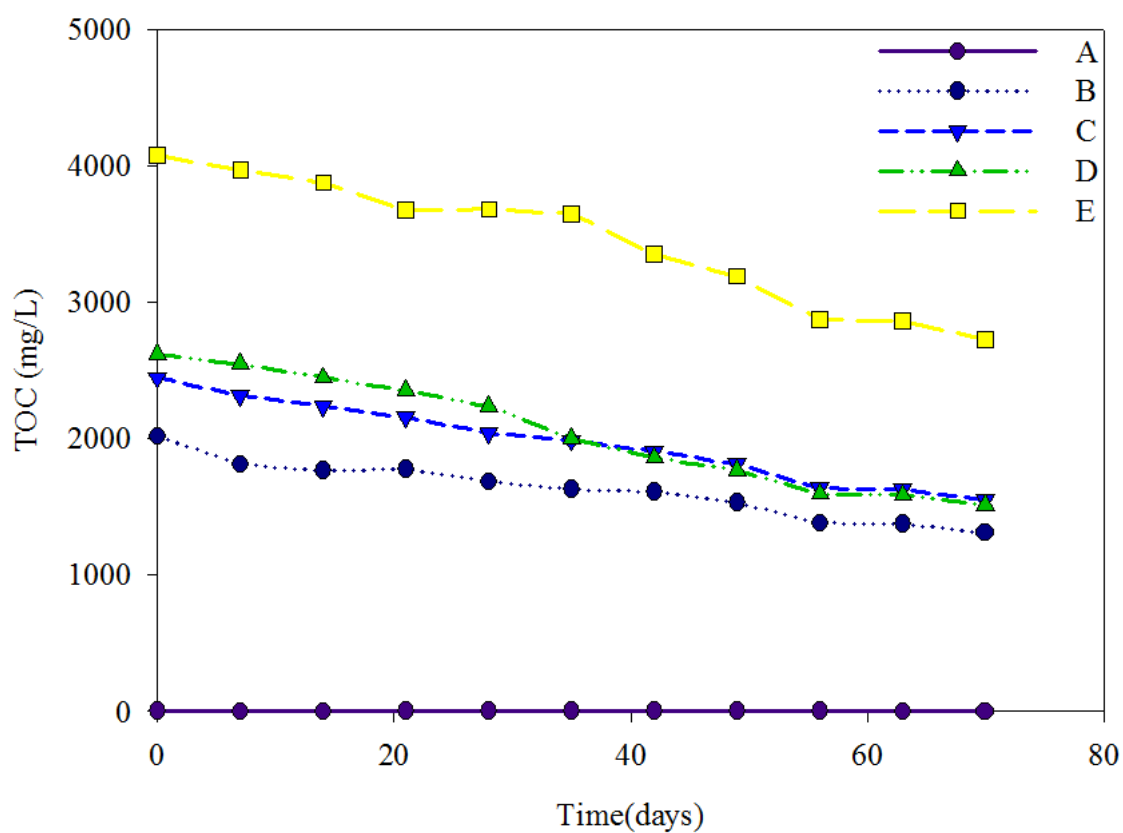


圖 4.11 微生物厭氧批次實驗 TOC 濃度變化趨勢圖



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

## 4.2.2 各組別降解三氯乙烯

各組別監測結果顯示如圖 4.12 所示，自然降解組初始濃度 1.2 mg/L，反應第 35 天可顯示降解成效約 20%，後續會持續觀察。推估後期反應期間 TCE 趨於平衡曲線，亦表示 TCE 吸附平衡曲線中氣相與液相間平衡狀態。文獻指出，現地生物整治場址中，提供於地下水之基質 TOC 應大於 100 mg/L，方能確保微生物進行發酵產氫作用，並刺激微生物生長達到還原脫氯之效果，若是低於 20 mg/L，需再適度灌入營養基質，才能確保有足夠之電子提供(Dahan et al., 2017)。因此，本計畫利用自然降解組別試驗結果可知，現地地下水中 TOC 略顯不足，惟有添加足夠基質可有利於生物反應成效。

CMC 組別(B)數據顯示第 35 天降解成效約 77%，持續觀察反應 50 天降至法規標準 0.05 mg/L，CMC 組別反應期間水質參數 ORP-210 mV、DO 為厭氧狀態、TOC 濃度的變化及甲烷的生成，顯示  $\gamma$ -PGA 搭配 CMC 結合適合作為微生物生長之碳源並加強三氯乙烯之厭氧還原脫氯。故從  $\gamma$ -PGA 之 pH 數據顯示具有平衡地下水體之酸鹼值，能解決以往釋碳基質經微生物分解後會有酸化之問題，能使微生物不受到抑制生長。後續 CMC 改質組別可評估應用於現地進行試驗。乳化型  $\gamma$ -PGA 組別(C、D、E)，評估改質後加強式自然生物技術對污染物降解之情形以及對自然環境的影響。三種組別 TCE 濃度呈現逐漸下降趨勢於 35 天降解效率約 85%，觀察水質參數亦發現環境轉化成厭氧環境狀態。持續觀察 70 天降解效率達 95% 以上。推測降低可能原因為 TCE 具有與油脂較高親和性，當乳化型基質注入地下水中可有效快速攔阻 TCE 包附於油滴顆粒中，形成水相與油相間之相轉移作用，此時微生物可利用碳源後迅速增長，而提高污染物降解效率，造成濃度前期快速下降。然而，反應第 28 天後 TCE 濃度呈現平穩下降之趨勢，數據顯示乳化型  $\gamma$ -PGA 可作為微生物生長之碳源並加強三氯乙烯之厭氧還原脫氯，基質經微生物分解後會釋出有機酸造成 pH 值下降， $\gamma$ -PGA 基質特性氨基可綜合有機酸，未影響微生物生長及降解物染物之效率，故可排除過去研究地下水水質參數 pH 值酸化現象。結果顯示 CMC 結合  $\gamma$ -PGA 組別與乳化型  $\gamma$ -PGA 相較之下，乳化型  $\gamma$ -PGA 降解效率較高。另外，可排除過去乳化油衍生酸化現象，處理 TCE 之地下水時不需添加緩衝物質平衡水體之 pH 值，即可達到最佳之降解效果。



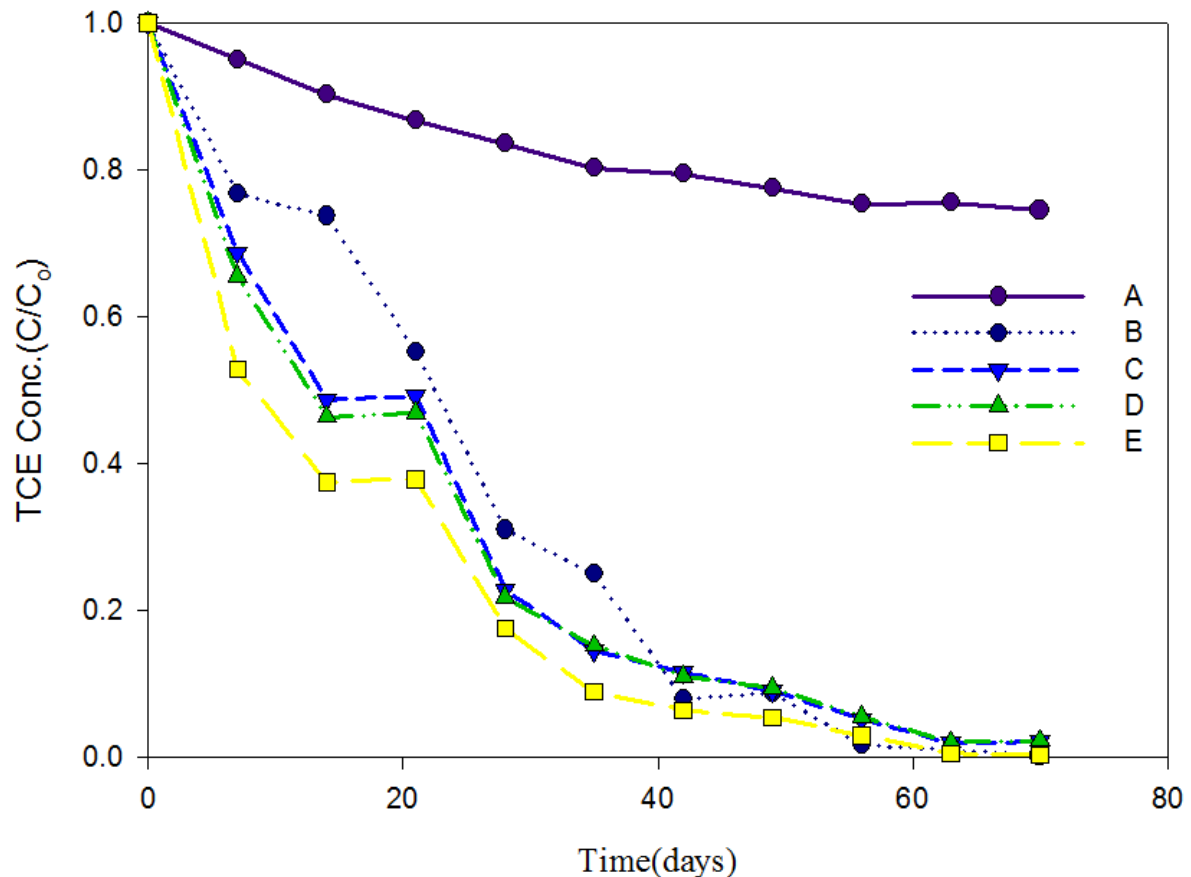


圖 4.12 各組別降解 TCE 濃度變化趨勢圖

### 4.2.3 各組別降解效率比較

本批次試驗藉由添加不同改質後基質對 TCE 的還原脫氯之情形，比較整體降解效率之情形，各組別在第 70 天之降解效率為  $E > D > C > B$ 。實驗結果顯示乳化型  $\gamma$ -PGA 降解成效相較單獨基質  $\gamma$ -PGA 或乳化油較為優勢，其各有特性使用乳化油緩衝液組之成分中，大豆油對 TCE 有較強富集性，具有物理吸附特性使 TCE 被乳化油包覆住，後續乳化油滴經微生物利用部分 TCE 慢慢釋出。後期因乳化油持續釋出有機酸，造成環境酸化而使微生物受到抑制，導致影響對 TCE 還原脫氯之效益。 $\gamma$ -PGA 基質可快速供微生物微生物利用使 TCE 濃度呈現平穩下降之趨勢。雖然  $\gamma$ -PGA 不具備像乳化油一樣能包覆住污染物之能力，但相較於乳化油可以提供較高量之 TOC，可長期下提供豐富碳源供微生物利用且未造成水質酸化之問題產生。若乳化型  $\gamma$ -PGA 與其他基質比較，於處理 TCE 污染物時具備以下優勢：(1) 整治時程短，不須大量之灌注量即可達到法規標準；(2)  $\gamma$ -PGA 本身具備有緩衝地下水酸鹼值之能力，可以解決以往釋碳基質經微生物利用後產生逐漸酸化之情形發生；(3) 乳化型  $\gamma$ -PGA 推估可長效性且均勻分布於土壤顆粒間。從各組別之中間產物結果如圖 4.13 所示，三氯乙烯經微生物行脫氯之作用會有副產物



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

如 c-DCE、t-DCE、1,1-DCE 和 VC 等之生成及累積，其中各組別之 c-DCE 及 t-DCE 在初期有明顯之生成，批次試驗反應 60 天後均低於法規標準，顯示微生物在厭氧情形下還原脫氯 TCE，未有副產物之累積而造成毒性問題。

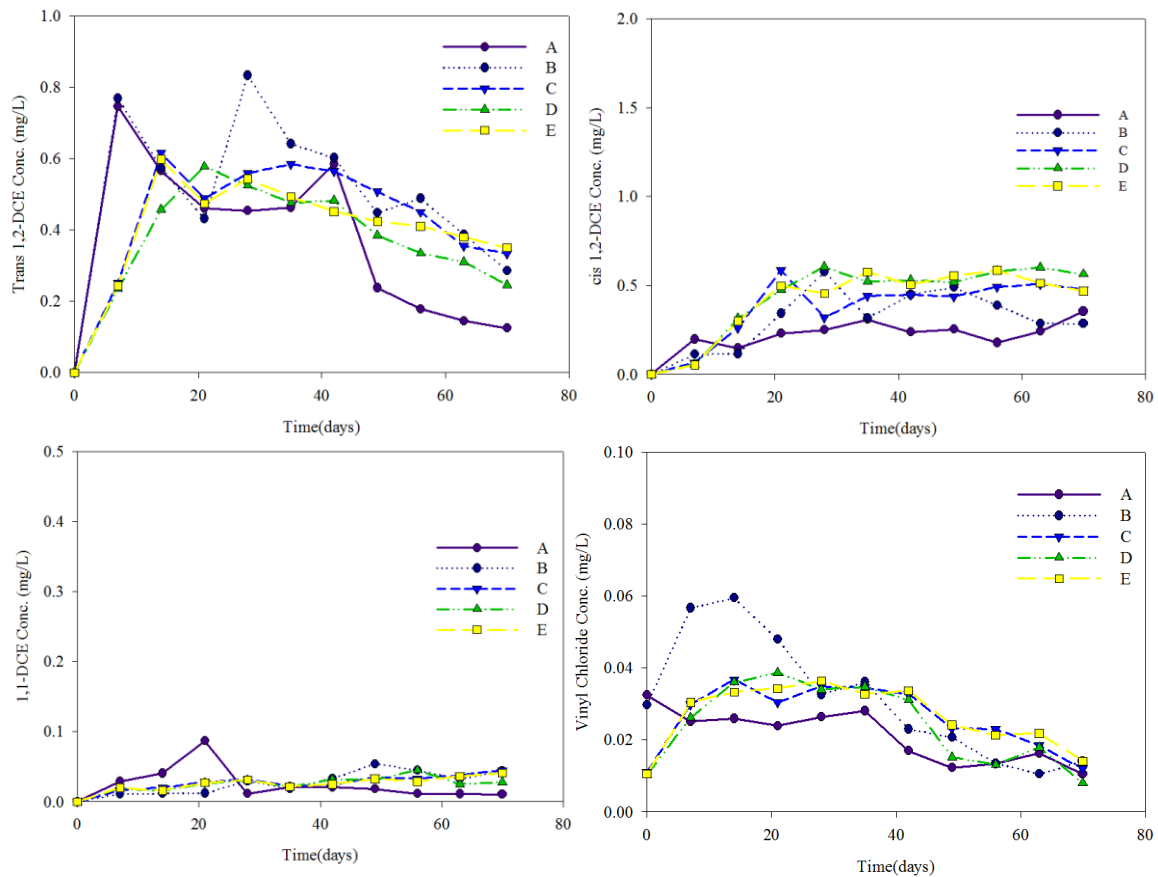


圖 4.13 各組別副產物濃度變化趨勢圖



#### 4.2.4 各組批次試驗菌量分析

加強式生物處理係指利用基質提供土壤中的微生物足夠碳源將污染物分解去除，同時亦達到降低污染物對環境及人類健康危害之目的，現地土壤中含有眾多的微生物族群，其大多數菌數約  $10^3 \sim 10^7$  cells/g。本實驗為瞭解微生態系統 (microcosm) 模擬現地環境微生物種類、特性及批次試驗 *DHC* 菌種之變化趨勢，批次試驗中各組分別以前、中、後三個時期進行微生物菌相分析，利用 PCR 技術放大 16S rDNA 的 V6-V8 片段，將 PCR 之產物搭配 qPCR 技術觀察各批次瓶中 *DHC* 菌量變化，瞭解添加基質刺激與馴化現地微生物消長情形，利於微生物還原脫氯降解污染物之成效之依據。

本研究利用 qPCR 定量技術不僅可瞭解指標性菌株稍長，且若能於污染物降解途徑場址中鑑定出具有降解之脫氯球菌之種類及數量等，有助於提升生物整治成效，提供未來應用於受含氯有機污染之場址進行生物復育之參考依據。本研究於批次生物整治期間偵測不同反應天數之降解組別，分別為 CMC  $\gamma$ -PGA 組、乳化型  $\gamma$ -PGA 不同比例組別，採樣天數為第 0、28 及 70 天進行 *DHC* 菌量分析，可進一步瞭解厭氧還原脫氯過程中針對 *DHC* 菌屬稍長變化之情形。此外，相關研究亦證實 *DHC* 在含氯有機污染場址中為最常見之代表性菌株，目前僅有 *DHC* 菌屬能夠完全將污染物降解至乙烯 (Lee et al., 2013; Dolinová et al., 2017; Pérez-de-Mora et al., 2018; Schaefer et al., 2018; Yu et al., 2018)。批次實驗組別 *DHC* 之菌量結果如圖 4.14 所示，各組別之初期之菌量在約  $10^3 \sim 10^4$  gene copies/g，於第 70 天 B、D 組別菌量大於  $10^5$  gene copies/g，其中以 B 組別的菌量較高為  $1.3 \times 10^6$  gene copies/g，污染物濃度對照結果顯示具最佳 TCE 降解成效，表示  $\gamma$ -PGA 適合 *DHC* 之菌群生長及利用。另外，C、D 組別因水質參數 pH 值低於 6.2，*DHC* 菌量成長可能受到抑制，菌量均低於  $10^5$  gene copies/g，*DHC* 菌屬對於環境酸鹼較為敏感 pH 值低於 6.2 會受到抑制之情形 (Philips et al., 2013; Meckenstock et al., 2015; Yang et al., 2018b)。當環境中 pH 值產生明顯的變化會降低還原脫氯效率，因此維持環境中 pH 值為中性可達到最大還原脫氯成效，由批次試驗之結果顯示，若未有酸化現象組別 *DHC* 菌屬成長較顯著變化，故適合還原脫氯之菌群生長，對污染物之降解亦具有最佳之降解效果。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

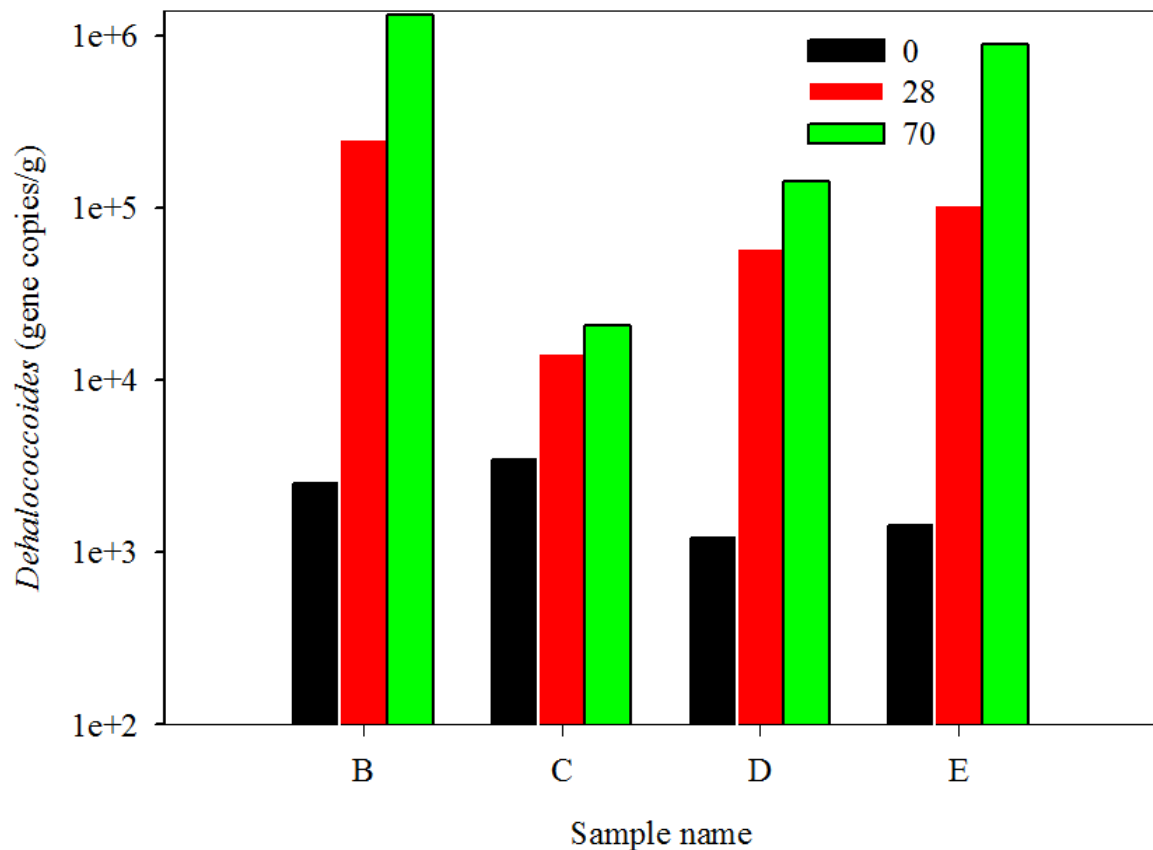


圖 4.14 批次實驗各組別 *DHC* 菌屬之變化圖

### 4.3 模場試驗

本研究模場試驗(field scale study)將整合實驗室試驗評估使用  $\gamma$ -PGA 處理含氯有機物污染之場址進行模場試驗探討其操作條件及整治成效。原先以台南市永康區鹽行地段受含氯有機物污染場址進行現地生物復育試驗，驗證以  $\gamma$ -PGA 加強含氯污染物還原脫氯之成效。因台南市永康區鹽行地段場址今年進行道路施工經由商確不便此場址進行現地試驗，後續改為高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號進行模場試驗亦已取得相關單位同意。該場址遭受含氯有機物污染較高，主要目標污染物為 PCE 及 TCE，為加速地下水污染團之還原脫氯作用，添加  $\gamma$ -PGA 基質進行加強式生物復育整治成效，場址井位示意圖如圖 4.15 所示。本場址水力傳導係數為  $3.90 \times 10^{-3}$  cm/s，地下水流向由東向西流動，土壤組成份以砂質壤土為主如表 4.4 所列。本計畫目前規劃設置一個上游監測井、一個注藥井、二個下游監測井，後續本團隊將評估整治成效及場址狀況，若監測井不足或位置不適當，增設數口臨時監測井作為整治井。此外，本計畫將依現場之微生物反應速率，做必要之整治技術之調整，以提高微生物活性及數量。注藥井(IW)提供現地試驗，並於其地下水下游處約 1~2 公尺設置二口監測井 DW1 (距離注藥井 1.5



## 第四章：結果與討論

m)、DW2 (距離注藥井 2.5m)，並選 UW (距離注藥井 1 m) 為污染的上游井做為控制井，各井設置規格如 4.5 所列。本團隊目前進行第一次  $\gamma$ -PGA 藥劑灌注，其灌注量為 10 L  $\gamma$ -PGA 藥劑並稀釋 36 倍藥劑量的推進水後灌入井中基質同心圓向外擴散，將  $\gamma$ -PGA 基質 TOC 濃度控制於 2400 mg/L。於注藥井及 3 口監測井定期採樣，其監測項目包括污染物濃度、地質化學參數變化及 DHC 分析搭配 NGS，以評估以  $\gamma$ -PGA 為基質的整治成效。

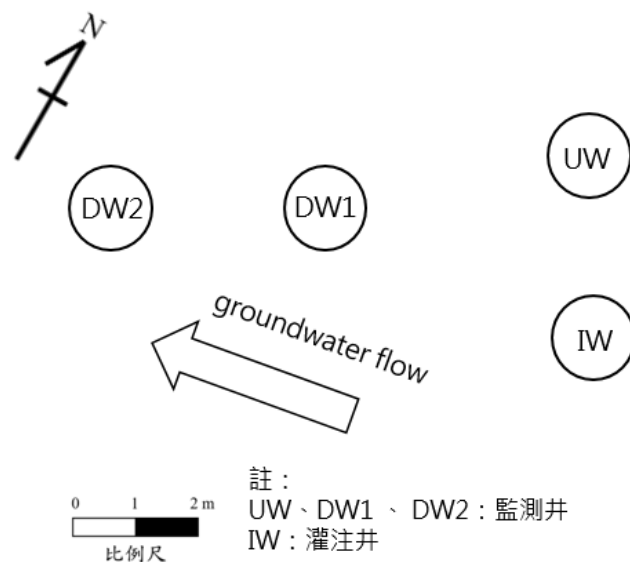


圖 4.15 模場試驗井位示意圖

表 4.4 場址土壤地質特性

上限深度(M)	下限深度(M)	岩石或土壤性質描述
0	0.7	回填粉土質砂夾礫石
0.7	2.8	粗中細砂夾少量貝屑
2.8	7.6	粗中細砂夾黏土及貝屑
7.6	8.1	粗中細砂夾大量貝屑





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

表 4.5 場址各簡易井設置規格

井編號	井徑 (吋)	井深 (m)	開篩 深度 (m)	型式	管理單位
UW	2	7.5	3-7.5	隱藏式 簡易井	本計畫設井
IW	2	7.5	3-7.5	隱藏式 簡易井	本計畫設井
DW1 (E00806)	2	6.6	0.5-6.5	隱藏式 標準井	高雄市環保局
DW2	2	7.5	3-7.5	隱藏式 簡易井	本計畫設井

### 4.3.1 現地灌注試驗水質分析

現地試驗之水質監測結果顯示圖 4.16 所示，模場地下水背景 pH 值介於 5.0~6.0；DO 介於 1.3~2.12 mg/L；ORP 介於 -285~35 mV。注藥井(IW)7 天後 pH 值上降至 8.5；DO 降至 0.65 mg/L；ORP 降至 -247 mV，pH 值灌注基質後上升現象，過去實驗室批次與管柱試驗均亦類似情形，其推估是導致 pH 值上升為  $\gamma$ -PGA 結構上有  $\text{NH}_2$  胺基之官能基，解離後和水反應形成氨  $\text{NH}_3$  是鹼性物質，實驗監測氨氮濃度確定有增加之趨勢，以佐證上述之推測原因。目前數據顯示注藥井內已產生厭氧環境，各項基本水質參數明顯變化；注藥第 7 天後注藥井與監測井地下水環境已呈現厭氧狀態（DO 0.3~0.5 mg/L；ORP -263~-161 mV），藉由  $\gamma$ -PGA 藥劑添加，使現地地下水氧氣逐漸被微生物消耗呈現厭氧狀態，根據文獻指出於厭氧還原脫氯條件下，DO 需小於 0.5 mg/L，當 DO 過高的環境下會抑制厭氧微生物生長，進而影響整治成效(Panagiotakis et al., 2015)。由模場試驗獲知添加  $\gamma$ -PGA 藥劑可刺激微生物生長，並消耗水中 DO 形成厭氧環境，同時亦證實地下水流向下游移動，灌藥井形成透水性生物反應牆及厭氧還原環境。

模場整治注入基質於目前整治期間地下水中環境 pH 值維持中性範圍，推估原因是  $\gamma$ -PGA 結構上有  $\text{NH}_2$  胺基之官能基解離後和水反應形成氨  $\text{NH}_3$  是鹼性物質，造成 pH 值上升主要原因，亦同時達到緩衝效果。於地下含水層中 pH 是含氯



污染物，於生物轉化過程中極具影響的重要因子，許多生物復育微生物降解污染物之最適 pH 介於 6-8 且較多可還原脫氯之重要菌群皆適合中性環境生長。過去研究指出，污染物降解過程中會因基質快速被微生物分解產生有機酸、脂肪酸之影響，而導致水質 pH 酸化程度之影響(Wen et al., 2017)，當 pH 值小於 6.2 會降低脫氯反應速率且脫氯菌群容易受到抑制之情形(Meckenstock et al., 2015; Yang et al., 2018b)。當這些有機酸累積時，經常造成地下水體 pH 無法維持於微生物最適 pH 反應區間，進而影響微生物降解污染物之效率及期程，因此調整及維持地下水體環境中最適微生物反應 pH 值是具挑戰的工法。本模場試驗選用  $\gamma$ -PGA 基質可中和厭氧微生物反應產生之有機酸，維持最適生物反應之 pH，避免厭氧整治期間之酸化問題造成脫氯菌之生長抑制。

各監測井 TOC 監測數據顯示，目前第一次藥劑灌注經由水流，流向下游監測井，於各監測井測得 TOC 殘餘量，可證實上游注藥井降解效果顯著亦成功形成透水性生物整治牆，符合現地、被動及生物整治概念之技術即包括現地生物復育(in situ bioremediation, ISB)結合透水性反應牆(permeable reactive barrier, PRB) (Freidman et al., 2017)。現場注入的基質後 ORP 維持於-247mV 至-157 mV，這表示此地下水環境下，能有助於提供鐵還原、硫酸鹽還原或甲烷化等反應產生，營造最佳脫氯條件之環境。由目前模場監測數據獲知，灌注井在整治期監所測得 ORP 由氧化態轉為還原態，ORP 持續下降能低於-200 mV 能有效促進還原脫率之反應，同時亦顯示地下環境已逐漸形成厭氧狀態，有利於現地在短期內提供厭氧生物循環還原代謝途徑降解污染物，目前後續持續監測評估整體成效。

目前監測氮氮變化趨勢如圖 4.17 所示，其驗證前述推估 pH 值上升原因是否有相關性，經由監測結果得知，於灌注基質後除了 UW 井以外其餘井位氮氮濃度均有上升趨勢。基質隨著地下水流流動，其 IW 井濃度氮氮最高，因 IW 井基質灌注井，因基質流入監測井需一段時間以及土壤異質性關係，隨著孔隙流入監測井之基質可能僅有一部分而已，才導致監測井之氮氮濃度並未提升很多，後續須進一步深入了解地下水水文狀況。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

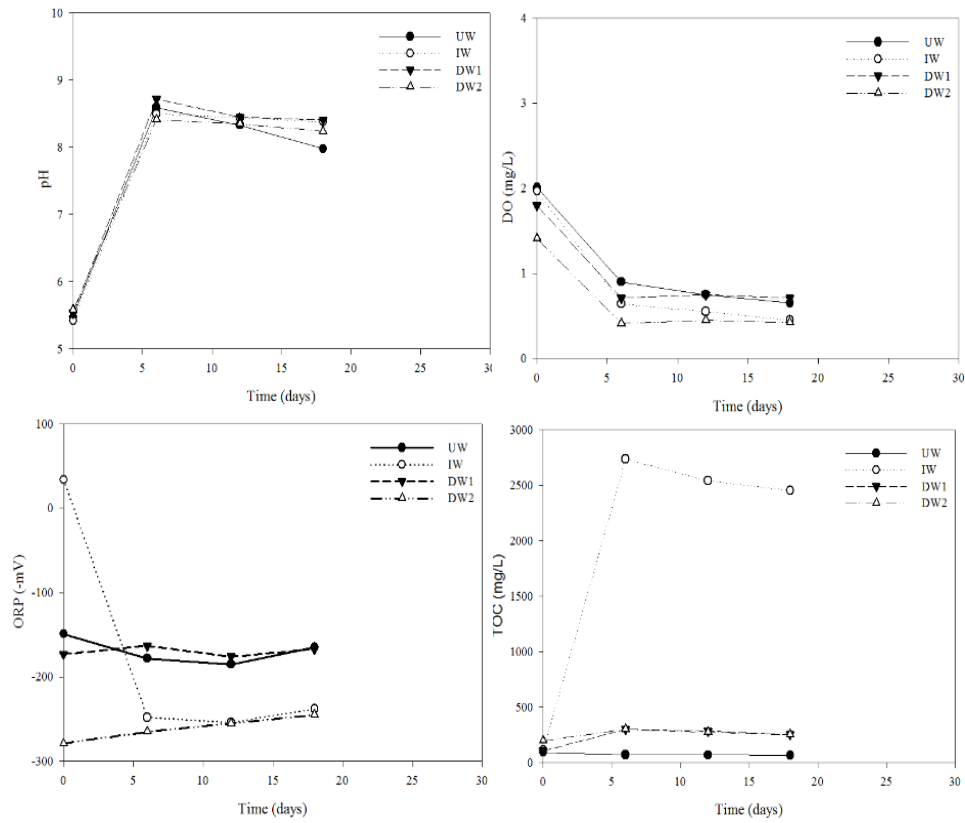


圖 4.16 模場試驗之基本水質監測趨勢圖

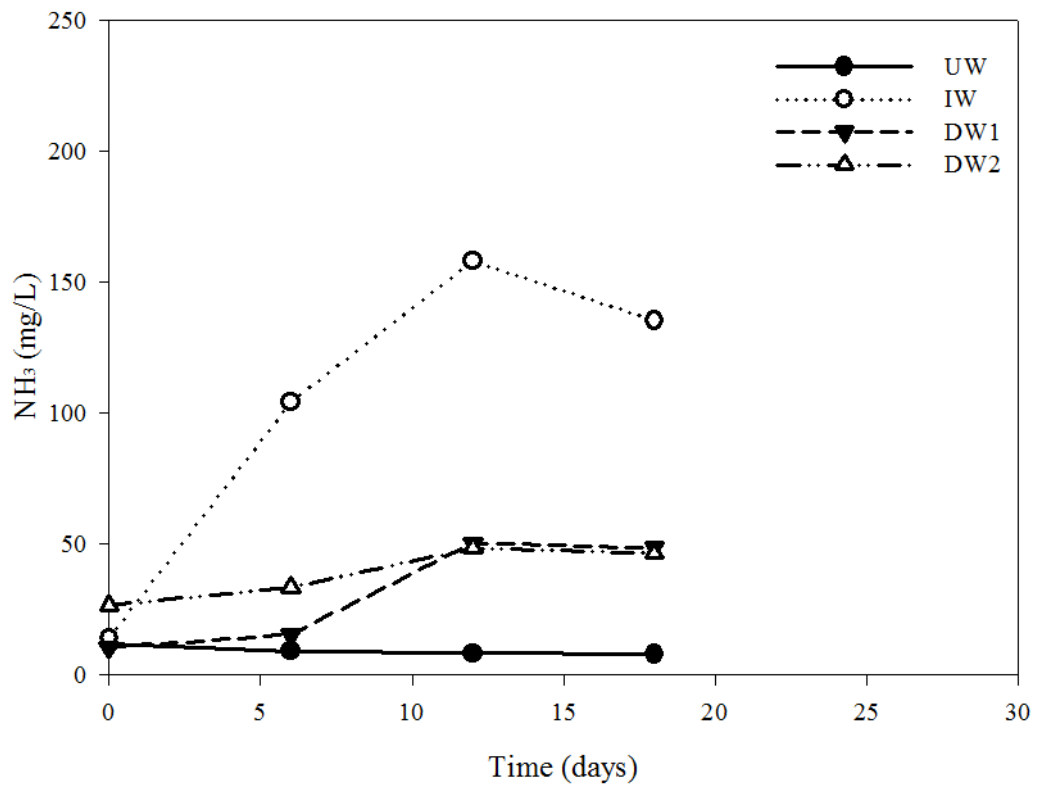


圖 4.17 模場試驗氨氮變化趨勢圖



### 4.3.2 含氯有機物降解趨勢

由圖 4.18 結果顯示，於注藥後第 7 天分析 IW 井 TCE 濃度為 0.524 mg/L，持續觀察分析 IW 井，目前結果發現注藥後反應 18 天測得現地地下水中 TCE 濃度 0.407 mg/L。監測井結果顯示，DW1(距離注藥井 1.5 m) TCE 濃度降解緩慢，評估可能 *DHC* 菌量較不足，後續評估是否需額外添加本團隊培養 *DHC* 菌於 DW1 井，以利於 *DHC* 為優勢菌種快速生長，後續會持續監測濃度變化趨勢。由現地地下水中 TOC 濃度測得濃度高於 100 mg/L 可供給微生物碳源利用，DW1 與 DW2 兩口井監測到 TOC 濃度上升趨勢，推測注藥井基質流向下游；數據顯示 DW2 井（距離注藥井 2.5 m）TCE 濃度 18 天內由 1.993 mg/L 降解至 0.597 mg/L，實驗結果可證實上游注藥井基質有隨著地下水流動將基質帶入下游，監測井污染物濃度均有下降趨勢，其降解效果顯著亦成功形成透水性生物整治牆。UW 井為污染的上游井做為控制井，試驗 18 天 TCE 濃度呈現下降之趨勢，推估原因為現地土壤中之原先營養源被微生物利用，注藥井基質可能未經由地下水流向流入 UW 井，後續可能導致營養源不足，降低降解效率。

由圖 4.19 結果顯示，UW 井副產物監測結果顯示現地環境背景主要存在之低氯數污染物為 c-DCE、1,1-DCE，VC，目前副產物濃度均有上升趨勢，顯示注藥井副產物上升證實現地 TCE 有效被微生物降解，後續會持續觀察副產物濃度是否造成累積現象情況。目前數據顯示注藥井中高氯數污染物降解至低氯數污染物，注藥井研究結果顯示  $\gamma$ -PGA 藥劑良好之成效。DW1 井副產物監測結果顯示，數據證實注藥井副產物上升證實現地 TCE 有效被微生物降解，下游井(DW1、DW2)結果顯示可能上游部分之降解副產物向下游移動，亦證實上游注藥井有效阻止污染物 TCE 向下游移動。目前研究顯示下列幾點現象證實 TCE 脫氯反應發生：(1) TCE 濃度下降趨勢與地下水流動路徑相關；(2)電子接受者被消耗濃度降低(3)降解 TCE 產生副產物。以上結果證實  $\gamma$ -PGA 藥劑與現地生物降解能有效移除目標污染物 TCE 及 DCE，後續會持續監測濃度是否持續下降趨勢。本模場所灌注之基質，目前確實可穩定且有效降解 TCE 及其副產物，持續觀察是否副產物累積現象，以達環境友善之成效並能阻止污染物 TCE 向下游傳輸。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

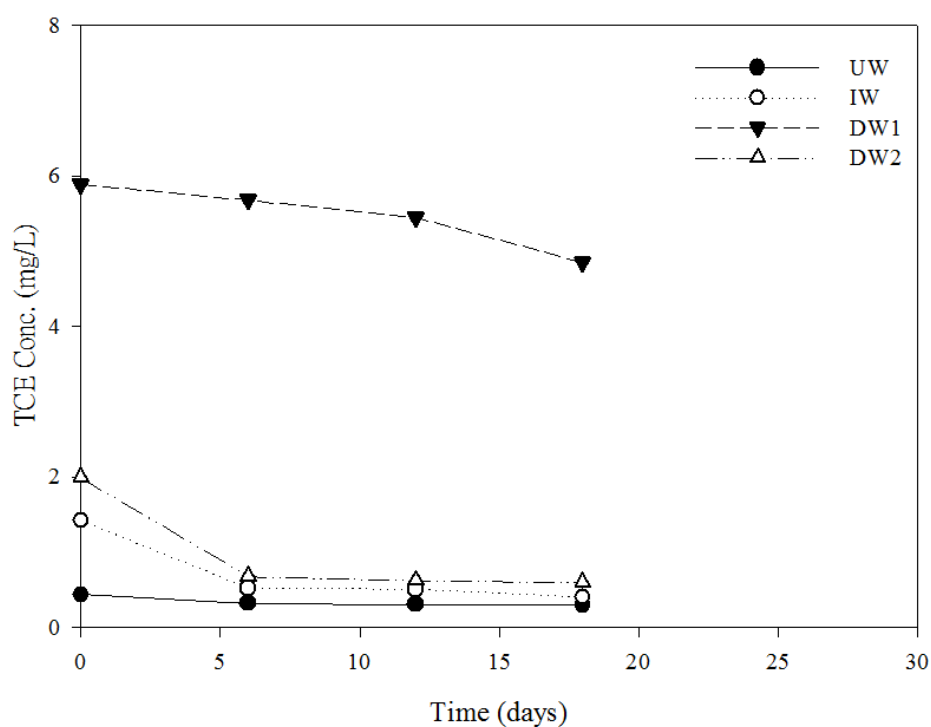


圖 4.18 模場試驗 TCE 濃度變化趨勢圖

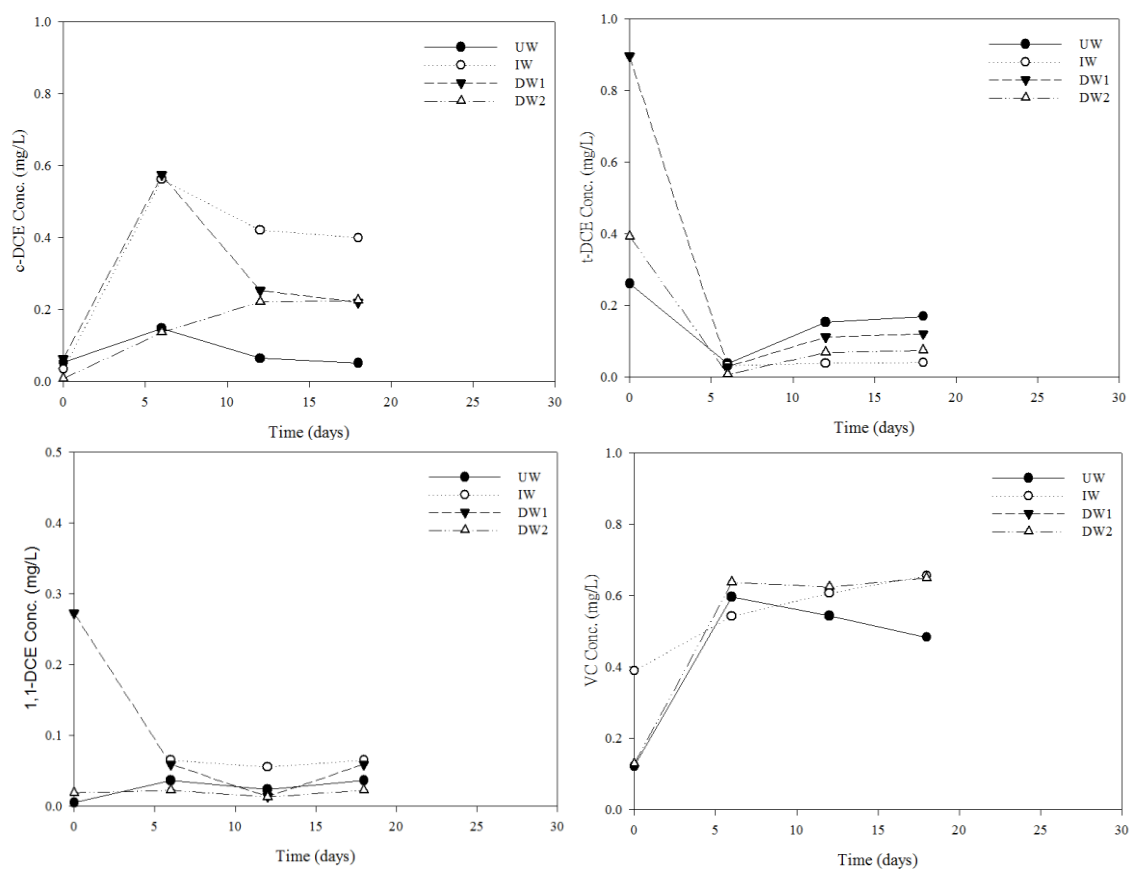


圖 4.19 模場試驗副產物變化趨勢圖





## 4.4 第二年模場試驗

本團隊以高雄市前鎮區興邦段 340 及 341 部分地號作為試驗區，第二年將  $\gamma$ -PGA 改質前後進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制進行污染區域的整治並評估整治成效。此外，本計畫將依現場之微生物反應速率，做必要之整治技術之調整，以提高微生物活性及數量，地下水之分析項目將包括含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析。本團隊目前以 1 口注藥井 3 口監測井進行灌注，評估用  $\gamma$ -PGA 作為整治 PCE 及 TCE 污染和邊界控制的可行性。

模場試驗區進行改質前後的  $\gamma$ -PGA 的試驗，驗證改質後的  $\gamma$ -PGA 對 TCE 污染場址的整治成效，模場試驗的程序和監測及評估方式與相同。本團隊將探討兩個階段的模場試驗成效，評估改質後的  $\gamma$ -PGA 的適用性以及整治成效提升的程度。兩個階段成效進行經濟效益分析，評估應用  $\gamma$ -PGA 以及改質後的  $\gamma$ -PGA 作為厭氧脫氯基質之操作成本，並和其他常用之基質進行成本分析，評估  $\gamma$ -PGA 以及改質後的  $\gamma$ -PGA 之市場競爭力。本計畫在各階段中，將使用 NGS 分析技術結合 qPCR 於現地試驗進行菌相及菌量分析，以瞭解 *DHC* 菌量變化和優勢菌種之變化，做為應用  $\gamma$ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。

第二年主要完成工作項目如下

- (1) 完成改質前  $\gamma$ -PGA 現地試驗評估，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域  $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估。
- (2) 完成改質後  $\gamma$ -PGA 進行現地的灌注，以厭氧還原脫氯機制，進行污染區域改質後  $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估
- (3) 完成以整治牆的概念，發展被動式現地生物還原脫氯法整治 TCE 污染之地下水之設計方法。
- (4) 完成以 NGS 分析技術結合 qPCR 於實驗中進行菌相分析，以瞭解 *DHC* 菌量和優勢菌相之變化，做為應用  $\gamma$ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。
- (5) 完成改良式基質，突破過去基質衍生之影響，日後生物復育選定基質灌注更具多樣性。
- (6) 完成評估整體模場整治成效與成本效益分析，評估  $\gamma$ -PGA 以及改質後的  $\gamma$ -PGA 之市場競爭力。



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

第二年研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	備註
文獻蒐集												
改質前 $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估												
灌注改質後之 $\gamma$ -PGA												
含氯有機物濃度、地質化學參數、脫氯菌群的變化分析												
期中報告撰寫												
改質後 $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估												
分子生物及定序分析												
生物復育技術整體分析評估												
期末報告撰寫												
工作進度估計百分比 （累積數）	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
預定查核點	第 3 個月完成；改質前 $\gamma$ -PGA 模場整治成效及成本效益評估											
	第 6 個月完成；期中報告撰寫											
	第 9 個月完成；改質後 $\gamma$ -PGA 模場成效評估與分子生物及定序分析。											
	第 11 個月完成；現地生物降解整治效益評析，並提出期末報告。											



## 第五章 結論

### 5.1 結論

本計畫主要之目的為評估以  $\gamma$ -PGA 為基質，以整治受 TCE 污染地下水之可行性，本計畫在實驗室試驗與模場試驗除了分析污染物濃度和地質化學參數變化外，並以分子生物技術(qPCR 結合 NGS)探討  $\gamma$ -PGA 對脫氯菌量與菌相的變化趨勢。目前主要的結論包括以下各項：

- (1) 改質後組別基本特性分析之結果顯示，各組別粒徑均介於 400 nm 至 5,500 nm 之間分布於奈米到微米之間，改質組別粒徑大小有效分佈到土壤顆粒間，達到均勻分佈及增加生物可及性目標。
- (2) 改質後組別介達電位均為負電位，可使基質有效向下游傳輸，改質後基質未有不均質現象且均含具豐富碳源供於微生物利用。
- (3) 管柱流通性試驗結果顯示  $\gamma$ -PGA 基質注入體積約 6~7 PV，TOC 濃度達到平衡趨勢。添加 CMC 之改質組別，約 11~13 PV TOC 濃度達到平衡趨勢，較  $\gamma$ -PGA 高出 5 PV 貫穿時間，顯示添加羧甲基纖維素之改質可提升其分佈係數(partition coefficient)，增加基質和土壤吸附性。乳化型  $\gamma$ -PGA 組別，在注入體積約 9~11 PV 後，TOC 濃度可達到平衡，均較  $\gamma$ -PGA 更能達到緩釋 TOC 效果。以乳化油進行  $\gamma$ -PGA 改質，pH 則有緩慢降低情形，顯示乳化油之分解性較佳，其因生物降解產生有機酸而使 pH 降低。
- (4) 實驗室乳化型  $\gamma$ -PGA 作為碳源， $\gamma$ -PGA 基質具緩衝 pH 值之作用，原因為  $\gamma$ -PGA 具有胺基，胺基釋放後為和水反應產生氨( $\text{NH}_3$ )，由於氨為鹼性物質，因此可中和生物降解產生有機酸，乳化油長效均勻分布土壤顆粒間，能夠有效解決基質導制 pH 酸化問題環境中 pH 的變化決定微生物行還原脫氯的效率。
- (5) 批次各組別 TCE 生物分解實驗結果顯示，各組別均迅速達到厭氧狀態，TCE 在 35 天降解率均可達 77% 以上，其中又以乳化型  $\gamma$ -PGA 基質組中之 TCE 降解產率最高(35 天達 85% TCE 去除率)。主要原因為 TCE 具有與油脂較高親和性，當乳化型基質注入地下水中可有效快速攔阻 TCE 包附於油滴顆粒中，形成水相與油相間之相轉移作用，此時微生物可利用碳源後迅速增長，而提高污染物降解效率。
- (6) 實驗室初步成果顯示以  $\gamma$ -PGA 結合乳化油或 CMC 結合  $\gamma$ -PGA 作為基質，



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

可有效控制 pH，加速 TCE 之還原脫氯效率，並縮短整治期程。此外，改質基質並有緩釋及長效性效果。

- (7) 目前現地成效  $\gamma$ -PGA 灌注井(IW) 與 2 口下游監測井(DW1 及 DW2)、於 IW 注入基質後 TCE 濃度下降趨勢，副產物明顯上升趨勢，後續持續監測污染物濃度。目前結果顯示  $\gamma$ -PGA 作為碳源可有效供微生物生長進而降解目標污染物濃度  $\gamma$ -PGA 基質具有極佳之傳輸性，並可釋出高濃度 TOC，達到還原脫氯目標， $\gamma$ -PGA 具有緩衝 pH 之效果，使 pH 維持中性解決過去生物基質分解後造成水質酸化之問題。

## 5.2 建議

- (1) 本團隊後續將持續完成現地模場試驗，以驗證實場應用之成果。若實場數據顯示  $\gamma$ -PGA 可有效促進現場 TCE 之生物降解，則將使  $\gamma$ -PGA 之基質系統成為一種更具經濟效益及環境友善之綠色整治工法。
- (2) 後續將研發改質後  $\gamma$ -PGA 應用於不同地質之現地場址，評估  $\gamma$ -PGA 應於各種場址之可行性，使以  $\gamma$ -PGA 為緩衝釋碳基質之系統成為一種更具經濟效益及環境友善之綠色整治工法。 $\gamma$ -PGA 官能基可顯示緩衝 pH 效果為  $\gamma$ -PGA 之主要優勢之一，後續將針對  $\gamma$ -PGA 與對地下水 pH 緩衝之特性做深入探討。
- (3) 後續以分子生物技術進行微生物菌相分析，確認主要優勢菌種。
- (4) 目前  $\gamma$ -PGA 以在各個領域均有廣泛之應用，已有學者利用不同之環境條件下衍生製造出不同類型  $\gamma$ -PGA，如分子量不同而發展出的高分子及低分子之  $\gamma$ -PGA，另也有與不同金屬結合形成鈉離子型及鈣離子型之  $\gamma$ -PGA。而不同類型之  $\gamma$ -PGA 在應用上也有不同之差異。故未來針對不同類型之  $\gamma$ -PGA 對含氯有機物或其他類型之污染物之處理效益做深入研究。



## 參考文獻

- Akash, Vinay Mohan, P., Neelesh, B., Navneet, 2018. Bioremediation of Environmental Pollutants. in: Vinay Mohan, P., Navneet (Eds.). Handbook of Research on Microbial Tools for Environmental Waste Management. IGI Global, Hershey, PA, 80-104.
- Alfán-Guzmán, R., Ertan, H., Manefield, M., Lee, M., 2017. Isolation and characterization of *Dehalobacter* sp. strain TeCB1 including identification of TcbA: a novel tetra- and trichlorobenzene reductive dehalogenase. *Frontiers in Microbiology* 8, 558.
- Anju, A.J., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., 2018. Production, Characterization, and Applications of Microbial Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid. *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges*. Springer, 105-126.
- Badin, A., Broholm, M.M., Jacobsen, C.S., Palau, J., Dennis, P., Hunkeler, D., 2016. Identification of abiotic and biotic reductive dechlorination in a chlorinated ethene plume after thermal source remediation by means of isotopic and molecular biology tools. *Journal of contaminant hydrology* 192, 1-19.
- Barrow, N., 2017. The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and soil* 410, 401-410.
- Buckley, A.K., 2017. Contaminant Mass Distribution of a Mixed Organic Contaminant Plume Down-Gradient of an Aged DNAPL Source Zone in Sedimentary Rock.
- Cecchin, I., Reddy, K.R., Thomé, A., Tessaro, E.F., Schnaid, F., 2017. Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119, 419-428.
- Cerqueira, V.S., Maria do Carmo, R.P., Camargo, F.A., Bento, F.M., 2014. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95, 338-345.
- Chang, C.H., Yang, H.Y., Hung, J.M., Lu, C.J., Liu, M.H., 2017. Simulation of combined anaerobic/aerobic bioremediation of tetrachloroethylene in groundwater by a column system. *International Biodeterioration & Biodegradation* 117, 150-157.
- Chang, Y.C., Chen, T.Y., Tsai, Y.P., Chen, K.F., 2018. Remediation of trichloroethene (TCE)-contaminated groundwater by persulfate oxidation: a field-scale study. *RSC Advances* 8,





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

2433-2440.

Chen, J.L., Ortiz, R., Steele, T.W., Stuckey, D.C., 2014. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. *Biotechnology advances* 32, 1523-1534.

Chheda, D., Sorial, G.A., 2017. Evaluation of co-metabolic removal of trichloroethylene in a biotrickling filter under acidic conditions. *Journal of Environmental Sciences* 57, 54-61.

Chiu, D.W., 2015. Using poly-glutamic acid to enhance the anaerobic dechlorination of trichloroethylene. MS Thesis, Institute of Environmental Engineering, National Sun Yat-Sen University, Taiwan.

Dafny, E., 2017. TCE longevity in the vadose zone and loading to the groundwater—The case of episodic NAPL releases from near-surface source. *Environmental Technology & Innovation* 7, 128-140.

Dahan, O., Katz, I., Avishai, L., Ronen, Z., 2017. Transport and degradation of perchlorate in deep vadose zone: implications from direct observations during bioremediation treatment. *Hydrology and Earth System Sciences* 21, 4011-4020.

Detman, A., Bucha, M., Simoneit, B.R.T., Mielecki, D., Piwowarczyk, C., Chojnacka, A., Błaszczuk, M.K., Jędrysek, M.O., Marynowski, L., Sikora, A., 2018. Lignite biodegradation under conditions of acidic molasses fermentation. *International Journal of Coal Geology* 196, 274-287.

Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháček, J., Ševců, A., 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 13262-13283.

Dong, S., Feng, C., Cui, W., Chen, N., Liu, Y., Liu, T., 2018. Anaerobic Bioremediation Performance and Indigenous Microbial Communities in Treatment of Trichloroethylene/Nitrate-Contaminated Groundwater. *Environmental Engineering Science* 35, 311-322.

Dudhagara, P., Bhavsar, S., Bhagat, C., Ghelani, A., Bhatt, S., Patel, R., 2015. Web Resources for Metagenomics Studies. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13, 296-303.

Dumas, O., Despreaux, T., Perros, F., Lau, E., Andujar, P., Humbert, M., Montani, D., Descatha, A., 2018. Respiratory effects of trichloroethylene. *Respiratory Medicine* 134, 47-53.

Field, M.S., 2018. Investigating and Remediating Contaminated Karst Aquifers. *Karst*



- Groundwater Contamination and Public Health. Springer, 101-115.
- Frasconi, D., Zanzaroli, G., Danko, A.S., 2015. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: a review. *Journal of hazardous materials* 283, 382-399.
- Freidman, B.L., Gras, S.L., Snape, I., Stevens, G.W., Mumford, K.A., 2017. A bio-reactive barrier sequence for petroleum hydrocarbon capture and degradation in low nutrient environments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 116, 26-37.
- Gates-Hollingsworth, M.A., Perry, M.R., Chen, H., Needham, J., Houghton, R.L., Raychaudhuri, S., Hubbard, M.A., Kozel, T.R., 2015. Immunoassay for capsular antigen of *Bacillus anthracis* enables rapid diagnosis in a rabbit model of inhalational anthrax. *PloS one* 10, 0126304.
- Ghaly, A., Ramakrishnan, V., 2015. Nitrogen sources and cycling in the ecosystem and its role in air, water and soil pollution: a critical review. *Journal of Pollution Effects & Control*, 1-26.
- Guo, Z., Brusseau, M.L., 2017. The impact of well-field configuration and permeability heterogeneity on contaminant mass removal and plume persistence. *Journal of Hazardous Materials* 333, 109-115.
- Harkness, M., Fisher, A., 2013. Use of emulsified vegetable oil to support bioremediation of TCE DNAPL in soil columns. *Journal of contaminant hydrology* 151, 16-33.
- Hisada, M., Kawase, Y., 2017. Mucilage extracted from wasted natto (fermented soybeans) as a low-cost poly- $\gamma$ -glutamic acid based biosorbent: Removal of rare-earth metal Nd from aqueous solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 6061-6069.
- Huang, J., Wu, M., Tang, J., Zhou, R., Chen, J., Han, W., Xie, Z., 2016. Enhanced bio-reduction of hexavalent chromium by an anaerobic consortium using henna plant biomass as electron donor and redox mediator. *Desalination and Water Treatment* 57, 15125-15132.
- Inbaraj, B.S., Wang, J., Lu, J., Siao, F., Chen, B., 2009. Adsorption of toxic mercury (II) by an extracellular biopolymer poly ( $\gamma$ -glutamic acid). *Bioresource Technology* 100, 200-207.
- Jawaid, M., Paridah, M., Saba, N., 2017. Introduction to biomass and its composites. *Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials*. Elsevier, 1-11.
- Jeon, J.R., Murugesan, K., Baldrian, P., Schmidt, S., Chang, Y.-S., 2016. Aerobic bacterial catabolism of persistent organic pollutants—potential impact of biotic and abiotic



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

- interaction. *Current opinion in biotechnology* 38, 71-78.
- Jochum, T., Michalzik, B., Bachmann, A., Popp, J., Frosch, T., 2015. Microbial respiration and natural attenuation of benzene contaminated soils investigated by cavity enhanced Raman multi-gas spectroscopy. *Analyst* 140, 3143-3149.
- Johansson, G., 2017. Using PCA to reveal hidden structures in the remediation steps of chlorinated solvents.
- Kao, C.M., Liao, H.Y., Chien, C.C., Tseng, Y.K., Tang, P., Lin, C.E., Chen, S.-C., 2016. The change of microbial community from chlorinated solvent-contaminated groundwater after biostimulation using the metagenome analysis. *Journal of Hazardous Materials* 302, 144-150.
- Khalil, I., Irorere, V., Radecka, I., Burns, A., Kowalczyk, M., Mason, J., Khechara, M., 2016. Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid: Biodegradable Polymer for Potential Protection of Beneficial Viruses. *Materials* 9, 28.
- Kissell, S.M., 2017. Comparing the Effect of Carbon Sources, Lactate and Whey, on Biological Reductive Dechlorination of TCE in Laboratory Flow Through Columns.
- Kleindienst, S., Higgins, S.A., Tsementzi, D., Chen, G., Konstantinidis, K.T., Mack, E.E., Löffler, F.E., 2017. 'Candidatus Dichloromethanomonas elyunquensis' gen. nov., sp. nov., a dichloromethane-degrading anaerobe of the Peptococcaceae family. *Systematic and Applied Microbiology* 40, 150-159.
- Krachunov, M., Vassilev, D., Nisheva, M., Kulev, O., Simeonova, V., Dimitrov, V., 2015. Fuzzy Indication of Reliability in Metagenomics NGS Data Analysis. *Procedia Computer Science* 51, 2859-2863.
- Kranzioch, I., Ganz, S., Tiehm, A., 2015. Chloroethene degradation and expression of Dehalococcoides dehalogenase genes in cultures originating from Yangtze sediments. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 3138-3148.
- Kumar, V., Shahi, S., Singh, S., 2018. Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer, 115-136.
- Kuo, Y., Liang, S., Wang, S., Chen, S., Kao, C., 2013. Application of emulsified substrate biobarrier to remediate TCE-contaminated groundwater: Pilot-scale study. *Journal of*



- Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste 18, 04014006.
- Kwiatkowska-Malina, J., 2018. Qualitative and quantitative soil organic matter estimation for sustainable soil management. *Journal of Soils and Sediments* 18, 2801-2812.
- Kwon, K., Shim, H., Bae, W., Oh, J., Bae, J., 2016. Simultaneous biodegradation of carbon tetrachloride and trichloroethylene in a coupled anaerobic/aerobic biobarrier. *Journal of Hazardous Materials* 313, 60-67.
- Lai, A., Aulenta, F., Mingazzini, M., Palumbo, M.T., Papini, M.P., Verdini, R., Majone, M., 2017. Bioelectrochemical approach for reductive and oxidative dechlorination of chlorinated aliphatic hydrocarbons (CAHs). *Chemosphere* 169, 351-360.
- Lee, P.K., Cheng, D., West, K.A., Alvarez-Cohen, L., He, J., 2013. Isolation of two new *D. ehalococcoides* mccartyi strains with dissimilar dechlorination functions and their characterization by comparative genomics via microarray analysis. *Environmental microbiology* 15, 2293-2305.
- Lee, S.S., Kaown, D., Lee, K.K., 2015. Evaluation of the fate and transport of chlorinated ethenes in a complex groundwater system discharging to a stream in Wonju, Korea. *Journal of contaminant hydrology* 182, 231-243.
- Leitão, P., Aulenta, F., Rossetti, S., Nouws, H.P.A., Danko, A.S., 2018. Impact of magnetite nanoparticles on the syntrophic dechlorination of 1,2-dichloroethane. *Science of The Total Environment* 624, 17-23.
- Lerner, J.E.C., de los Angeles Gutierrez, M., Mellado, D., Giuliani, D., Massolo, L., Sanchez, E.Y., Porta, A., 2018. Characterization and cancer risk assessment of VOCs in home and school environments in gran La Plata, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 10039-10048.
- Liang, C., Hsieh, C.L., 2015. Evaluation of surfactant flushing for remediating EDC-tar contamination. *Journal of Contaminant Hydrology* 177-178, 158-166.
- Liang, S., Kuo, Y., Chen, S., Chen, C., Kao, C., 2013. Development of a slow polycolloid-releasing substrate (SPRS) biobarrier to remediate TCE-contaminated aquifers. *Journal of hazardous materials* 254, 107-115.
- Liao, X., Yan, X., Ma, D., Zhao, D., Sun, L., Li, Y., Fei, Y., Li, P., Lin, L., Tao, H., 2018. The Research and Development of Technology for Contaminated Site Remediation. *Twenty*



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

- Years of Research and Development on Soil Pollution and Remediation in China. Springer, 785-798.
- Lien, P., Yang, Z., Chang, Y., Tu, Y., Kao, C., 2016. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater with coexistence of fuel oil: effectiveness and mechanism study. *Chemical Engineering Journal* 289, 525-536.
- Lin, C.W., Wu, C.H., Guo, P.Y., Chang, S.H., 2017. Innovative encapsulated oxygen-releasing beads for bioremediation of BTEX at high concentration in groundwater. *Journal of environmental management* 204, 12-16.
- Lin, K.S., Mdlovu, N.V., Chen, C.Y., Chiang, C.L., Dehvari, K., 2018. Degradation of TCE, PCE, and 1, 2-DCE DNAPLs in contaminated groundwater using polyethylenimine-modified zero-valent iron nanoparticles. *Journal of Cleaner Production* 175, 456-466.
- Liu, N., Ding, L., Li, H., Zhang, P., Zheng, J., Weng, C.H., 2018a. Stable carbon isotope fractionation of chlorinated ethenes by a microbial consortium containing multiple dechlorinating genes. *Bioresource technology* 261, 133-141.
- Liu, S., Zhao, T., Xing, Z., Yang, X., Wang, E., 2018b. Advances in biotic and abiotic mutual promoting mechanism for chlorinated aliphatic hydrocarbons degradation. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology* 34, 510.
- Luo, W., Zhu, X., Chen, W., Duan, Z., Wang, L., Zhou, Y., 2014. Mechanisms and strategies of microbial cometabolism in the degradation of organic compounds—chlorinated ethylenes as the model. *Water Science and Technology* 69, 1971-1983.
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zou, W., Li, S., 2016. Microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels* 9, 134.
- Lyon, D.Y., Vogel, T.M., 2013. Bioaugmentation for Groundwater Remediation: an Overview. in: Stroot, H.F., Leeson, A., Ward, C.H. (Eds.). *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*. Springer New York, New York, NY, 1-37.
- Mészáros, É., Imfeld, G., Nikolausz, M., Nijenhuis, I., 2013. Occurrence of Dehalococcoides and reductive dehalogenase genes in microcosms, a constructed wetland and groundwater from a chlorinated ethene contaminated field site as indicators for in situ reductive dehalogenation. *Water, Air, & Soil Pollution* 224, 1768.





- Maire, J., Joubert, A., Kaifas, D., Invernizzi, T., Marduel, J., Colombano, S., Cazaux, D., Marion, C., Klein, P.-Y., Dumestre, A., 2018. Assessment of flushing methods for the removal of heavy chlorinated compounds DNAPL in an alluvial aquifer. *Science of the Total Environment* 612, 1149-1158.
- Majone, M., Verdini, R., Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Kalogerakis, N., Agathos, S., Puig, S., Zanaroli, G., Fava, F., 2015. In situ groundwater and sediment bioremediation: barriers and perspectives at European contaminated sites. *New Biotechnology* 32, 133-146.
- Mao, X., Polasko, A., Alvarez-Cohen, L., 2017. The Effects of sulfate reduction on TCE dechlorination by *Dehalococcoides*-containing microbial communities. *Applied and environmental microbiology, AEM*. 03384-03316.
- Mao, X., Stenuit, B., Polasko, A., Alvarez-Cohen, L., 2015. Efficient metabolic exchange and electron transfer within a syntrophic TCE degrading co-culture of *Dehalococcoides mccartyi* 195 and *Syntrophomonas wolfei*. *Applied and environmental microbiology*, 03464-03414.
- Matturro, B., Presta, E., Rossetti, S., 2016. Reductive dechlorination of tetrachloroethene in marine sediments: biodiversity and dehalorespiring capabilities of the indigenous microbes. *Science of the Total Environment* 545, 445-452.
- Mayer-Blackwell, K., Azizian, M.F., Green, J.K., Spormann, A.M., Semprini, L., 2017. Survival of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides mccartyi* under long-term electron donor limitation. *Environmental science & technology* 51, 1635-1642.
- McLean, J.E., Ervin, J., Zhou, J., Sorensen, D.L., Dupont, R.R., 2015. Biostimulation and Bioaugmentation to Enhance Reductive Dechlorination of TCE in a Long-Term Flow Through Column Study. *Groundwater Monitoring & Remediation* 35, 76-88.
- Meckenstock, R.U., Elsner, M., Griebler, C., Lueders, T., Stumpp, C., Aamand, J., Agathos, S.N., Albrechtsen, H.-J., Bastiaens, L., Bjerg, P.L., Boon, N., Dejonghe, W., Huang, W.E., Schmidt, S.I., Smolders, E., Sørensen, S.R., Springael, D., van Breukelen, B.M., 2015. Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers. *Environmental Science & Technology* 49, 7073-7081.
- Men, Y., Yu, K., Bælum, J., Gao, Y., Tremblay, J., Prestat, E., Stenuit, B., Tringe, S.G., Jansson, J., Zhang, T., 2017. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the structure and dynamics of a dechlorinating community containing *Dehalococcoides mccartyi* and



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

- corrinoid-providing microorganisms under cobalamin-limited conditions. *Applied and environmental microbiology* 83, 03508-03516.
- Muller, K.A., Esfahani, S.G., Chapra, S.C., Ramsburg, C.A., 2018. Transport and Retention of Concentrated Oil-in-Water Emulsions in Porous Media. *Environmental science & technology* 52, 4256-4264.
- Němeček, J., Steinová, J., Špánek, R., Pluhař, T., Pokorný, P., Najmanová, P., Knytl, V., Černík, M., 2018. Thermally enhanced in situ bioremediation of groundwater contaminated with chlorinated solvents – A field test. *Science of The Total Environment* 622-623, 743-755.
- Ni, Z., van Gaans, P., Rijnaarts, H., Grotenhuis, T., 2018. Combination of aquifer thermal energy storage and enhanced bioremediation: Biological and chemical clogging. *Science of the Total Environment* 613, 707-713.
- Nobre, R.C.M., Nobre, M.M.M., Campos, T.M.P., Ogles, D., 2017. In-situ biodegradation potential of 1,2-DCA and VC at sites with different hydrogeological settings. *Journal of Hazardous Materials* 340, 417-426.
- Ortiz-Estrada, Á.M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., 2018. Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems, *Reviews in Aquaculture*.
- Pérez-de-Mora, A., Lacourt, A., McMaster, M.L., Liang, X., Dworatzek, S.M., Edwards, E.A., 2018. Chlorinated electron acceptor abundance drives selection of *Dehalococcoides mccartyi* (D. mccartyi) strains in dechlorinating enrichment cultures and groundwater environments, *Frontiers in Microbiology* 9.
- Pabinger, S., Dander, A., Fischer, M., Snajder, R., Sperk, M., Efremova, M., Krabichler, B., Speicher, M.R., Zschocke, J., Trajanoski, Z., 2014. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Briefings in Bioinformatics* 15, 256-278.
- Panagiotakis, I., Antoniou, K., Mamais, D., Pantazidou, M., 2015. Effects of Different Electron Donor Feeding Patterns on TCE Reductive Dechlorination Performance. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 94, 289-294.
- Pang, X., Lei, P., Feng, X., Xu, Z., Xu, H., Liu, K., 2018. Poly- $\gamma$ -glutamic acid, a bio-chelator, alleviates the toxicity of Cd and Pb in the soil and promotes the establishment of healthy *Cucumis sativus* L. seedling. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.



- Parker, B.L., Chapman, S.W., Goldstein, K.J., Cherry, J.A., 2018. Multiple lines of field evidence to inform fracture network connectivity at a shale site contaminated with dense non-aqueous phase liquids. Geological Society, London, Special Publications 479, 479-478.
- Parween, T., Bhandari, P., Sharma, R., Jan, S., Siddiqui, Z.H., Patanjali, P., 2018. Bioremediation: A Sustainable Tool to Prevent Pesticide Pollution. Modern Age Environmental Problems and their Remediation. Springer, 215-227.
- Philips, J., Maes, N., Springael, D., Smolders, E., 2013. Acidification due to microbial dechlorination near a trichloroethene DNAPL is overcome with pH buffer or formate as electron donor: Experimental demonstration in diffusion-cells. Journal of Contaminant Hydrology 147, 25-33.
- Sairam, R., Tyagi, A., Chinnusamy, V., 2016. Salinity tolerance: cellular mechanisms and gene regulation. Plant-environment interactions. CRC Press, 137-191.
- Saiyari, D.M., Chuang, H.-P., Senoro, D.B., Lin, T.-F., Whang, L.-M., Chiu, Y.-T., Chen, Y.-H., 2018. A review in the current developments of genus Dehalococcoides, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater, Sustainable Environment Research.
- Salman, M., Gerhard, J.I., Major, D.W., Pironi, P., Hadden, R., 2015. Remediation of trichloroethylene-contaminated soils by star technology using vegetable oil smoldering. Journal of Hazardous Materials 285, 346-355.
- Scalzi, M., Mueller, J., Karachalios, A., 2018. Inhibition of methanogenesis in reducing environments, Google Patents.
- Schaefer, C.E., Lavorgna, G.M., Haluska, A.A., Annable, M.D., 2018. Long-Term Impacts on Groundwater and Reductive Dechlorination Following Bioremediation in a Highly Characterized Trichloroethene DNAPL Source Area. Groundwater Monitoring & Remediation 38, 65-74.
- Shapiro, A.M., Tiedeman, C.R., Imbrigiotta, T.E., Goode, D.J., Hsieh, P.A., Lacombe, P.J., DeFlaun, M.F., Drew, S.R., Curtis, G.P., 2018. Bioremediation in Fractured Rock: 2. Mobilization of Chloroethene Compounds from the Rock Matrix. Groundwater 56, 317-336.



以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

- Sharma, J.K., Gautam, R.K., Nanekar, S.V., Weber, R., Singh, B.K., Singh, S.K., Juwarkar, A.A., 2017. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-21.
- Sheu, Y.T., Tsang, D.C., Dong, C.D., Chen, C.W., Luo, S.G., Kao, C.M., 2017. Enhanced Bioremediation of TCE-contaminated Groundwater Using Gamma Poly-glutamic Acid as the Primary Substrate, *Journal of Cleaner Production*.
- Sheu, Y.T., Tsang, D.C., Dong, C.D., Chen, C.W., Luo, S.G., Kao, C.M., 2018a. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater using gamma poly-glutamic acid as the primary substrate. *Journal of Cleaner Production* 178, 108-118.
- Sheu, Y., Chen, S., Chien, C., Chen, C., Kao, C., 2015. Application of a long-lasting colloidal substrate with pH and hydrogen sulfide control capabilities to remediate TCE-contaminated groundwater. *Journal of hazardous materials* 284, 222-232.
- Shoji, M., Isobe, H., Shen, J.-R., Yamaguchi, K., 2016. Geometric and electronic structures of the synthetic  $\text{Mn}_4\text{CaO}_4$  model compound mimicking the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Phys Chem Chem Phys* 18, 11330-11340.
- Sirisansaneeyakul, S., Cao, M., Kongklom, N., Chuensangjun, C., Shi, Z., Chisti, Y., 2017. Microbial production of poly- $\gamma$ -glutamic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 173.
- Srirattana, S., Piaowan, K., Lowry, G.V., Phenrat, T., 2017. Electromagnetic induction of foam-based nanoscale zerovalent iron (NZVI) particles to thermally enhance non-aqueous phase liquid (NAPL) volatilization in unsaturated porous media: Proof of concept. *Chemosphere* 183, 323-331.
- Srivastava, S., 2015. Bioremediation technology: a greener and sustainable approach for restoration of environmental pollution. *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends*. Springer, 1-18.
- Stroo, H.F., West, M.R., Kueper, B.H., Borden, R.C., Major, D.W., Ward, C.H., 2014. In situ bioremediation of chlorinated ethene source zones. *Chlorinated solvent source zone remediation*. Springer, 395-457.
- Sudheesh, A., 2018. Bioaugmentation of Chlorinated Solvents in Groundwater Using *Dehalococcoides*.



- Tang, Y., Zhou, J., Yang, P., Yan, J., Zhou, N., 2017. Groundwater. Groundwater Engineering. Springer Singapore, Singapore, 1-34.
- Tatusova, T., Ciufo, S., Fedorov, B., O'Neill, K., Tolstoy, I., 2014. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Research* 42, 553-559.
- Tsai, T., Liu, J., Chang, Y., Chen, K., Kao, C., 2014. Application of polycolloid-releasing substrate to remediate trichloroethylene-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *Journal of hazardous materials* 268, 92-101.
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology* 223, 277-286.
- WANG, H.-b., CHENG, M., SHENG, J., YANG, Y.-y., LI, S.-h., YAN, B.-l., 2011. Study on the Adsorption Characteristic of Metal Ions on Gelatin Membrane Cross-linked Poly- $\gamma$ -glutamic Acid. *Hubei Agricultural Sciences* 19, 021.
- Wang, L., Hu, D., Kong, X., Liu, J., Li, X., Zhou, K., Zhao, H., Zhou, C., 2018. Anionic polypeptide poly ( $\gamma$ -glutamic acid)-functionalized magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO-(o-MWCNTs) hybrid nanocomposite for high-efficiency removal of Cd (II), Cu (II) and Ni (II) heavy metal ions. *Chemical Engineering Journal* 346, 38-49.
- Wang, S., Chen, S., Lin, Y., Kuo, Y., Chen, J., Kao, C., 2016. Acidification and sulfide formation control during reductive dechlorination of 1, 2-dichloroethane in groundwater: Effectiveness and mechanistic study. *Chemosphere* 160, 216-229.
- Watson, D.B., Wu, W.-M., Mehlhorn, T., Tang, G., Earles, J., Lowe, K., Gihring, T.M., Zhang, G., Phillips, J., Boyanov, M.I., 2013. In situ bioremediation of uranium with emulsified vegetable oil as the electron donor. *Environmental science & technology* 47, 6440-6448.
- Wen, L.L., Zhang, Y., Chen, J.X., Zhang, Z.X., Yi, Y.Y., Tang, Y., Rittmann, B.E., Zhao, H.-P., 2017. The dechlorination of TCE by a perchlorate reducing consortium. *Chemical Engineering Journal* 313, 1215-1221.
- Wong, J.W.C., Rajeshwar, D., Tyagi, A., 2017. Current developments in biotechnology and bioengineering, Elsevier.
- Xiu, Z.m., Gregory, K.B., Lowry, G.V., Alvarez, P.J., 2010. Effect of bare and coated nanoscale zerovalent iron on tceA and vcrA gene expression in *Dehalococcoides* spp. *Environmental science & technology* 44, 7647-7651.





以聚麩基質生物復育受含氯有機物污染地下水：基質開發及現地模場試驗

- Yang, J., Kim, E., Kim, J., Poo, H., 2018a. Orally administered poly- $\gamma$ -glutamic acid enhances mucosal immune responses through production of intestinal chemokines and activation of mucosal dendritic cells, *Am Assoc Immunol*.
- Yang, J., Meng, L., Guo, L., 2018b. In situ remediation of chlorinated solvent-contaminated groundwater using ZVI/organic carbon amendment in China: field pilot test and full-scale application. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 5051-5062.
- Yang, L., 2015. Exploring the Influence of Sorption and Back Diffusion on Dense Nonaqueous Phase Liquid (DNAPL) Source Zone Plume Persistence in Heterogeneous Formations, Tufts University.
- Yang, Y., Cápiro, N.L., Marcet, T.F., Yan, J., Pennell, K.D., Löffler, F.E., 2017a. Organohalide respiration with chlorinated ethenes under low pH conditions. *Environmental Science & Technology* 51, 8579-8588.
- Yang, Y., Cápiro, N.L., Yan, J., Marcet, T.F., Pennell, K.D., Löffler, F.E., 2017b. Resilience and recovery of *Dehalococcoides mccartyi* following low pH exposure. *FEMS microbiology ecology* 93, 130.
- Yang, Y., Higgins, S.A., Yan, J., Şimşir, B., Chourey, K., Iyer, R., Hettich, R.L., Baldwin, B., Ogles, D.M., Löffler, F.E., 2017c. Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes. *The ISME journal* 11, 2767.
- Yang, Z.H., Dong, C.D., Chen, C.W., Sheu, Y.T., Kao, C.M., 2017d. Using poly-glutamic acid as soil-washing agent to remediate heavy metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Yang, Z.H., Dong, C.D., Chen, C.W., Sheu, Y.T., Kao, C.M., 2018c. Using poly-glutamic acid as soil-washing agent to remediate heavy metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 5231-5242.
- Ye, S., Zeng, G., Wu, H., Zhang, C., Dai, J., Liang, J., Yu, J., Ren, X., Yi, H., Cheng, M., 2017. Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil. *Critical reviews in biotechnology* 37, 1062-1076.
- Yu, L., Lu, Q., Qiu, L., Xu, G., Zeng, Y., Luo, X., Wang, S., Mai, B., 2018. Enantioselective Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in *Dehalococcoides mccartyi* CG1. *Appl.*



- Environ. Microbiol., AEM. 01300-01318.
- Zeng, W., Chen, G., Wu, H., Wang, J., Liu, Y., Guo, Y., Liang, Z., 2016. Improvement of *Bacillus subtilis* for poly- $\gamma$ -glutamic acid production by genome shuffling. *Microbial Biotechnology* 9, 824-833.
- Zhong, L., Truex, M.J., Kananizadeh, N., Li, Y., Lea, A.S., Yan, X., 2015. Delivery of vegetable oil suspensions in a shear thinning fluid for enhanced bioremediation. *Journal of Contaminant Hydrology* 175-176, 17-25.
- Ziels, R.M., Karlsson, A., Beck, D.A.C., Ejlertsson, J., Yekta, S.S., Bjorn, A., Stensel, H.D., Svensson, B.H., 2016. Microbial community adaptation influences long-chain fatty acid conversion during anaerobic codigestion of fats, oils, and grease with municipal sludge. *Water Research* 103, 372-382.
- 王洪斌、成明、盛菊、楊艷艷、李士虎、閻斌倫，2011， $\gamma$ -聚谷氨酸明膠膜對重金屬離子吸附特性研究，*湖北農業科學*，第 19 期。
- 林書弘、胡凱康、劉力瑜，2013，次世代定序資料模擬軟體的比較，*作物、環境與生物資訊*。
- 張文，張樹清，王學江，2014， $\gamma$ -聚谷氨酸的微生物合成及在農業生產中的應用，*中國農學通報*(Chinese Agricultural Science Bulletin)，30(6) 122，P40-45。
- 陳勇志 2011，以天然棉絮交聯聚麩胺酸去除水中鐵離子，高雄師範大學化學系，碩士論文。
- 陳俊位，2014，聚麩胺酸之特性及其在農業上之應用，*臺中區農業改良場特刊*，122 期，237- 244。