



行政院環境保護署

108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

應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機 污染物還原脫氯效率：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 : 國立中央大學／生命科學系
- 專案主持人 : 陳師慶 教授
- 專案執行期間 : 108年01月04日起至
108年11月30日止

中華民國 108 年 12 月 印製



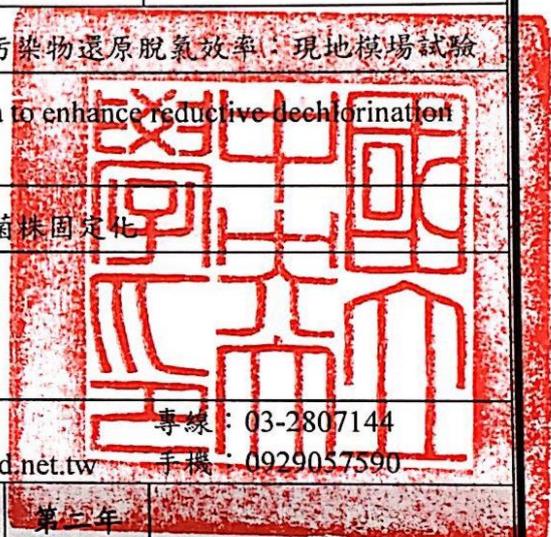


108 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案申請書

一、專案基本資料表

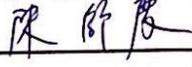
申請編號：

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 type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他				
申請機構系所	國立中央大學				
機構地址	桃園市中壢區中大路 300 號				
專案主持人	陳師慶	職等/職稱	教授		
協同主持人	陳耀宗	職等/職稱	博士		
專案名稱	中文	應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗			
	英文	Application of hydrogen-producing bacteria to enhance reductive dechlorination efficiency of chlorine ethene : field test			
	關鍵字	氯乙烯、生物強化、產氫菌、脫氯菌、菌株固定化			
執行期程	自民國 108 年 01 月 04 日起 至民國 108 年 11 月 30 日止				
專案主持人	姓名：陳師慶	E-mail: osychna@ksts.seed.net.tw	專線：03-2807144 手機：0929057590		
經費分析總表	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	438,900	528,000	(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	425,563	507,454	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	2,580	33,660	(差旅與租賃費用)
	5.	雜項費用	14,775	21,795	(1~6 項相加之 5% 為限)
	6.	行政管理費	88,182	109,091	(1~5 項相加之 10% 為限)
	專案計畫申請總金額		970,000	1,200,000	2,170,000



陳師慶

說明:1. 本署以部份補助為原則，得指定不補助項目，不補助項目應為自籌款項，應自行核銷不得申請。
2. 非實驗性質之專案，若第一項費用編列金額超出比率，須於申請時向本署專簽說明，俾利審查。
3. 補助專案經費編列自申請起經專案核准後，經費編列中各項費用單價與需求只可減少與下修。

專案主持人： 陳師慶   (簽名及蓋章) 日期： 2019/01/04

(請蓋上申請單位大小章)





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

108 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：108 年 05 月 20 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 checked="" type="checkbox"/> 研究專案 <input 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	國立中央大學生命科學系	計畫主持人	陳師慶教授
專案名稱	應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：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	0	0	台灣專利申請中改投國外期刊
		(2) 研討會論文	1	0	0	0	台灣專利申請中改投國外研討會論文
	2. 國外投稿 (篇數)	(1) 期刊論文	1	0	1	100%	Lo, K.-H., Lu, C.-W., Lin, W.-H., Chien, C.-C., Chen, S.-C., and Kao, C.-M.(2020). Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized Clostridium butyricum in silica gel. Chemosphere 238, 124596. (impact factor: 5.108)
		(2) 研討會論文	0	0	1	100%	Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized Clostridium butyricum in silica gel



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)
							(ASM Microbe 2019)
3.報告 (篇數)	(1)技術報告		0	0	0	0	
	(2)研究報告		0	0	0	0	
4.專著 (本數)			0	0	0	0	
5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會		0	0	0	0	
	(2)成果發表會						1. 107年土壤及地下水 研究與模場試驗成 果發表會，應用產 氫菌提升產氫量以 加強含氯有機污染 物還原脫氯效率：現 地模場試驗 (2019/04) 2. 南港生技展， Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized Clostridium butyricum in silica gel (2019/10)
	(3)論壇		0	0	0	0	
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術		0	0	0	0	
	(2)技術平台		0	0	0	0	
7.研發人員 (人數)	(1)碩士		2	2	2	2	
	(2)博士		1	1	1	1	
8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊		0	0	0	0	
	(2)跨機構團隊		0	0	0	0	
	(3)形成研究中 心		0	0	0	0	
	(4)形成實驗室		0	0	0	0	
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)
		已核 准	發明 /設計 合計					
A 智慧 財產 權	1.專利 (件數)	已核 准	發明	0	0	0	0	
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
		申 請 中	發明	0	1	1	100%	包埋微生物膠體、 其製備方法以及降 解含氯有機物的組 合物，發明第 108114190 號
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
B 研 發 技 術 轉 移	2.先期技術 成果移轉	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金(仟 元)		0	0	0	0	
	3.技術移轉 (專利)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金 (仟元)		0	0	0	0	
	4.技術移轉 (應用技 術)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金(仟 元)		0	0	0	0	
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)		0	0	0	0	
		(2)品種/系(件數)		0	0	0	0	
	C 產 學 研 合 作	6.促成合作 研究	件數		0	0	0	0
金額(仟元)			0	0	0	0		
7.促成投資		件數		0	0	0	0	
		投資金額 (仟元)		0	0	0	0	
8.促成取得 業界科專		件數		0	0	0	0	
		業界投資金額 (仟元)		0	0	0	0	



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	0	0	0	0	
		收入(仟元)	0	0	0	0	
	2.諮詢服務	次數	0	0	0	0	
		收入(仟元)	0	0	0	0	
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策	0	0	0	0	
		(2)法規	0	0	0	0	
		(3)規範	0	0	0	0	
		(4)標準	0	0	0	0	
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)		0	0	0	0	
	5.獲得獎項(件數)		0	0	1	100%	2019 台灣創新技術博覽會，銅牌獎
	6.提升能源效率(%)		0	0	0	0	
	7.節能減碳效率(%)		0	0	0	0	
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，本研究第一年度欲自現地地下水中篩選出產氫菌株，並利用固定化技術比較數種固定化材料，以增加產氫菌株穩定度、產氫活性與毒物耐受性，並利用次世代定序菌相分析技術分析整治前後菌相變化，評估添加固定化產氫菌株與營養基質是否對脫氯菌株有益，以增進含氯有機物整治效益。第二年度本研究將以台南永康模場作為實場整治試驗地點，建立與評估添加產氫菌與營養基質對於地下水含氯有機污染物污染場址之整治效益，作為未來整治 TCE 污染更具經濟效益及環境友善之綠色整治工法。



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	108 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：陳師慶	
計畫名稱	應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一： 1. 建議提高產氫菌種提供氫氣速率與數量之效益能更久，目前在微型試驗中僅 10-30 天，期能找出能配合試驗模場的環境特性的生長條件與技術。 2. 是否可建立提供氫氣速率與數量之參數與污染區脫氯速度間之相關性分析。 3. 固定化菌種技術可存活 30 天，但如何研發具有長效且持續性產氫氣體之固定化膠體能在污染區的環境能存在？		1. 感謝委員指教，本團隊會持續追蹤現地之氫氣含量，並隨時調整膠體菌種比例，期許找到最佳生長條件及技術。 2. 感謝委員指教，本團隊將進行管柱測試，試圖加強氫氣速率與數量之參數與污染區脫氯速度間之相關性分析。 3. 感謝委員指教，環境變數多變，唯有緊密追蹤方可以之膠體的應用效能，期許於今年計劃中能有所得。	
委員二： 1. 模場計畫在成果績效自評項目中，有關(二)產業面與(三)政策面選項中不宜空白。 2. 所選模場現正有工程進行中與改善整治施行中，需注意協調，免生爭議。		1. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。 2. 感謝委員指教，本團隊會密切與瑞昶科技公司緊密合作。	
委員三： 1. 主持人之學術研究能力與土水污染技術發展能力均佳，足以勝任本專案計畫。計畫主持人近五年的研究與土水技術發展績效亦佳。 2. 本專案計畫執行團隊學術研究能力與土水污染技術發展能力佳，本團隊足		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教。 4. 感謝委員指教，本團隊會將今年計畫所遇到之困難整理成 trouble shooting，以利於後續其他專案之借鏡。 5. 感謝委員指教。 6. 感謝委員指教。	



- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <p>以勝任本專案計畫。本計畫團隊近年對土水污染相關計畫執行績效佳。</p> <p>3. 本專案計畫對未來土壤及地下水污染整治工作推動有貢獻。</p> <p>4. 依本計畫申請書中所列的成果與績效自評表可推知，本計畫執行所獲得的研究成果以論文發表為主，對國內土水污染領域的主要貢獻，仍待藉由實務應用的成果加以驗證。現地試驗模場已有其他的整治計畫進行中，除了模場之外的其他同類型整治區域所觀察到的現象(控制參數與地下水質…等)，建議一併整理以做為比對對象。現地可能的” trouble shooting” (例如井篩阻塞…等)也建議列入比對評估。</p> <p>5. 本專案計畫書撰寫具體，研究方法具可行性。</p> <p>6. 本專案計畫執行後所獲得的研究成果對未來土水污染實場的實際應用性仍待進一步驗證(本年度的研究重點)。</p> <p>7. 本專案計畫書中的文獻蒐集完整，計畫主持人對國內外本研究領域的現況了解。</p> <p>8. 專案執行期限合理，計畫書中也已說明計畫執行的預期成果。</p> <p>9. 本計畫為延續性計畫，本年度之前的歷年專案執行成果已有學術論文發表。</p> <p>10. 本計畫書已依計畫構想審查委員意見調整(修正)。</p> | <p>7. 感謝委員指教。</p> <p>8. 感謝委員指教。</p> <p>9. 感謝委員指教。</p> <p>10. 感謝委員指教。</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|



<p>委員四：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 計畫執行同意書、聲明書及自式檢核表，請簽名或蓋章。 2. 108 年度專案自評表，研發人員期中、期末達成率請修正。 3. 建議選擇利用現有的監測井，以減少新設井數。 4. 期末報告建議增加成本效益評估。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。 2. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。 3. 感謝委員指教，本團隊將利用現有監測井 MW1，並新增 3 口反應井 IW1-3 以及上游監測井 MW2。 4. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。
<p>委員五：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 建議補充說明相關研究參數的設定，例如場址的 TCE 濃度、固定化微生物的量、產氫菌的添加量。 2. 建議查核點增加脫氯菌 (Dehalococcoides) 降解 TCE 的中間產物分析，以及最終產物乙烯的含量。 3. 篩選污染物降解各階段所需要之菌株為生物強化之關鍵因子，建議補充說明本計畫是否會固定化各階段所需要之菌株，或僅一種菌株。 4. 建議查核點增加，固定化菌株在場址的濃度變化與生物活性持久性與穩定性的探討。 5. 建議補充說明如何強化質傳效果。 6. 建議查核點補充說明處理成本分析。 7. 建議查核點補充固定化菌株受剪切損壞的評估。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教，本場址之主要污染物為 cis-DCE，其濃度為 3.7 ppm，固定化產氫之量將取膠體體積之百分之五之飽和菌液。 2. 感謝委員建議，此項將於含氯有機物濃度與水質參數監測之查核點進行討論。 3. 感謝委員指教，產氫菌為 <i>Clostridium</i> sp.，經鑑定比對後，其菌種接近 <i>C. butyricum</i> (DSM2478)。 4. 感謝委員指教，本團隊將評估如何監控膠體內活菌數。 5. 感謝委員指教，本團隊會進行管柱試驗，試圖說明氫氣之擴散效果。 6. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。 7. 感謝委員指教，本團隊將會於營養基質與固定化產氫菌株灌注之查核點進行論及評估。
<p>委員六：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 績效成果自評應以 108 年度為準，計畫尚未開始應無工作進度達成數。 2. 計畫書部分誤植、語句未完成、或縮寫未說明，例如 p.3 最後一句、p.4「離地」、p.5 FY、p.14 Entrapping 指的是包埋或包封？ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員建議，已於修正計畫書訂正。 2. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。 3. 感謝委員指教，本團隊將使用中山大學高志明實驗室所提共之 SPRS 乳化基質，已被證明可以提升現地脫氯速率。 4. 感謝委員指教，本計畫需要中山大學



<p>3. 第二年現地整治欲使用的乳化型稀釋碳基質形式與劑量如何決定？現場評估最佳整治程序之因子如何判定？</p> <p>4. 研究人力有三位非本校的兼任助理，請補充說明原因。</p> <p>5. 近五年內研究成果統計表、專兼任助理學經歷說明均為空白。</p>	<p>環境工程系之高志明實驗室協助採樣及相關檢測之諮詢，故需額外聘請該校學生為兼任助理。</p> <p>5. 感謝委員指教，已於修正計畫書訂正。</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 審查意見回覆對照表
修正計畫書 期末報告

計畫年度	108 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究型 <input checked="" type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：陳師慶 NO：A8	
計畫名稱	應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場實驗(二)		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 108 年度專案成果績效自評中，論文 3 篇未達成，是否於期末達成？請說明。申請中發明一件，值得欽佩。 2. 依既定進度，本次期中須完成場址灌注井與監測井設置，現地營養基質與固定化產氫菌株灌注，以及含氯有機物濃度與水質參數監測等，進度符合。 3. 現地整治工法目前已獲致結論為：經由乳化油生物刺激法以及固定產氫菌之生物加強法處理，反應井 cis-DCE 皆在 30 天後被降解至 0.1ppm 以下，並且有固定化處理之反應井於 30 天後開始測得乙烯之產生，確認固定化產氫菌之膠體能使得污染物完成脫氯反應至乙烯，符合本計畫之預期成果。 4. 未來實場應用值得期待。		1. 感謝委員提醒，107 年度成果目前已投稿至國際期刊 Chemosphere 正在審稿中。已於 108 年 6 月參加環保署成果發表(國內 1 件)，於 108 年 6 月參加國際研討會 ASM(國際 1 件)，同時將研發成果發表於 108 年 7 月之亞洲生技展(國內 1 件)。108 年 9 月將本計畫之成果發表桃園農業博覽會之綠色能源相關產業展示(國內 1 件)。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教。	
委員二 1. 完成場址監測井及觀測井之設置，現地灌注營養基質與固定化產氫菌株。 2. 後續建議持續偵測固定產氫菌株之生長變化情形。 3. 甲烷菌之產生與乳化油之關係與維持氫氣濃度，有待後續解決。		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，本團隊使用之固定化產氫菌膠體於去年計畫開始使用一年後，更換全新培養基後三天仍能偵測到氫氣的產生。之後將會取現地已使用之固定化產氫菌回實驗室確認活性以及生長變化。 3. 感謝委員指教，後續會加強監測甲烷、氫氣以及 TOC 的相關數值，並決定工法之使用。	



<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本年度研究將以台南永康模場作為實場整治試驗地點，評估添加產氫菌與營養基質對於地下水含氯有機污染物污染場址之整治效益。 2. 請補充說明因應甲烷的生成備製甲烷抑制劑之類型。 3. 本研究於15天另外添加磷酸緩衝劑於現地以控制pH值，請補充說明磷酸緩衝劑是否會影響菌種的分布。 4. 報告顯示乳化油會對甲烷的生成有影響，建議補充說明乳化油的種類，是否會對土壤整治造成影響。 5. 建議持續監測固定化菌株在場址的變化與生物活性持久性與穩定性的探討。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，甲烷抑制劑參考前人文獻使用最終濃度 0.5 mM 2-bromoethanesulfonate(BES) 做為灌注條件，後續將觀察抑制劑灌注後甲烷與含氯有機物濃度變化，以優化未來整治工法設計。 3. 感謝委員指教，由於文獻指出若現地地下水 pH 值低於 5.5 時，將顯著抑制脫氯反應進行，因此本團隊選用配製微生物培養基常用之磷酸鹽緩衝藥劑改善地下水經灌注後酸化的問題，後續會以次世代定序菌相分析技術，觀察現地菌群是否有利於脫氯反應進行。 4. 感謝委員指教，本團隊使用之乳化油成分主要為大豆油，由於可提供大量碳源，因此在整治期間需考慮水質酸化與甲烷化問題，由於大豆油不飽和脂肪酸含量較高，未來可嘗試改用飽和脂肪酸含量較高的油品種類進行配置，搭配緩衝藥劑與甲烷抑制劑，期望可以改善現行灌注基質所遇到的問題。 5. 感謝委員指教，本團隊使用之固定化產氫菌膠體於去年計畫開始使用一年後，更換全新培養基後三天仍能偵測到氫氣的產生。目前用於現地場址的管柱，後續將取部份樣品進行實驗室培養，以觀察固定化菌株的穩定性與活性。
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 專案執行進度符合期程及工作內容。 2. 建議對後續甲烷抑制劑添加時機之判定，是否可明確以相關水質分析作為判斷準則？ 3. 以實際模場執行之結果對灌注乳化型 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，甲烷目前監測到 2ppm 左右，若持續上升將會影響脫氯之效果，因此將以甲烷之生成趨勢作為判斷準則。 3. 感謝委員指教。



<p>釋碳基質是否已達最佳效果？</p> <p>4. 模場下游含氯污染物濃度差異不大，後續如何提昇工法，以利降解，宜規劃。</p>	<p>4. 感謝委員指教，由於現地水流速不快(水利傳導係數為 $4.44 \times 10^{-4} \text{cm/s}$)，推估整治後之地下水自然流動達下游井需要花費至少 3 個月以上，因此本團隊將會加強監測地下水之流動。倘若確認地下水之流動過於緩慢，未來本工法可能需要搭配幫補抽水流動，增加藥劑的流佈，因地制宜，以利降解。</p>
<p>委員五</p> <p>1. 4.1.2.1 節為縮寫代號，請加註定義及代表意義，EX：HB30、OC30、LC30。</p> <p>2. 現場菌相分析雖測得關鍵脫氯菌門，但含量僅佔 0.2%~2.1%，是否有加入生物刺激法及固定化產氫菌之生物加強法後之菌相變化比較，以了解所施作工法對現地生物相的影響。</p> <p>3. 初期執行脫氯成效良好，後續待進行甲烷抑制及成本估算。</p>	<p>1. 感謝委員指教，將於期末報告修正。</p> <p>2. 感謝委員指教，本計畫將於灌注後再次進行注藥後之菌相分析，將會以比較生物刺激法以及生物加強法之菌相差異。</p> <p>3. 感謝委員指教，將會進行成本估算。</p>
<p>委員六</p> <p>1. 請補充評估簡易井 IW-1 受實驗簡易井 IW-2 釋氫範圍之影響可能性(兩井距離僅 1m)。</p> <p>2. 請補充評估乳化油流動至既有監測景 MW-1 之所需時間。</p>	<p>1. 感謝委員指教，於現地場址之數據得知，IW-1 與 IW-2 之氫氣並無太大之差異，且於上游 MW-2 與下游 MW-1 皆有測得氫氣產生，釋氫影響範圍應該超過 1m，最高可達 3m，且乳化油於現地發酵亦會產氫，過多的氫氣將會脫離水相無法給予脫氯菌使用，未來可以評估將反應井之間距範圍加大，增加污染攔截之範圍。</p> <p>2. 感謝委員指教，本案構想為污染攔截之現地處理法，即為乳化油刺激反應井之菌相並且將污染物脫氯至乙烯，乳化油流動緩慢並無需要流動至 MW-1，而是希望經由反應井整治後地下水流到 MW-1 並使得反應井污染物濃度下降，由於現地水流速不快(水利傳導係數為 $4.44 \times 10^{-4} \text{cm/s}$)，推估整治後之地下水自然流動達下游井需要花費至少 3 個月以上，因此本團隊將會加強</p>



	<p>監測地下水之流動。</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 審查意見回覆對照表
修正計畫書 期末報告

計畫年度	108 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 研究型 <input checked="" type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：陳師慶 NO：A8	
計畫名稱	應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場實驗(二)		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. vcrA：宜多討論。 2. Methane 低宜說明(溶解度低)。 3. 菌相中有部份具共代謝作用，宜討論。 4. 本期末報告對計畫執行現況、流程及方法說明具體。 5. 計畫後續執行工作項目及內容已於 P.73 說明。 6. 計畫執行進度與預定進度查核表大致相符。 7. 本期末報告並未說明執行進度是否落後，也未說明計畫執行期間的困難點。 8. 本期末報告所提出的研究內容與計畫目的相符。 9. 根據研究內容所提出之討論與建議的可行性與應用性的說明，建議應更具體，以期具參考意義(因為已有實務應用的經驗，本工法實務的成效與限制的評估，改善成效提升的評估…等，建議更具體說明)(由 DCE 轉化致 VC 所需的氫比由 TCE 轉化至 DCE 所需的氫較多一些，本計畫的成果在此條件下所能提供的改善貢獻…等等，建議更完整的說明)(圖 31 第 100 天左右的情況應討論，並建議將圖 31 與圖 32 的結果比對討論)。 10. 本計畫執行有研究人員(學生或助理)		1. 感謝委員指教，vcrA 參與二氯乙烯及氯乙烯之脫氯反應，為現地完全脫氯之關鍵基因，相關內容將會補充於期末報告。 2. 感謝委員提醒，甲烷部分溶解於地下水，因此測得的數值不高與其溶解度有關。 3. 感謝委員指教，現地測得 <i>Pseudomonas</i> 、 <i>Geobacter</i> 、 <i>Comamonas</i> 等菌屬，於相關文獻已發表其參與含氯有機物之共代謝，相關內容將會補充於期末報告。 4. 感謝委員指教。 5. 感謝委員指教。 6. 感謝委員指教。 7. 感謝委員指教，執行進度符合計畫規劃，相關執行困難點將補充於第五章。 8. 感謝委員指教。 9. 感謝委員指教，產氫包埋整治工法確實可以應用於多氯乙烯污染物之場地，證實在以 DCE 為主的場地，提供包埋產氫菌可以使其完全脫氯轉化為乙烯之潛力，本計畫的成果在此條件下所能達到提升整治工效之成果。 10. 感謝委員指教。 11. 感謝委員指教。 12. 感謝委員指教。	



<p>參與。</p> <p>11. 本計畫的學術產出為：本期末報告、期刊論文、研討會論文。</p> <p>12. 本計畫執行期間有研究人員(學生或助理)參與，人才培育符合預期。</p> <p>13. 本期末報告已就研究成果提出專利申請。</p> <p>14. 本計畫的執行與研究成果對土水污染整治的政策，以及對社會經濟發展的效益，不易由本報告中評估。</p>	<p>13. 感謝委員指教。</p> <p>14. 感謝委員指教。</p>
<p>委員二</p> <p>1. 環境參數(如 TOC、ORP 等)與產氫菌生長以及脫氯效率間之關係，是否有進一步評估再分析，以利後續工程應用之參考。</p> <p>2. 有關基本環境參數分析中，氧化還原電位(ORP)於MW2之上游監測井變動較為異常，是否有關之原因分析？若推測雨季之溶氧進入，則其他 DO 值似未有相對之變化，請再予以合理推測或探討。</p> <p>3. P.61 提及反應井 TOC 濃度不利於生物復育，其理由或依據為何？請予以釐清或修正。</p> <p>4. 請說明本計畫之產氫濃度變化與甲烷濃度變化趨勢是否吻合厭氧反應之現象？其中當甲烷濃度被抑制時，產氫濃度未增加，請探討現地應用生物復育技術之可能影響因素，以及解決對策或建議。</p> <p>5. 根據乙烯濃度分析結果，可否推估氯乙烯之分解效果？另中間產物是否偵測？請補充說明。</p>	<p>1. 感謝委員指教，本團隊在 107 年環保署計畫中，已經證實本氫菌膠體在厭氧的環境下能夠生長，且提升脫氯效率，因此本團隊沿用該環境參數的條件進行現地工程應用。</p> <p>2. 感謝委員指教，降雨除了影響溶氧亦影響水流方向，這裡應為水流向改變使得 ORP 之氧化還原電位改變，故 DO 無相對的變化。</p> <p>3. 感謝委員指教，此處提及的部分為上游監測井，整體 TOC 濃度為 18.24±8 ppm，文獻已記載現地 TOC 低於 20ppm 將不利於進行脫氯反應(Jeffrey Talley, 2016)。</p> <p>4. 感謝委員指教，甲烷生成與脫氯反應在現地同時進行，在電子提供者充足的情況下，會以甲烷生成為主，當甲烷生成被抑制後，電子流向將會回歸脫氯反應，將會有助於完全脫氯，因此我們在反應井 IW02 及 IW03 之結果可以看到更多的乙烯生成，因此吻合厭氧還原反應。</p> <p>5. 感謝委員指教，本場地經過包埋整治工法後反應井中呈現厭氧還原態，因此乙烯之產生則為氯乙烯脫氯之結果。由二氯乙烯脫氯為氯乙烯，氯乙烯脫氯為乙烯，中間產物皆有偵測。</p>



<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 目前測試井比較無法判定有效半徑，建議後續可考慮強化此部分。 2. 有關 <i>bvcA</i> 及 <i>vcrA</i> copy 數與降解至乙炔間，有良好之分析，尤其是簡報中的報告，建議納入報告定稿本。另建議對於控制組及灌注組兩者間之差異統計顯著性，也建議補充。 3. 本研究應用固定化菌株，利用生物反應牆方式，處理含氯烯類污染場址地下水，並結合分子生物監測，判斷技術可行性。兩年研究內容包括固定化菌株製造、現場模場整治實驗以及效果評估。整體實驗內容豐富，應用的分析技術新穎、解析也合理，對於場址監測及評估可能具應用性。 4. 由 <i>cis</i>-DCE 資料(圖 30)看起來，控制組(IW1)與反應組(IW2 及 3)降解效率幾乎一樣，但是 VC 降解則有明顯差異；但由 DNA 數據看起來，似乎三個井 <i>vcrA</i> 數據接近，<i>bvcA</i> 則有差異，控制組與反應組差異，建議補充說明是因為何種原因所造成？ 5. 文中所提到 VC 降解速率差異，請說明其計算基準，以及差異上是否具統計意義。 6. 本方法係以生物反應牆概念施行，但由於控制組與實驗組下游共有一口監測井，比較無法釐清其成效。後續建議能以不同監測井監測其成效。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教，本團隊將會在未來的研究中強化此部分。 2. 感謝委員指教，本次結果將會納入報告定稿本。 3. 感謝委員指教。 4. 感謝委員指教，在圖 32 中，<i>vcrA</i> 數據接近，<i>bvcA</i> 有差異，然而，控制組的脫鹵球菌的總數(16s rRNA)明顯低於反應井，反應井脫鹵球菌之總體數量大於 10^5 copies/L，因此 VC 降解有明顯差異與脫鹵球菌總數有關。 5. 感謝委員指教，經由計算濃度差異除以反應天數，可以得知各井氯乙炔降解速率分別為: IW01 -0.0008 ppm/day、IW02 -0.0025 ppm/day 及 IW03 -0.0012 ppm/day，反應井與控制組之氯乙炔降解經由 t.test 計算後 $p < 0.01$，有統計上的差異。 6. 感謝委員指教，由於預算限制，本團隊僅設置一口監測井及控制組，倘若未來計畫經費許可，本團隊將會另設控制組反應井及增設監測井加強範圍監測。
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 整體而言，期末報告進度符合預期且報告內容成果豐碩。 2. 本研究為何不一起包埋產氫與脫氫菌群。 3. 產氫一般會伴隨酸化，請說明研究中 pH 與揮發酸生成狀況。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，本計畫為創新包埋整治技術，現地應用包埋產氫菌已有不錯之成效，本團隊將改良此技術，在 109 年環保署計畫中提出包埋產氫菌及脫鹵球菌之高效脫氯膠體，屆時懇請委員多多支持。



<p>4. 有關結論中提到 Dehalococcoides 也有這類衝突出現。</p> <p>5. 建議本研究應針對所有資訊進行統計分析以了解各參數彼此間的相關性。</p>	<p>3. 感謝委員指教，在產氫的過程中的確現地 pH 有下降，本團隊立即補充緩衝溶液使其 pH 維持在 6.5 以上，脫氯反應持續進行。</p> <p>4. 感謝委員指教，根據文獻報導，當脫鹵球菌長時間暴露在 pH<5.5 之環境，則會失去脫氯之活性，因此維持適當的 pH 極為重要。</p> <p>5. 感謝委員指教，將會補充在期末報告。</p>
<p>委員五</p> <p>1. 目標與進度皆符合。</p> <p>2. 報告撰寫優良。</p> <p>3. 此計畫補助之最終目標為提供實務應用上之技術，依此前提為基礎，請明確於結論中說明此計畫之成果，並且針對研究成果與污染整治工程實務應用關聯進行說明或提出規劃建議。</p>	<p>1. 感謝委員指教。</p> <p>2. 感謝委員指教。</p> <p>3. 感謝委員指教，產氫包埋整治工法確實可以應用於多氯乙烯污染物之場地，證實在以 DCE 為主的場地，提供包埋產氫菌可以使其完全脫氯轉化為乙烯之潛力，本計畫的成果在此條件下所能達到提升整治工效之成果。包埋產氫菌可以提升現地脫鹵球菌之菌數，但是期間消耗過長，因此未來可以建構絕對厭氧操作技術，大量培養脫鹵球菌，包埋脫鹵球菌與產氫菌，開發高效脫氯生物膠體，加速整治期程。</p>



二、研究成果中英文摘要

中文摘要

含氯有機物因其特性為比水重之非水相液體(dense non-aqueous phase liquid, DNAPL)，進入地下環境後，因其低黏滯性使其可在地表下快速移動，低表面張力使其容易穿入土壤小孔隙或岩石裂隙，造成整治困難度高。生物整治法被喻為自然、環保及節能的處理技術，也是目前環境污染整治的趨勢。在厭氧環境，已被證實一種脫氯菌 (*Dehalococcoides*)可以完全還原 VC 至乙烯，但脫氯作用需要氫氣作為電子提供者，降解初期氫氣含量仍充足，因此脫氯作用速率較為快速，但至降解後期氫氣逐漸消耗殆盡使脫率速率降低。研究期末報告部分，對其進行運轉中菌相調查，包埋產氫菌膠體結合乳化油之生物刺激法，於反應井中菌相組成穩定，可以測得發酵者 *Clostridium* spp.及 *Desulfovibrio* spp.，以及提共維他命 B12 之相關菌株 *Desulfovibrio* spp.及 *Methanosarcina* sp.，以 qPCR 分析地下水樣本，反應井之包埋產氫菌組別測得其脫鹵球菌菌數可以長時間維持再 $10^5/L$ ，且相關功能性基因如 *tceA*、*vcrA* 及 *bvcA* 皆有所提升，VC RDase 與脫鹵球菌總菌數之比例維持在 0.3~3 之間可以觀測到乙烯之產生，證實生物產氫膠體對於脫鹵球菌菌數及功能性基因的表現影響相當有效果。本計畫成功利用生物包埋產氫菌達成現地地下水試驗，經過添加生物包埋產氫菌則可以提升脫鹵球菌菌數及功能性基因的表現，進而增強降解多氯乙烯達成完全降解至乙烯之功效，確實降解現地污染物 cis-DCE，並在反應井中測得乙烯之產生。

關鍵字: 氯乙烯、生物強化、產氫菌、脫氯菌、菌株固定化





英文摘要

Chlorine-containing organic matter is dense non-aqueous phase liquid (DNAPL) because of its characteristics, and enters the underground environment. DNAPL has low viscosity, it can move rapidly under the surface. It is easy to penetrate into small pores or cracks in the soil, resulting in high difficulty in remediation. The bioremediation method has been hailed as a natural, environmental, and energy-saving treatment technology, and it is also a current trend of environmental pollution remediation. In an anaerobic environment, it has been confirmed that *Dehalococcoides* spp. can completely reduce VC to ethylene, but *Dechlorination* spp. requires hydrogen as an electron supplier. The hydrogen content is still sufficient in the initial stage of degradation, so the rate of dechlorination is relatively fast, but at the end of the degradation stage, hydrogen is gradually depleted and the rate of depletion is reduced. At the end of the research report, the immobilized hydrogen-producing bacteria gel combined SPRS was applied in the pilot study. By the metagenome analysis, the composition of microcosm in the reaction well was stable. We can found *Clostridium* spp. and *Desulfovibrio* spp. as fermentors. *Methanosarcina* sp., which is a strain that can supply vitamin B12. qPCR used to analyze groundwater samples. The number of *Dehalococcoides* in the reaction wells was maintained at $10^5/L$ for a long time. Functional genes, such as *tceA*, *vcrA*, and *bvcA* were improved. The ratio of VC RDase to the total number of *Dehalococcoides* was maintained between 0.3 and 3. Ethylene production was observed, and the number of *Dehalococcoides* was confirmed. And the immobilized hydrogen-producing bacteria gel performance effects of functional genes are quite practical. The project successfully used the bio-encapsulated hydrogen-producing bacteria to reach the groundwater test in situ. After adding the bio-encapsulated hydrogen-producing bacteria, the number of *Dehalococcoides* and functional genes can be improved, and the degradation of polyvinyl chloride can be enhanced to achieve complete degradation to ethylene. The effect is that the local pollutant cis-DCE is degraded, and the production of ethylene is measured.

Keywords: Vinyl chloride, Bioaugmentation, Hydrogen producing bacteria, Dechlorination bacteria, Immobilized





行政院環境保護署

108 年度土壤及地下污染整治基金補助研究與模場試驗專案

目次

第一章：計畫前言與研究目的	1
1.1 三氯乙烯 (TCE)	1
1.2 含氯場址整治方法	2
1.3 厭氧還原脫氯生物研究	5
1.4 無氧代謝降解-還原脫氯	6
1.5 參與厭氧降解的細菌	6
1.6 酵素和功能性基因參與 PCE/TCE 厭氧脫氯作用	7
1.7 產氫菌加強 TCE 分解	9
1.8 包埋固定化菌株技術應用	10
第二章：研究目的	14
第三章：研究方法與過程	16
3.1 試驗地下水之介紹	16
3.1.1 目前場址營運狀況	16
3.1.2 污染情形	20
3.2 模場試驗設井規劃	22
3.3 菌株固定化及管柱設置	24
3.4 模場試驗地下水水質採樣規劃	25
3.5 地下水基本性質分析	26
3.5.1 地下水水質參數分析 (酸鹼值 (pH)、導電度 (EC)、氧化還原電位 (ORP)、溶氧量 (DO))	26
3.5.2 地下水總溶解性有機碳分析	26
3.5.3 地下水樣品 genomic DNA 萃取	26
3.6 DNA 純化	27
3.7 基因選殖	27
3.8 即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)	28
3.8.1 標準品製備	28
3.8.2 qPCR 上機步驟	29
3.9 TCE 相關代謝物 GC 層析檢測	31
3.10 次世代定序菌相分析組裝流程	31
第四章：實驗結果	33
4.1 模場運轉前之次世代定序菌相分析	33



4.1.1 原始數據品質檢測及有效序列分布	33
4.1.2 Metagenome 菌相分析結果	35
4.1.2.1 稀有曲線及菌種累積曲線	35
4.1.2.2 菌相變化分析	37
4.1.2.3 樣本主座標分析及菌相熱點分析	42
4.1.3 模場運轉前策略評估	45
4.2 模場整治之次世代定序菌相分析	47
4.2.1 原始數據品質檢測及有效序列分析	47
4.2.2 Metagenome 菌相分析結果.....	48
4.2.2.1 稀有曲線及菌種累積曲線	48
4.2.2.2 菌相變化分析	50
4.2.2.3 樣本主座標分析及菌相熱點分析	55
4.3 地下水基本性質分析以及膠體管柱之設置	57
4.4 基本環境參數分析	58
4.5 氫氣與關切氫氣競爭者之分析	62
4.6 關切污染物級最終產物之分析	64
4.7 現地脫鹵球菌菌數及功能基因變化分析	67
4.8 模場整治效益及策略評估	69
第五章： 結論與建議	72
5.1 模場運轉前之次世代菌相分析結論	72
5.2 模場整治之次世代菌相分析結論	72
5.3 現地整治工法結論	72
5.4 成果與建議.....	73
第六章： 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	74
第七章： 參考文獻	76
第八章： 補充資料 – 場址基本資料	85
8.1 場址公告資料	85
8.2 場址名稱、地址、地號或位置及污染行為人及污染土地關係人資料	89
8.2.1 場址名稱.....	89
8.2.2 場址地址、地號或位置	89
8.2.3 污染行為人資料	91
8.3 場址沿革、目前營運狀況及運作歷史	91
8.3.1 場址沿革.....	91
8.3.2 目前營運狀況	93



8.3.3 運作歷史.....	96
8.4 場址可能污染來源	102



行政院環境保護署
108 年度土壤及地下污染整治基金補助研究與模場試驗專案
圖次

圖 1. 含氯有機物降解路徑與代謝基因圖.....	8
圖 2. 細胞固定方式示意圖.....	11
圖 3. 研究架構與實驗流程圖.....	15
圖 4. 永康地下水污染場址地理位置圖.....	17
圖 5. 場址之井位與地理位置圖.....	18
圖 6. 場址地下水流向圖。(A) 2 月 (B) 10 月.....	19
圖 7. 污染物等濃度曲線圖.....	21
圖 8 監測井以及反應井之設計圖.....	22
圖 9 反應井以及監測井於 cis-DCE 等濃度曲線圖之相對位置圖.....	23
圖 10 固定化產氫菌膠體管柱設置示意圖.....	24
圖 11. 物種豐富度排名曲線圖.....	35
圖 12. 菌種 OTUs 稀釋曲線圖.....	36
圖 13. 以門為分類之菌相累積變化圖.....	39
圖 14. 以屬為分類之菌相累積變化圖.....	40
圖 15 反應井與監測井之樣本主座標分析圖.....	42
圖 16. 以種為分類之菌種前 50 名之熱點分析圖.....	43
圖 17 <i>Dehalogenamonas</i> 完全脫氯之關鍵酵素示意圖 (Yang, 2017).....	45
圖 18 物種豐富度排名曲線圖.....	48
圖 19 菌種 OTUs 稀釋曲線圖.....	49
圖 20 以門為分類之菌相累積變化圖.....	52
圖 21 反應井以屬為分類之菌相累積變化圖.....	53
圖 22 監測井以屬為分類之菌相累積變化圖.....	54
圖 23 反應井與監測井之樣本主座標分析圖.....	55
圖 24 以屬為分類之菌種前 50 名之熱點分析圖.....	56
圖 25 反應井以及監測井之 pH 之變化.....	58
圖 26 反應井以及監測井(A) ORP 之變化 (B) DO 之變化.....	59
圖 27 反應井以及監測井之(A) 導電度之變化 (B) TOC 之變化.....	60
圖 28 反應井以及監測井之氫氣變化圖.....	62
圖 29 反應井以及監測井之甲烷變化圖.....	63
圖 30 反應井以及監測井之關切污染物 cisDCE 之變化分析.....	64
圖 31 反應井以及監測井之關切最終產物(A)氯乙烯及(B)乙烯(Ethene)之變化分	



析.....	65
圖 32 反應井之(A)多氯乙烯污染物降解之比較圖;脫鹵球菌基因變化圖 (B) <i>tceA</i> (C) <i>vcrA</i> (D) <i>bvcA</i> (E) 16s rRNA	67
圖 33 醌非依賴性電子傳遞鏈在有機鹵化物呼吸細菌中之機制圖。(Wang et al., 2018).....	69
圖 34 RDase 基因及脫鹵球菌 16S rRNA 基因之比例與完全脫氯生成乙烯關係圖.....	70
圖 35 微生物組成在多氯有機污染物降解過程中所扮演之角色.....	71



行政院環境保護署

108年度土壤及地下污染整治基金輔助研究與模場試驗專案

表次

表 1. 地下水整治方法統計表.....	4
表 2 各井之設置深度、井篩區間以及地下水水位.....	22
表 3 模場試驗地下水水質採樣規劃表.....	25
表 4. 聚合酶連鎖反應 (PCR)混合液配置.....	28
表 5. realtime-PCR 反應 SYBR Green 系統之混合液配方.....	29
表 6. realtime-PCR 反應 TaqMan 系統之混合液配方.....	29
表 7. 本計畫所使用之引子與探針序列.....	30
表 8. 原始數據品質檢測表.....	33
表 9. 有效序列分布表.....	34
表 10. Alpha 多樣性之結果表.....	36
表 11. 以種為分類階層之菌相變化表.....	37
表 12 原始數據品質檢測表.....	47
表 13 Alpha 多樣性之結果表.....	49
表 14 以種為分類階層之菌相變化表.....	50
表 15 挖井工程後一個月之各井地下水基本性質表.....	57
表 16 已分離鑑定之脫鹵球菌(<i>Dehalococcoides mccartyi</i>)菌種表.....	68



第一章：計畫前言與研究目的

1.1 三氯乙烯 (TCE)

三氯乙烯 (TCE)具有獨特的溶劑特性，因此適用於廣泛的工業應用 (Ohlen 等, 2005)。TCE 的使用開始於 20 世紀 20 年代。目前，它被廣泛用於金屬脫脂 (佔 TCE 總消耗量的 80-90%)，清潔和乾燥有關空航天領域電子元件操作 (用於沖洗液態氧)，塗料和塗料印刷油墨生產，在紡織品作為熏蒸劑和冷藏等 (Ohlen et al., 2005 ; Hazen et al., 2009)。TCE 的年度全球生產 2005 年為 6.7×10^5 公噸，消費量為 4.3×10^5 公噸 (Lacson, 2005)。它是一種密集的無色具有類似氯仿氣味的液體 (Jacoby et al., 1998)。TCE 是進入生物圈的有毒污染物，主要是由於處理不當導致洩漏溢出和處理含各種來源 TCE 的流出物 (Fernandes et al., 2009 ; Haest et al., 2010)。根據美國環保局 (2006 年)，在 2005 年 TCE 在美國的環境釋放量超過 2.5×10^3 公噸。1970 年，TCE 首次在地下水中被發現 (美國環保局, 2001 年)。如美國環保保護局 (美國環保署, 2001 年)，毒品局美國物質和疾病登記處 (美國毒物和疾病登記署, 2003 年)和印度中央污染控制委員會 (CPCB, 2007)等等。美國環保局和印度 CPCB 已經設定了空氣中三氯乙烯的允許限制最大值分別為 0.003 毫克/立方米和 270 毫克/立方米。由於其釋放到環境中，TCE 對人體健康構成威脅。它是其中之一最危險的揮發性有機(VOCs)化合物，已被證明具有致癌性和致突變性 (USEPA, 1997)。幾種慢性疾病包括眩暈、震顫、噁心、嗜睡、疲勞、肝癌、肝炎和心力衰竭等 (美國 EPA, 2007)。

TCE 在環境中的命運取決於釋放它的介質 (空氣，土壤或水)。它在正常條件下不水解，但可在水中緩慢被光氧化 (HSDB, 2002)。土壤中的三氯乙烯，在不同地點之生物降解分解過程速率較慢，約幾個月至幾年的半衰期。但因 TCE 有較高蒸氣壓，因此主要存在於氣相而不是吸附在大氣中微粒狀態。一旦 TCE 被釋放到空中，它可通過光氧化過程被破壞。在夏季約 3-8 天的半衰期，冬季則是 2 週。由於 TCE 在環境中具有持久性，因此，如何開發有效和經濟的方法去清除 TCE 污染，已成為研究人員主要關切課題。幾種物理和化學方法如泵處理、氣提、活性炭吸附和高級氧化過程已經被開發並應用於清除 TCE 污染的環境 (Yuan et al., 2012)。但這些過程大多耗時，污染並且昂貴 (Abumaizer et al., 1998)。生物修復是一種具有吸引力去除 TCE 方法。微生物降解具有許多優點如成本效益、高效能性及環保性等優點，可將 TCE 完全礦化成二氧化碳和氯 (Russell et al. 1992; Atlas & Philip, 2005)。



應用產氮菌提升產氮量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

Pant & Pant (2010) 整理過去 20 年中有關 TCE 生物降解研究報告。發現在厭氧條件下的還原脫氮條件以氯化乙烯充當電子受體。共代謝作用需要氧氣用於 TCE 酵素降解。在有氧條件微生物直接氧化氯化乙烯，因可氯化乙烯可充當電子供給者。Shulaka et al. (2014) 指出固氮菌可在微氣候條件生長，並可在缺氮環境中，固定氮氣，提供氮源，支持相關脫氮菌生長 (Roesch et al., 2008)。甲烷營養菌可在各種不同生存條件下生長，可適應不同的 pH 值，溫度，O₂ 和重金屬濃度 (Dubey, 2005)。利用不同微生物特性，來強化 TCE 降解能力，已經成為生物降解 TCE 之重要方向。

1.2 含氮場址整治方法

依污染物處理實施場所劃分，可分為現地 (*in situ*)、現場 (*on site*) 與離場 (*off site*) 三種，現地處理係指直接於土壤及地下水污染區進行整治工作；離地處理則需先將遭受污染之土壤挖出或地下水抽出至地表面上，再進行整治處理；離場處理係指將遭受污染之土壤及地下水由地表下暴露出後，經由運輸系統運離污染場址後進行處理 (環保署, 98 年)。現地處理不需挖掘土壤，且對大範圍污染區域只需以生物、化學進行重複操作的步驟，故可節省大量離場成本且在污染現場即可操作，近年來被大量應用在台灣的含氮有機物污染場址。

依處理方法而言，含氮有機污染物整治方法可分為物理技術、化學處理技術及生物處理技術等三大類別。物理處理技術係利用污染物的物理特性進行整治作業，涵括土壤開挖法、空氣曝氣法、DNAPL 純相回收、地下水抽除處理法及熱處理技術等。化學處理技術係利用氧化還原機制，降低污染物質量、移動性或毒性的方法，包含現地化學氧化法、現地化學還原法、透水性反應牆、零價鐵還原及界面活性劑等。生物處理技術係利用生物代謝轉化並降解污染物，涵蓋植生復育及地下水生物整治等 (工業局, 93 年)。

現地生物處理的優點包涵可整治去除污染區溶解相及可脫附的吸附相污染物、對場址的破壞干擾程度較低、成本低廉、現地生物復育整治工程結束後，原場址仍可藉由自然衰減方式，將污染狀況更進一步的加以改善、整治低溶解度及高吸附性的污染物時，整治時程會比抽取處理法為短、較無衍生二次污染物的問題等 (USEPA, 1994)。

根據美國 USEPA 統計 Superfund (超級基金) 整治場址資料顯示，由 2009 年至 2011 年，現地地下水整治方法的趨勢以生物整治及化學氧化為主 (USEPA,



第一章：計畫前言與研究目的

2013)。依前述統計資料，現地地下水整治作業中，生物整治所使用的比例為最多，佔 24%；其次為化學氧化法 (14%)，相關統計資料表如表 1。顯見現地生物復育為美國地下水整治之主要趨勢，而國內代表性場址如桃園 RCA、台中漢翔公司及高雄福德爺廟等地下水含氯有機污染場址，皆採用厭氧還原脫氯之生物處理法為整治方案。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

表 1. 地下水整治方法統計表

Technologies	Total (FY05-08)	Percent Groundwater Decision Documents (FY05-08)	Total(FY09-11)	Percent Groundwater Decision Documents (FY09-11)
Pump and Treat	85	26%	45	22%
Groundwater Pump and Treat	82	25%	44	21%
Surface Water Collect and Treat	5	2%	1	<1%
In Situ Treatment	97	30%	79	38%
Bioremediation	60	19%	49	24%
Chemical Treatment	38	12%	28	14%
Air Sparging	10	3%	12	6%
Permeable Reactive Barrier	7	2%	8	4%
In Well Air Stripping	0	0%	2	1%
Multi-Phase Extraction	1	<1%	2	1%
Phytoremediation	3	1%	0	0%
Fracturing	1	<1%	0	0%
MNA of Groundwater	116	36%	56	27%
Groundwater Containment (VEB)	16	5%	6	3%
Constructed Treatment Wetland	1	<1%	4	2%
For Groundwater Treatment	1	<1%	3	<1%
For Surface Water Treatment	0	0%	1	<1%
Other Remedies	281	87%	177	86%
Institutional Controls	274	85%	173	84%
Alternative Water Supply	26	8%	13	6%
Engineering Control	4	1%	2	1%
Technologies	Total (FY05-08)	Percent Groundwater Decision Documents (FY05-08)	Total(FY09-11)	Percent Groundwater Decision Documents (FY09-11)

備註:各場址選用之整治方案可能為 1 個以上。

資料來源:Superfund Remedy Report 14th Edition, USEPA, 2013



1.3 厭氧還原脫氯生物研究

四氯乙烯 (PCE)和三氯乙烯 (TCE)已是環境中常見工業污染物 (Moran et al.2007)。它們具有特殊的化學性質和很多優點，在工業，農業和軍事領域有廣泛的應用，但它們對環境可造成持久性的毒性影響 (Henschler 1994)。由於 PCE 和 TCE 的密度和粘度高於水，及 PCE 和 TCE 都是疏水性的且溶解度相對較低；因此，在地下水中仍然存在。此外，相對較高的揮發性使其可以釋放到非飽和土壤區 (Wittlingerova et al., 2013)和大氣中。

受污染含水層中的 PCE 和 TCE 來於人工合成，但順式 1,2-二氯乙烯 (cDCE)和氯乙烯 (VC)主要來源於污染環境內微生物降解 (Nijenhuis et al., 2007; Vogel and McCarty, 1985); 但 PVC 塑料的工業生產也可能是 VC 的直接來源 (Hartmans et al.1985)。氯乙烯在含水層中通常可造成持久性污染物，被許多微生物降解產生副產品如 cDCE 和 VC，其毒性比原本 PCE 和 TCE 具有更高的毒性 (Mattes et al.2010)。少量的氯乙烯也可天然產生的。例如，VC 可由土壤內耐腐酸，鐵 (III)和氯化物 (Keppler et al.2002)之間的化學反應產生的，並且 PCE 和 TCE 可通過海藻生物合成產生 (Abrahamsson et al., 1995)。

微生物對 PCE 和 TCE 的厭氧降解都是通過一系列步驟進行的，每個步驟都包括逐一移除氯原子，即反式 1,2-和 1,1-二氯乙烯 (tDCE 和 1,1-DCE) 和 VC 到乙烯。cDCE 是有機鹵化物呼吸過程中產生的主要 DCE 異構體，這一過程稱為「微生物還原脫氯」或「生物還原脫鹵」(Tandoi et al., 1994)。各種不同的細菌類群，各自對氯乙烯具有不同的代謝活性，常與氯乙烯污染的含水層共存，它們的實際活性取決於當地的環境條件，即需氧或厭氧 (Imfeld et al., 2011)。氯乙烯的細菌降解可以通過厭氧和有氧代謝降解 (用作電子供體的氯乙烯)通過厭氧有機鹵化物呼吸作用 (用氯乙烯作為電子受體) (Hug et al.2013; Paul et al., 2016)，或有氧及厭氧共代謝有機鹵化物。這些細菌在微生物代謝過程中可發生，且這過程中沒有提供碳源或能量提供細菌生長 (Mohn and Tiedje 1992; Wilson and Wilson 1985.)。有研究報告 VC 和 DCE 可被厭氧氧化 (Bradley and Chapelle 1998)，但實際上，在低氧濃度仍屬有氧氧化作用 (Fullerton et al., 2014)。同樣，一些細菌，在低氧條件下對氯乙烯通過厭氧氧化降解(Tiehm and Schmidt, 2011)。

有許多研究參與了氯乙烯降解的代謝途徑；為強化目前的生物修復過程，部分研究涉及細菌多樣性，細菌生長和特定細菌群的特定活性的測定 (Dolinová et al., 2016)。許多有關能夠將氯乙烯降解的細菌菌株，現在已被



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

分離出來，並且該類許多細菌菌株的全基因組也完全被定序 (Dolinová et al., 2016)。未來有助於對該類菌種作詳細基礎和應用研究，開發該類菌種對 TCE 降解能力之潛能。

1.4 無氧代謝降解-還原脫氯

有機鹵化物呼吸作用是厭氧環境中氯乙烯降解的主要手段 (Dollinova et al., 2016)。在厭氧有機鹵化物呼吸期間，使用氯乙烯作為電子受體，並且使用來自脫鹵反應產生的能量，用於微生物生長。最終的電子提供者通常是氫，許多不同的釋氫化合物可以用作主要電子提供者，例如，單化合物如乙酸鹽，苯甲酸鹽，丁酸鹽、甲醇、乙醇、葡萄糖、乳酸鹽或丙酸鹽；或所謂的複合化合物如乳化植物油，有機護膜、糖蜜、乳清和麵粉。因 cDCE 和 VC 不易被細菌通過有機鹵化物呼吸作用而降解，因此，容易在污染場址累積 (Dollinova et al., 2016)。有機鹵化物的呼吸速率可以與生物地球化學過程的相互作用和通過不同微生物群體間氫的競爭會影響 (Dollinova et al., 2016)。因此，加入電子供給者可能不會刺激脫鹵微生物的活性，但可刺激競爭微生物群體的活性，如甲烷菌及乙酸菌之於硫酸鹽，硝酸鹽，鐵和錳還原劑。例如，如果有較高的氫濃度，產甲烷菌就可以競爭氫氣，並將其用於甲烷生成 (Aulenta et al., 2005; Ballapragada et al. 1997)。在低氫濃度下，脫氯細菌對氫氣有很高的親和力，可能與產甲烷菌競爭 (Yang and McCarty 1998)。因此，氫供應的緩慢釋放有利於脫氯細菌 (Fennell et al., 1997; Yang and McCarty 2002)。因此，還原脫氯和氧化還原過程 (如硫酸鹽和鐵還原) 之間的關係對降解過程有重要影響。一些研究證明，硫酸鹽和鐵的還原作用可競爭氫氣，降低脫氯作用 (Aulenta et al., 2008; Azizian et al., 2010)。另外，硫酸鹽還原亦可以減緩 cDCE 和 VC 的脫氯，可能會導致硫化物的累積 (Pantazidou et al., 2012)。除了硫化物和/或氫的競爭 (Berggren et al., 2013)，硫酸鹽的添加可降低 PCE，cDCE 和 VC 脫氯作用。然而，一些研究中顯示添加硫酸鹽反而可提高脫氯效率 (Harkness et al., 2012)。這些矛盾的結果可能是由於在硫酸鹽還原過程中產生了微鹼性條件，使脫氯作用不受影響 (Robinson et al., 2009)。

1.5 參與厭氧降解的細菌

大多數細菌僅能夠通過還原脫氯將 PCE 和 TCE 部分降解為 cDCE 或 VC。



儘管 VC 被認為是脫氯作用代謝產物，但是 *D. mccartyi* strain 195 能夠將 PCE 完全還原脫氯為乙烯 (Maymó-Gatell et al.,2001)。從污染沉積物中分離出兩種其他菌株，*Propionibacterium* sp. HK-1 和 *Propionibacterium acnes* HK-3 顯示出可將 PCE 和 cDCE 降解成為乙烯的兩種厭氧菌 (Chang et al.,2011)。該研究首次證明除 *Dehalococcoides* (*Chloryl Chloroflexi*) 以外的其他菌株，亦能夠降解 PCE 而不產生有毒的副產物。因此，具有上述這種能力的更多菌種，可能還在等待被發現。儘管如此，*Dehalococcoides* 仍然是三氯乙烯污染場地發現主要菌種，它們的存在與乙烯的形成密切相關。cDCE 和/或 VC 的累積與 *Dehalococcoides* 存在有正相關性 (Hendrickson et al.,2002; Kranzioch et al., 2013)。因此，*Dehalococcoides* 的存在，可證明污染場地具有三氯乙烯的生物降解潛力 (Major et al.2002; van der Zaan et al., 2010)。以氯乙烯作為電子受體和氫作為電子供體的 *Dehalococcoides* 菌株為 *D. mccartyi* (Löffler et al., 2013)。*Dehalococcoides* 限於厭氧條件，並受到氧氣的抑制 (Kaster et al., 2014)一些 *Dehalococcoides* 菌株能夠部分氯乙烯降解，例如，BAV1、CBDB1、FL2、GT、KB-1、MB 和 VS，個別 *Dehalococcoides* 菌株不能完成氯乙烯厭氧降解。

幾種脫鹵球菌屬基因組序列已被測序並描述 (Hendrickson et al., 2002; Kube et al.,2005)。雖然可通過分析 16S rRNA 基因來確定微生物群落成員，但這不適用於解決不同的 *Dehalococcoides* 菌株，因為它們的 16S rRNA 基因序列差異非常小 (He et al.2005; Löffler et al.,2013)。因此，通過 16S rRNA 分析得到的親緣關係測試結果與使用 RDase 基因的水平轉移功能性還原性脫鹵素酶 (RDases)的親緣分析結果比較並不相關 (McMurdie et al., 2009)。儘管脫氯菌產生脫氯效率差異很大，和 *Dehalococcoides* 基因組是具有高度保守性，因此，幾乎不可能使用基因組的一小部分來區分個別脫鹵球菌，必須再測定 RDases 基因的存在與活性，來證明 *Dehalococcoides* 脫氯作用。

1.6 酵素和功能性基因參與 PCE/TCE 厭氧脫氯作用

RDase 是有機鹵素呼吸的關鍵酶，因為它們直接催化碳-氯鍵的裂解 (Futamata et al., 2009)。儘管大多數 RDase 都與細胞膜結合，但是在 *Desulfitobacterium*，*Dehalobacter* 和 *Sulfurospirillum multivorans* (Jugder et al.,2015; Maphosa et al.,2012)，可在細胞質發現 RDases 存在。PCE 還原脫鹵素酶 (PCE-RDase) 可將 PCE 和 / 或 TCE 還原脫氯成 cDCE



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

(Neumann,1996)，TCE-RDase 還原 TCE，通過 cDCE 至 VC (Magnuson 等人 1998)，VC-RDase (VcrA) 將 cDCE 和 VC 脫氯化成乙烯 (Müller 2004)，1,2-二氯乙烷轉化為乙烯 (Parthasarathy 等,2015)。VC-RDase (BvcA) 將 VC 氯化為乙烯 (Krajmalnik-Brown 等 2004)。這些 RDase 可能具有更多不同的催化反應 (Lee et al.2013)。例如，VCRDase (BvcA) 對所有 DCE 異構物進行脫氯作用 (Tang 等，2013)。

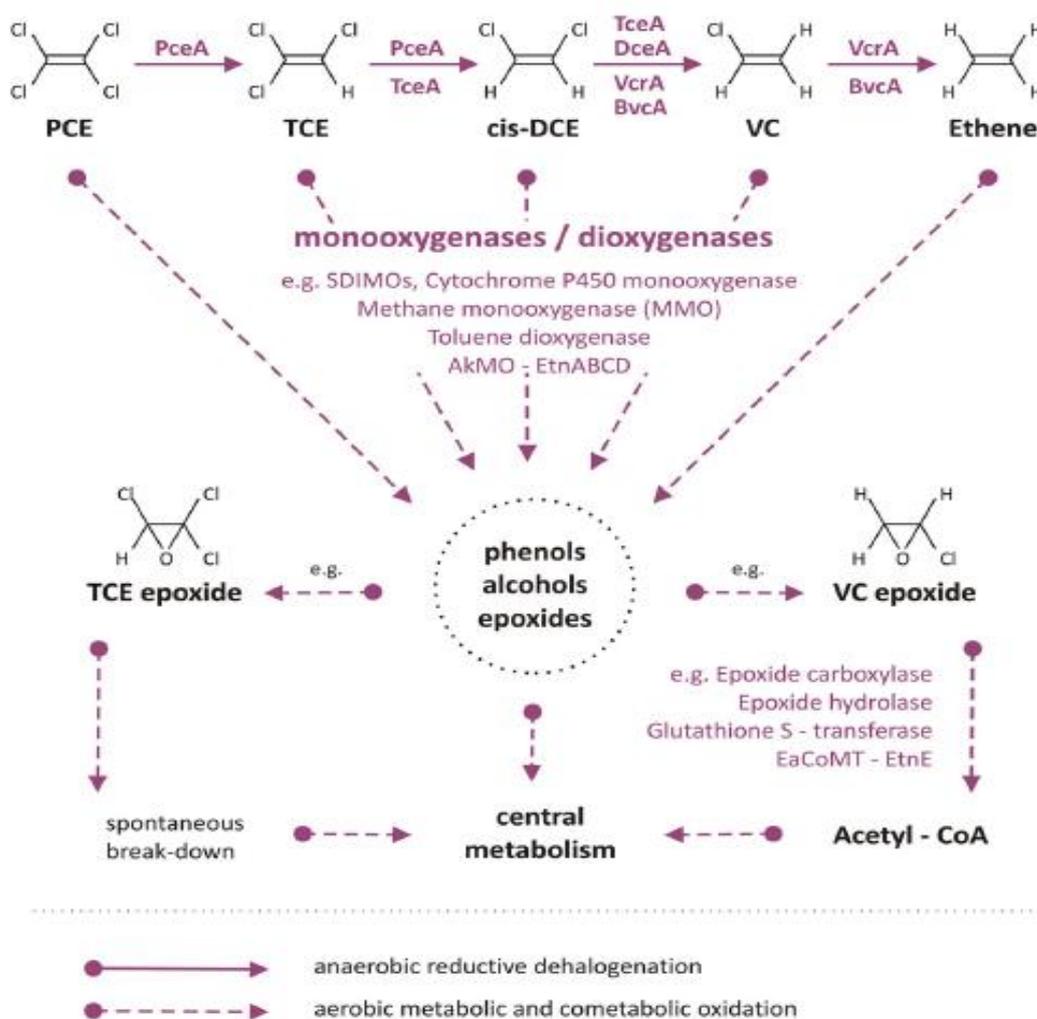


圖 1. 含氯有機物降解路徑與代謝基因圖

測定 RDase 基因的存在和表達可反應脫氯活性程度，並可以克服以 16S rRNA 為主要測定基因方法的局限性。pceA、tceA、vcrA 和 bvcA 於 RDase 基因，分別對不同氯化物具有不同特異性如上圖 1 所示，可用於確定不同脫氯菌生長和脫氯活性。編碼 RDase 的多種基因，可在細胞中存在並表達，通常以多個拷貝的形式出現 (Hug et al., 2013)。大約 650 種已知 rdhA 基因存在 Dehalococcoides (Hölscher et al., 2004; Hug et al., 2013; Kube et al., 2005)。因此，設計合成 pceA、tceA、vcrA 和 bvcA 等 RDase 基因的 primer，可用於

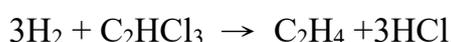


確定氯乙烯降解菌。

三種不同的生物復育方法被應用於降解氯乙烯。首先是「受監控的自然衰減」(MNA)，它採用天然的非生物和再污染現址原微生物降解過程策略。MNA 包括在預測的時間範圍內監測污染場址污染物濃度是否衰減。Wiedemeier 等人 (1998)年制定了評估和實施 MNA 方法。該方法專注於生物還原脫氯。用於評估 MNA 的分析技術僅限於有機和無機化學和無機化學/地球化學 (VOCs、溶解氧、硝酸鹽、Fe(II)、硫酸鹽、甲烷、乙烯、ORP、pH、溫度和鹽度)，並沒有考慮微生物參數。在 MNA 不足以降低污染物濃度到期望目標時，第二種方法被稱為「增強自然衰減」或「生物刺激」。它包括監測自然衰減的原理，但包括碳源或其他電子供體的添加，進一步加速天然氯乙烯的降解 (Dolinová et al., 2016; Lacinová et al., 2013)。為了確認生物刺激法之成功，微生物群體必須已經存在於含水層中。分子生物技術常用來評估污染場地的微生物群體。在實施生物刺激法前，先檢測是否在污染場址是否有分解 TCE 微生物或相關基因。例如，對將氯乙烯轉化成有害的 VC 菌株進行評估。進一步在整治過程中，分析量化特定基因和微生物的變化，可在污染含水層，來評估生物刺激和生物強化效能。第三種方法可以用於目標含水層不含具有分解 TCE 的菌種。生物刺激涉及到添加具有已知降解活性的預培養的細菌，強化污染場址生物復育。目前，具有高效能分子生物技術如 metagenome，可評估污染廠址微生物菌相，不論在整治前後，可決定生物強化或生物刺激成效。

1.7 產氫菌加強 TCE 分解

利用生物代謝含氯碳氫化合物，由於添加基質種類不同，提供微生物代謝生長的自由能則不同，不僅使污染物的生物轉換情形有所差異，同時影響生物代謝途徑。在很多研究中發現，隨著基質種類及濃度不同，會影響含氯碳氫化合物的生物降解情形 (Tsai et al., 2014)。厭氧菌除了利用含氯化合物為電子接受者外，在脫鹵呼吸之過程中，亦需要有電子供給者 (electron donor) 存在以提供電子，一般之電子供給者為氫氣 (hydrogen)、甲醇 (methanol)、乙酸 (acetate) 或甲酸鹽 (formate) 等，下式為三氯乙烯以氫氣作為電子接受者之反應方程式：





應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

氫氣為脫鹵反應中電子提供者，微生物經由基質磷酸化之過程產生 ATP。大部分能降解多氯乙烯之微生物其脫鹵呼吸之氧化還原電位介於+250 至 +600mV，因此，由熱力學之角度來看，含氯有機化合物在厭氧之狀態下是傾向於作為電子接受者 (Dugat-Bony et al., 2012)；此外，含氯有機物接受電子為自發性反應，並可於反應過程中產生能量。氫氣在還原環境中常常是一個快速且直接的電子供給者，因此氫氣會被許多的微生物族群所競爭，除了脫氯菌 (Hydrogenotrophic dechlorinators)外，像甲烷菌、硫酸鹽還原菌、氯化菌、脫硝菌、Fe (III)還原菌等 (Panagiotakis et al., 2015)都會利用氫氣，尤其是甲烷菌，在很多的厭氧混合族群中，甲烷菌常常是優勢菌種，加上甲烷菌在氫氣的競爭上 (特別是高濃度下)佔有絕對的優勢，因此是脫氯菌在競爭氫氣上的主要對手。雖然很多的有機物都可以扮演電子提供者的角色，但在近幾年的研究中發現，氫氣在還原脫氯反應中常扮演直接供給電子的角色，而且被認為是促使還原脫氯反應進行的關鍵因子，可直接增加含氯有機物污染場址中的脫氯菌 *Dehalococcoides* 之數量，強化多氯乙烯整治成效。微生物一般將四氯乙烯脫氯到三氯乙烯時的氫氣還足夠，因此脫氯的時間較為快速，但到了後期氫氣逐漸地被消耗殆盡，此時必須透過額外添加氫氣的方式來幫助 *Dehalococcoides* 菌屬的還原脫氯反應。但是額外添加氫氣的成本相對來說較高，已經不符合生物復育的原則。因此可利用額外添加產氫菌株 (例如: *Clostridium butyricum*)來幫助 *Dehalococcoides* 菌屬的還原脫氯反應，氫化酶 (hydrogenase)對於微生物發酵產生氫氣來說是一個關鍵的酵素，氫化酶的基因為 *hydA* (Wang et al., 2008)，利用 qPCR 進行定量監測，可了解污染場址中產氫氣的能力，以便對污染場址進行適當的調控。幫助含氯有機物污染場址的整治 (Aulenta et al., 2006)。

1.8 包埋固定化菌株技術應用

固定化微生物技術利用物理或化學手段將具有特定生理功能的游離微生物固定於載體材料內部或表面，使其高濃度密集、保持較高生物活性且可持續使用的一種新型生物工程技術。固定化微生物技術可將選定的高效優勢菌固定在載體上，使該菌在特定處理系統中具有活性高、專一性強、耐受性強 (如 pH、溫度、有毒有害物質)、處理效果穩定、有毒有害物質去除速率快等優點。同時，固定化微生物技術還可以將混合菌屬集於同一載體，使混合菌屬協同處理污染物。固定化微生物技術以其自身的巨大優勢在廢水處理領域中引起普遍的關注，但目前尚處於實驗室水平，要實現由室內模擬階段進入



第一章：計畫前言與研究目的

實際工程應用，還需在以下方面取得突破：(1)篩選對特定污染物去除效率高、耐受能力強的微生物，加強極端微生物的研究，或充分利用複合菌群(2)研發新型的耐用廉價、強度高、傳質好、性能穩定、環境友好型複合固定化載體(3)深入研究和探討固定化微生物去除污染物的作用機制。

固定化細胞系統具有許多優點已有報導，其中一些主要原因如下：(1)提供高生物量。(2)提供細胞再利用並減少昂貴的過程。(3)細胞回收和細胞再循環。(4)在高稀釋度下消除細胞清洗問題。(5)高流量允許高體積生產率。(6)提供適合的微環境條件。(7)提高遺傳穩定性。(8)防止剪切損壞。(9)高耐毒性化學品、pH、溫度、溶劑和重金屬 (Bayat et al., 2015)。載體選擇常重要。載體必須具有以下標準：(1)無毒、無污染、不可生物降解。(2)高濃度菌數載重能力。(3)機械、生物和化學穩定性高。(4)長保存期。(5)充足的功能。(6)低成本價格。(7)從流動介質到載體中心的最佳擴散距離。(8)容易從介質中分離細胞和載體。(9)易於處理和再生 (Bayat et al., 2015)。Alginate (藻酸鹽) (由不同比例製成的聚合物和從棕色藻類提取的甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的序列)是大多數固定系統中選擇的聚合物，因為它們易於處理，對人類無害，對環境傷害低，可大量生產且價格便宜。從生理學角度來看，藻酸鹽的主要優點是細胞在固定化過程中不會發生物理化學條件的極端變化，不影響凝膠反應體系統和通透性 (Buque et al. 2002)。已經使用許多不同形式的細胞固定如下圖 2，包括從左到右：(1).吸附 (2).共價結合 (3).包埋 (4).包封。在這些方法中，Entrapping 已被廣泛研究 (Jack and Zajiv, 1977)。

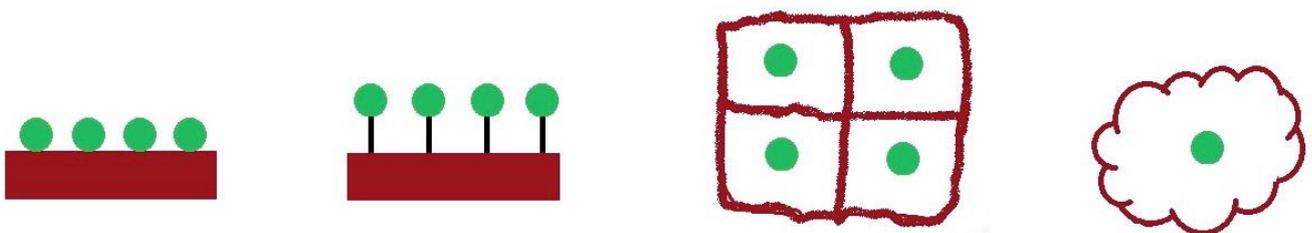


圖 2. 細胞固定方式示意圖

增加了可用的表面積，以促進生物量的生長並且還提高降解速率。Obuekwe 和 Al-Muttawa (2001)發現節桿菌屬和從科威特油湖分離的革蘭氏陰性芽孢桿菌，然後在低營養條件下將這些細菌與木屑，發泡膠或麥麩一起作為載體孵育，形成穩定的外多醣介導的固定化培養物。作者測試了在 45°C



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

下生存和降解碳氮化合物 6 週的能力。新鮮固定的細胞比自由細胞的懸浮液具有更高降低原油的能力。在其他研究中 Quek 等 (2006) 報導了 *Rhodococcus* sp. 的固定在 F92 聚氨酯泡沫 (PUF) 在石油煙生物修復中的應用。Radwan 等人固定化油降解細菌之生物膜塗覆大型藻類。這種天然固定可以保護細菌免受洗滌和稀釋，也可以提供氧氣，以及可能的含氮和磷化合物和維生素提供油降解細菌之用 (Radwan et al., 2002)。Gentili 等 (2002) 使用幾丁質和殼聚糖薄片來固定棒桿菌 QBT0。這種支持物是從蝦和螃蟹獲得的天然無毒無污染的可生物降解的生物材料。固定在殼多醣和殼聚糖薄片上的棒桿菌 QBT 顯著增加了原油生物降解。Wiesel 等 (1993) 觀察到混合細菌培養固定在顆粒狀粘土上表現出良好的生長，並證明了與模型土壤系統中的自由懸浮細胞相比，表現出對多芳烴 (PAH) 的同等降解潛力。Diaz 等人在聚丙烯纖維上固定化細菌團聚體 MPD-M，他們觀察到固定化細胞與自由活細胞相比顯著提高了原油的生物降解率，細菌團聚體 MPD-M 在固定化體系中高度穩定，不受添加鹽度的影響 (Diaz et al., 2002)。

Xu 和 Lu (2010) 表明，通過將固定在花生殼粉末上的碳氮化合物降解細菌作為生物載體應用，原油污染土壤中的除油量增加。該生物載體具有較大的表面積和較強的吸附能力，另外提高了氧氣擴散，提高了土壤中的脫氮酶活性。Cocquempot 等人 (1981) 檢查了固定化細胞在 PUF 中比固定在藻酸鹽中更好，因為儲存穩定性和微生物活性。由於聚氨酯泡沫的孔隙率，機械性能，疏水性和親水性的廣泛範圍而開發的聚氨酯泡沫的使用。例如 Oh 等人 (2000) 固定的解脂耶氏酵母在用於原油降解的聚氨酯泡沫中。Liang 等人 (2009) 比較了含有自由活體細菌培養物和活性炭生物載體的污染土壤中原油的降解量。結果表明，活性炭生物載體固定化可以提高土壤的氧氣，營養物質傳質和保水能力，從而提高原油生物降解，細菌群體和總微生物活性。固定化細胞用於其他化合物的生物降解。最近，Maliji 等人使用天然支持物，如 luffa 和海綿來固定蠟樣芽孢桿菌在柴油降解應用。該吸附系統可以控制污染，並且可以很容易地以低成本使用。Kim 等人 (2006) 研究了污染物 (苯酚) 對游離藻酸鈣和固定化惡臭假單胞菌 MK1 (KCTC12283) 對吡啶生物降解的影響。他們證明，固定化的細胞可以有效地增加對苯酚的耐受性，並導致吡啶的降解增加。在某些情況下，石油碳氮化合物的微生物代謝可能會產生有毒的代謝物，如環烷酸，這可能會阻礙隨後的生物降解，因為它們會抑制微生物代謝的毒性 (Lu et al. 2010)。Weir 等人 (1995) 使用藻酸銅綠假單胞菌 UG14，粘土和脫脂乳來降解菲。他們觀察到 30 天后包封細胞的存活率較高，而游離細胞持續 18 天。O'Reilly 等人 (1989) 通過假單胞菌屬



第一章：計畫前言與研究目的

(*Pseudomonas* sp.)研究了 p-Cresol 的降解。固定在藻酸鈣和聚氨酯中。結果表明，由於其具有較高的機械強度和改善的氧傳遞特性，聚氨酯是一種比藻酸鈣更好的固定基質。 Bay et al. (2015) 整理出固定化菌種對生物降解之應用如下表。

Table 1. Some immobilized cells for use in biodegradation compounds.

Compounds Degraded	Carriers	Microorganisms	References
acrylamide	alginate	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Xanthomonas maltophilia</i>	[54]
Cadmium and Zinc	alginate	<i>Pseudomonas fluorescens</i> G7	[55]
2-chloroethanol	sand	<i>Pseudomonas putida</i> US2	[56]
cyanuric acid	Granular clay	<i>Pseudomonas</i> sp. NRRL B-12228	[57]
Diesel oil	Polyvinyl alcohol	Hydrocarbon-degrading bacteria	[58]
Ethylbenzene	Alginate, agar, polyacrylamide	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -CS2	[59]
Mercury	alginate	nitrogen-fixing bacteria (NFB)	[60]
naphthalene	alginate, agar and polyacrylamide	<i>Pseudomonas</i> sp. strain NGK 1	[61]
p-Nitrophenol	diatomaceous earth	<i>Pseudomonas</i> sp.	[62]
pentachlorophenol	polyurethane	Flavobacterium sp.	[63]
Pentachlorophenol	alginate	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[64]
Pentachlorophenol	k-Carrageenan	<i>Pseudomonas</i> sp. UG30	[65]
phenol	Polyvinyl alcohol (PVA)	<i>Acinetobacter</i> sp. strain PD12	[66]
phenol	agar	methanogenic consortium	[67]
Phenol, trichloroethane	Chitosan	<i>Pseudomonas putida</i> BCRc14349	[68]
sodium cyanide and acetonitrile	alginate	<i>Pseudomonas putida</i>	[69]
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	polyacrylamide	<i>Pseudomonas</i> C12B	[70]
2,4,6-trinitrotoluene (TNT)	alginate	<i>Arthrobacter</i> sp.	[71]
2,4,6-Trichlorophenol	k-Carrageenan/gelatin gel	Microbial consortium	[72]



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

第二章：研究目的

地下水含氯有機物因其低水溶性及比重大於水等特性，被視為難去除的污染物之一。現地生物整治費用較離地處理低廉、可持續降解氧化後低濃度含氯有機物、將污染物轉為無害物質等優點。前人研究指出氫氣在厭氧還原脫氯過程中扮演重要角色，而地下水現地微生物中產氫菌株由於競爭、碳源不足等原因，常無法穩定提供氫氣做為脫氯菌群還原脫氯電子來源，導致還原脫氯效率低落，而菌株固定化技術能強化菌株耐受性與穩定性，因此本計劃將結合生物刺激法和生物固定化技術並配合次世代定序法等，建立完整系統評估監測機制，使現地地下水中含氯有機物厭氧生物整治達最佳化。此外，鹵化烯烴生物厭氧代謝過程中，脫鹵化速率與電子提供者：氫氣有顯著關係，試驗期間反應速率緩慢，推究其原因係產生氫氣的特定菌種有限，冀透過本模場之菌種鑑定發現適合臺灣在地特定產氫菌，並結合生物固定化技術提高整治工法之還原脫氯效率。

第二年針對期中報告我們所主要研究的內容及目的如下：

1. 設置現地模場整治與監測井，添加灌注乳化型釋碳基質與固定化產氫菌株，定期監測模場多氯乙烯污染物降解速率與地下水性質分析。
2. 利用次世代定序技術檢測多氯乙烯污染水相在降解過程中微生物相 (Microbiota) 之變化。
3. 利用即時定量 PCR 測定模場內脫氯菌與三種多氯乙烯降解基因變化。



研究架構與實驗流程

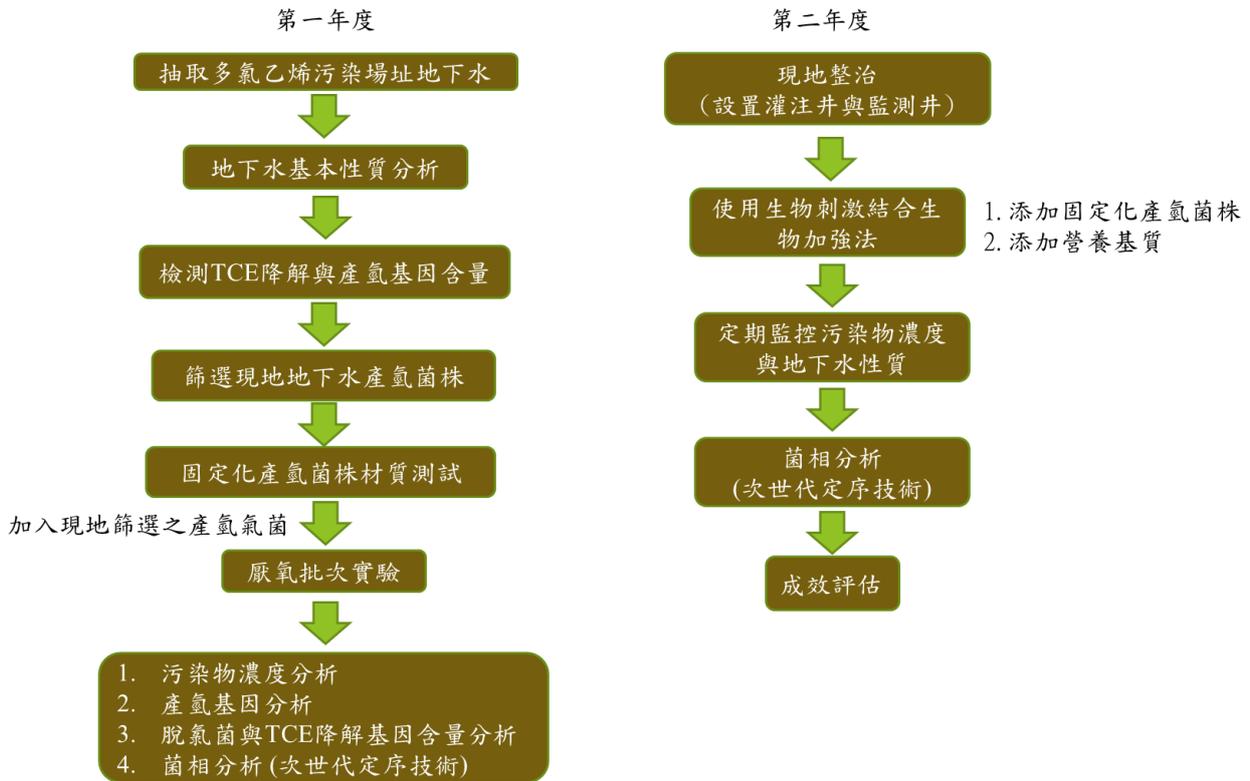


圖 3. 研究架構與實驗流程圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

第三章：研究方法與過程

3.1 試驗地下水之介紹

3.1.1 目前場址營運狀況

本計畫模場場址位於台南市永康區鹽行段 1522-1 地號為主，屬於永康地下水污染場址內之道路區，並已獲得台南區公所的同意。永康地下水污染場址位於台南市永康區永康交流道西側附近(如圖 4)，該場址係起源於 90 年度環保署執行之全國性污染調查計畫，於永康加油站發現地下水受含氯有機物污染，後續臺南市（縣）環境保護局（以下簡稱環保局）執行污染調查、查證計畫確認之含氯污染場址。

永康地下水污染場址根據調查結果污染物主要為含氯有機物而非一般加油站油品洩漏之汽油類污染物，本計畫以該場區永安路 12 巷道路區為模場試驗區。圖 5 為場址之既設井位與模場位置圖。本模場（永安路 12 巷以南）之地下水流向呈現南向北或由東南東向北北西向之趨勢，土壤性質為粉土及黏土，不同季節之地下水流向並無明顯變化，如圖 6 所示。本試驗最近之地下水採樣點 R00328 其水力傳導係數為 4.44×10^{-4} cm/s。



第三章：研究方法與過程

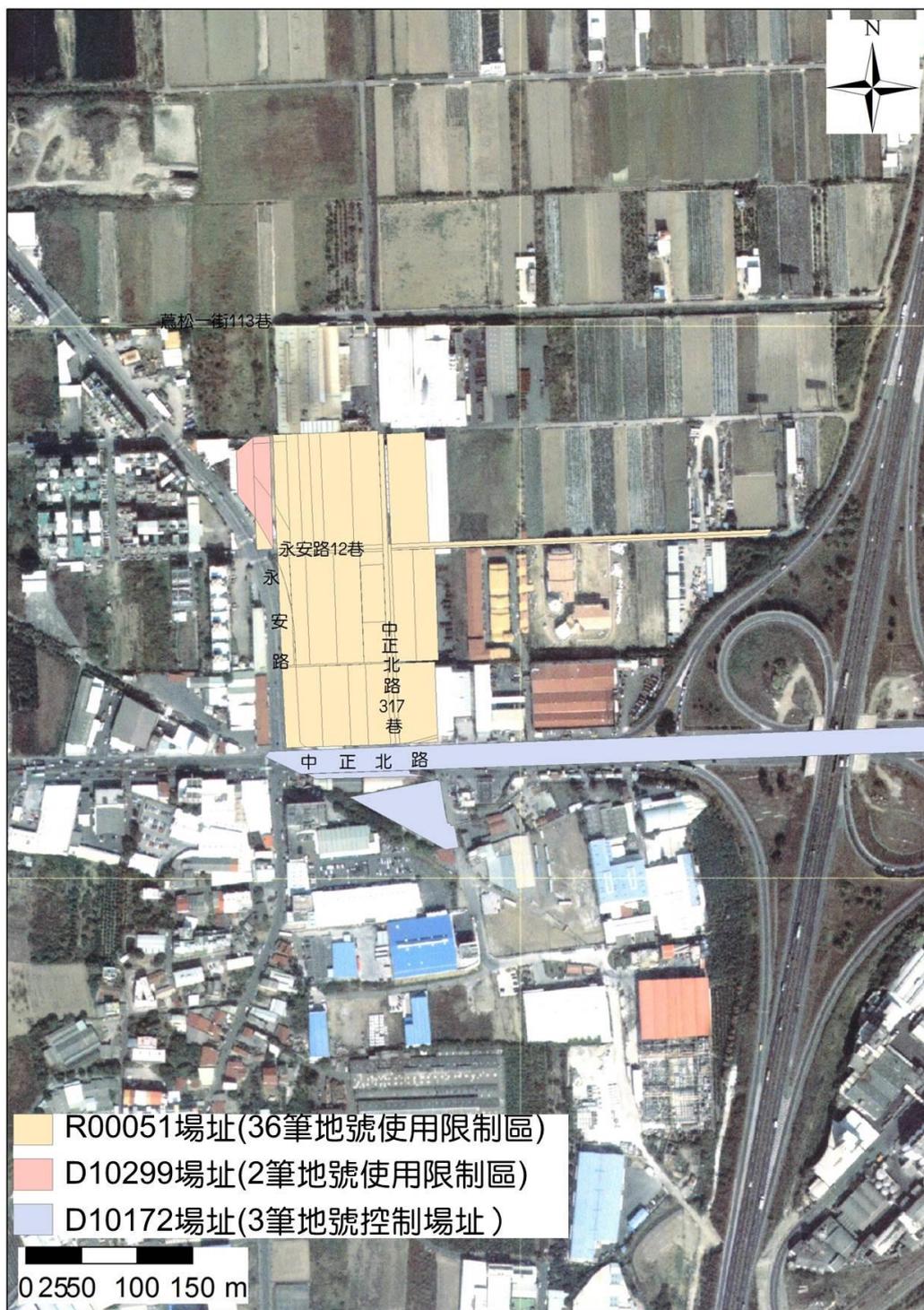


圖 4. 永康地下水污染場址地理位置圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

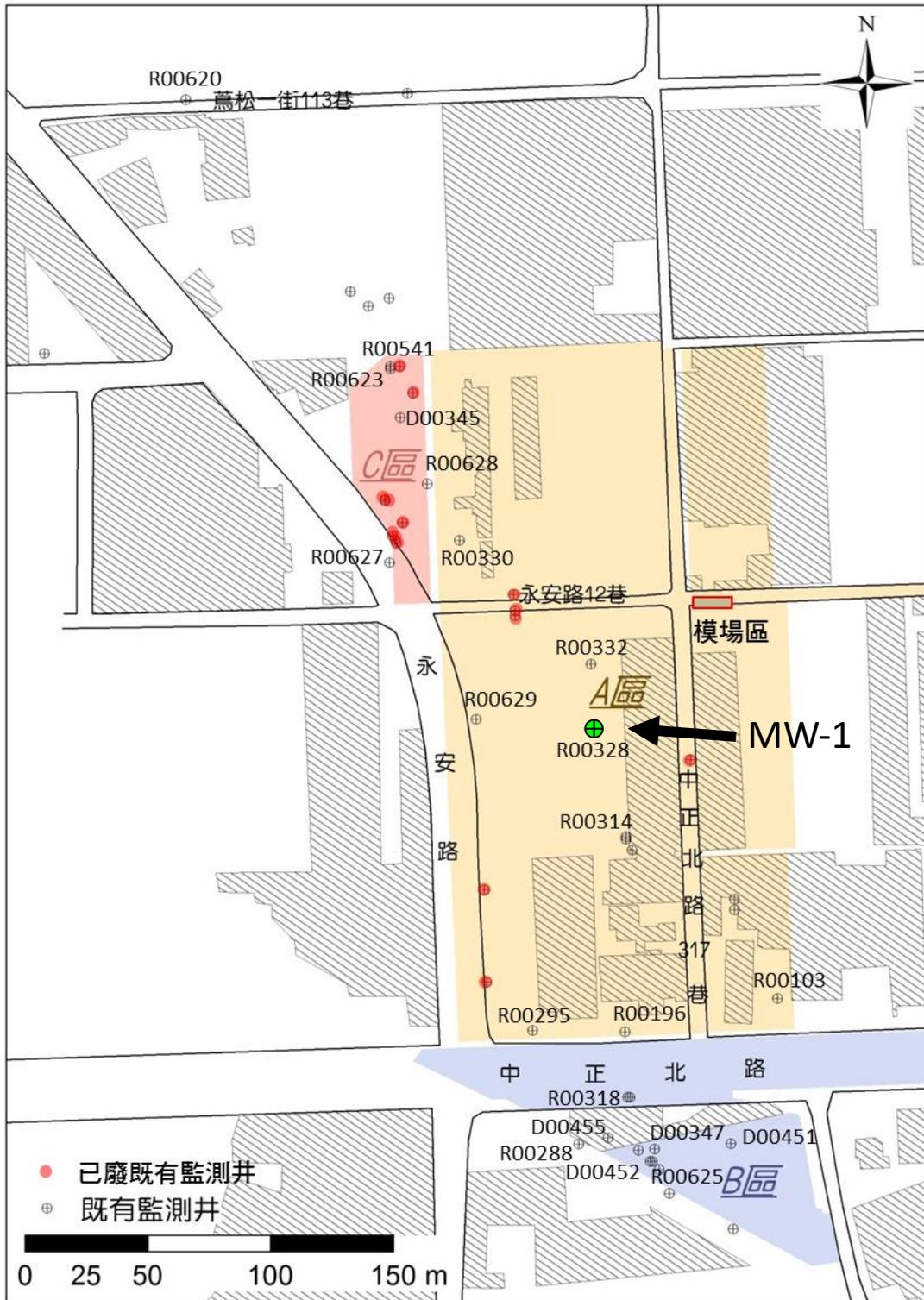
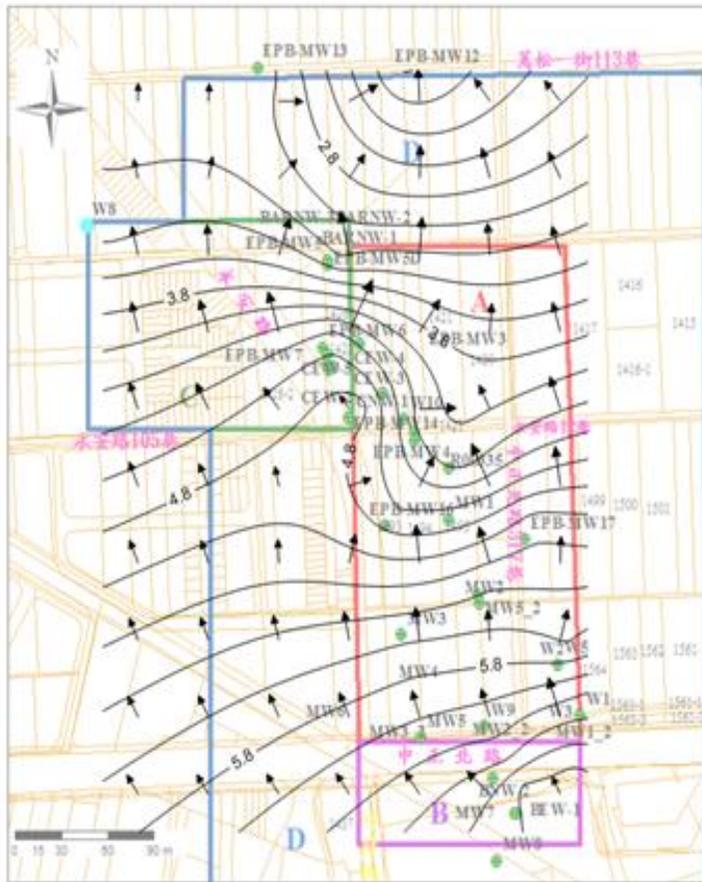
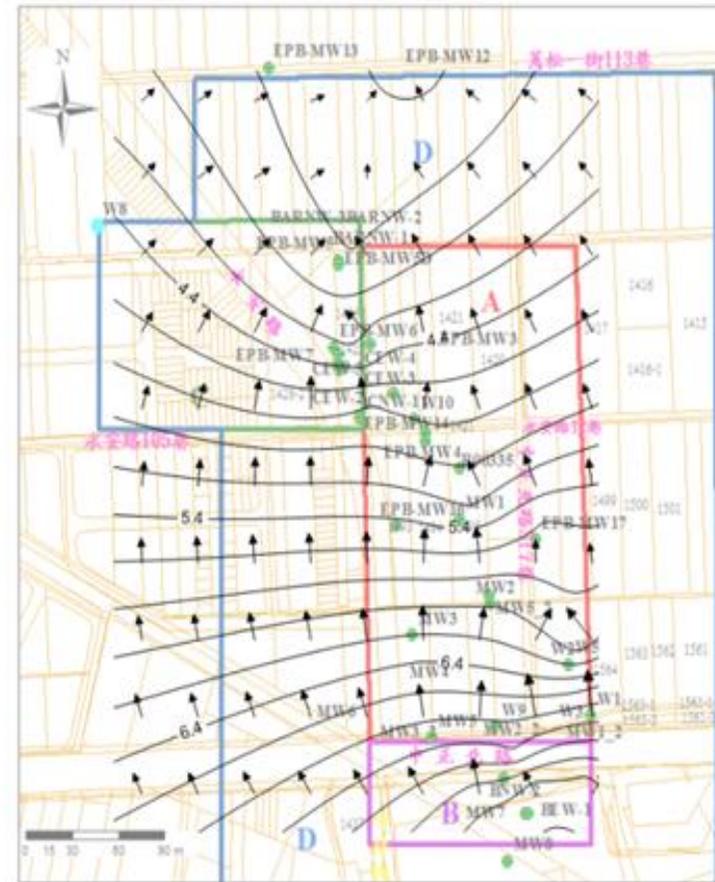


圖 5. 場址之井位與地理位置圖



(A)



(B)

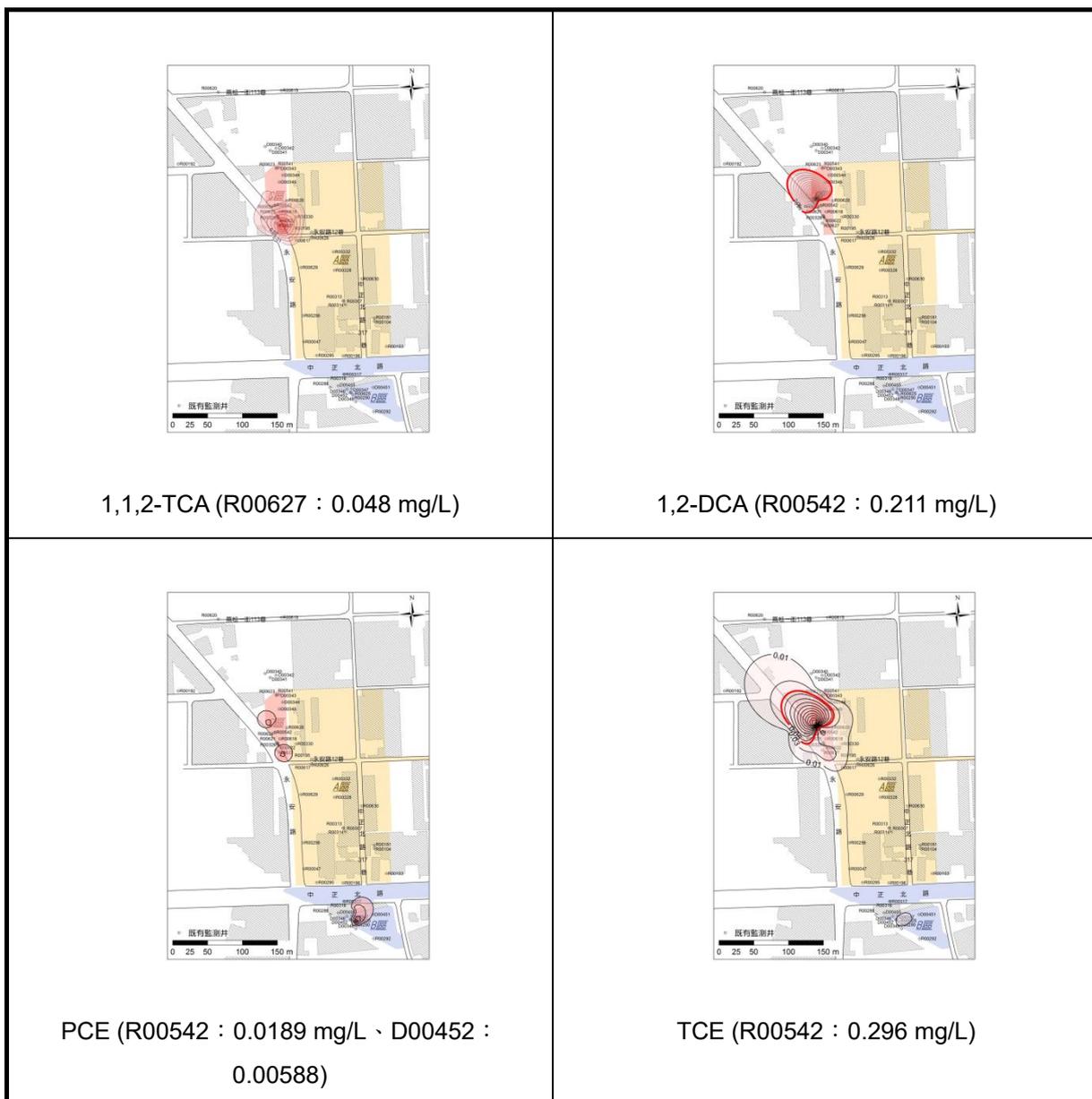
圖 6. 場址地下水流向圖。(A) 2 月 (B) 10 月



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

3.1.2 污染情形

列管場址公告中，地下水遭受污染的污染物主要為四氯乙烯、三氯乙烯及相關代謝產物。根據環保署 103 年度「臺南市永康鹽行段及鹽東段地下水污染評估與調查計畫」的調查結果，最高污染濃度 TCE 為 R00542 井 0.296 mg/L，cis-1,2-DCE 為 R00103 井 5.59 mg/L，VC 為 W10 井 1.49 mg/L，污染物等濃度曲線圖及較高濃度監測井如圖 7 所示，模場區係位於永康地下水污染場址之下游污染團區，而非污染源區，因此主要污染物為降解之 cis-1,2-DCE 及 VC。





第三章：研究方法與過程

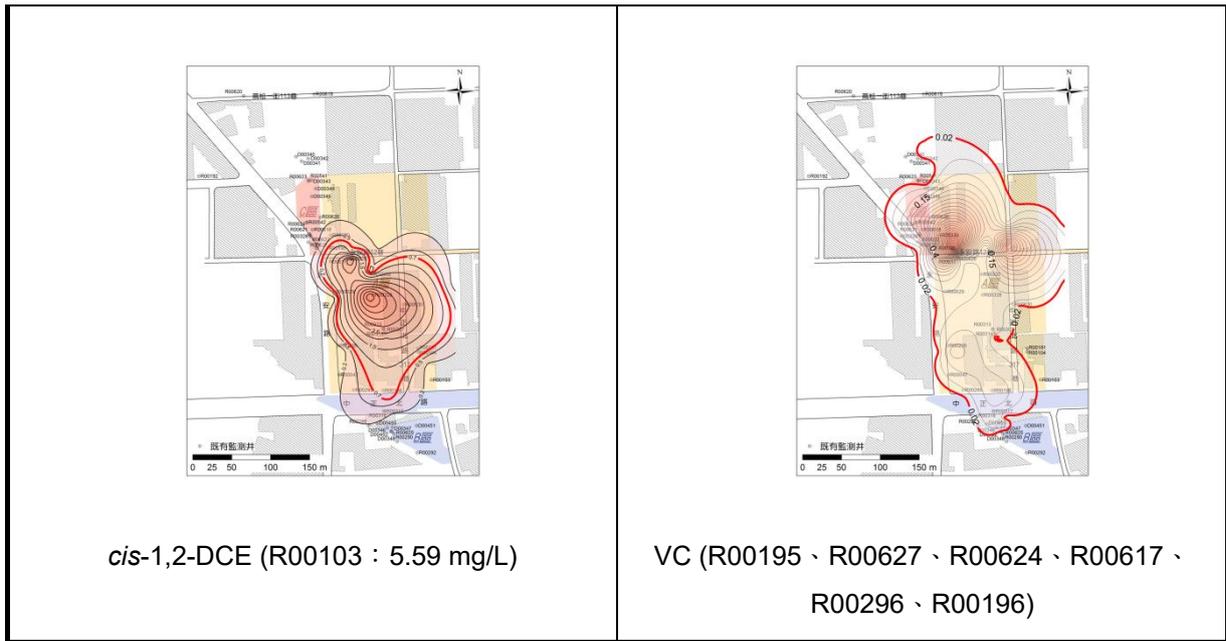


圖 7. 污染物等濃度曲線圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

3.2 模場試驗設井規劃

本研究採用固定化產氫菌加強現地脫氯之生物整治技術，設計一地下水整治系統，於污染區設置小型模場系統，傳統現地生物復育系統僅於污染區上游灌注藥劑系統，利用發酵作用刺激現地微生物菌相，但往往關鍵電子提供者氫氣大多被甲烷菌以及硫酸菌所使用，使得關鍵脫氯菌並無法有效利用氫氣進行脫氯，固本研究設計 3 口氫氣反應井(IW1-3)，其中兩口將添加固定化產氫菌管柱，三口井接添加乳化油生物製劑，並同時於上游新設置一口監測井 MW2，搭配現場既有井 MW1 做為後續成效評估之採樣監測井，其設計圖下圖 8，相關參數如表 2，設井位置圖如圖 9。

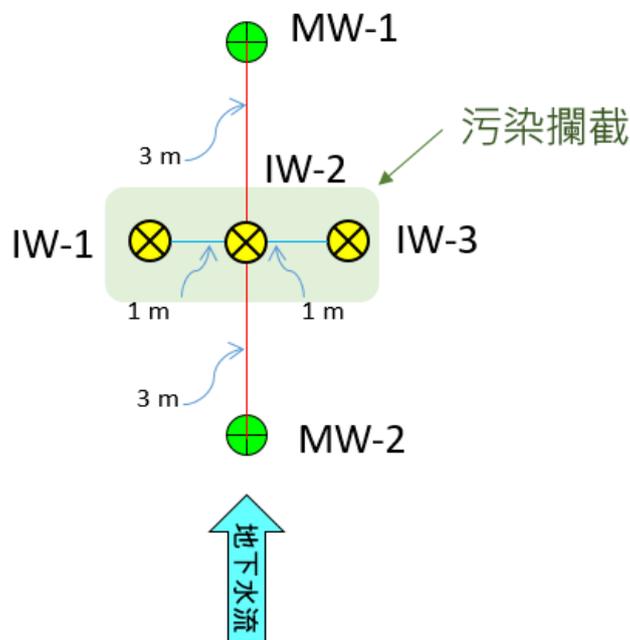


圖 8 監測井以及反應井之設計圖

表 2 各井之設置深度、井篩區間以及地下水水位

井名	設置井深(m)	井篩區間(m)	水位(m)
MW1	8.17	6.67-8.17	2.28
MW2	8.61	2.51-8.51	2.53
IW-1	8.63	2.53-8.53	2.59
IW-2	8.63	2.53-8.53	2.59
IW-3	8.62	2.52-8.52	2.52



第三章：研究方法與過程

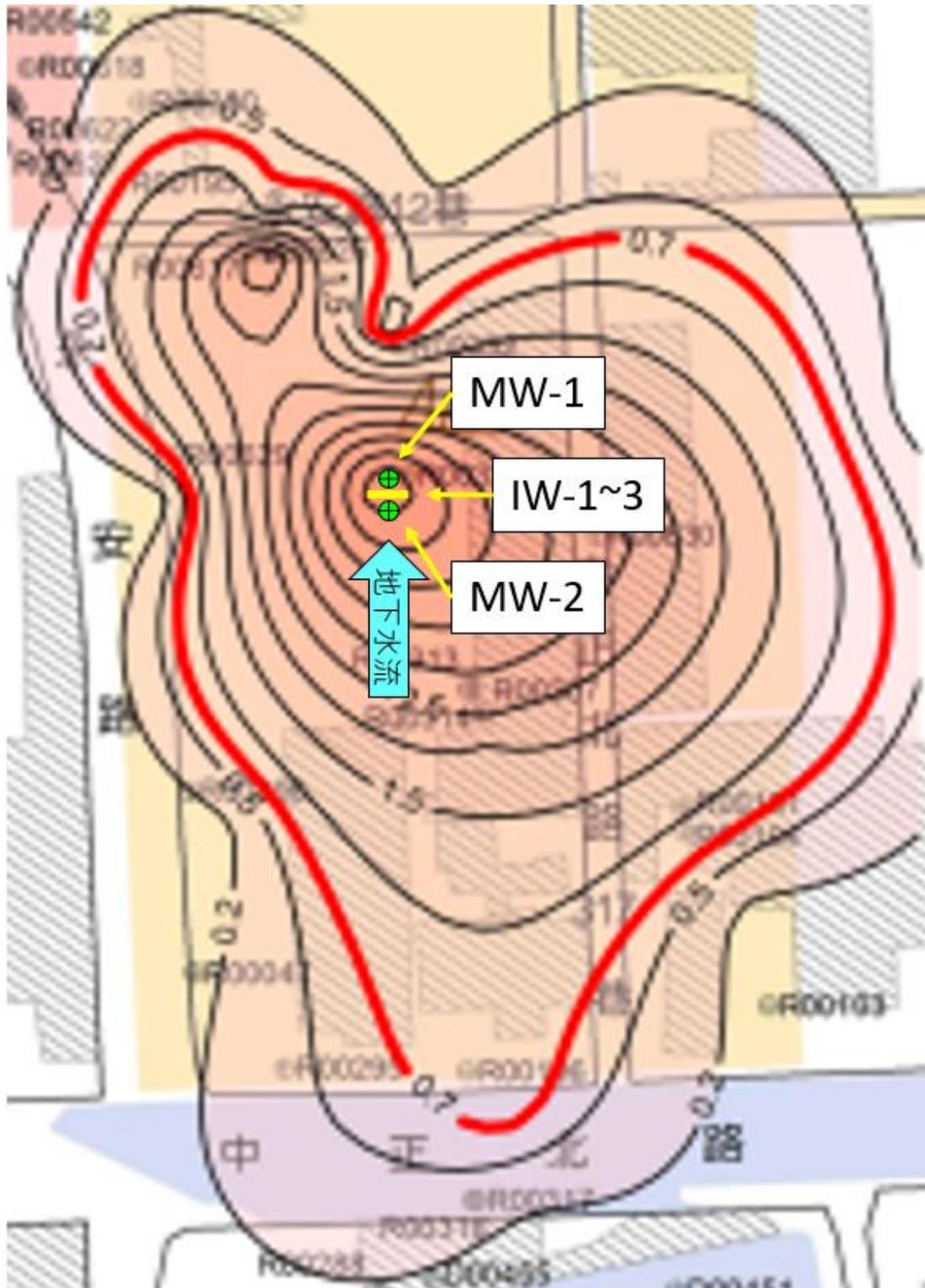


圖 9 反應井以及監測井於 cis-DCE 等濃度曲線圖之相對位置圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

3.3 菌株固定化及管柱設置

固定化菌株材質為矽膠基底，由於其配方與製程涉及專利申請機密，因此此處只簡易敘述。菌株經培養完成後，離心收集菌體，再以 PBS 溶液回溶後與矽膠材料混和充填至模具內，待凝固後即完成菌株固定，將菌體填充至管柱內，加入 PBS 溶液維持菌體新鮮度，即可投放於現地反應井使用，管柱簡圖如下圖 10。

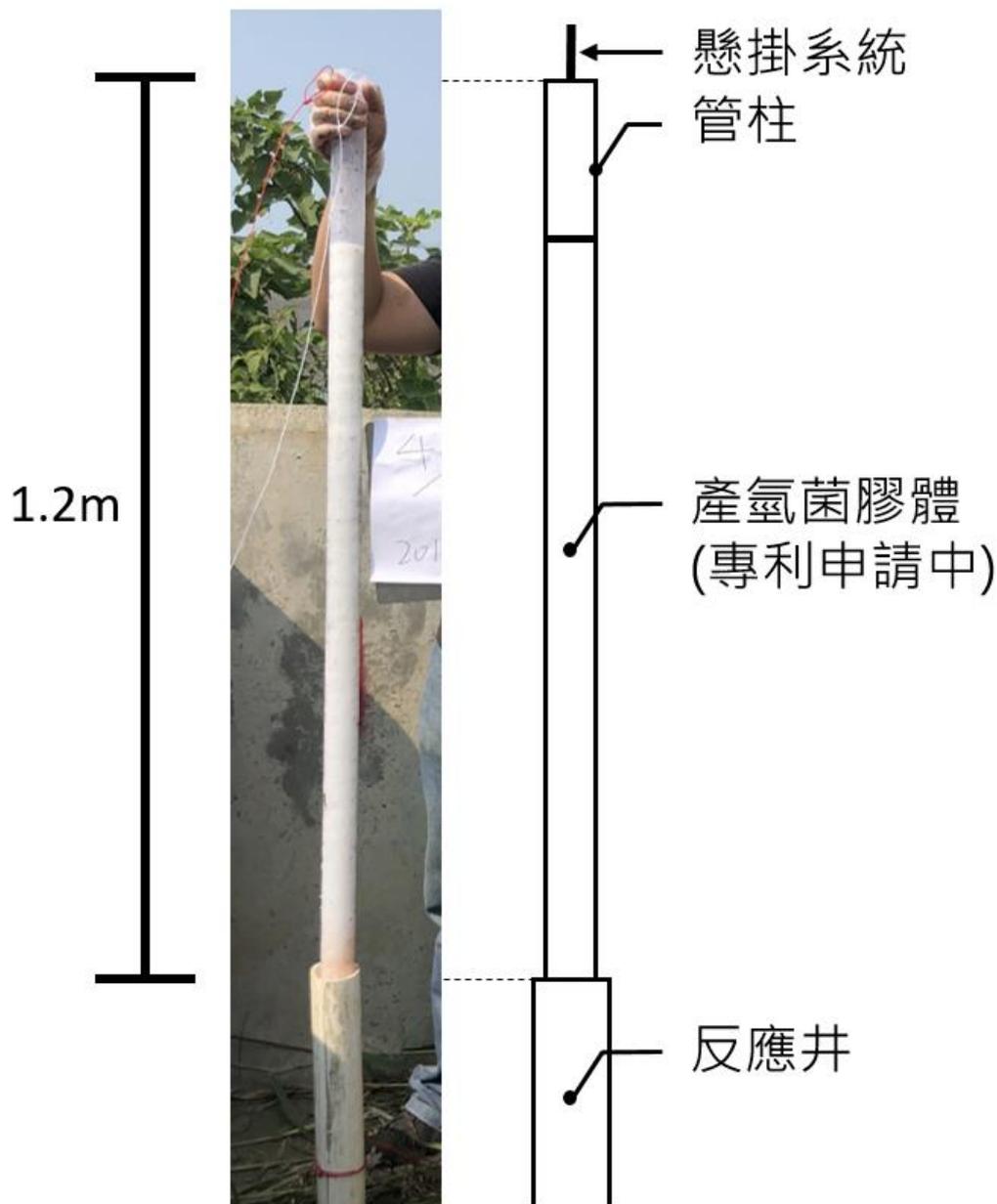


圖 10 固定化產氫菌膠體管柱設置示意圖



3.4 模場試驗地下水水質採樣規劃

為能比較系統運作前後差異，微生物相分析將於系統啟動前採樣 1 次，系統運作穩定後採樣 2 次，共採 3 次，系統運作穩定需依據地下水水質參數監測結果加以評估。模場試驗地下水水質採樣規劃表如表 3。

表 3 模場試驗地下水水質採樣規劃表

分析項目	設井	運轉前	運轉中				運轉後	小計
	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月-10月	
一般水質項目	1	1	4	4	2	2	3	17
關切污染物 (VOCs)	1	1	4	4	2	2	3	17
最終產物 (氫氣(H ₂)、甲烷(CH ₄)、乙烯(C ₂ H ₄))	1	1	4	4	2	2	3	17
Metagenome Analysis	-	1	-	-	1	-	-	2
qPCR Analysis	-	1	4	4	1	1	3	14



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

3.5 地下水基本性質分析

3.5.1 地下水水質參數分析 (酸鹼值 (pH)、導電度 (EC)、氧化還原電位 (ORP)、溶氧量 (DO))

取出 100 mL 現地地下水倒入於 250 mL 燒杯內，並將已洗淨校正及擦拭乾淨之 pH、EC、ORP 及 DO 電極偵測端完全浸入水樣的中間層及以封口膜封密，計時五分鐘待所有參數穩定，紀錄各儀器所顯示之單位數值 (NIEA W424.52A；NIEA W203.51B；NIEA W455.52C)。

3.5.2 地下水總溶解性有機碳分析

本分析以參考水中總有機碳檢測方法—燃燒/紅外線測定法，取 10 mL (或適量體積)以 0.45 μm 孔徑玻璃纖維濾紙過濾樣品中大顆粒、不溶質物質與微生物細胞殘骸所造成的干擾，並取得澄清除菌的水樣，將其使用試劑水適當稀釋混合均勻並上機進行重複分析測試，得出具代表性樣品數據 ($\text{mg CO}_2\text{-C/L}$)。

3.5.3 地下水樣品 genomic DNA 萃取

將 1 公升的地下水樣品以轉速(25000 \times g)高速離心的方式，離心 10 分鐘，並收集沉積物以及微生物。利用傳統法(CTAB DNA extraction method)來萃取污染地下水中的微生物之 genomic DNA，此方法改良自 1996 年 Zhou 等人所提出的酵素法 (Zhou et al.,1996)。

首先加入 DNA extraction buffer，加入的量以蓋過沉積物為主，再以震盪器 (vortex)將已加入 DNA extraction buffer 之樣品震盪至均勻為止，再加入 100 μL 之 Lysozyme (100 mg/mL)，將混合完成的液體放置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中反應 1 小時，在 1 小時的反應時間內，每 15 分鐘以震盪器均勻的震盪萃取 DNA 之溶液。結束 1 小時的反應後，加入 20 μL proteinase K (20 mg/mL)以及 30 μL SDS(20%)，以震盪器將混合好的溶液震盪均勻，再將混合完成的液體放置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中反應 2 小時，2 小時的反應時間，和上述一樣每 15 分鐘需以震盪器，震盪正在萃取 DNA 之溶液。反應 2 小時後，加入 100 μL NaCl 以及 75 μL CTAB 至正在萃取之溶液中，以震盪器均勻震盪後。放置於 65 $^{\circ}\text{C}$ 之水浴槽反應 30 分鐘，同樣也是每 15 分鐘以震盪器均勻震盪，反應結束後加入等體積的冰 phenol/chloromform/Isoamyl alcohol (25:24:1)，上下緩慢搖晃大約 20 下，以轉速(25000 \times g)離心 10 分鐘，重複此步驟直到中間層的蛋白質消失，將離心過後的上清液取至新的離心管內，加入 chloromform/Isoamyl alcohol (24:1)，上下緩慢搖晃大約 20 下。以轉速(25000 \times g)離心 10 分鐘，再將離心過後的上清液取至新的離心管內，加入 2 倍體積的冰 Isoprppanol，上下緩慢搖晃讓液體充分混合均勻，將樣品放置於-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱



overnight 讓 DNA 沉澱。

隔日將樣品取出，以轉速(25000xg)離心 10 分鐘讓 DNA 沉澱，此時將上清液去除，留下沉澱物，利用 500 μ L 之 75%酒精清洗沉澱物，再以轉速(25000xg)離心 15 分鐘後將酒精上清液去除，並在重複此步驟 1 次，再將含有沉澱物的離心管放入冷凍乾燥機中將水分以及酒精去除乾淨，將已滅好菌並且過濾過的二次水(ddH₂O)加入，使 DNA 沉澱物回溶成液態，將液態的 DNA 保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.6 DNA 純化

土壤或是地下水中有很多的干擾物質，例如腐植酸，可能會影響聚合酶鏈鎖反應(PCR)或是即時定量(real-timePCR)等其他實驗，因此在萃取完 DNA 後必須經過純化的步驟，萃取完的 DNA，使用捷恩麥克公司之 DNA Clean/Extraction kit 來進行純化的步驟。或是進行 cloning 實驗的 ligation 步驟，進行 ligation 此步驟之前會先將目標 DNA 利用 PCR 放大，由於 PCR 的 Taq 以及 buffer 可能會影響 PCR 的產物和載體(vector)之間的黏合，因此在做 ligation 之前也必須進行 DNA 純化的步驟，膠體的純化也是使用捷恩麥克公司 DNA Clean/Extraction kit 來進行純化。

3.7 基因選殖

以 PCR 的方式將目標片段放大，以膠體純化套組進行目標 PCR 產物純化，PCR 產物依照 pGEM-T easy cloning kit 進行接合反應，將混合試劑放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱 overnight 進行 ligation，使 PCR 的產物可以黏合在 pGEM-T Easy Vector 上以利於進行 transformation 的實驗。

將 ligation 混和液與 *E.coli* competent cell 混合均勻後放置冰上 20 分鐘，以熱休克(heat shock)的方式，42 $^{\circ}$ C 加熱 45 秒，將黏合好的 plasmid 送入 *E.coli* competent cell，熱休克完成後再將混合液放置冰上 10 分鐘，此時將混合液加入含有 1mL SOC 培養基之 1.5 mL 離心管，移入 37 $^{\circ}$ C 培養箱進行培養，培養大約一個半小時至兩個小時後，將培養完成的菌液取出。將 100 μ L 菌液塗於含 X-Gal、IPTG、ampicillin 之 LB 培養基上，以 37 $^{\circ}$ C 培養 overnight 進行藍白篩培養，隔日挑選白色菌落使用 T7 以及 SP6 primer 進行 PCR 確認，確認目標的片段是否有成功的接合在 pGEM-T Easy Vector 上，正確的菌落送至基龍米克斯公司進行後續的定序工作。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

3.8 即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)

3.8.1 標準品製備

先利用各目標序列引子 (表 7.)進行 PCR 將目標片段放大，反應混和液配方如表 4 所示，再依照 3.7 步驟將挑出的菌落培養，並送至明欣生技公司進行後續的定序工作。比對確認含有正確序列質體之菌落，以含有抗生素 LB 培養基以 37 °C 進行搖晃培養，再以小量質體純化套組進行質體純化，將純化後的質體使用分光光度計測量 DNA 的濃度。

將得到的 DNA 濃度帶入公式(A)換算成 gene copies (Ritalahti et al.,2006)。

$$(A) \quad \text{gene copies} = (\text{DNA concentration [ng/}\mu\text{l]}) \left(\frac{1 \text{ g}}{1,000^3 \text{ ng}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol bp DNA}}{660 \text{ g DNA}} \right) \\ \times \left(\frac{6.023 \times 10^{23} \text{ bp}}{\text{mol bp}} \right) \left(\frac{1 \text{ copy}}{\text{genome or plasmid size [bp]}} \right) \\ \times (\text{volume of template } [\mu\text{l}])$$

表 4. 聚合酶連鎖反應 (PCR)混合液配置

Reagent	Volume
ddH ₂ O	18.4μL
10x buffer	2.5μL
dNTP (2.5mM)	2μL
forward primer (50μM)	0.4μL
reverse primer (50μM)	0.4μL
Taq polymerase(5U)	0.3μL
DNA template	1μL

將 DNA 序列稀釋到適當的濃度，將稀釋完成的標準曲線進行 real-time PCR 上機，確認目標序列之標準曲線達到 $R^2 = 0.995$ 以上，以利於後續針對目標序列之濃度定量。



3.8.2 qPCR 上機步驟

將製備完成的標準品由濃度 10^8 以十倍序列稀釋至 10^2 gene copies/ μL ，再依照 (表 5.)配置 real-time PCR SYBR Green 系統之混合液，或是依照 (表 6.)配置 real-time PCR TaqMan 系統之混合液，將混合液分裝到八連排中。

表 5. realtime-PCR 反應 SYBR Green 系統之混合液配方

Reagent	Volume
2X Master Mix Fast SYBR	5 μL
forward primer (25 μM)	0.04 μL
reverse primer (25 μM)	0.04 μL
ddH ₂ O	3.92 μL
DNA template	1 μL

表 6. realtime-PCR 反應 TaqMan 系統之混合液配方

Reagent	Volume
2X Master Mix Fast SYBR	5 μL
forward primer (25 μM)	0.12 μL
reverse primer (25 μM)	0.12 μL
probe(25 μM)	0.12 μL
ddH ₂ O	3.92 μL
DNA template	1 μL



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

表 7. 本計畫所使用之引子與探針序列

Target	Primer	Sequence (5' ->3')
<i>Dehalococcoides</i> sp.16S rRNA gene	730F	GCGGTTTTCTAGGTTGTC
	1350R	CACCTTGCTGATATGCGG
	1200F	CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT
<i>Dehalococcoides</i> qpcr	DHC Probe	FAM-TCCTCAGTTCGGATTGCAGGTGAA- TAMRA
	1271R	CAACTTCATGCAGGCGGG
<i>TceA</i> gene	797F	ACGCCAAAGTGCGAAAAGC
	2490R	TAATCTATTCCATCCTTTCTC
<i>TceA</i> gene qpcr	TceA1270F	ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA
	TceA1336R	GCGGCATATATTAGGGCATCTT
	TceA1294 Probe	FAM-TGGGCTATGGCGACCGCAGG- TAMRA
	vcrAF	CTATGAAGGCCCTCCAGATGC
<i>VcrA</i> gene	vcrAR	GTAACAGCCCCAATATGCAAGTA
	Vcr1022F	CGGGCGGATGCACTATTTT
<i>VcrA</i> gene qpcr	Vcr1093R	GAATAGTCCGTGCCCTTCCTC
	Vcr1042 Probe	FAM- CGCAGTAACTCAACCATTTCCTGGTAGTGG- TAMRA
	bvcAF	TGCCTCAAGTACAGGTGGT
	bvcAR	TTGTGGAGGACCTACCT
<i>BvcA</i> gene	Bvc925F	AAAAGCACTTGGCTATCAAGGAC
	Bvc1017R	CCAAAAGCACCACCAGGTC



	Bvc977Prob	FAM-TGGTGGCGACGTGGCTATGTGG-
	e	TAMRA
<i>hydA</i> gene	hydA_f	GCWGATATGACWATWATGGAAGAAG
	BHR	GCWGCTTCCATWACTCCACC
<i>hydA</i> gene qpcr	hydA_f	GCWGATATGACWATWATGGAAGAAG
	hydA_R	CCAAAWATTTGTTGWGGTGA

3.9 TCE 相關代謝物 GC 層析檢測

以針筒抽取 microcosm 瓶中之上層液體，並依不同稀釋倍數抽取合適之體積，注入裝滿超純水的 40 mL 棕色瓶中，將稀釋之樣品放入吹氣捕捉裝置(purge and trap concentrator)和氣相層析儀中，進行氯乙烯類之分析。

三氯乙烯之分析儀器為 GC-ECD (Agilent, 6890 GC/ μ ECD)。採用長度 30 m、膜厚 3.0 μ m、內徑 0.53 mm 之毛細管層析管柱(Agilent DB624)，可承受最高溫度 260°C。載流氣體(carrier gas)及輔助氣體(makeup gas)為零級氮(純度 99.9995%)，流量為 18.8 mL/min，氣體分流比(split ratio)為 10:1，氣體分流量(split flow)為 115 mL/min。注射口溫度 180°C，偵測器溫度 250°C。溫度控制條件為 40°C 維持 3 分鐘後，以每分鐘 8°C 之升溫速度升溫至 200°C 並維持 3 分鐘，分析時間共 26.00 分鐘。三氯乙烯平均停留時間為 2.53 分鐘，經由偵測器測而得之訊號傳送至所連接之電腦分析軟體(HP ChemStation)，可得分析結果。

3.10 次世代定序菌相分析組裝流程

微生物 16S rDNA V3-V4 區域放大純化

使用專一性引子以 PCR 擴增微生物 16S rDNA V3-V4 區域後，使用 2% 瓊脂凝膠進行電泳檢測。切下 400-450bp 的明亮條帶，以 Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 純化 PCR 產物。所有 PCR 反應均用 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 進行。

建庫與定序

使用 Nextera XT Index Kit 樣品製備試劑盒 (Illumina, USA) 按照製造商的建議進行建庫與接上 barcode，建庫後之樣品使用與 4200 TapeStation System 系統進行建庫品質評估，品質良好之樣品使用 Illumina MiSeq 平台進行 300 bps pair-end 定序。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

定序結果組裝

將定序完成之 raw data 去除 barcode 與 primer 序列後，以 FLASH(Caporado et al., 2011)軟體進行組裝，組裝完成之序列以 USEARCH (Youssef et al., 2009)進行 quality control 以獲得品質良好之序列 (Segata et al., 2011)，具有 $\geq 97\%$ 相似性的序列被分配給相同的 OTU。篩選每個 OTU 的代表性序列使用基於 Silva 數據庫 v 123。

OTU 群集與物種註釋

序列分析由 Qiime 軟體 (Edgar et al., 2013)進行。使用 mothur 計算 α 多樣性指數 (Richness、Chao1、ACE、Shannon 多樣性、Simpson 多樣性、Inverse Simpson、Shannon 均勻度、Simpson 均勻度和 Good's 覆蓋率)。使用 VEGAN9 之 R 套件計算稀疏曲線和物種積累曲線， β 多樣性指數 (Bray-Curtis 矩陣，PCoA 和 NMDS) 也是如此。



第四章：實驗結果

4.1 模場運轉前之次世代定序菌相分析

4.1.1 原始數據品質檢測及有效序列分布

表 8. 原始數據品質檢測表

#.	Sample	Q20%	Q30%	Clean reads	Merged tags	Filtered tags	Effective tags	Classified tags
1.	MW01-1	86.83	74.17	380,958	186,541	184,014	177,423	159,907
2.	MW02-1	86.18	73.32	88,720	42,813	42,142	42,073	37,776
3.	IW01-1	86.02	73.11	122,204	58,330	57,291	57,223	52,653
4.	IW02-1	84.40	70.93	118,066	54,607	53,894	53,826	50,285
5.	IW03-1	87.27	74.54	150,376	73,336	71,901	71,802	67,552

Clean reads: 將原始序列移除 PhiX 序列後，篩選 QV<20 之總讀數

Merged tags: 成功配對之原始序列

Merged%: #merged tags / #clean pairs

Filtered: 將原始序列清除引子、adaptors、低品質序列(QV<20)以及過短之序列後所得之序列總數

Non-chimera (effective tags): 移除凱美拉序列後所得之序列總數

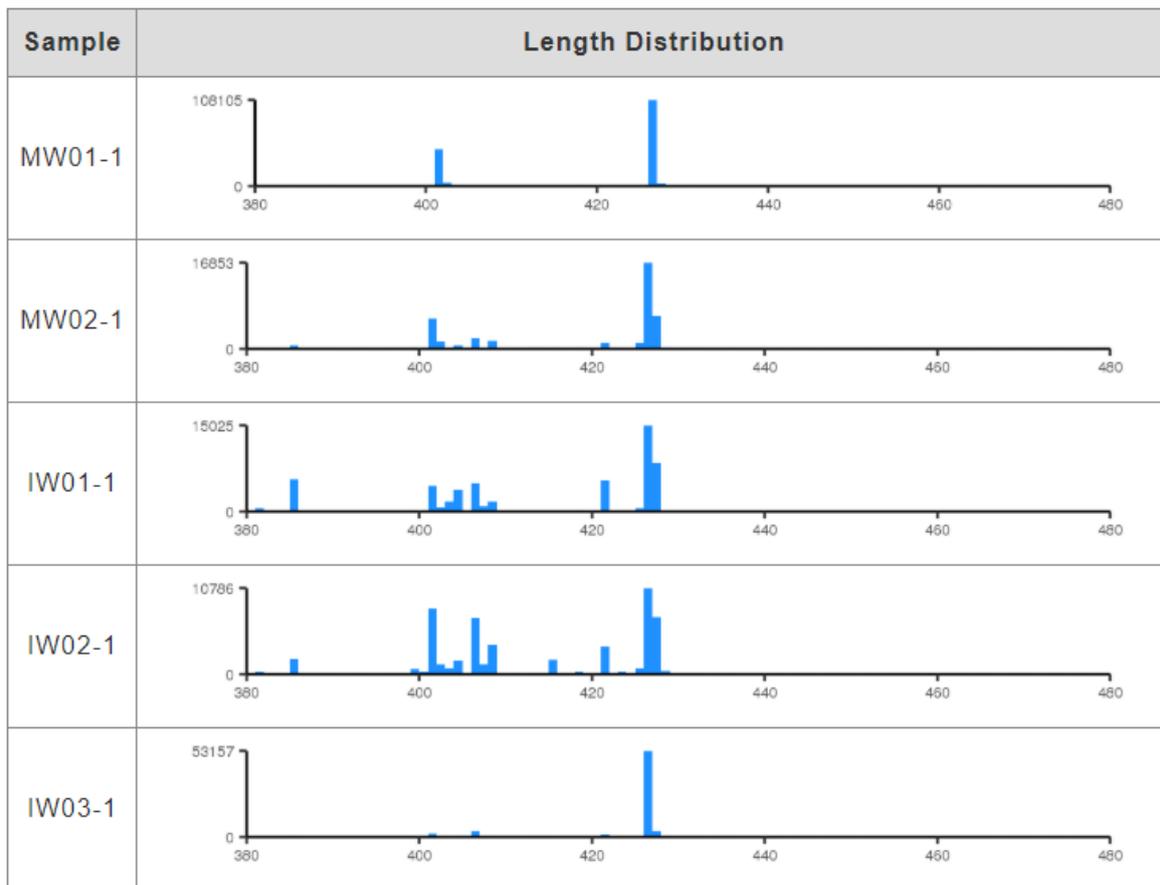
Avg. length: 平均有效序列之長度 (non-chimera)

Effective%: #effective tags / #clean pairs



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

表 9. 有效序列分布表



將設井完一個月後之地下水樣本之總 DNA 抽取後，進行 16s rDNA V3-V4 區域放大，將增幅片段以 Miseq 2*300bp 進行測序，分析樣品進行 pair-end library，測序所獲得雙端點之序列，並剔除品質較差以及凱美拉序列後，各樣本之序列有效率(Effective%)皆大於 80%，品質符合生物資訊後續分析要求。各樣本名稱皆為該採樣井之編號，表 8 為原始數據之品質分析表，顯示本次次世代定序品質符合後續分析標準，表 9 為有效讀數分布圖，顯示本次所放大之 V3-V4 區域皆落在合理範圍內，樣品可以進行後續分析。



4.1.2 Metagenome 菌相分析結果

4.1.2.1 稀有曲線及菌種累積曲線

將品質合格之有效序列群，進行相似度（大於 97%）OTUs（Operational Taxonomic Units）聚類和菌種分類分析。

樣品中的 OTUs 依相對豐度由高到低排序得到對應的排序編號，再以 OTUs 的排序編號為橫坐標、OTUs 中的相對豐度為縱座標，以階梯線顯示相對豐度（左方縱軸 Relative Abundance）由高到低的變化趨勢。Rank Abundance Curve 可直觀看出樣本或分組中物種的豐富度和均勻度。物種的豐富程度由曲線在橫軸上的長度來反映，曲線越寬，表示物種的組成越豐富；物種組成的均勻程度由曲線的形狀來反映，曲線越平坦，表示物種組成的均勻程度越高，樣品中各物種所佔比例相似。實驗結果顯示如圖 11，5 個樣品之中只有 MW01 曲線平滑下降，顯示 MW01 之物種豐富度遠高於其他 4 個井，其次為 MW02，其餘三個反應井皆為直線下降，顯示新設井的菌相因為某些因素偏向某幾個菌群。

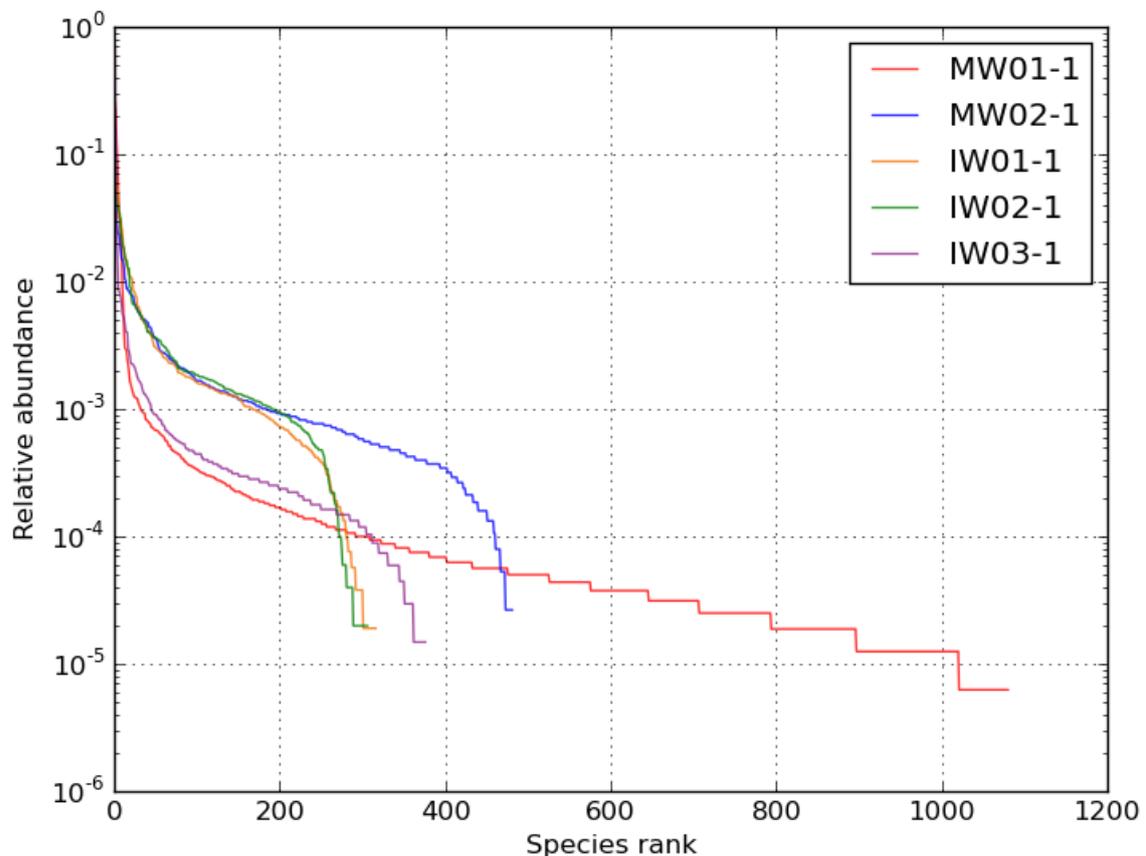


圖 11. 物種豐富度排名曲線圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

Alpha 多樣性是指一個特定區域或者生態系統內的多樣性，用來描述單個樣品的物種多樣性，用以衡量定序量是否足夠的一個標準，稀有度曲線則是判斷此次測定深度是否足夠，若 OTU 定序達飽和，則會看到曲線趨近水平，反之曲線若還處於上升階段，則 OTU 並未完全被定序。由表可以得知 MW01 之物種豐富度最高，次是 MW02，最末為 IW02。由於 MW01 為既有井，設井時間較長且有做護欄保護，故該井豐富度較高為合理。MW02 以及 IW1-3 皆為新設井，菌相豐富度較少，因此 MW01 比較能夠代表現地原生菌種之菌相，結果如表 10 及圖 12。

表 10. Alpha 多樣性之結果表

Sample ID	Richness	Chao1	Simpson	Shannon	Good's coverage
MW01	1080	1094.16	0.0065	0.41	0.9996
MW02	481	486.14	0.0642	0.79	0.9998
IW01	316	328	0.1295	0.78	0.9997
IW02	306	323	0.1344	0.8	0.9996
IW03	376	384.75	0.0053	0.33	0.9998

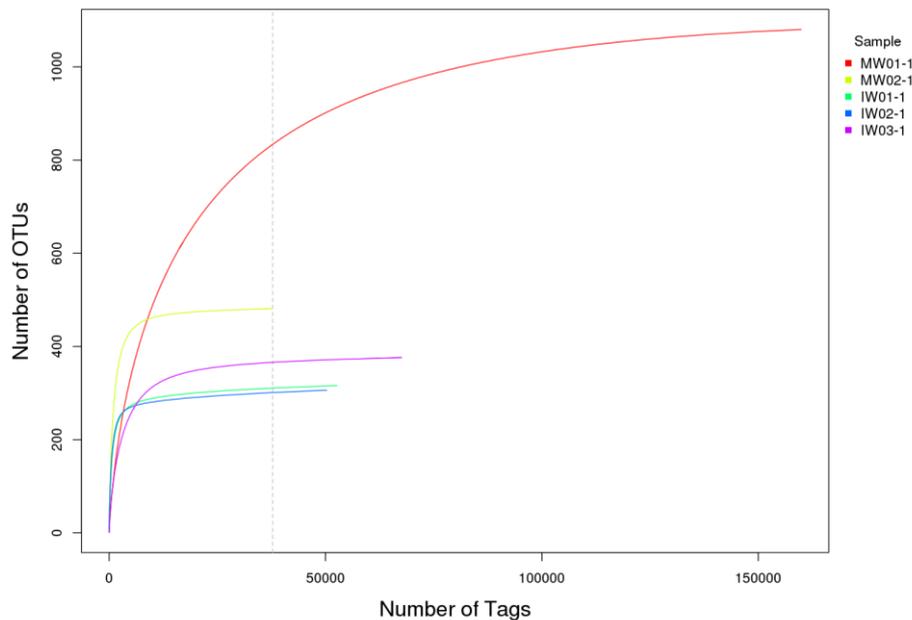


圖 12. 菌種 OTUs 稀釋曲線圖



4.1.2.2 菌相變化分析

V3-V4 區域 OTU Taxonomy

將 OTU 以種階層菌量排名前 50 之詳細數據如表 11，其中將與 TCE 降解相關且之菌種以紅色字體標註，以利於後續討論。(此表順序依照 OUT 讀值數總和進行排列)

表 11. 以種為分類階層之菌相變化表

Taxonomy	Read of Sample				
	MW01	MW02	IW01	IW02	IW03
Gallionellaceae	41530	6372	129	761	30
Novosphingobium	34840	898	1008	2593	541
Burkholderiaceae	27993	830	138	435	33
Hydrogenophaga	14060	309	213	119	21
Nocardioides	4	1830	3388	6694	3001
Bacteria	1778	2656	1121	1370	1297
Curvibacter	5170	59	150	36	15
Rheinheimera_texasensis	5092	132	0	1	0
Sulfuricurvum	4069	29	0	0	0
uncultured_ge	2568	352	243	536	226
Rhodobacteraceae	2955	33	33	99	4
Bacillus_anthraxis	15	574	1654	2300	1146
Staphylococcus	0	387	1630	1925	0
Reyranella	0	33	475	2053	0
Family_XVIII	14	1038	542	921	22
Corynebacterium_tuberculostearicum	0	217	681	1714	274
Methanobacterium_formicicum	1	248	3539	1255	360
Dehalogenimonas_sp._enrichment_culture_ clone_CG3	1466	0	0	17	0
Subgroup_6_ge	18	591	175	771	329
Corynebacterium_1	0	79	478	1244	397
Acinetobacter_junii_CIP_64.5	9	1176	629	120	272
Acinetobacter_lwoffii	2	298	431	950	192
Anaerocella	0	290	2866	917	503



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

Rokubacteriales_ge	5	987	67	173	364
Vogesella	1066	0	0	0	8
Cutibacterium	0	33	927	1007	146
Pseudomonas_alcaligenes	193	547	252	236	2
Legionella	31	626	5115	302	49349
Meiothermus_silvanus_DSM_9946	0	292	296	634	75
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	42	816	1	53	199
Sphingomonas	24	393	265	447	56
Thermincola	0	175	598	676	101
Parcubacteria	775	72	87	0	0
Fluviicoccus	2	63	164	744	12
Babeliales	39	319	92	415	93
Syntrophomonas	0	109	3927	662	366
Unknown_Family_ge	0	0	564	741	19
Corynebacterium_imitans	0	103	329	633	589
Rhodocyclaceae	144	499	76	87	12
Methanosarcina	8	191	1643	461	269
Methylomonas	1	656	0	0	0
Vogesella_sp._5137	644	0	0	0	26
Neisseriaceae	0	448	864	155	509
Anaerolineaceae	544	54	28	0	37
Candidatus_Kaiserbacteria_ge	442	0	0	88	0
CG2-30-50-142_ge	1	331	152	197	167
Desulfobulbaceae	54	39	81	429	32
Bathyarchaeia_ge	347	108	97	46	14
Aquicella	7	319	42	167	94
Zoogloea_resiniphila	4	299	9	188	81
Alphaproteobacteria	347	80	70	52	0
Candidatus_Magasanikbacteria_bacterium_RIFOXYD1_FULL_40_23	471	1	0	0	0
Other	13132	11785	17384	14861	6269



第四章：實驗結果

在菌相分析中，我們將各組別在菌「門」的層級進行比較，並將占比低於1%之菌門分類至 Other，其結果如圖 13，各個組別之前三大菌門以及關鍵脫氣菌門 Chloroflexi 之分布分別為：

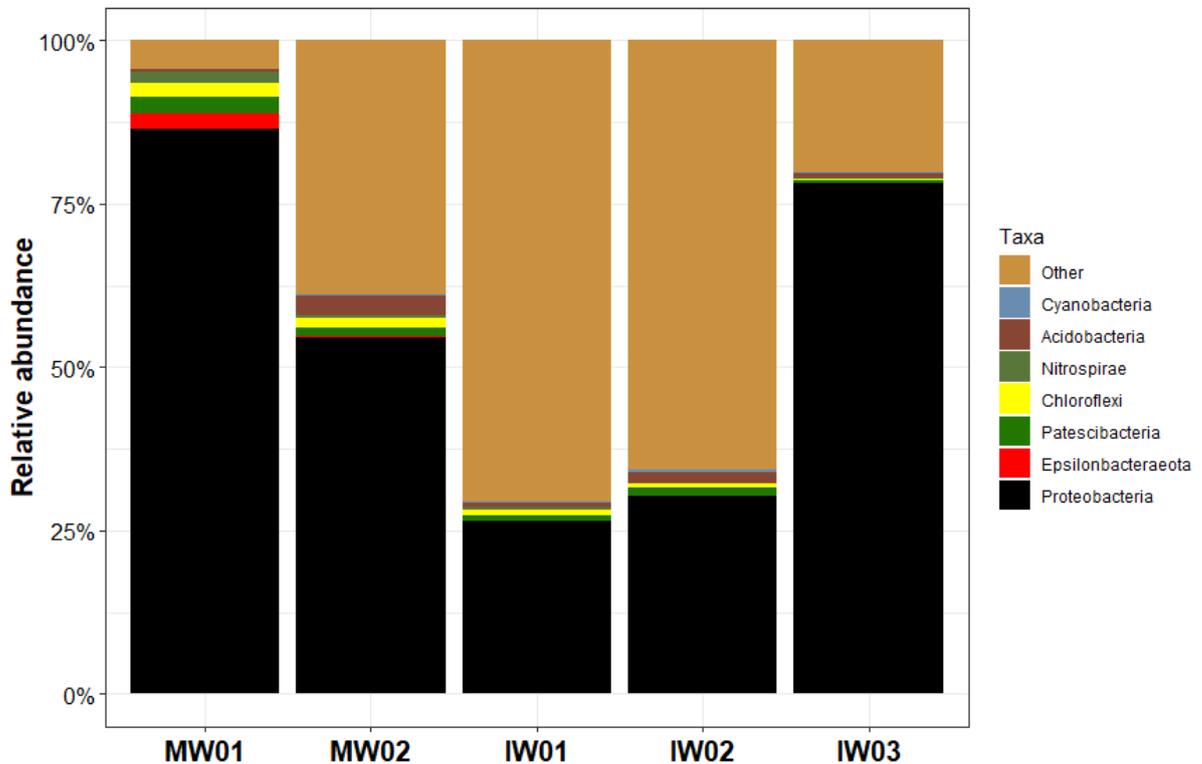


圖 13. 以門為分類之菌相累積變化圖

1. MW01: Proteobacteria (86.4%)、Epsilonbacteraeota (2.5%)、Patescibacteria (2.5%)、Chloroflexi (2.1%)
2. MW02: Proteobacteria (54.6%)、Acidobacteria (2.8%)、Chloroflexi (1.5%)
3. IW01: Proteobacteria (26.4%)、Patescibacteria (1%)、Acidobacteria (0.8%)、Chloroflexi (0.7%)
4. IW02: Proteobacteria (30.3%)、Acidobacteria (1.6%)、Patescibacteria (1.1%)、Chloroflexi (0.8%)
5. IW03: Proteobacteria (78.2%)、Acidobacteria (0.6%)、Patescibacteria (0.5%)、Chloroflexi (0.2%)



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

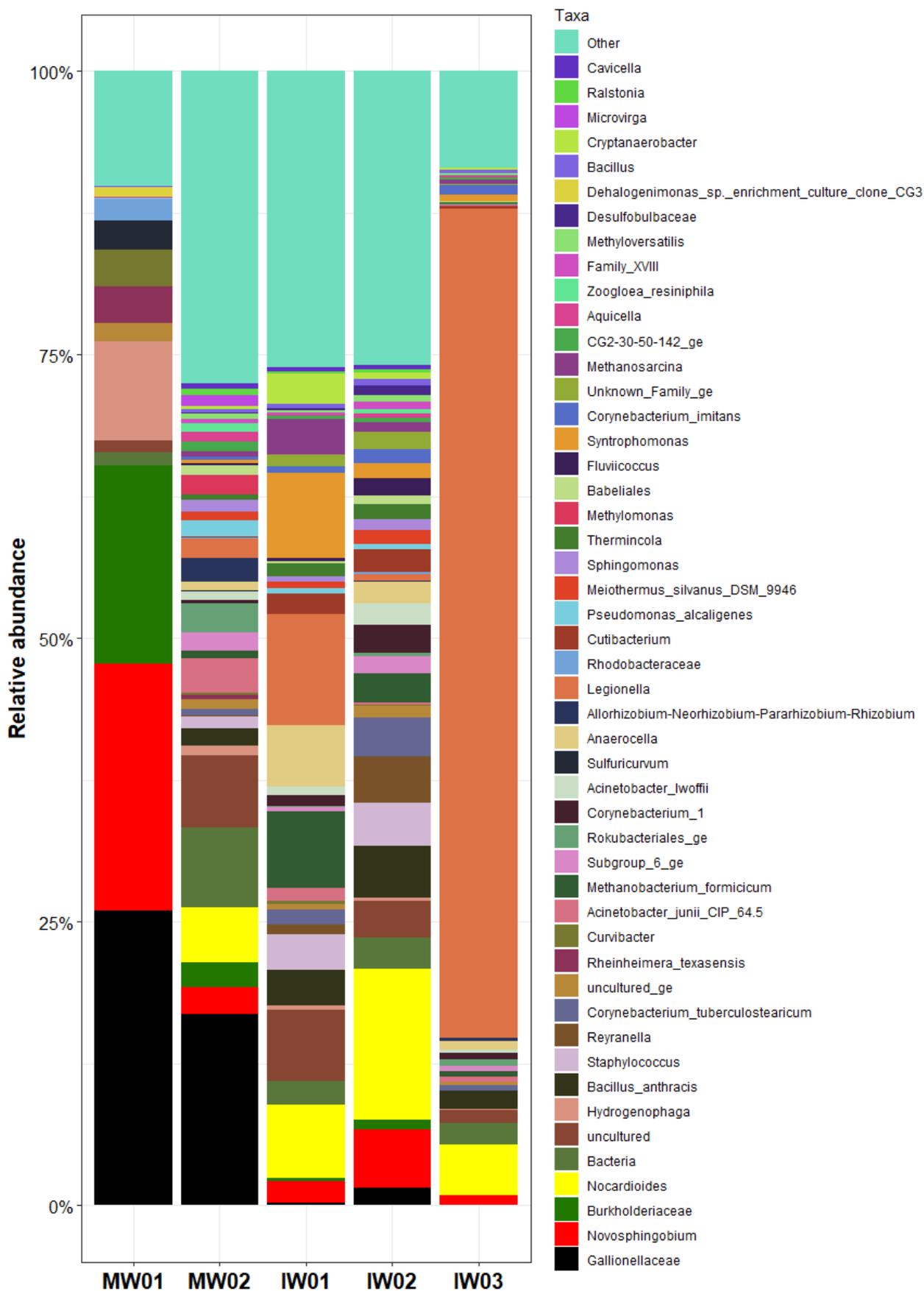


圖 14. 以屬為分類之菌相累積變化圖



第四章：實驗結果

另外，我們將有 unclassified 的 Taxonomy 剔除後，將占比低於 0.1% 之 Taxonomy 歸納至 Other，進行分類比較，其結果如圖 14，各個組別之前三菌群以及關鍵脫氯菌群分別為

1. MW01: Gallionellaceae (F, 25.9%)、Novosphingobium (G, 21.7%)、Burkholderiaceae (F, 17.5%)、Dehalogenimonas sp. enrichment culture clone CG3 (S, 0.9%)
2. MW02: Gallionellaceae (F, 16.8%)、Nocardioides (G, 4.8%)、Acinetobacter junii_CIP_64.5 (S, 3.1%)
3. IW01: Legionella (9.7%)、Syntrophomonas (7.4%)、Methanobacterium_formicicum (6.7%)、Nocardioides (6.4%)
4. IW02: Nocardioides (13.3%)、Novosphingobium (G, 5.1%)、Bacillus_anthraxis (S, 4.5%)
5. IW03: Legionella (G, 73.1%)、Nocardioides (G, 4.4%)、Bacillus_anthraxis (S, 1.7%)



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.1.2.3 樣本主座標分析及菌相熱點分析

主成分分析(Principal components analysis, PCA)是一種常用的數據間差異分析方法，PCoA(Principal coordinate analysis,PCoA)則是主座標分析，常利用計算物種距離的方法(Jaccard 和 Bray-Curtis)區分各組樣品，PCA 和 PCoA 最大的區別在於 PCA 分析是基於原始的物種組成矩陣所做的排序分析，而 PCoA 分析則是基於物種組成計算得到的距離矩陣得出，故在資料判讀上 PCoA 較 PCA 容易，已顯示各組的 Beta 多樣性指標。將本實驗各組的數據進行 PCoA 計算後，實驗結果如圖 15，可以看出樣品被區分成 3 區，且新設井 MW02、IW01 以及 IW02 被歸類於同一區域。

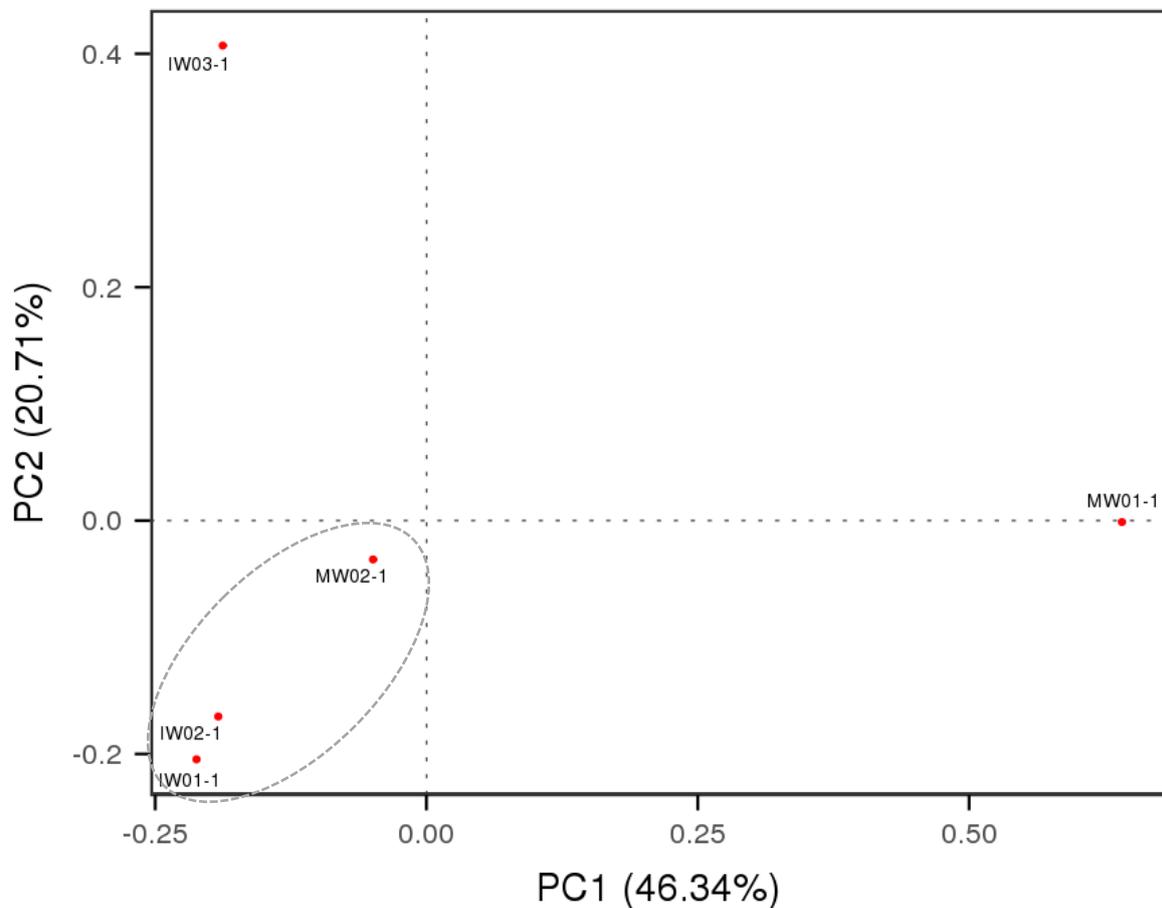


圖 15 反應井與監測井之樣本主座標分析圖



第四章：實驗結果

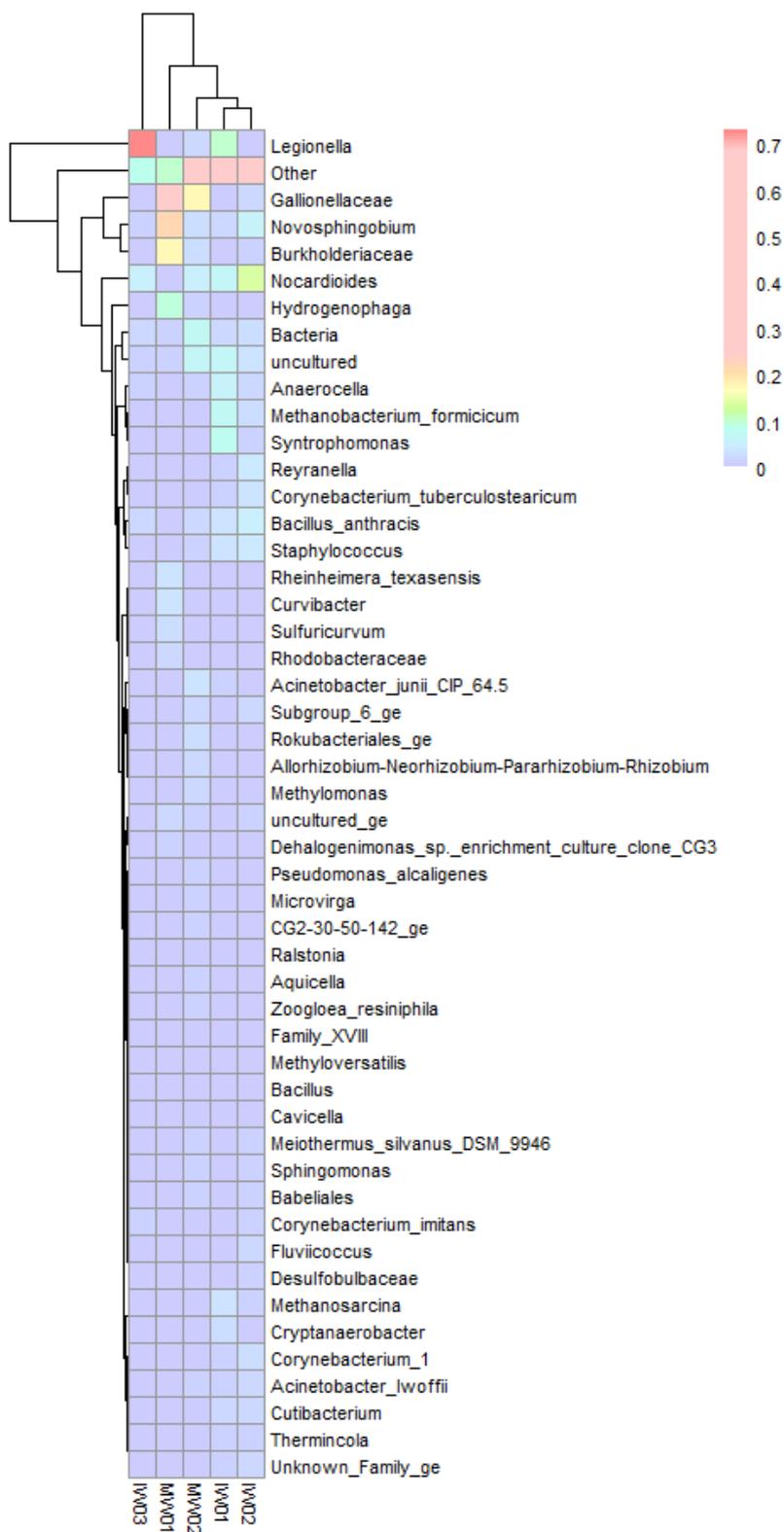


圖 16. 以種為分類之菌種前 50 名之熱點分析圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

從熱點分析圖 16 綜觀菌相分布，可以得到與 PCoA 分析類似的分群，MW02、IW01 以及 IW02 被分入同一群，顯示在新設井的菌相彼此相近，並與 MW01 分開距離，顯示在挖井的過程中，影響到當地本土菌相，並由菌相變化分析表得知，新設井大多為耗氧菌，與多氯乙烯相關之菌群如 Actinobacteria 門之 Nocardioidea 屬皆在新設井有發現，且該菌的菌量在菌相中皆占比不低(4-13%)，粗估可能是設井的動作帶入溶氧讓耗氧菌的族群增長。IW03 之菌相較其他新設井不同，以 Proteobacteria 門之 Legionella 屬最多(73%)，其次為 Nocardioidea 屬(4%)，其原因目前不明。



4.1.3 模場運轉前策略評估

綜合以上次世代菌相分析，可以對於本次模場現地菌相有初步了解，可以將主要菌群依照過去文獻發表過之相關功能做分類，分為多氯乙烯厭氧脫氯、多氯乙烯有氧代謝、甲烷生成以及致病菌類，以進行後續討論。

本次方法使用 16s rDNA 區域放大法，不易在環境樣本中偵測到 *Dehalococcoides*(Tas et al., 2010)，在本團隊之過去研究中發現以全基因定序後再以 LCA 分析法方可以鑑定到脫鹵球菌之存在(Kao et al., 2016)。然而，Yang 團隊(2017)發現許多含有多氯乙烯污染的場址中，沒有偵測到 *Dehalococcoides* 的存在依然可以透過環境工程的整治完全脫氯至乙烯，經該團隊努力，發現了 *Dehalogenamonas* 可以成為新的完全脫氯指標菌，並且透過全基因定序以及蛋白質體交互分析，找到可以將 VC 脫氯至乙烯之關鍵基因 *creA*(如下圖 17)，顯示脫氯反應不一定完全僅靠 *Dehalococcoides*，並且在現地模場樣本中，有 80% 的土壤樣本中可以發現 *Dehalococcoides* 以及 *Dehalogenamonas* 並存，其中 65% 的樣本中 *Dehalogenamonas* 的總量高於 *Dehalococcoides*，因此 *Dehalogenamonas* 在含氯有機物的貢獻可能比 *Dehalococcoides* 還要高。本次場址運轉前分析，發現在既有井 MW01 中，偵測到大量 *Dehalogenamonas* 的存在(0.9%)，並且在後續實驗中本場址亦可以完全脫氯至乙烯，呼應到 Yang 團隊的研究結果，顯示本場址擁有完全脫氯的潛力。因此，在未來檢測中，本團隊將加入 *Dehalogenamonas* 的 qPCR 檢測，分析 *Dehalococcoides* 和 *Dehalogenamonas* 此兩株脫氯關鍵菌的變化。

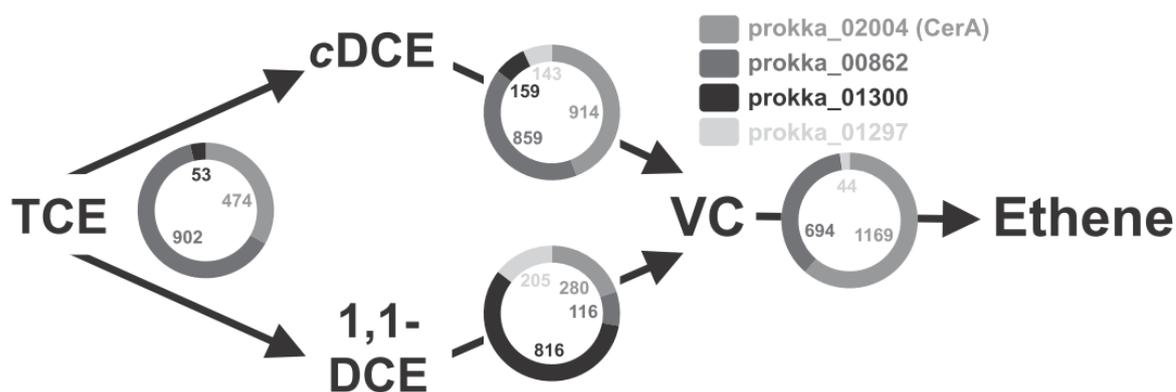


圖 17 *Dehalogenamonas* 完全脫氯之關鍵酵素示意圖 (Yang, 2017)



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

有研究指出 *Pseudomonas*, *Mycobacterium* 和 *Nocardioidea*(Mattes et al., 2010; Miho et al., 2017)這些菌株是可以在有氧的環境下代謝氯乙烯，在本研究中於新設井皆發現高比例之 *Nocardioidea* spp.，可能顯示在挖井過後，些微的空氣被帶入地下，使得該類菌群增加。

在本次菌相中，偵測到古生菌 *Methanobacterium formicicum* 在新設井佔大量(1.7%~7.4%)，在前人的研究中，*M. formicicum* 可以在無氧的狀態下將 H_2 、 CO_2 以及甲酸發酵成甲烷(Urantulkuur, et al., 2016)，顯示在本場池中，具有甲烷菌的存在。甲烷菌的偵測呼應到圖之現地整治數據，於30天開始測得到甲烷(如圖29)，並持續上升中，本團隊將因應甲烷的生成備製甲烷抑制劑，控管氫氣競爭者的消長，期許可以更有效提升多氯乙烯之降解。

另外在本場址中測得致病菌，*Burkholderiaceae* 屬在文獻報導會產生肺炎(Dickson, et al., 2013)，以及軍團菌 *Legiolla* 屬亦會導致肺炎(Burstein, et al., 2013)，尤其在 IW03 中非常的優勢。另外還有檢測到炭疽病原菌 *Bacillus anthracis*(Ehling-Schulz, et al., 2019)，未來在現場人員的採樣上，會加強各類安全措施，以避免相關病菌危害人體。



4.2 模場整治之次世代定序菌相分析

4.2.1 原始數據品質檢測及有效序列分析

表 12 原始數據品質檢測表

#.	Sample	Q20%	Q30%	Clean reads	Merged tags	Filtered tags	Effective tags	Classified tags
1.	MW01-2	91.46	80.97	497,876	244,976	241,841	237,774	224,556
2.	MW02-2	90.16	78.5	583,506	286,986	282,246	271,954	247,236
3.	IW01-2	90.47	78.99	615,964	302,511	297,721	286,809	270,979
4.	IW02-2	90.78	79.74	496,776	243,666	239,922	229,114	216,436
5.	IW03-2	90.76	79.66	618,756	304,489	299,498	285,504	270,169

Clean reads: 將原始序列移除 PhiX 序列後，篩選 QV<20 之總讀數

Merged tags: 成功配對之原始序列

Merged%: #merged tags / #clean pairs

Filtered: 將原始序列清除引子、adaptors、低品質序列(QV<20)以及過短之序列後所得之序列總數

Non-chimera (effective tags): 移除凱美拉序列後所得之序列總數

Avg. length: 平均有效序列之長度 (non-chimera)

Effective%: #effective tags / #clean pairs



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.2.2 Metagenome 菌相分析結果

4.2.2.1 稀有曲線及菌種累積曲線

將品質合格之有效序列群，進行相似度（大於 97%）OTUs（Operational Taxonomic Units）聚類和菌種分類分析。

樣品中的 OTUs 依相對豐度由高到低排序得到對應的排序編號，再以 OTUs 的排序編號為橫坐標、OTUs 中的相對豐度為縱座標，以階梯線顯示相對豐度（左方縱軸 Relative Abundance）由高到低的變化趨勢。Rank Abundance Curve 可直觀看出樣本或分組中物種的豐富度和均勻度。物種的豐富程度由曲線在橫軸上的長度來反映，曲線越寬，表示物種的組成越豐富；物種組成的均勻程度由曲線的形狀來反映，曲線越平坦，表示物種組成的均勻程度越高，樣品中各物種所佔比例相似。實驗結果顯示如圖 18，5 個樣品之中只有 MW01 曲線平滑下降，顯示 MW02 之物種豐富度遠高於其他 4 個井，其次為 MW01，其餘三個反應井皆為直線下降，顯示由此顯示監測井的菌相維持物種多樣性，反應井之菌相因整理工法進而使得主要菌相改變。

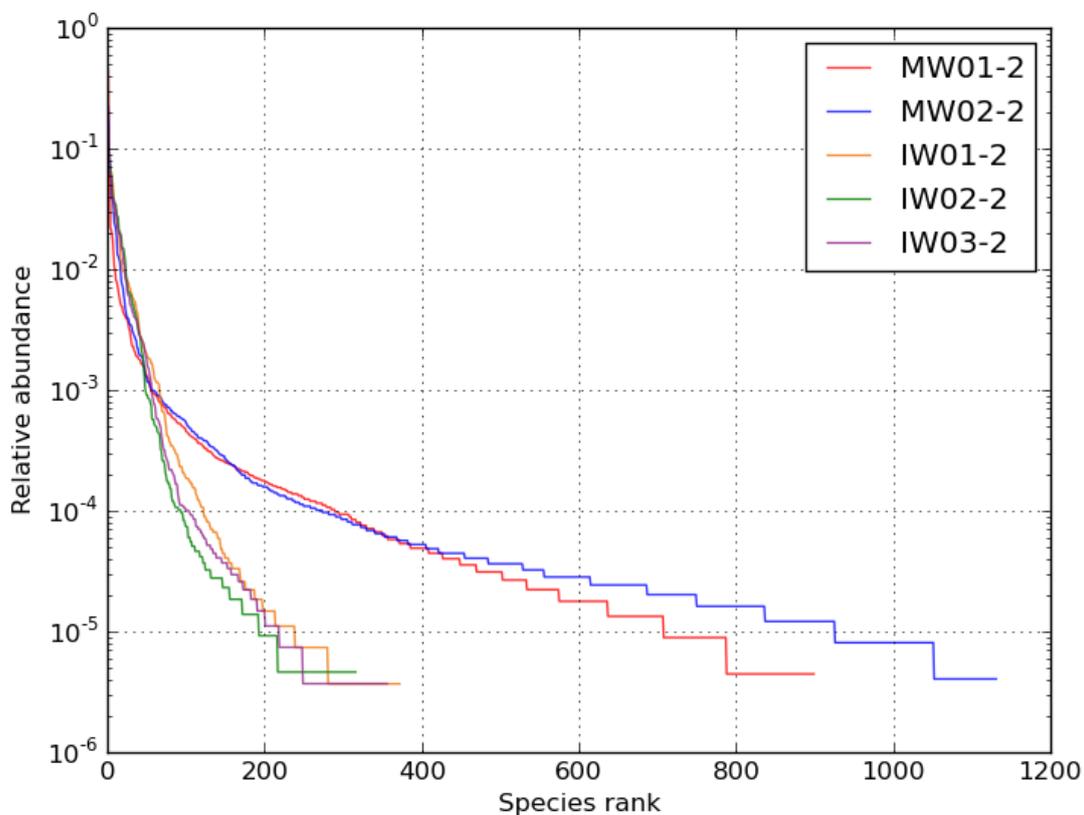


圖 18 物種豐富度排名曲線圖



第四章：實驗結果

Alpha 多樣性是指一個特定區域或者生態系統內的多樣性，用來描述單個樣品的物種多樣性，用以衡量定序量是否足夠的一個標準，稀有度曲線則是可以判斷此次測定深度是否足夠，若 OTU 定序達飽和，則會看到曲線趨近水平，反之曲線若還處於上升階段，則 OTU 並未完全被定序。由表可以得知 MW02 之物種豐富度最高，其次是 MW01，最末為 IW02。上下游監測井 MW01 及 MW02 並無進行生物整治，因此維持較高之豐度。反應井 IW01-03 皆進行生物包埋整治工法處例，因生物製劑會導致菌相趨向某幾大族群以利於脫氯反應進行，因此物種豐富度較監測井低，其結果如表 13 及圖 19。

表 13 Alpha 多樣性之結果表

Sample ID	Richness	Chao1	Simpson	Shannon	Good's coverage
MW01-2	899	975.74	0.0049	0.41	0.9995
MW02-2	1131	1155.88	0.0107	0.5	0.9997
IW01-2	372	469.35	0.0516	0.59	0.9997
IW02-2	316	514	0.0642	0.59	0.9995
IW03-2	356	542.39	0.0463	0.57	0.9996

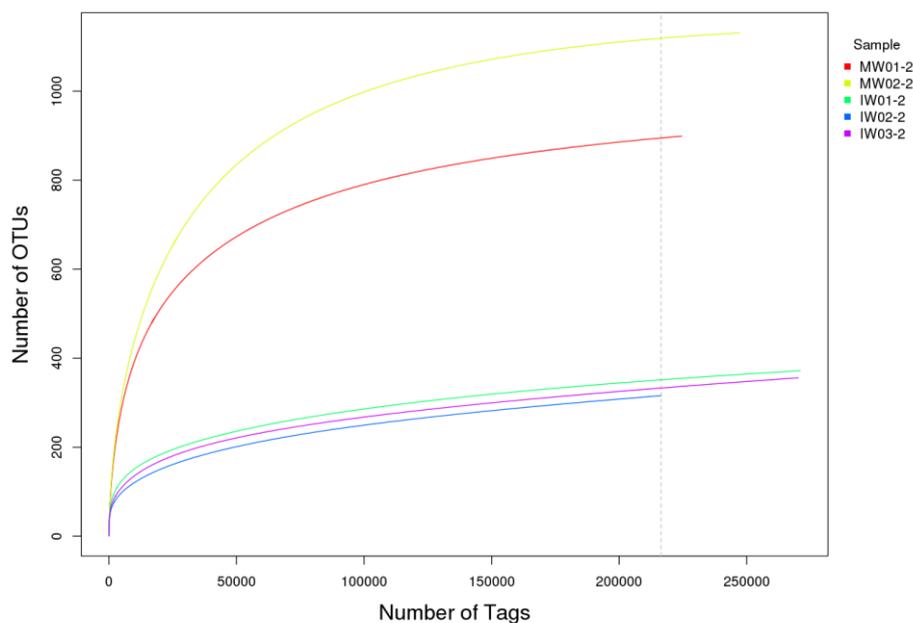


圖 19 菌種 OTUs 稀釋曲線圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.2.2.2 菌相變化分析

V3-V4 區域 OTU Taxonomy

將 OTU 以種階層菌量排名前 50 之詳細數據如表 14，其中將與 TCE 降解相關且之菌種以紅色字體標註，以利於後續討論。(此表順序依照 OUT 讀值數總和進行排列)

表 14 以種為分類階層之菌相變化表

Taxonomy	Read of Sample				
	MW01	MW02	IW01	IW02	IW03
Citrobacter_amalonaticus	79	636	37930	24480	46270
Veillonellaceae	803	293	20804	21393	14285
Dysgonomonas_mossii	58	39	18650	13270	23390
Desulfovibrio_desulfuricans	46	23	18150	14500	18000
Zymophilus	56	24	17520	10830	15860
Phascolarctobacterium_faecium	31	20	9025	7452	16510
Klebsiella	24	376	14580	5934	8457
Bacteroides_graminisolvens	27	29	7826	7681	11460
Megasphaera_cerevisiae	21	13	6229	8223	10160
Lachnoclostridium_5	21	11	8157	8858	7201
Bacteroides	23	18	4948	8813	10010
Propionispora	36	11	4326	6434	12890
Dysgonomonas_gadei	23	13	5381	7524	8491
Ruminococcaceae_NK4A214_group	100	79	14128	5853	1201
Enterococcus	24	31	11498	3982	5266
Shewanella	13	9	357	15930	1682
Ruminococcaceae	142	18	5928	5910	5954
Clostridium_magnum_DSM_2767	25	12	6658	3244	6013
Oscillibacter	12	7	4801	2678	2496
Actinomycetaceae	12	7	3249	1017	5270
Macellibacteroides	34	3	2214	4159	3019
Proteiniphilum	8	7	4141	1356	3741
Lachnospiraceae	7	7	5342	998	2385
Raoultella_ornithinolytica	5	2	1475	4430	739
Caproiciproducens	6	2	2290	1956	1345
Kluyvera_intermedia	12	27	2599	1343	1640
Clostridium_beijerinckii_NCIMB_8052	9	5	2135	1115	2133
Fusobacterium_varium	8	4	1941	2811	45



第四章：實驗結果

Methanosarcina	339	20	2101	1371	956
Sporomusa	7	1	1254	862	1664
Sporomusa_ovata_DSM_2662	2	0	1245	928	1308
Clostridiaceae_1	6	3	1651	139	1231
Propionispora_sp._2/2-37	3	1	495	1116	1400
Anaerosinus_glycerini	28	33	1766	301	715
Actinomyces_polynesiensis	5	0	758	822	1070
Acidaminococcaceae	10	1	1119	620	800
Ruminiclostridium_9	3	2	1424	480	619
Dysgonomonas	2	2	1109	297	1001
SN8	32	1	1578	197	616
Ruminococcaceae_UCG-008	1	0	621	315	1147
Hydrogenoanaerobacterium	3	3	388	589	1028
Dysgonomonas_capnocytophagoides	4	2	501	713	779
Pleomorphomonas_koreensis	3	3	692	382	662
Eubacterium_aggregans	4	1	849	168	674
Bacteroides_paurosaccharolyticus_JCM_15092	1	0	319	230	1077
Anaerosinus	0	0	623	423	418
Exiguobacterium	6	7	648	221	430
Proteobacteria	35	2	228	123	925
Dysgonomonas_termitidis	3	0	312	503	425
Other	224556	247236	270979	216436	270169



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

在菌相分析中，我們將各組別在菌「門」的層級進行比較，並將占比低於1%之菌門分類至 Other，其結果如圖 20，各個組別之前三大菌門以及關鍵脫氯菌門 Chloroflexi 之分布分別為：

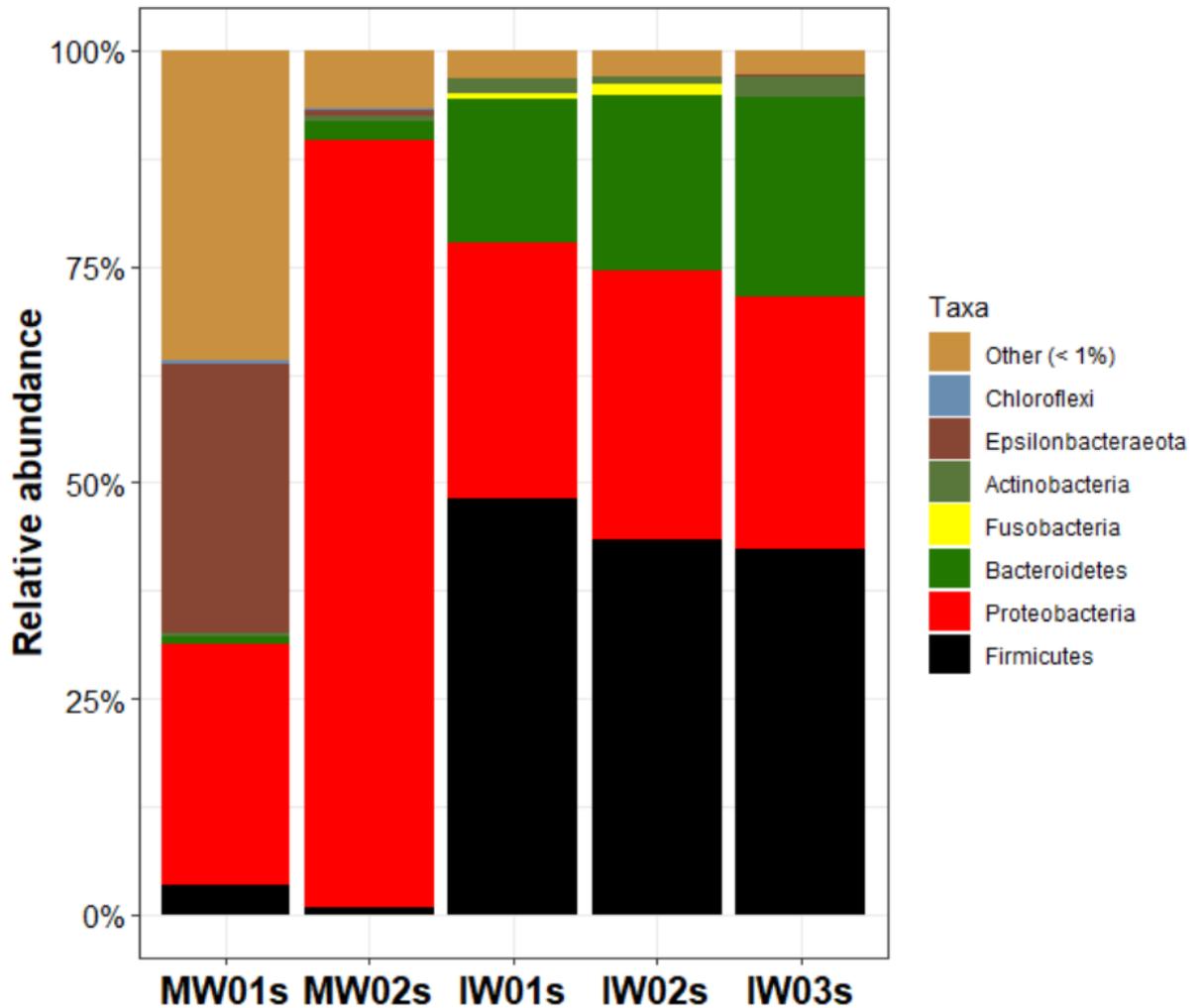


圖 20 以門為分類之菌相累積變化圖

1. MW01: Epsilonbacteraeota (45.7%)、Proteobacteria (41%)、Firmicutes (5.1%)、Chloroflexi (0.7%)
2. MW02: Proteobacteria (90.2%)、Bacteroidetes (2.2%)、Firmicutes (0.9%)、Chloroflexi (0.4%)
3. IW01: Firmicutes (49.3%)、Patescibacteria (30.4%)、Bacteroidetes (16.94%)
4. IW02: Firmicutes (44.4%)、Patescibacteria (31.8%)、Bacteroidetes (20.8%)
5. IW03: Firmicutes (43.4%)、Patescibacteria (30%)、Bacteroidetes (23.7%)



第四章：實驗結果

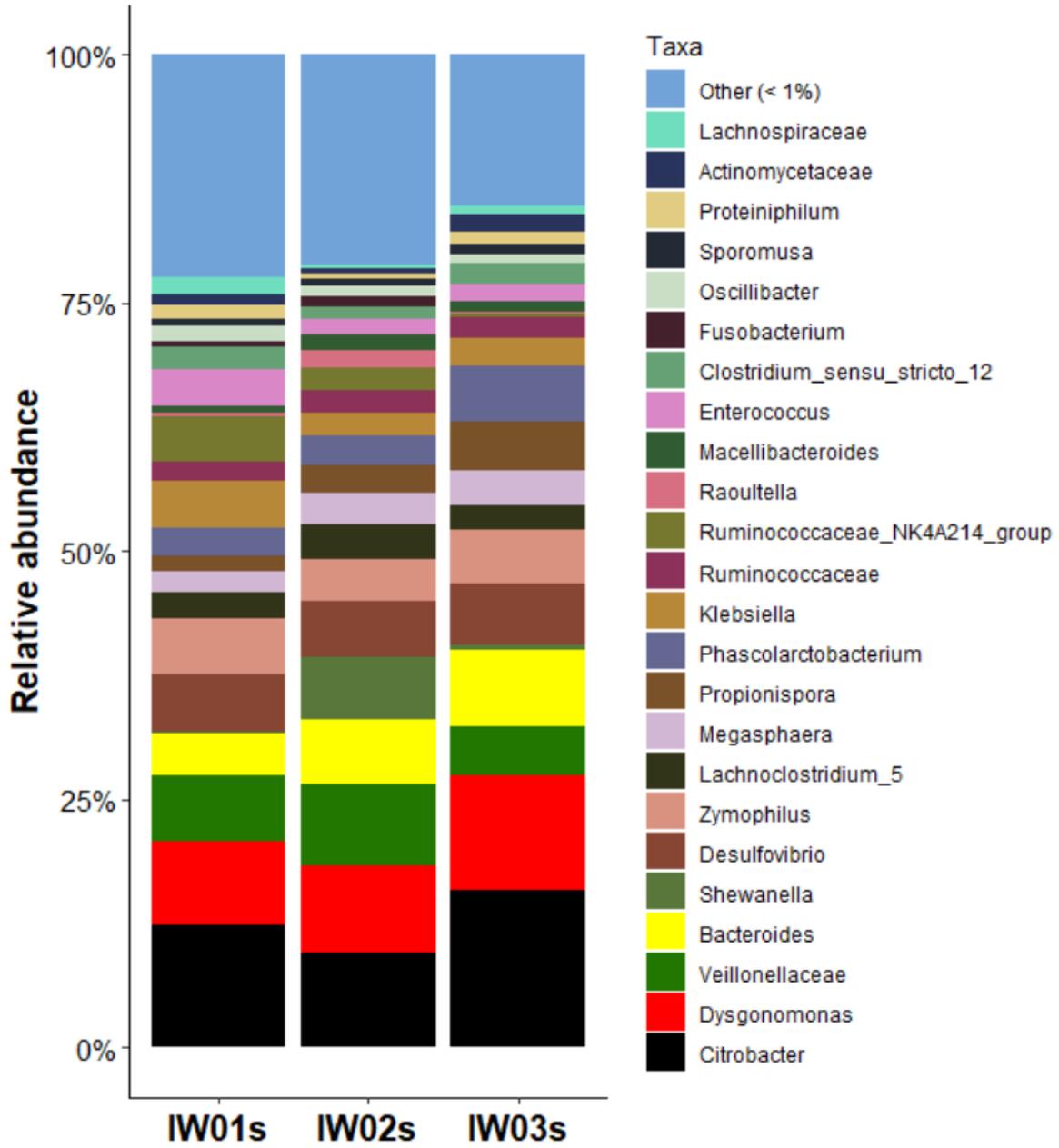


圖 21 反應井以屬為分類之菌相累積變化圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

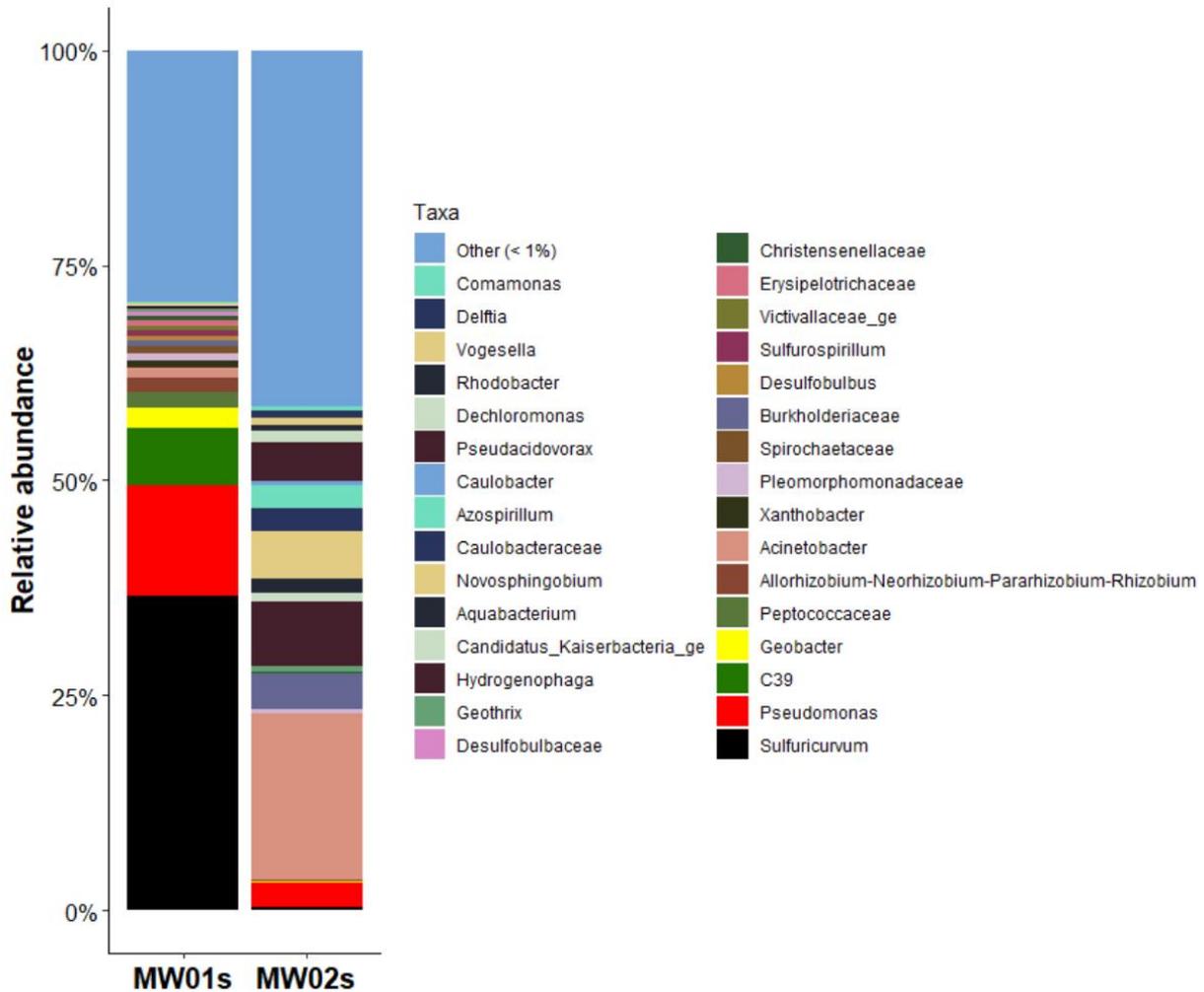


圖 22 監測井以屬為分類之菌相累積變化圖

另外，我們將有 unclassified 的 Taxonomy 剔除後，將占比低於 0.1% 之 Taxonomy 歸納至 Other，進行分類比較，其結果如圖 21 及圖 22，各個組別之前三菌群以及關鍵脫氯菌群分別為

1. MW01: Sulfuricurvum (45%)、Pseudomonas (15.8%)、Geobacter (2.8%)
2. MW02: Acinetobacter (28.1%)、Hydrogenophaga (11%)、Novosphingobium (8.2%)、Comamonas (0.7%)、Geobacter (0.3%)
3. IW01: Citrobacter (14.2%)、Dysgonomonas (9.6%)、Veillonellaceae (7.7%)、Desulfovibrio (6.7%)、Clostridium_sensu_stricto_12 (2.5%)
4. IW02: Citrobacter (11.4%)、Dysgonomonas (10.3%)、Veillonellaceae (9.9%)、Desulfovibrio (6.7%)、Clostridium_sensu_stricto_12 (1.5%)
5. IW03: Citrobacter (17.2%)、Dysgonomonas (12.6%)、Bacteroides (8.5%)、Desulfovibrio (6.7%)、Clostridium_sensu_stricto_12 (2.2%)



4.2.2.3 樣本主座標分析及菌相熱點分析

主成分分析(Principal components analysis, PCA)是一種常用的數據間差異分析方法，PCoA(Principal coordinate analysis, PCoA)則是主座標分析，常利用計算物種距離的方法(Jaccard 和 Bray-Curtis)區分各組樣品，PCA 和 PCoA 最大的區別在於 PCA 分析是基於原始的物種組成矩陣所做的排序分析，而 PCoA 分析則是基於物種組成計算得到的距離矩陣得出，故在資料判讀上 PCoA 較 PCA 容易，已顯示各組的 Beta 多樣性指標。將本實驗各組的數據進行 PCoA 計算後，實驗結果如圖 23，可以看出樣品被區分成 3 區，且生物包埋處理法之反應井 IW01、IW02 以及 IW03 被歸類於同一區域。

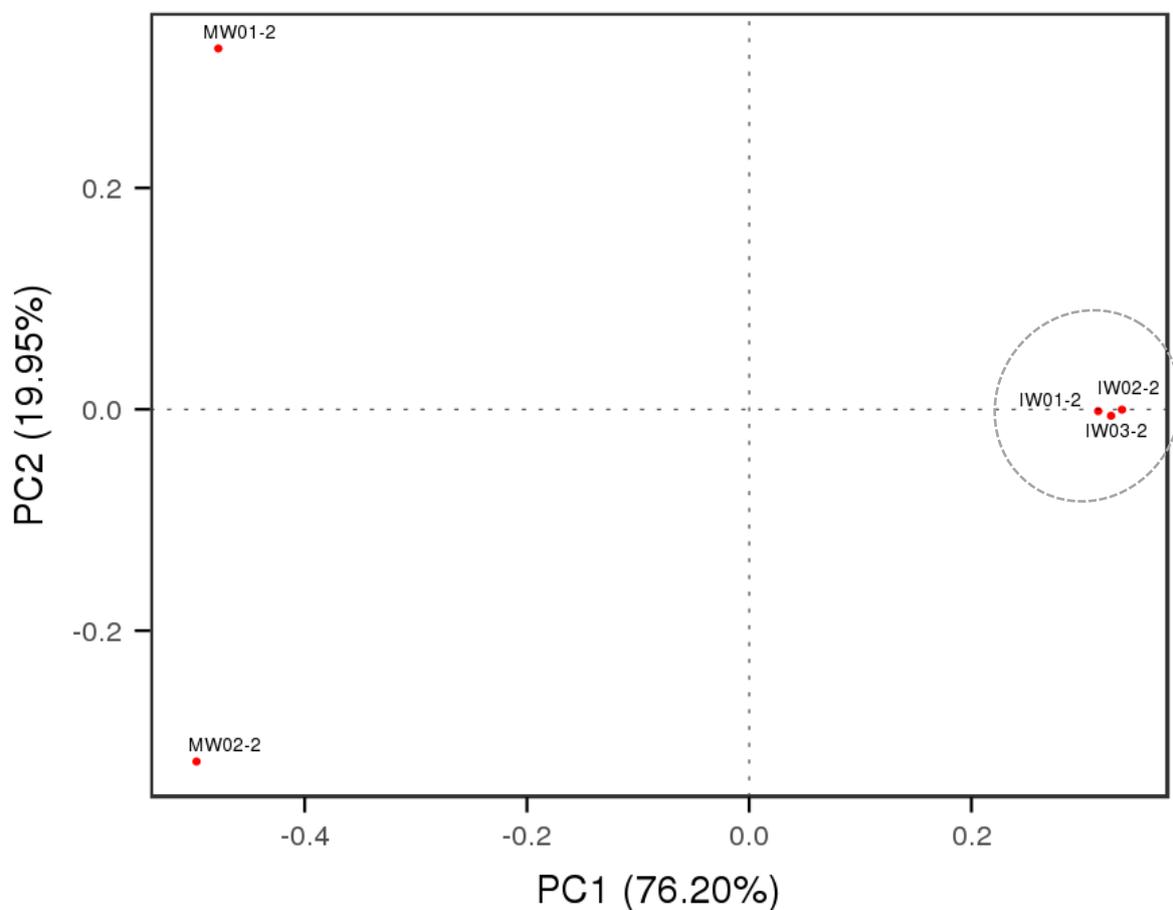


圖 23 反應井與監測井之樣本主座標分析圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

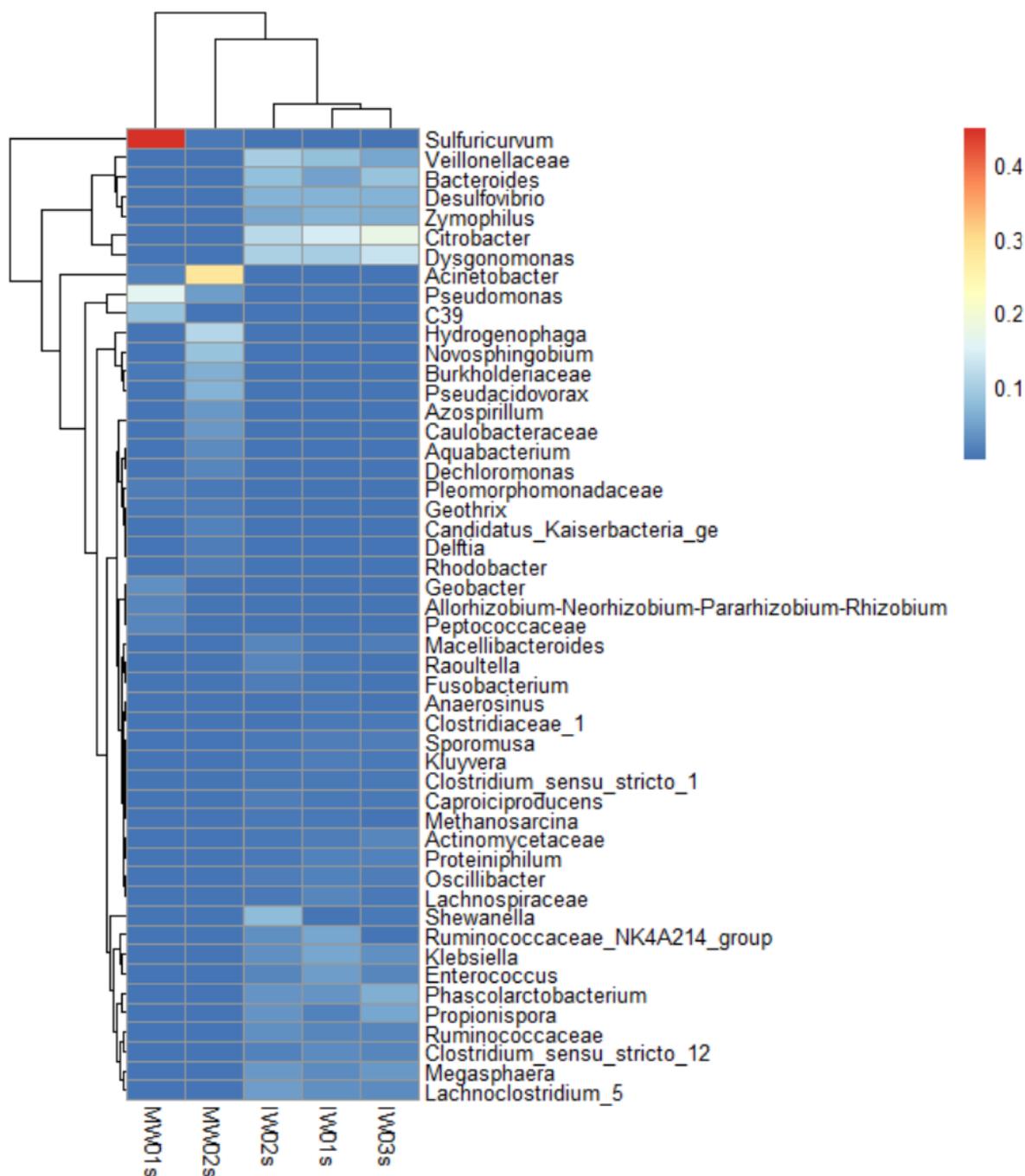


圖 24 以屬為分類之菌種前 50 名之熱點分析圖

從熱點分析圖 24 綜觀菌相分布，可以得到與 PCoA 分析類似的分群，IW01、IW02 以及 IW03 被分入同一群，顯示在生物包埋整治工法處理下，菌相皆為相近，主要菌群如 *Citrobacter*、*Dysgonomonas* 及 *Veillonellaceae*，與多氯乙烯相關之菌群如 *Proteobacteria* 門之 *Desulfovibrio* 屬，該菌在反應井中的菌量在菌相中佔比很穩定(6.7%)，*Clostridium_sensu_stricto_12* 菌數與本次包埋菌 *Clostridium butyricum* 相近，因此在菌相中佔比也相當穩定(1.5-2.5%)，現地測得 *Pseudomonas*、*Geobacter*、*Comamonas* 等菌屬，於相關文獻已發表其參與含氯有機物之共代謝。



4.3 地下水基本性質分析以及膠體管柱之設置

本研究監測的水質參數項目為總有機碳 (TOC)、甲烷 (CH₄)、水溫、溶氧量 (DO)、氧化還原電位 (ORP) 及 pH 值，現地地下水總有機碳濃度為 10 mg/L，水溫為 26.5°C，溶氧量為 3.3 mg/L，氧化還原電位為 137 mV，pH 值為 7.1。地下水中含氯揮發性有機物 (VOC) 分析結果顯示 MW1 井未偵測到 TCE 存在，*cis*-1,2-DCE 濃度為 5.59 mg/L (管制標準為 0.7 mg/L)，VC 濃度為 0.0568 mg/L (管制標準為 0.02 mg/L)，結果顯示地下水含氯揮發性有機物仍超出第二類地下水管制標準，主要污染物為 TCE 次級代謝物 *cis*-1,2-DCE 以及 VC 之累積。

在新設井後一個月，再一次分析地下水基本性質，本次加入 IW1-3 及 MW2，其結果如下表 15。此時觀測到 *cis*-1,2-DCE 濃度為落在範圍 4.379 至 1.445 mg/L 之間，VC 於 MW01 測得 0.0459，皆高於管制標準，MW1 之污染物稍微下降一些可能跟設井的擾動有關係。

本次研究將投放產氫菌膠體管柱投放至 IW02 以及 IW03，IW01 將只有添加乳化油並無膠體管柱，作為本實驗之控制組。IW02 以及 IW03 將會在灌注乳化油後，將膠體管柱浸入反應井中，使其位置若於反應井底部(深度 8.63m)，確保管柱能夠始終被地下水淹沒。

表 15 挖井工程後一個月之各井地下水基本性質表

測井編號	導電度 (μS/cm)	溫度 (°C)	溶氧 (mg/L)	pH 值	氧化還原電位 (Eh)	<i>cis</i> -DCE (mg/L)	1,1-DCE (mg/L)	VC (mg/L)	乙烯 (mg/L)
MW1	621	27.2	1.23	7.2	-12	4.379	0.017	0.0459	ND
MW2	697	27.5	1.18	6.98	8	2.246	0.004	-	ND
IW1	743	27.2	2.15	7.23	-9	1.445	0.003	-	ND
IW2	729	27.5	1.18	7.12	-21	1.458	0.000	-	ND
IW3	728	27.2	2.21	7.18	27	1.463	0.001	-	ND



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.4 基本環境參數分析

利用中華民國行政院環境保護署檢驗所(NIEA)公告之地下水採樣及分析方法執行。分析項目包含 pH 值、還原電位(ORP)及溶氧(DO)，樣本為反應井(IW1-3)、上游監測井(MW2)以及下游監測井(MW1)。

圖 25 為現地地下水水樣之 pH 值變化；圖 26(A)為現地地下水水樣之氧化還原電位變化；圖 26 (B)為現地地下水水樣之溶氧量變化；圖 27(A)為現地地下水水樣之導電度變化量；圖 27(B)為現地地下水水樣之總碳量變化量。我們發現在添加乳化油生物製劑後，於隔週 pH 大幅下降至 5.5，根據前人研究(Yi, et al., 2017)當現地如果 pH 低於 5.5 則不會有脫氯反應，因此本團隊於第 15 天另外添加磷酸緩衝劑於現地，往後的 pH 值則維持於 pH 6.5 上下，適合厭氧脫氯反應的進行。

經本團隊之持續監控，現地之 pH 於第 56 天及 119 天反應井皆有下降至 pH 5.7±0.2，於下降之時間點補充磷酸緩衝劑於現地，維持 pH 之穩定並確保脫氯反應之進行。

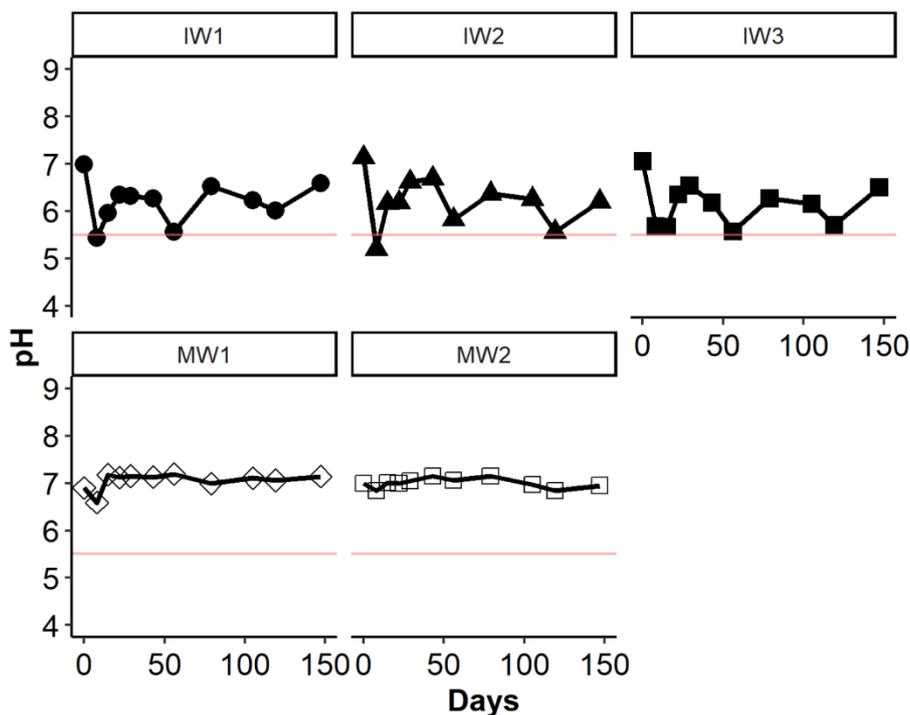


圖 25 反應井以及監測井之 pH 之變化



第四章：實驗結果

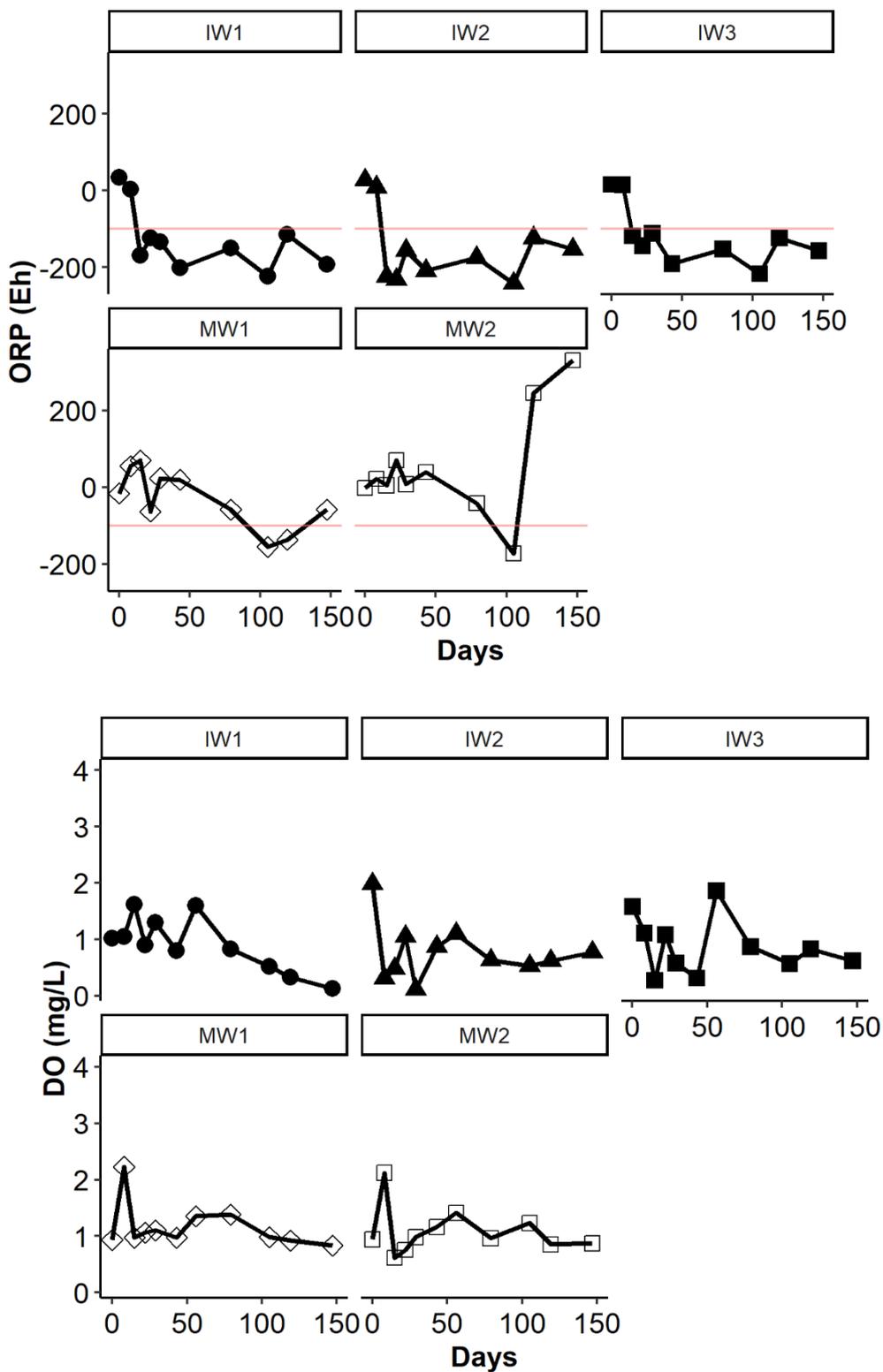


圖 26 反應井以及監測井(A) ORP 之變化 (B) DO 之變化



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

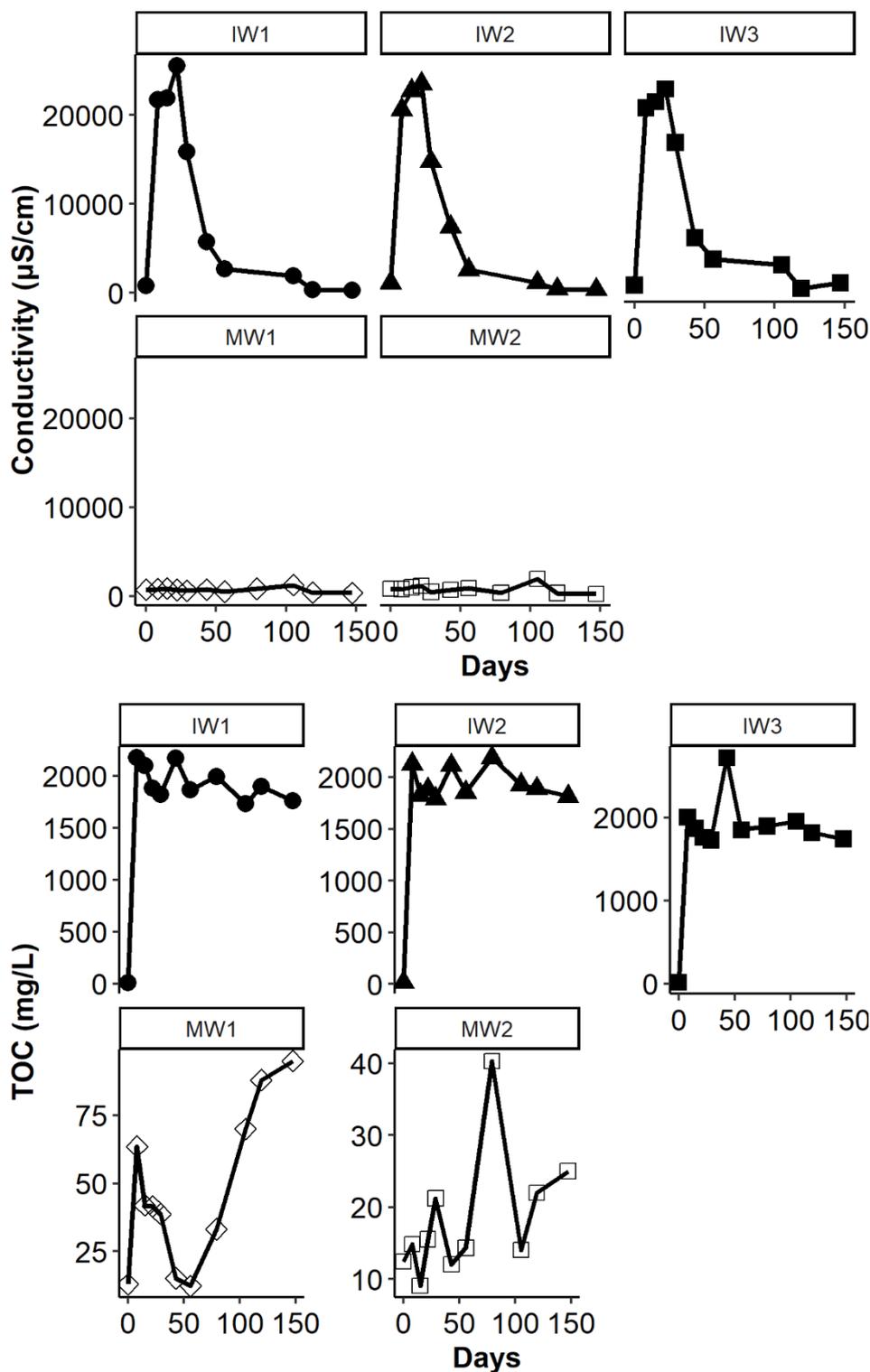


圖 27 反應井以及監測井之(A) 導電度之變化 (B) TOC 之變化

氧化還原電位(ORP)以及溶氧量(DO)顯示，經由添加乳化油基質或固定化膠體皆維持在厭氧狀態，顯示該環境適合脫氯菌進行脫氯，上下游監測井之 ORP 一度到達厭氧狀態，顯示上下游監測井有微生物之活動，上游井於 150 天後有急遽的上升，本團隊認為與雨季有關導致地下水有溶氧的進入。導電度因添加



第四章：實驗結果

生物基質而上升，並且隨著藥劑散佈被稀釋，導電度因而持續下降。TOC 隨者時間逐漸下降，但是監測井之 TOC 數值皆不高，顯示乳化油在土壤間擴散之效率不高，文獻顯示當 TOC 大於 20ppm 以上則可以利於厭氧生物復育進行(Adrian et al., 2016)，本場址觀測到下游井 MW01 於前 50 天有測得 TOC 上升至 50 ppm，並於有持續上升之現象，顯示藥劑有持續往下游井傳輸。上游井 TOC 有些許波動，TOC 有一度上升，但是整體 TOC 濃度為 18.24 ± 8 ppm，文獻已記載現地 TOC 低於 20ppm 將不利於進行脫氯反應(Jeffrey Talley, 2016)。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.5 氫氣與關切氫氣競爭者之分析

利用中華民國行政院環境保護署檢驗所(NIEA)公告之地下水採樣及分析方法執行。分析項目包含關切電子提供者:氫氣(H_2)以及關切競爭者甲烷(CH_4)。

氫氣偵測如圖 28，可以發現反應井皆於 15 天時有著最高的產氫量，其中以 IW2 達 0.722(mg/L)為最高點，可以見得隨後氫氣產量則開始下降，各井並於 30 天後維持在 0.3~0.4ppm 之濃度，IW02 整體氫氣濃度為最高。下游監測井亦測得少許氫氣存在，並持續維持長達 150 天，顯示氫氣的擴散範圍比起藥劑還要廣闊，並顯示本產氫菌生物包埋工法有持續提供氫氣於現地至微生物使用。上游井有測得些許氫氣上升，可能與雨季導致水流流向改變有關，顯示本工法產生之氫氣可隨著水流移動到周遭上下游井。

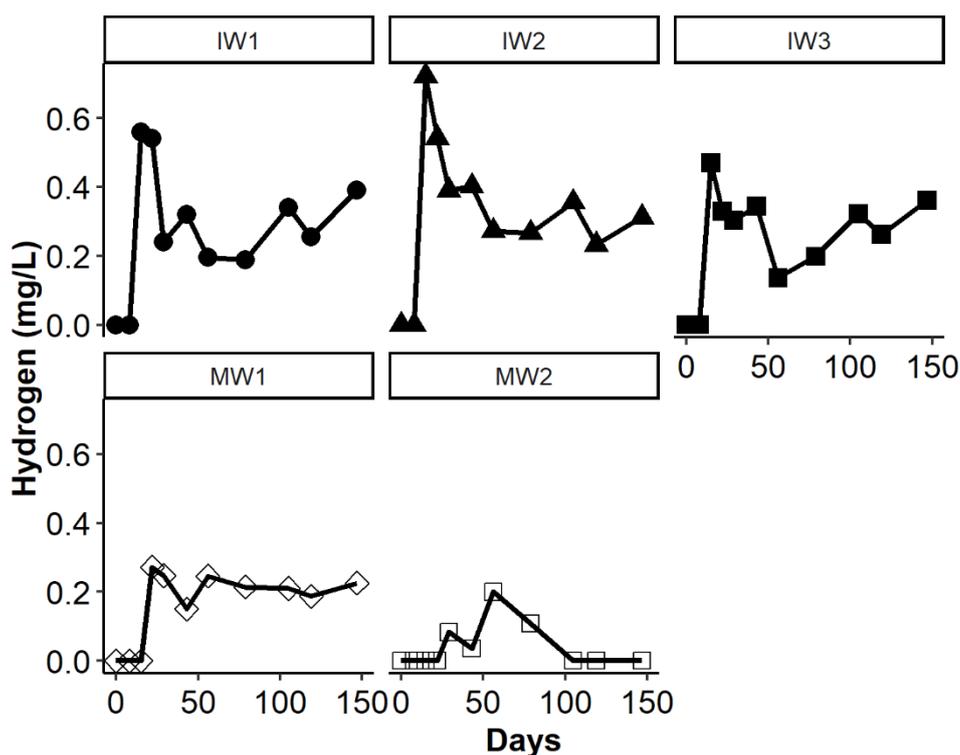


圖 28 反應井以及監測井之氫氣變化圖

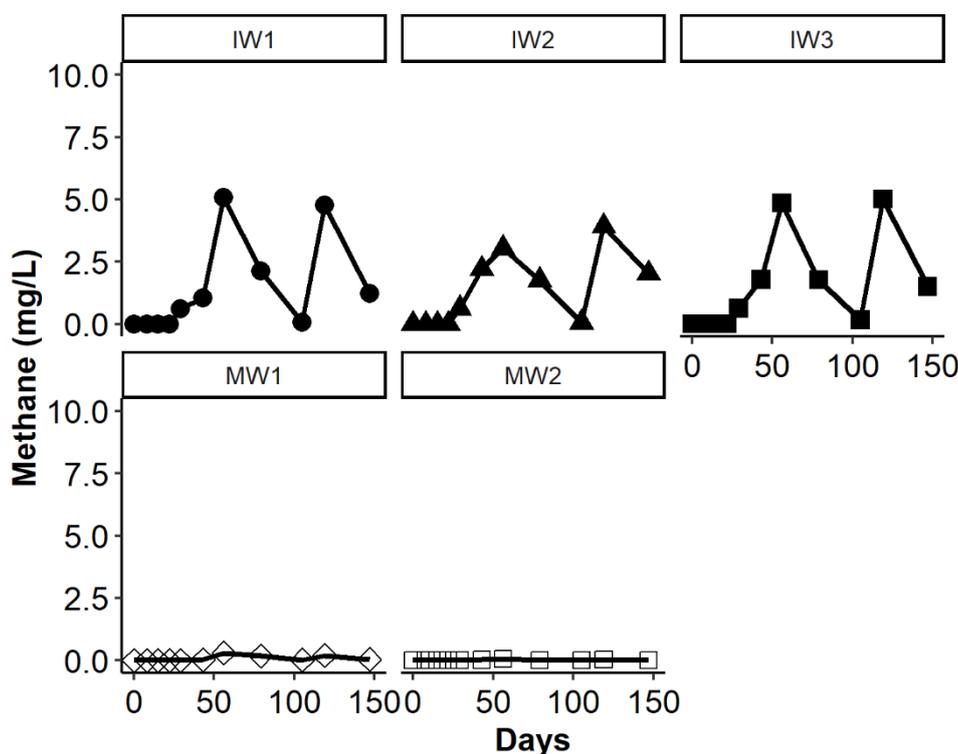


圖 29 反應井以及監測井之甲烷變化圖

在第 30 天後，甲烷開始被測得(圖 29)，由此可得知甲烷菌已經開始生長，氫氣被甲烷菌所利用，從實驗數據得知目前甲烷並沒有生成太多，可能甲烷部分溶解於地下水，因此測得的數值不高與其溶解度有關，並於 56 天時目前測得最高值僅為 5.06 mg/L，三組反應井皆無太大的差異，甲烷的生成與乳化油的添加有著密切的關係，本研究團隊在第 56 天時加入甲烷抑制劑 BES(0.5mM)於現地，隨後可見得甲烷的生成被抑制，三個反應井於 105 天達最低點 0.68(mg/L)，顯示甲烷生成菌確實被抑制，但隨後我們觀測到甲烷有回升的趨勢，但隨即又下降，這裡可能與雨季有關，雨水的沖刷導致甲烷抑制劑濃度無法維持，進而影響甲烷生成菌抑制之功效。甲烷生成與脫氯反應在現地同時進行，在電子提供者充足的情況下，會以甲烷生成為主，當甲烷生成被抑制後，電子流向將會回歸脫氯反應，將會有助於完全脫氯，因此我們在反應井 IW02 及 IW03 之結果可以看到更多的乙烯生成(圖 31)，因此吻合厭氧還原反應。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

4.6 關切污染物級最終產物之分析

利用中華民國行政院環境保護署檢驗所(NIEA)公告之地下水採樣及分析方法執行。分析項目包含關切污染物順-二氯乙烯(cis-DCE)以及最終產物: 乙烯(C₂H₄)。

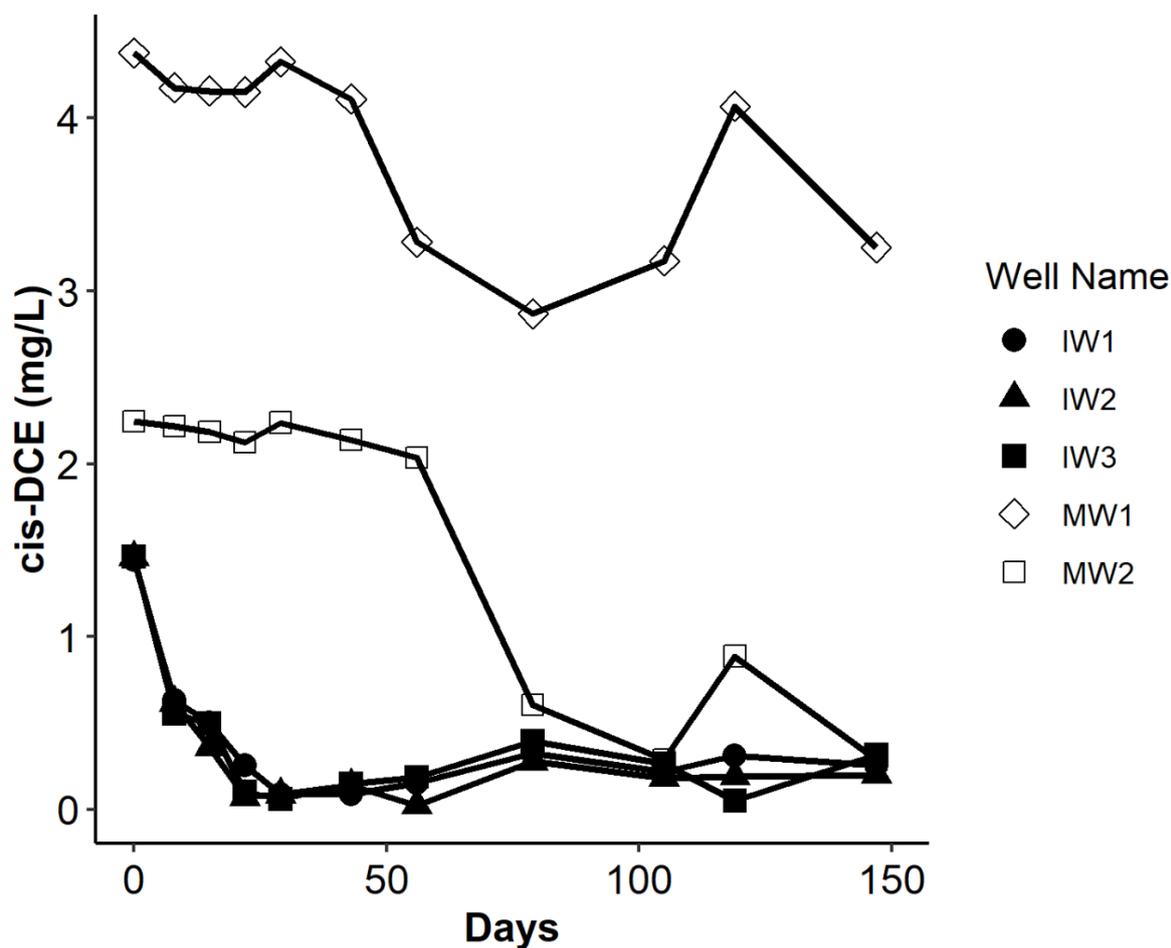


圖 30 反應井以及監測井之關切污染物 cisDCE 之變化分析



第四章：實驗結果

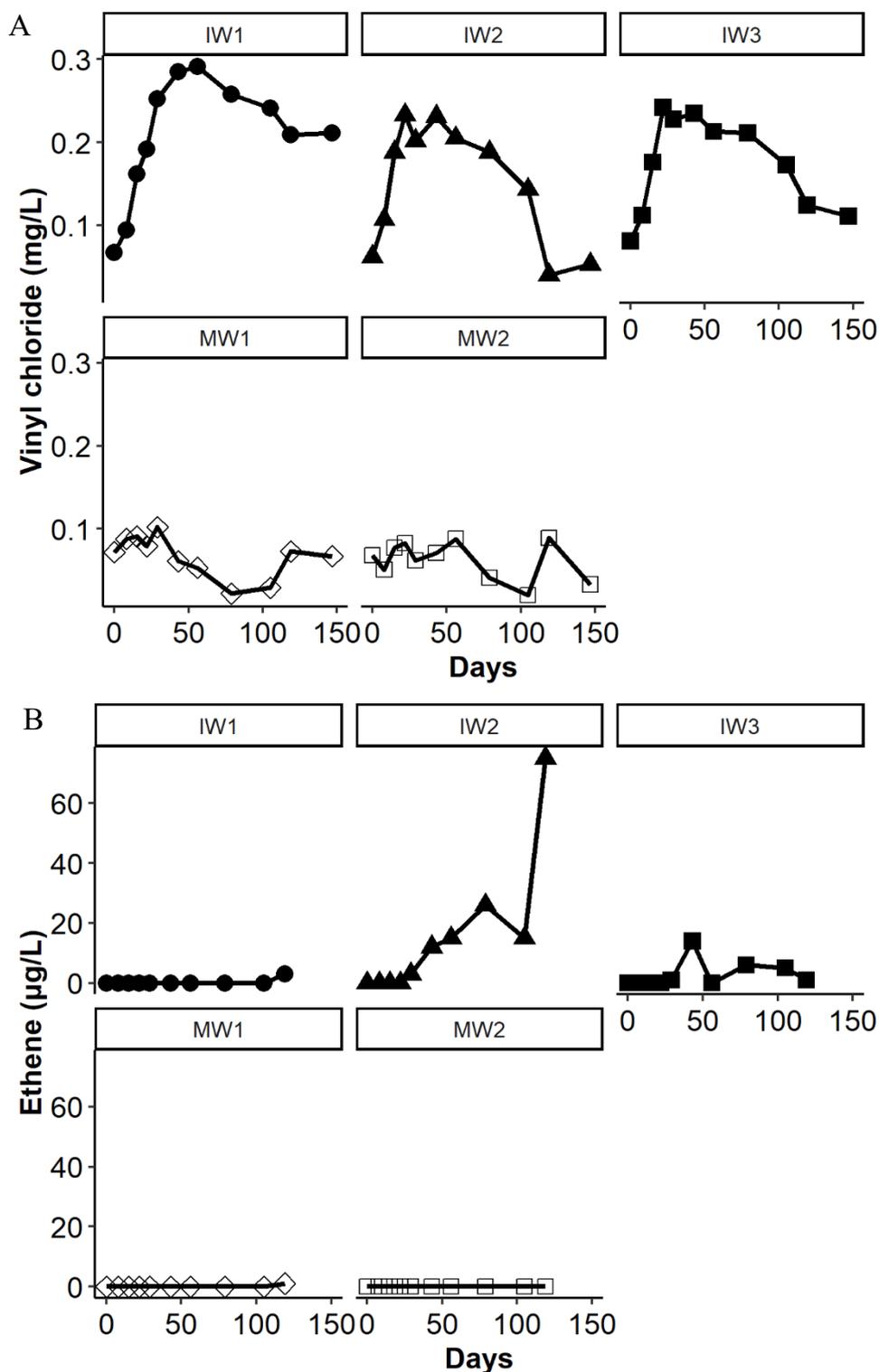


圖 31 反應井以及監測井之關切最終產物(A)氯乙烯及(B)乙烯(Ethene)

由圖 30 可知，cis-DCE 之起始濃度，MW01 為 4.379 mg/L、MW02 為 2.246 mg/L，IW01 為 1.445 mg/L、IW02 為 1.458 mg/L 以及 IW03 為 1.463 mg/L。反應



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

井之 cis-DCE 污染物於整治工法開始第一個星期即大量被分解，已低於法規之管制濃度 0.7 ppm，並且於第 30 天達到最低點 0.086 ± 0.02 mg/L，並維持在 0.1 mg/L，微生物進而轉向降解氯乙烯，經過 150 天之觀察，反應井之 cis-DCE 濃度皆維持於 0.2 ± 0.1 mg/L，顯示本生物包埋結合污染攔截工法可以於現地降低 cis-DCE 之濃度。

由圖 31(A)所示，氯乙烯於整治工法開始前 50 天升高，與 cis-DCE 之降解趨勢一致，於 50 天後生物開始降解氯乙烯並使得濃度持續下降中，降解速率經由計算濃度差異除以反應天數，這裡可以見得於反應井中，使用生物包埋法之反應井(IW02 和 IW03)其氯乙烯降解速率較快($p < 0.01$)，IW02 之降解速率為 -0.0025 mg/L · day，IW03 之降解速率為 -0.0012 mg/L · day，然而，沒有加入產氫菌包埋之對照組反應井 IW01 其氯乙烯降解速率僅有 -0.0008 mg/L · day，顯示產氫菌包埋之工法可以有效提升生物刺激法進行氯乙烯之降解，進而使得完全脫氯。下游井 MW01 於 105 天測得最低濃度達 0.019 mg/L，已低於法規之管制濃度 0.02 mg/L，顯示污染攔截之工法著實有效果，但是因雨季使得周遭水流紊亂，氯乙烯有回升之現象，欲達完全移除多氯乙烯需要更長期之整治期程，但生物包埋結合污染攔截之工法應可加速整治期程。

乙烯於第 30 天時在反應井中被測得(圖 31 B)，並持續上升中，IW02 於第 119 天達到 0.075 μ g/L，顯示在本次研究中，添加產氫菌膠體於現地模場之中，確實能使得污染物完成脫氯反應至乙烯，符合本計畫之預期成果。



4.7 現地脫鹵球菌菌數及功能基因變化分析

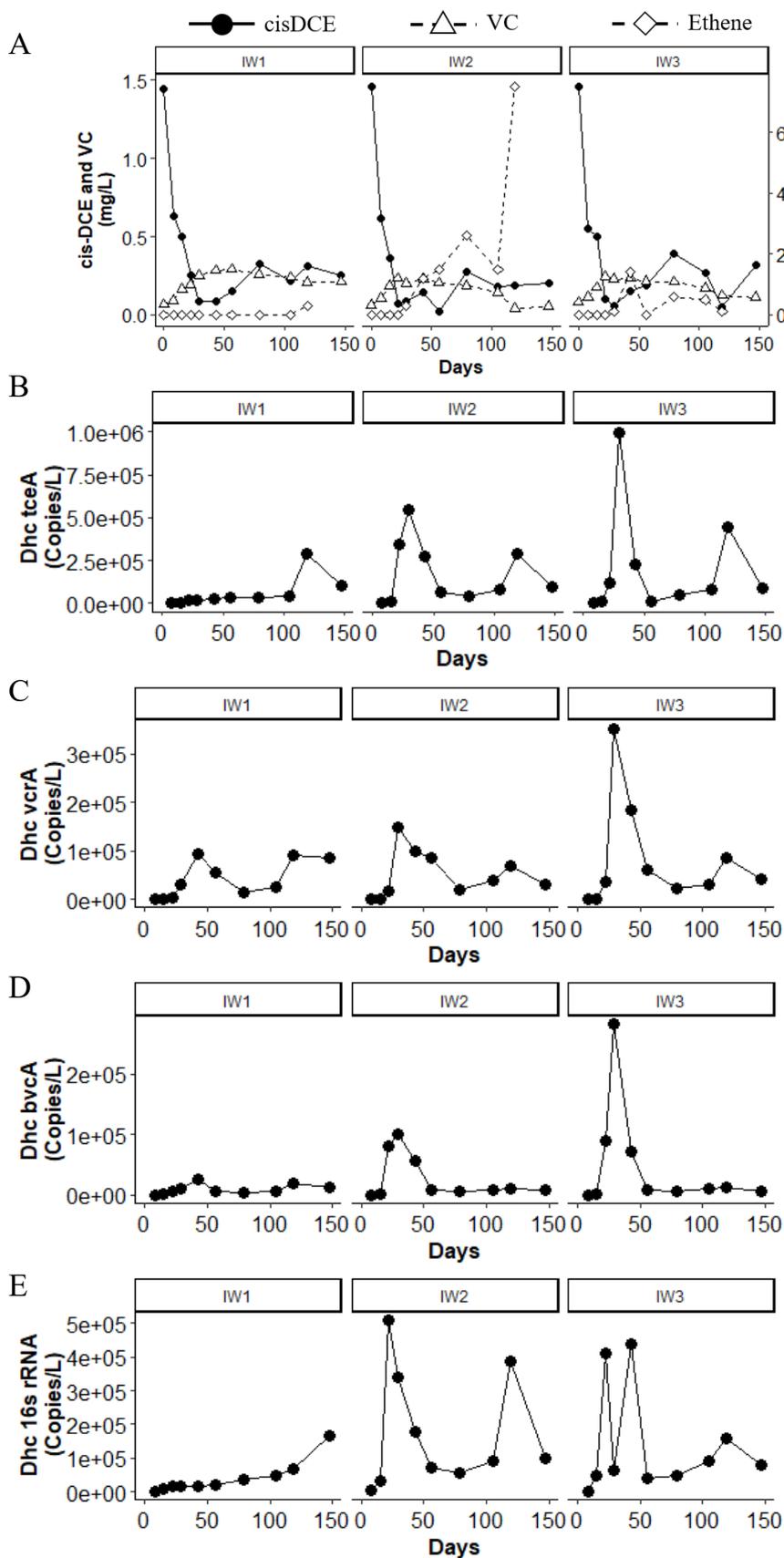


圖 32 反應井之(A) 多氯乙烯污染物降解之比較圖;脫鹵球菌基因變化圖 (B) *tceA* (C) *vcrA* (D) *bvcA* (E) 16s rRNA



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

圖 32(A)為彙整多氯乙烯污染物降解之比較圖，於添加生物包埋膠體之反應井 IW02，可以確實觀測到當 cisDCE 被快速脫氯後產生 VC，隨後生物開始利用 VC 進行脫氯產生乙烯，其關鍵脫氯菌株為脫鹵球菌，本團隊利用 qPCR 之檢測法分析現地脫鹵球菌之基因數 16s rRNA、*tceA*、*vcrA* 與 *bvcA*，以證明本場地是經生物厭氧還原之脫氯反應達到完全脫氯之功效。16s rRNA 可以單獨檢測現地脫鹵球菌之菌量，包含同屬 *Dehalococcoides* 不同品種之脫鹵球菌，於圖 32(E) 可見得有添加生物產氫膠體之反應井 IW02 及 IW03 其脫鹵球菌之數量於前 20 天至 56 天數量急劇上升，最高點為第 22 天之 IW02 測得 $5.08 \times 10^5/L$ ，在 56 天至 100 天之間有一度下降，原因可能是 cisDCE 被脫氯至低濃度後，脫鹵球菌轉而對氯乙烯進行代謝，進而改變其還原脫氯酵素之表現量(圖 32 BCD)，在整治後期 105 天至 145 天脫鹵球菌菌數亦維持在 $10^5/L$ 之水平，將氯乙烯完全脫氯至無毒之乙烯。然而，在未加入生物產氫膠體之對組井 IW01，於 150 天後才測得現地菌量上升至 $10^5/L$ ，由此可以顯示本包埋生物膠體之工法確實可以提升現地脫鹵球菌之數量，其效果可以維持長達 150 天以上。

對於 cisDCE 之代謝於整治運轉前 50 天，功能基因 *tceA*、*vcrA* 及 *bvcA* 皆在模場水樣中被測得，由此可以顯示模場具有完全脫氯之效能，三口反應井皆測得 *vcrA*，因此顯示 *vcrA* 於本場地為主要將 cisDCE 脫氯至 VC 之關鍵基因，然而 IW02 與 IW03 皆有額外測得 *bvcA* 及 *tceA* 之表現，並於第 29 天開始有觀察到乙烯之上升，其中 *bvcA* 為被證實具有快速降解氯乙烯至乙烯之能力(He et al., 2003)，*vcrA* 具有降解氯乙烯至乙烯之功效(Müller et al., 2004)，顯示這兩個基因對於氯乙烯脫氯至乙烯非常有幫助，*tceA* 則需要其他生物進行共代謝才可以將氯乙烯脫氯至乙烯(Clark et al., 2018)，因此顯示生物包埋整治工法能確實提升本場地之關鍵完全還原脫氯基因(*bvcA* 及 *vcrA*)，有效解決過去現地氯乙烯累積之問題。相關脫氯菌種及功能基因代表如下表 16 所示(Adrian and Löffler, 2016)。

表 16 已分離鑑定之脫鹵球菌(*Dehalococcoides mccartyi*)菌種表

菌種	脫氯呼吸反應受質及產物	代表基因
195	PCE, TCE, cDCE, 1,1DCE → VC (ETH) 1,2-DCA → ETH	<i>pceAB</i> , <i>tceAB</i>
BAV1	DCEs, VC → ETH VBr → ETH	<i>bvcAB</i>
VS	TCE, cDCE, 1,1-DCE, VC → ETH	<i>vcrAB</i>
FL2	TCE, cDCE, tDCE → VC (ETH)	<i>tceAB</i>
GT	TCE, cDCE, 1,1-DCE → ETH	<i>vcrAB</i>
ANAS1	TCE, cDCE, 1,1-DCE, → VC (ETH)	<i>tceA</i>
ANAS2	TCE, cDCE, 1,1-DCE, VC → ETH	<i>tceA</i>
11a	TCE, DCEs, VC → ETH 1,2-DCA → ETH	<i>vcrA</i>
11a5	TCE, cDCE, 1,1-DCE, tDCE → VC	<i>vcrA</i>



4.8 模場整治效益及策略評估

綜合以上分析，由生物包理工法並添加固定化產氫菌，進而提升對 cisDCE 及氯乙烯降解有利之物種，於反應井中，從菌種熱點分析以及菌種表可得前兩名：

1. *Desulfovibrio* (6.7%)、
2. *Clostridium sensu stricto 12* (2.5%)

在下游監測井中，從菌種熱點分析以及菌種表可得前兩名：

1. *Pseudomonas* (15.8%)
2. *Geobacter* (2.8%)

Desulfovibrio spp. 於本次整治之反應井中皆維持相近的比例(6.7%)，目前被文獻報導對於提供環境維他命 B12(Corrinoid Cofactor, 鈷安素)扮演重要之角色 (Men et al., 2011)，維他命 B12 為脫氯菌還原脫氯之啟動因子，氫氣提供電子至脫氯酶(RdhA)時，需要以維他命 B12 作為輔酶，但是脫氯菌無法自行合成維他命 B12，僅只能依賴其他菌種製造提供，其機制圖如下圖 33(Wang et al., 2018):

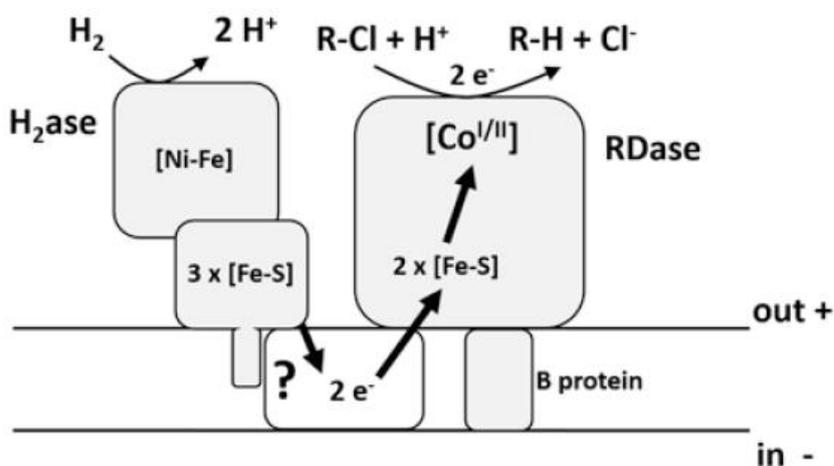


圖 33 醜非依賴性電子傳遞鏈在有機鹵化物呼吸細菌中之機制圖。(Wang et al., 2018)

目前可知維他命 B12 可由硫酸還原菌種或甲烷菌產生，我們亦在此次菌相分析中有發現甲烷菌 *Methanosarcina* sp. 及 *Desulfovibrio* spp.，故可以確認本模場能夠自行合成維他命 B12。

Clostridium spp. 為本次包埋所使用之菌屬，在反應井中皆有測得一定之比例，*Clostridium* spp.及 *Desulfovibrio* spp.在文獻上記載擁有以發酵產生醋酸以及氫氣之能力(Boyle et al. 1999)，醋酸目前被公認為 *Dehalococcoides* spp.可使用之唯一碳來源，因此脫鹵球菌需要此類發酵者(Fermentor)提供氫氣及醋酸才能有效生長並增加菌量，透過本次菌相分析之結果可以得知 *Clostridium* spp.及 *Desulfovibrio* spp.為主要現地之發酵者。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

在文獻顯示脫氯反應不一定完全僅靠 *Dehalococcoides*，本次菌相分析亦於下游監測井有發現與多氯乙烯降解相關之菌種。*Geobacter* 屬目前被報導能夠在具有硫酸鹽的環境下將 TCE 降解(Tsai et al., 2014)，另外，有研究指出 *Pseudomonas* spp. 菌株是可以在有氧的環境下代謝 TCE(Kotik et al., 2013)，因本次實驗上下游井大多時間不為厭氧態，這意味著本場址在有氧之條件下可能具備有氧降解多氯乙烯之潛力，但隨著整治進行，地下水環境逐步趨向厭氧態，因此本場址必需使用生物厭氧脫氯還原才可以將 cisDCE 及 VC 有效移除。

雖然在 NGS 菌相分析中沒有在反應井中看到脫鹵球菌的存在，但是在 qPCR 的實驗中皆有測得該菌之功能性基因，由於本次 NGS 是使用 16s rDNA 之分析法，可以分析絕大部分之菌相組成，但是此種方法並不適合分析脫鹵球菌(Tas et al., 2010)，因此本團隊搭配 qPCR 加以佐證脫鹵球菌之存在。Clark 團隊(2018)選取美國 62 個場址之 859 處地下水樣本，針對其 qPCR 之數據加以分析，觀測到當模場具有完全脫氯至乙烯之能力時，其現地脫鹵球菌氯乙烯脫氯之功能性基因 *bvcA+vcrA*(VC RDase)與脫鹵球菌菌數整體比例介於 0.1~10 倍之間，其比例倘若於該區間之外則較難以有乙烯之生成，且關鍵之功能性基因 *vcrA* 及 *bvcA* 其數量須超過 $10^5/L$ 。根據前人之研究，分析本次脫鹵球菌功能性基因之變化，其結果如下圖 34，可以見得 IW02 及 IW03 有測得乙烯，且 VC RDase 與脫鹵球菌總菌數之比例維持在 0.3~3 之間並維持在 $10^5/L$ 以上，僅有第 119 天之 IW02 之比例為 0.2，上下游監測井皆大多落於此區間之外，生物刺激法之對照組 IW01 脫鹵球菌雖在區間內但是其菌數於 100 天前小於 $10^5/L$ ，不利於乙烯產生，由此可見生物產氫膠體對於脫鹵球菌菌數及功能性基因的表現影響相當有效果。

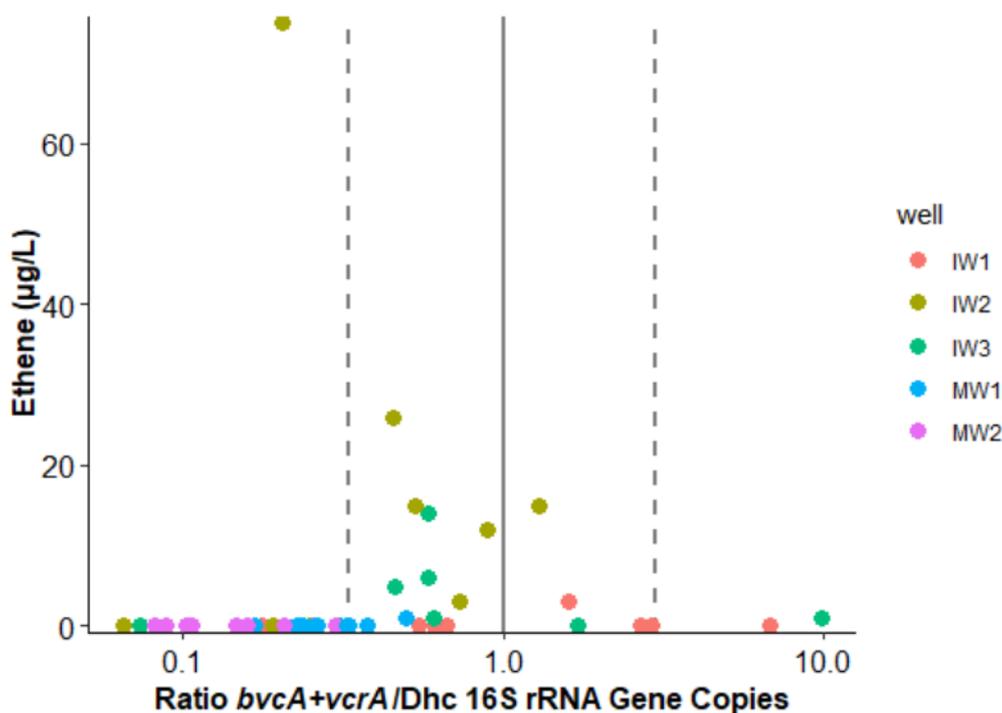


圖 34 RDase 基因及脫鹵球菌 16S rRNA 基因之比例與完全脫氯生成乙烯關係圖

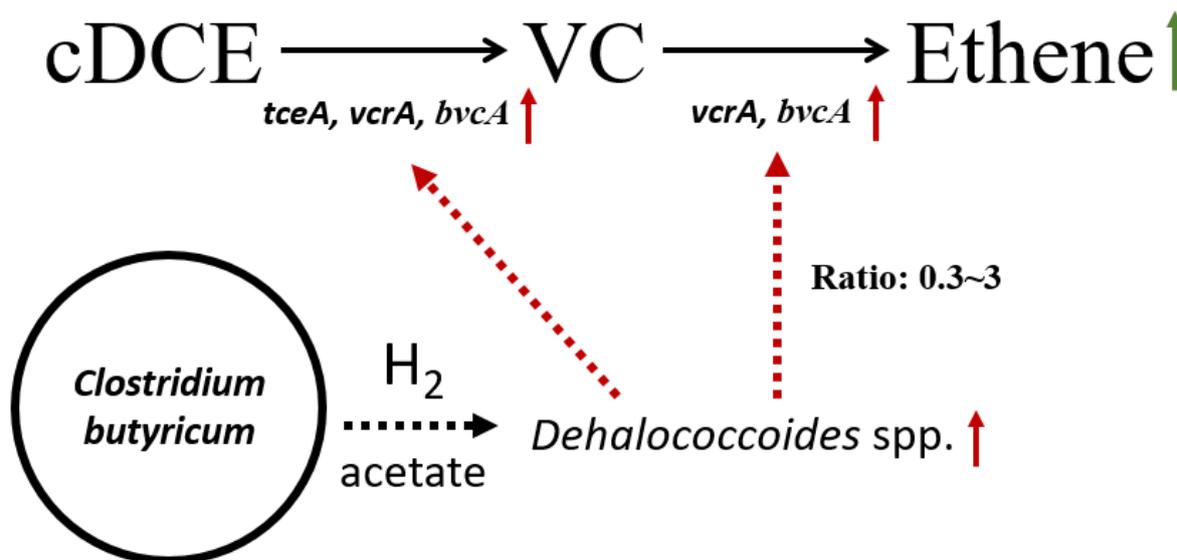


圖 35 微生物組成在多氯有機污染物降解過程中所扮演之角色

最後，本計畫成功以生物包埋產氫菌之膠體達成現地地下水試驗，經過添加固定化產氫菌可以使得現地脫鹵球菌菌數增加，相關脫氯功能性基因 *bvcA* 及 *vcrA* 亦有所增加，*vcrA* 參與二氯乙烯及氯乙烯之脫氯反應，為現地完全脫氯之關鍵基因，因此提升現地脫氯之速率，進而增強降解多氯乙烯並達成完全脫氯至乙烯之目的，本次試驗結果可以應用於現地模場並解決多氯乙烯累積之問題，其關係圖如圖 35。透過 NGS 之菌相分析，產氫菌搭配乳化油之使用，則可以維持生態之平衡不過度篩選菌株導致生態失衡，且相關多氯乙烯降解協助者皆因有產氫菌而提升功效，協助脫鹵球菌之生長。在本次試驗有添加甲烷抑制劑試圖解決甲烷生成之問題，但因雨季乾擾導致效果不顯著，未來實施本次工法將會加強甲烷之監控，控管氫氣競爭者的消長，可以更有效提升多氯乙烯之降解。因此，本計畫提供一套全新現地整治工法，並證實該工法具有一定之功效，未來將結合更多模場場址之整治，優化改良本工法以提升我國多氯乙烯污染整治之能力。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

第五章：結論與建議

本研究利用現地所採樣之地下水進行產氫菌篩選，探討添加產氫菌株對現地地下水脫氯菌群厭氧還原脫氯效率之影響，嘗試使用固定化材質固定菌株以增強菌株穩定性，並提供永續整治方針及分子生物技術於三氯乙烯污染地下水場址整治規劃。根據此次計畫結果，將其整理如下：

5.1 模場運轉前之次世代菌相分析結論

1. 經由菌相分析，可以得知該場址具有潛力菌株 *Dehalogenamonas*，本次定序沒有發現 *Dehalococcoides*，未來將在 qPCR 檢測中，加入 *Dehalogenamonas* 之數量測定，分析 *Dehalococcoides* 和 *Dehalogenamonas* 此兩株脫氯關鍵菌的變化。
2. 新設井因挖井工程影響本地菌相，使得與多氯乙烯相關之耗氧代謝菌 *Nocardioides spp.* 被大量偵測，因此本地具有有氧代謝多氯乙烯污染物之能力。
3. 現地菌相觀測到甲烷菌得存在，因此未來許加強甲烷抑制之相關工法，使得多氯乙烯之脫氯反應能達到最大化。

5.2 模場整治之次世代菌相分析結論

1. 經由本次菌相分析可得知，包埋產氫菌膠體結合乳化油之生物刺激法，於反應井中菌相組成穩定，可以測得發酵者 *Clostridium spp.* 及 *Desulfovibrio spp.*，以及提共維他命 B12 之相關菌株 *Desulfovibrio spp.* 及 *Methanosarcina sp.*。
2. 脫鹵球菌並沒有在次世代分析中被測得，必須使用 qPCR 之方法才可以定量脫鹵球菌之數量以及其功能基因之表現量。
3. 於監測井 MW01 測得 *Dehalogenamonas spp.*，經團隊以 qPCR 進行測試，*Dehalogenamonas* 數量相對 *Dehalococcoides* 少或者測不到(Data not shown)，因此本計畫後續不再測試 *Dehalogenamonas* 數量。

5.3 現地整治工法結論

1. 經由乳化油生物刺激法以及固定化產氫菌之生物加強法處理，反應井之 cis-DCE 皆在 30 天後被降解至 0.1ppm 以下，並且有固定化處理之反應井於 30 天後開始測得乙烯之產生，反應井持續於 150 天後測得乙烯，確認固定化產氫菌之膠體能使得污染物完成脫氯反應至乙烯，符合本計畫之預期成果。



第五章：結果與建議

2. 下游井於 30 開始濃度下降，於第 79 天測得最低濃度為 2.868ppm，cis-DCE 移除率達 35%，並於 150 天維持濃度於 3.3 ± 0.5 ppm，顯示本生物包埋結合污染攔截工法可以於現地降低 cis-DCE 之濃度。
3. 下游監測井亦測得少許氫氣存在，並持續維持長達 150 天，顯示氫氣的擴散範圍比起藥劑還要廣闊，並顯示本產氫菌生物包理工法有持續提供氫氣於現地至微生物使用。
4. 以 qPCR 分析地下水樣本，反應井之包埋產氫菌組別測得其脫鹵球菌菌數可以長時間維持再 $10^5/L$ ，且相關功能性基因如 *tceA*、*vcrA* 及 *bvcA* 皆有所提升，VC RDase 與脫鹵球菌總菌數之比例維持在 0.3~3 之間可以觀測到乙烯之產生，由此可見生物產氫膠體對於脫鹵球菌菌數及功能性基因的表現影響相當有效果。
5. 單純添加乳化油會使得反應井之地下水酸化，若是低於 pH 5.5 則不利於厭氧脫氯反應，磷酸緩衝液的添加有助於 pH 回歸至 pH 6.5，以利於後續整治。
6. 本計畫成功利用生物包埋產氫菌達成現地地下水試驗，經過添加生物包埋產氫菌則可以提升脫鹵球菌菌數及功能性基因的表現，進而增強降解多氯乙烯達成完全降解至乙烯之功效。

5.4 成果與建議

1. 產氫包埋整治工法確實可以應用於多氯乙烯污染物之場地，證實在以 DCE 為主的場地，提供包埋產氫菌可以使其完全脫氯轉化為乙烯之潛力，本計畫的成果在此條件下所能達到提升整治工效之成果。
2. 包埋產氫菌可以提升現地脫鹵球菌之菌數，但是期間消耗過長，因此未來可以建構絕對厭氧操作技術，大量培養脫鹵球菌，包埋脫鹵球菌與產氫菌，開發高效脫氯生物膠體，加速整治期程。
3. 由於本包埋生物膠體結合污染攔截牆之工法，地下水流向以及攔截牆之範圍為重要，在本計畫中觀察到台灣雨量變化大，容易影響地下水流向，優化本工法加長攔截及用弧形配置增加下游測井才容易觀測到成效。
4. 本次計畫之執行困難點為地下水移動緩慢，下水流速同時也是影響整治成效的關鍵因素，下游搭配抽水井加速地下水流速，應可提升污染攔截牆之工法效益。



第六章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

	期末	<ol style="list-style-type: none">1. 完成整治前後地下水菌相變化分析2. 評估生物復育技術整治成本與效益3. 繳交期末報告
--	----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------



第七章：參考文獻

- Abrahamsson K, Ekdahl A, Collen J, Pedersen M (1995) Marine algae-a source of trichloroethylene and perchloroethylene. *Limnol Oceanogr* 40:1321–1326
- Abou-Zeid, D.M. (2004). *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-negative, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 54, 951–954.
- Abumaizer RJ, Kocher W, Smith EH. (1998). Biofiltration of BTEX contaminated air streams using compost activated carbon filter media. *J. Hazard. Mater.* 60: 111–126.
- ATSDR. (2003) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. USA: Department of Health and Human Services
- Aulenta, F., Gossett, J. M., Papini, M. P., Rossetti, S., and Majone, M. (2005). Comparative study of methanol, butyrate, and hydrogen as electron donors for long-term dechlorination of tetrachloroethene in mixed anaerobic cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 91(6), 743-753.
- Adrian, L., & Marco-Urrea, E. (2016). Isotopes in geobiochemistry: tracing metabolic pathways in microorganisms of environmental relevance with stable isotopes. *Current opinion in biotechnology*, 41, 19-25.
- Adrian, L., & Löffler, F. (2016) *Organohalide-Respiring Bacteria*
- Battumur, U., Yoon, Y. M., & Kim, C. H. (2016). Isolation and Characterization of a New *Methanobacterium formicicum* KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(4), 586–593.
- Berggren, D. R., Marshall, I. P., Azizian, M. F., Spormann, A. M., and Semprini, L. (2013). Effects of sulfate reduction on the bacterial community and kinetic parameters of a dechlorinating culture under chemostat growth conditions. *Environ. Sci. Technol.* 47(4), 1879-1886.
- Boyle, A.W., Phelps, C.D., and Young, L.Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive



- dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1133–1140.
- Bradley, P. M., Chapelle, F. H., and Lovley, D. R. (1998). Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8), 3102-3105.
- Burstein, D., Amaro, F., Zusman, T., Lifshitz, Z., Cohen, O., Gilbert, J. A., ... Segal, G. (2016). Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nature genetics*, **48**(2), 167–175. doi:10.1038/ng.3481
- Chang, Y. C., Ikeutsu, K., Toyama, T., Choi, D., and Kikuchi, S. (2011). Isolation and characterization of tetrachloroethylene- and cis-1,2-dichloroethylene-dechlorinating propionibacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**(10), 1667-1677.
- CPCB (Central Pollution Control Board). 2007. Ministry of Environment and Forests, Govt of India. Material safety data sheets.
- Chen, J. L., Ortiz, R., Steele, T. W., & Stuckey, D. C. (2014). Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*, **32**, 1523-1534.
- Chen, M., Liu, C., Li, X., Huang, W., and Li, F. (2014). Iron Reduction Coupled to Reductive Dechlorination in Red Soil: A Review. *Soil Science* **179**, 457–467.
- Clark, K., Taggart, D.M., Baldwin, B.R., Ritalahti, K.M., Murdoch, R.W., Hatt, J.K., and Löffler, F.E. (2018). Normalized Quantitative PCR Measurements as Predictors for Ethene Formation at Sites Impacted with Chlorinated Ethenes. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 13410–13420.
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., & Huffnagle, G. B. (2013). The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert review of respiratory medicine*, **7**(3), 245–257. doi:10.1586/ers.13.24
- Dolinova, I., Strojsova, M., Cernik, M., Nemecek, J., Machackova, J., and Sevcu, A. (2017). Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental science and pollution research international* **24**(15), 13262-13283.
- Dubey SK. 2005. Microbial ecology of methane emission in rice agroecosystem: a review. *Appl Ecol Environ Res* **3**: 1–27.



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology spectrum*, **7**(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
- Fernandes, V. C., Albergaria, J. T., Oliva-Teles, T., Delerue-Matos, C., and De Marco, P. (2009). Dual augmentation for aerobic bioremediation of MTBE and TCE pollution in heavy metal-contaminated soil. *Biodegradation* **20**(3), 375-382.
- Fullerton, H., Rogers, R., Freedman, D. L., and Zinder, S. H. (2014). Isolation of an aerobic vinyl chloride oxidizer from anaerobic groundwater. *Biodegradation* **25**(6), 893-901.
- Futamata, H., Kaiya, S., Sugawara, M., and Hiraishi, A. (2009). Phylogenetic and Transcriptional Analyses of a Tetrachloroethene-Dechlorinating "Dehalococcoides" Enrichment Culture TUT2264 and Its Reductive-Dehalogenase Genes. *Microbes Environ.* **24**(4), 330-337.
- Haest, P. J., Springael, D., and Smolders, E. (2010). Dechlorination kinetics of TCE at toxic TCE concentrations: Assessment of different models. *Water Res.* **44**(1), 331-339.
- Hakemian, A. S., and Rosenzweig, A. C. (2007). The biochemistry of methane oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 223-241.
- Harkness, M., Fisher, A., Lee, M. D., Mack, E. E., Payne, J. A., Dworatzek, S., Roberts, J., Acheson, C., Herrmann, R., and Possolo, A. (2012). Use of statistical tools to evaluate the reductive dechlorination of high levels of TCE in microcosm studies. *J. Contam. Hydrol.* **131**(1-4), 100-118.
- He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.-L., Koenigsberg, S.S., and Löffler, F.E. (2003). Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* **424**, 62-65.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2005). Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* **7**(9), 1442-1450.
- Henschler D (1994) Toxicity of chlorinated organic compounds: effects of the



- introduction of chlorine in organic molecules. *Angew Chem Int Ed* 33:1920–1935
- Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D. E., and Ebersole, R. C. (2002). Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2), 485-495.
- Holscher, T., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., Von Wintzingerode, F., Gorisch, H., Löffler, F. E., and Adrian, L. (2004). Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in Dehalococcoides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(9), 5290-5297.
- HSDB. (Hazardous Substances Data Bank). 2002. Trichloroethylene. National Library of Medicine. National Institutes of Health. Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A., and Adrian, L. (2013). Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368**(1616), 20120322.
- Hug LA, Maphosa F, Leys D, Löffler FE, Smidt H, Edwards EA, Adrian L (2013) Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Biological sciences* 368:20120322.
- Imfeld G, Pieper H, Shani N et al (2011) Characterization of groundwater microbial communities, dechlorinating bacteria, and in situ biodegradation of chloroethenes along a vertical gradient. *Water Air Soil Pollut* 221:107–122.
- Jugder, B. E., Ertan, H., Lee, M., Manefield, M., and Marquis, C. P. (2015). Reductive Dehalogenases Come of Age in Biological Destruction of Organohalides. *Trends Biotechnol.* **33**(10), 595-610.
- Kaster, A. K., Mayer-Blackwell, K., Pasarelli, B., and Spormann, A. M. (2014). Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *The ISME journal* **8**(9), 1831-1842.



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

- Keppler, F., Borchers, R., Pracht, J., Rheinberger, S., and Scholer, H. F. (2002). Natural formation of vinyl chloride in the terrestrial environment. *Environ. Sci. Technol.* **36**(11), 2479-2483.
- Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I. N., Saunders, F. M., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2004). Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(10), 6347-6351.
- Kranzioch, I., Stoll, C., Holbach, A., Chen, H., Wang, L., Zheng, B., Norra, S., Bi, Y., Schramm, K. W., and Tiehm, A. (2013). Dechlorination and organohalide-respiring bacteria dynamics in sediment samples of the Yangtze Three Gorges Reservoir. *Environmental science and pollution research international* **20**(10), 7046-7056.
- Kruse, T., van de Pas, B.A., Atteia, A., Krab, K., Hagen, W.R., Goodwin, L., Stams, A.J. (2015). Genomic, Proteomic, and Biochemical Analysis of the Organohalide Respiratory Pathway in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Journal of bacteriology*, **197**(5), 893-904.
- Lee, P. K., Cheng, D., West, K. A., Alvarez-Cohen, L., and He, J. (2013). Isolation of two new *Dehalococcoides mccartyi* strains with dissimilar dechlorination functions and their characterization by comparative genomics via microarray analysis. *Environ. Microbiol.* **15**(8), 2293-2305.
- Lee, I. S., Bae, J. H., & McCarty, P. L. (2007). Comparison between acetate and hydrogen as electron donors and implications for the reductive dehalogenation of PCE and TCE. *Journal of Contaminant Hydrology*, **94**, 76-85.
- Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Muller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H., and Spormann, A. M. (2013). *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis nov.*, order *Dehalococcoidales ord. nov.* and family *Dehalococcoidaceae fam. nov.*, within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(Pt 2), 625-635.
- Madsen, T., and Aamand, J. (1991). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*



57(9), 2453-2458.

- Magnuson, J. K., Stern, R. V., Gossett, J. M., Zinder, S. H., and Burris, D. R. (1998). Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(4), 1270-1275.
- Major, D. W., McMaster, M. L., Cox, E. E., Edwards, E. A., Dworatzek, S. M., Hendrickson, E. R., Starr, M. G., Payne, J. A., and Buonamici, L. W. (2002). Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* **36**(23), 5106-5116.
- Mattes, T. E., Alexander, A. K., and Coleman, N. V. (2010). Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**(4), 445-475.
- Maymo-Gatell, X., Anguish, T., and Zinder, S. H. (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by "Dehalococcoides ethenogenes" 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7), 3108-3113.
- McMurdie, P. J., Behrens, S. F., Muller, J. A., Goke, J., Ritalahti, K. M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S., Löffler, F. E., *et al.* (2009). Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring Dehalococcoides. *PLoS Genet.* **5**(11), e1000714.
- Mohn, W. W., and Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological reviews* **56**(3), 482-507.
- Müller, J.A., Rosner, B.M., Abendroth, G. von, Meshulam-Simon, G., McCarty, P.L., and Spormann, A.M. (2004). Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from Dehalococcoides sp. Strain VS and Its Environmental Distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4880-4888.
- Neumann, A., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1998). Tetrachloroethene dehalogenase from Dehalospirillum multivorans: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the pceA gene in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **180**(16), 4140-4145.
- Nijenhuis, I., and Kuntze, K. (2016). Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides-state of the art and remediation strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.*



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

38, 33-38.

- Ohlen, K., Chang, Y. K., Hegemann, W., Yin, C. R., and Lee, S. T. (2005). Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidized-bed reactor. *Chemosphere* **58**(3), 373-377.
- Pant, P., and Pant, S. (2010). A review: advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *J. Environ. Sci. (China)* **22**(1), 116-126.
- Parthasarathy, A., Stich, T. A., Lohner, S. T., Lesnefsky, A., Britt, R. D., and Spormann, A. M. (2015). Biochemical and EPR-spectroscopic investigation into heterologously expressed vinyl chloride reductive dehalogenase (VcrA) from *Dehalococcoides mccartyi* strain VS. *J. Am. Chem. Soc.* **137**(10), 3525-3532.
- Pantazidou M, Panagiotakis I, Mamais D, Zikidi V (2012) Chloroethene in the presence of different sulfate concentrations. *Ground water Monit Remediat* 32:106–119
- Poehlein, A., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2013). First Insights into the Genome of the Gram-Negative, Endospore-Forming Organism *Sporomusa ovata* Strain H1 DSM 2662. *Genome Announcements* 1.
- Russell HH, Mathews JE, Sewell GW. 1992. Groundwater issue: TCE removal from contaminated soil and groundwater. In: Research Report No.EPA/540/S-92/002 of USEPA. USEPA: Washington DC, USA
- Robinson, C., Barry, D. A., McCarty, P. L., Gerhard, J. I., and Kouznetsova, I. (2009). pH control for enhanced reductive bioremediation of chlorinated solvent source zones. *Sci. Total Environ.* **407**(16), 4560-4573. Shukla, A. K., Upadhyay, S. N., and Dubey, S. K. (2014). Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**(2), 101-114.
- Saiyari, D.M., Chuang, H.-P., Senoro, D.B., Lin, T.-F., Whang, L.-M., Chiu, Y.-T., and 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* **28**, 149–157.
- Tsai, T.t., Liu, j.k., Chang, YM, Chen, K.F., Kao, C.M. (2014) Application of polycolloid-releasing substrate to remediate trichloroethylene-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *J Hazard Mater* **68**:92-101.



第七章：參考文獻

- Tang, S., Chan, W. W., Fletcher, K. E., Seifert, J., Liang, X., Loffler, F. E., Edwards, E. A., and Adrian, L. (2013). Functional characterization of reductive dehalogenases by using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**(3), 974-981.
- Tiehm, A., and Schmidt, K. R. (2011). Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes--aspects of field application. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**(3), 415-421.
- Uchino, Y., Miura, T., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Ito, M., Takahata, Y., Suzuki, K., and Fujita, N. (2015). Complete genome sequencing of *Dehalococcoides* sp. strain UCH007 using a differential reads picking method. *Standards in genomic sciences* **10**, 102.
- US Environmental Protection Agency. 2001. National Air Toxics Program: The integrated urban strategy: Report to Congress
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1997. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. In: Directive No.9200.4-17 P of office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, USA: USEPA.
- Wang, S., Qiu, L., Liu, X., Xu, G., Siegert, M., Lu, Q., Juneau, P., Yu, L., Liang, D., He, Z., et al. (2018). Electron transport chains in organohalide-respiring bacteria and bioremediation implications. *Biotechnology Advances* **36**, 1194–1206.
- Wilson, J. T., and Wilson, B. H. (1985). Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(1), 242-243.
- Wittlingerova, Z., Machackova, J., Petruzalkova, A., Trapp, S., Vlk, K., and Zima, J. (2013). One-year measurements of chloroethenes in tree cores and groundwater at the SAP Mimon Site, Northern Bohemia. *Environmental science and pollution research international* **20**(2), 834-847.
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S. T., Bai, F., & Tang, I. (2012). High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnology and bioengineering*, **109**(11), 2746-2756.
- Yang, Y., and McCarty, P. L. (2002). Comparison between donor substrates for



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

biologically enhanced tetrachloroethene DNAPL dissolution. *Environ. Sci. Technol.* **36**(15), 3400-3404.

Yang, Y., Higgins, S. A., Yan, J., Şimşir, B., Chourey, K., Iyer, R., & Löffler, F. E. (2017). Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes. *The ISME journal*, *11*(12), 2767–2780. doi:10.1038/ismej.2017.127

Yi Yang, Natalie L. Cápiro, Jun Yan, Tyler F. Marcet, Kurt D. Pennell, Frank E. Löffler, Resilience and recovery of *Dehalococcoides mccartyi* following low pH exposure, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 93, Issue 12, December 2017, fix130,

Yohda, M., Yagi, O., Takechi, A., Kitajima, M., Matsuda, H., Miyamura, N., Aizawa, T., Nakajima, M., Sunairi, M., Daiba, A., *et al.* (2015). Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. *J. Biosci. Bioeng.* **120**(1), 69-77.

Yuan, S., Mao, X., and Alshawabkeh, A. N. (2012). Efficient degradation of TCE in groundwater using Pd and electro-generated H₂ and O₂: a shift in pathway from hydrodechlorination to oxidation in the presence of ferrous ions. *Environ. Sci. Technol.* **46**(6), 3398-3405.



第八章：補充資料 - 場址基本資料

8.1 場址公告資料

本計畫之公告場址起源於 90 年度環保署執行之全國性污染調查計畫，後續臺南市（縣）環境保護局（以下簡稱環保局）執行污染調查、查證計畫，依據執行成果進行場址列管公告。隨歷年計畫污染調查結果，共進行 9 次場址列管公告（如表 8.1-1），目前環保署場址管理系統整合為 3 處列管場址（場址編號為 R00051、D10299 及 D10172），包含控制場址 1 處（D10172 含 3 筆地號）及公告地下水受污染限制使用地區 2 處（分別含 36 筆地號之 R00051 及 2 筆地號之 D10299），各場址位置分布如圖 8.1-1 所示，整理 3 處場址相關資料於表 8.1-2。

歷次列管公告說明如下，相關列管公告詳附件二。

- 一、94 年 2 月 23 日公告：公告鹽行段 1418、1419-5、1419-7、1420、1420-1、1420-2、1421、1422、1423、1424、1425、1492、1492-1、1493、1493-1、1494、1495、1496、1496-1、1496-2、1496-3、1496-4、1497、1498、1522-1、1522-2、1565、1565-2、1565-4、1566、1567、1568、1569、1569-2 等 34 筆地號，為地下水受污染使用限制地區及限制事項，停止飲用或使用地下水，並限制鑽井使用地下水，列管地號面積共 40,390 平方公尺。
- 二、96 年 8 月 27 日公告：公告鹽行段 1426-5 地號及鹽東段 809 地號為地下水受污染使用限制地區及限制事項，停止飲用或使用地下水，並限制鑽井使用地下水，列管地號面積分別為 208 及 546.91 平方公尺。
- 三、101 年 5 月 17 日公告：公告鹽行段 1420-1 地號為地下水污染控制場址，列管地號面積為 333 平方公尺。
- 四、101 年 5 月 17 日公告：公告鹽行段 1426-5 地號為地下水污染控制場址，列管地號面積為 208 平方公尺。
- 五、101 年 5 月 17 日公告：公告鹽東段 809 地號為地下水污染控制場址，列管地號面積為 546.91 平方公尺。
- 六、103 年 5 月 2 日公告：公告鹽行段 1426 及 1427-3 地號為地下水受污染使用限制地區及限制事項，列管地號面積共 2,166 平方公尺。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

表 8.1-1 公告場址資料彙整表

日期	文號	公告者	法源	內容摘要
94.02.23	府環水字第 0940028772 A 號	臺南縣政府	土壤及地下水污染整治法第 21 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本縣永康市鹽行段 1418、1419-5、1419-7、1420、1420-1、1420-2、1421、1422、1423、1424、1425、1492、1492-1、1493、1493-1、1494、1495、1496、1496-1、1496-2、1496-3、1496-4、1497、1498、1522-1、1522-2、1565、1565-2、1565-4、1566、1567、1568、1569、1569-2 地號等 34 筆地號，為地下水受污染使用限制地區及限制事項 ● 地下水包括四氯乙烯、三氯乙烯、1,1-二氯乙烯、順-1,2-二氯乙烯、氯乙烯等物質超過管制標準值，其中場址地號 1567 地下水含四氯乙烯超過管制標準，地號 1565、1566 地下水三氯乙烯超過管制標準，地號 1420-1 地下水順-1,2-二氯乙烯、氯乙烯濃度超過管制標準，並以計畫中推估最大擴散範圍及危害性考量為公告範圍
101.05.17	府環水字第 1010375098 B 號	臺南市政府	土壤及地下水污染整治法第 12 條第 2 項及同法施行細則第 10 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本市永康區鹽行段 1420-1 地號為地下水污染控制場址 ● 地下水中順-1,2-二氯乙烯 4.01 mg/L、氯乙烯 0.186 mg/L
101.05.17	府環水字第 1010374090 B 號	臺南市政府	土壤及地下水污染整治法第 12 條第 2 項及同法施行細則第 10 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本市永康區鹽行段 1426-5 地號為地下水污染控制場址 ● 地下水中四氯乙烯 0.375 mg/L、三氯乙烯 0.519 mg/L、1,1-二氯乙烯 0.238 mg/L、順-1,2-二氯乙烯 0.729 mg/L、氯乙烯 0.791 mg/L
101.05.17	府環水字第 1010135732 B 號	臺南市政府	土壤及地下水污染整治法第 12 條第 2 項及同法施行細則第 10 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本市永康區鹽東段 809 地號為地下水污染控制場址 ● 地下水中三氯乙烯 0.0575 mg/L
103.05.02	府環土字第 1030398481 C 號	臺南市政府	土壤及地下水污染整治法第 27 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本市永康區鹽行段 1426-0000 及 1427-0003 等 2 筆地號為地下水受污染使用限制地區及限制事項 ● 地下水中三氯乙烯 0.0701 mg/L、氯乙烯 1.08 mg/L、1,2-二氯乙烷 0.822 mg/L
103.05.21	府環土字第 1030398392 C 號	臺南市政府	行政程序法第 118 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 撤銷臺南市政府 101 年 5 月 17 日府環水字第 1010374090B 號公告臺南市永康區鹽行段 1426-5 地號為地下水污染控制場址之公告
103.08.25	府環土字第 1030466663 C 號	臺南市政府	土壤及地下水污染整治法第 12 條第 2 項暨同法施行細則第 10 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 公告本市永康區鹽東段 817 地號及鹽行段 1188-1 地號為地下水污染控制場址 ● 地下水中三氯乙烯 0.230 mg/L、氯乙烯 0.02491 mg/L、四氯乙烯 0.187 mg/L 及順-1,2-二氯乙烯 0.856 mg/L
103.12.02	府環土字第 1030972888	臺南市政府	行政程序法第 117 條	<ul style="list-style-type: none"> ● 撤銷臺南市政府 101 年 5 月 17 日府環水字第 1010375098B 號公告臺南市永康區鹽行段 1420-

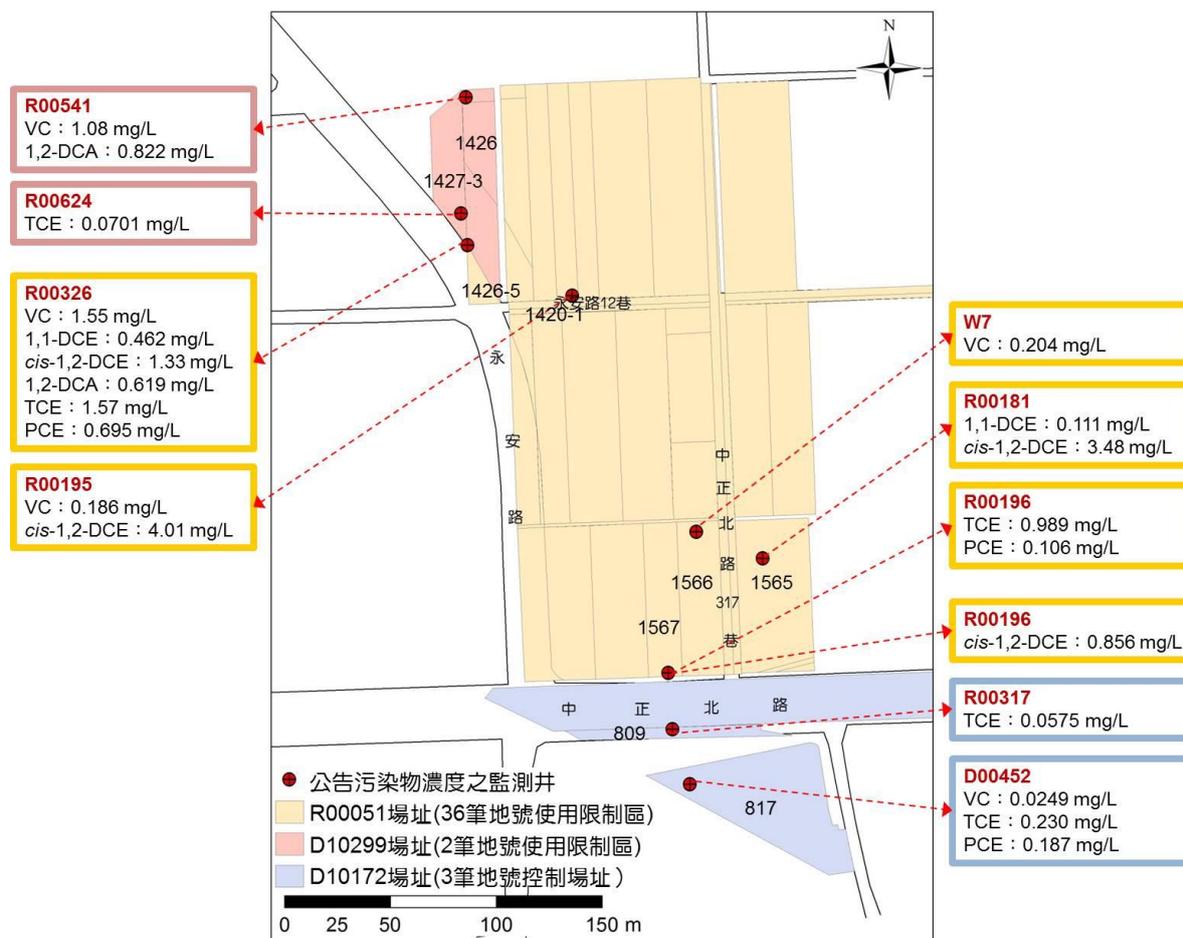


第八章：補充資料

	C 號			0001 地號為地下水污染控制場址之公告
--	-----	--	--	----------------------



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗



資料來源：環保署土壤及地下水污染整治網列管場址查詢 <http://sgw.epa.gov.tw/public/ContaminatedSitesMap/Default.aspx>

圖 8.1-1 地下水列管場址區域圖及公告之污染物最高濃度

表 8.1-2 計畫區域之公告列管場址彙整表

場址編號	場址名稱	地址	場址種類	狀態	場址面積 (m ²)	列管日期	土壤污染物	地下水污染物
R00051	永康區鹽行段 1418 等 36 筆地號土地 ^註	無	其他	地下水受污染限制使用地區及限制事項	41,145	2005/2/23	無	1,2-二氯乙烷；1,1-二氯乙烯；順-1,2-二氯乙烯；四氯乙烯；三氯乙烯；氯乙烷
D10299	臺南市永康區鹽行段 1426-0000 地號、臺南市永康區鹽行段 1427-0003 地號	臺南市永康區鹽行段 1426 及 1427-3 地號	其他	地下水受污染限制使用地區及限制事項	2,166	2014/5/2	無	1,2-二氯乙烷；三氯乙烯；氯乙烷
D10172	臺南市永康區鹽東段 0809-0000 地號-臺南市永康區鹽東段 0817-0000 地號-臺南市永康區鹽行段 1188-0001 地號	臺南市永康區鹽東段 809 地號、817 地號及鹽行段 1188-1 地號	其他	控制場址	19,325.27	2012/5/17	無	順-1,2-二氯乙烯；四氯乙烯；三氯乙烯；氯乙烷

註：原公告共 36 筆，因鹽東段 809 地號已另公告為控制場址，實際為 35 筆地號

資料來源：整理自行政院環境保護署土壤及地下水污染整治網列管場址查詢



<https://sgw.epa.gov.tw/ContaminatedSitesMap/Default.aspx>

- 七、103 年 5 月 21 日公告：撤銷鹽行段 1426-5 地號為地下水污染控制場址列管公告。
- 八、103 年 8 月 25 日公告：公告鹽東段 817 地號及鹽行段 1188-1 地號為地下水污染控制場址，列管地號面積共 19,325.27 平方公尺。
- 九、103 年 12 月 2 日公告：撤銷鹽行段 1420-1 地號為地下水污染控制場址列管公告。

8.2 場址名稱、地址、地號或位置及污染行為人及污染土地關係人資料

8.2.1 場址名稱

本計畫公告列管 3 場址，名稱分別為：

- 一、臺南市永康區鹽行段 1418 等 36 筆地號土地（地下水受污染使用限制區，場址編號 R00051）
- 二、臺南市永康區鹽東段 809 地號、817 地號及鹽行段 1188-1 地號（控制場址，場址編號 D10172）
- 三、臺南市永康區鹽行段 1426 及 1427-3 地號（地下水受污染使用限制區，場址編號 D10299）

8.2.2 場址地址、地號或位置

本計畫 3 處列管場址位於國道 1 號高速公路永康交流道西側約 200 公尺處（如圖 9.2-1 所示），R00051 場址包含地號：永康區鹽行段 1418、1419-5、1419-7、1420、1420-1、1420-2、1421、1422、1423、1424、1425、1492、1492-1、1493、1493-1、1494、1495、1496、1496-1、1496-2、1496-3、1496-4、1497、1498、1522-1、1522-2、1565、1565-2、1565-4、1566、1567、1568、1569、1569-2、1426-5 等 35 筆。

D10172 場址包含地號：永康區鹽東段 809 地號、817 地號及鹽行段 1188-1 地號等 3 筆。

D10299 場址包含地號：永康區鹽行段 1426 及 1427-3 地號。場址地號範圍套



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

繪及地理位置如前圖 8.1-1。

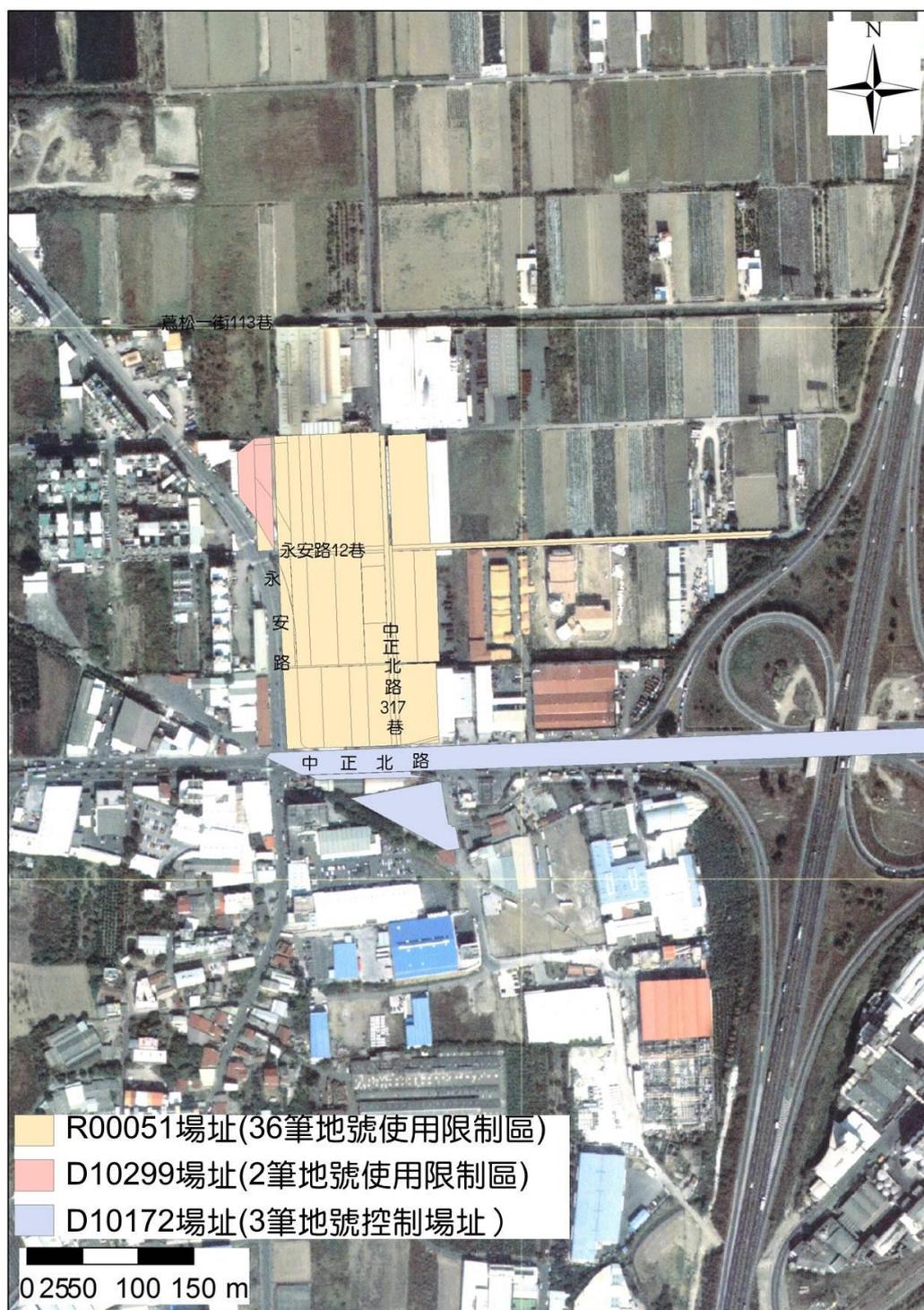


圖 8.2-1 本計畫區地下水列管場址位置圖



8.2.3 污染行為人資料

經環保局歷年執行之污染調查、污染源查證成果，顯示 D10172 場址之鹽東段 817 地號曾有錶殼製造公司設置，為污染源發生區，但該公司已於 85 年清算。R00051 場址為來自 D10172 場址污染降解產物之污染場址，僅有 D10299 場址污染行為人不明。

8.3 場址沿革、目前營運狀況及運作歷史

8.3.1 場址沿革

本計畫 3 處公告之地下水污染場址係為依環保局歷年調查、查證計畫成果，逐次公告之場址，歷年計畫及依其之公告整理如表 8.3-1 所示。

R00051 場址：係原臺南縣環保局依 93 年度「永康交流道中正加油站調查計畫」於中正北路南側至永安路 12 巷間之範圍調查結果，公告 34 筆地號為地下水受污染使用限制地區，其後 94 年度「94 年度永康市鹽行段 1418 等 34 筆地號之地下水受污染使用限制地區應變措施計畫」將污染調查範圍向南擴大至中正北路南側之匯豐汽車保養廠，依據調查結果於 96 年 8 月 27 日公告永康市鹽行段 1426-5 及鹽東段 809 地號等 2 筆地號土地為地下水受污染使用限制地區及限制事項。合併 2 次之公告範圍成為 R00051 所稱之「臺南市永康區鹽行段 1418 等 36 筆地號土地」地下水受污染使用限制地區及限制事項場址。惟因鹽東段 809 地號於 101 年 5 月 17 日已另公告為地下水污染控制場址，實際上 R00051 場址應包含 35 筆地號土地。

D10172 場址：包含永康區鹽東段 809、817 地號及鹽行段 1188-1 地號等 3 筆土地，係依「99 年度臺南縣永康市地下水受污染限制使用地區應變計畫」補充調查成果，於 101 年 5 月 17 日公告鹽東段 809 號土地為地下水污染控制場址，及於 103 年 8 月 25 日依據「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」調查成果，公告永康區鹽東段 817 號及鹽行段 1188-1 號等 2 筆土地為地下水污染控制場址，而合併為 D10172 場址。

D10299 場址：為依據「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」調查結果，於 103 年 5 月 2 日公告永康區鹽行段 1426 及 1427-0003 地號等 2 筆地號土地為地下水受污染使



應用產氫菌提升產氫量以加強含氮有機污染物還原脫氮效率：現地模場試驗

用限制區場址。

表 8.3-1 歷年計畫執行之行政管制

年度	計畫名稱	主辦機關	調查範圍	計畫內容	依據計畫成果之行政管制
90	地下水潛在污染源調查計畫	環保署	中正加油站內	潛在污染源調查(發現揮發性有機物污染)	—
91	地下水潛在污染場址調查與應變計畫	環保局	中正加油站	污染調查(確認氯化有機物污染)	—
92	加強基層環保建設辦理地下水污染防治工作計畫	環保局	中正加油站	污染調查 水文調查	—
93	永康交流道中正加油站調查計畫	環保局	中正加油站及大區域周界(中正北路南側至永安路12巷之間)	污染調查(範圍) 水文地質調查 地下水質化學	臺南縣環保局於民國94年2月23日公告永康鹽行段等34筆地號為地下水受污染使用限制區
94	94年度永康市鹽行段1418等34筆地號之地下水受污染使用限制地區應變措施計畫	環保局	中正北路南側(至匯豐汽車保養廠)至永安路12巷北側之間	應變措施 污染調查 場址概念模型建立	96年8月27日公告永康市鹽行段1426-5及鹽東段809地號等2筆地號土地為地下水受污染使用限制地區及限制事項
97	97年度臺南縣永康市地下水受污染使用限制地區應變計畫	環保局	中正北路南側至永安路12巷北側之間	應變計畫(操作維護) 定期地下水質監測	—
99	99年度臺南縣永康市地下水受污染限制使用地區應變計畫	環保局	A、B、C三區	應變計畫 補充調查： A、B區污染源補充調查 C區水文地質、污染源調查	101年5月17日公告3處地下水污染控制場址，分別為鹽行段1420-1、1426-5地號及鹽東段809號土地
101	101年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫	環保局	A、B、C、D四區	應變計畫 污染調查(範圍) 污染查證(B、C區)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 103年5月2日公告永康區鹽行段1426及1427-0003地號等2筆地號土地為地下水受污染使用限制區 2. 103年5月21日撤銷永康區鹽行段1426-5地號為地下水污染控制場址之公告 3. 103年8月25日公告永康區鹽東段817號及鹽行段1188-1號等2筆土地為地下水污染控制場址(因污染查證屬於污染來源明確者) 4. 103年12月2日撤銷永康區鹽行段1420-1地號為地下水污染控制場址之公告(因污染查證為污染行為人不明者)



年度	計畫名稱	主辦機關	調查範圍	計畫內容	依據計畫成果之行政管制
103	臺南市永康鹽行段及鹽東段地下水污染評估與調查計畫	環保署	A、B、C、D 四區	高污染區補充調查 污染源整治及傳輸 灌注技術開發評估	—

依據歷年場址公告時間先後，本計畫區分為 A、B、C 共 3 區（如圖 8.3-1 所示），A 區泛指 R00051 場址範圍（不包含鹽行段 1426-5 地號）、B 區為 D10172 場址、C 區為 D10299 場址加上鹽行段 1426-5 地號。歷年調查顯示計畫區有 2 處污染源，分別位於 B 區之鹽東段 817 地號以及 C 區之鹽行段 1426-5 地號附近區域。而從污染物種類之分布顯示 3 場址具有相關性，B 區鹽東段 817 地號（原為東南精密工業股份有限公司永康廠用地（以下簡稱東南公司）），目前為匯豐汽車停車場，以高氯數之 PCE、TCE 為主，屬於污染源區，A 區（R00051 場址，除鹽行段 1426-5 地號外）以低氯數之 *cis*-1,2-DCE 及 VC 為主，屬於 B 區污染源造成之污染團區，C 區之鹽行段 1426-5 地號（屬 R00051 場址，為永安路道路區）附近含高氯數之 PCE、TCE 及 1,1,2-TCA 等及其降解產物 1,2-DCA、*cis*-1,2-DCE 及 VC，顯示為不同於 B 區之污染源區，而 D10299 場址則以降解產物 1,2-DCA、VC 及 *cis*-1,2-DCE 濃度較高，為此 C 區污染源區下游之污染團區。

8.3.2 目前營運狀況

經歷年污染調查及查證，本計畫區除 B 區之鹽東段 817 地號曾為使用含氯有機溶劑工廠用地，屬於明顯潛在污染源外，其他區域無明確污染源。而 B 區潛在污染源工廠自 62 年設立營運至 85 年，已清算結束營業，協新汽車（匯豐汽車）於 95 年購入鹽東段 817 地號土地，作為南區銷售發車中心停車場。

A 區及 C 區土地使用包含加油站、汽車修護廠、工廠、道路及閒置空地，目前區內正執行「臺南市永康物流及轉運專區市地重劃工程」（以下簡稱物轉專區工程），A 區及 C 區土地範圍與物轉專區重疊面積 3.44 公頃，達兩區合計面積之 79.4%（如圖 9.3-2 所示），未重疊區為永安路既有道路區。與物轉專區重疊之土地目前交付臺南市地政局辦理市地重劃工程中，物轉專區市地重劃工程原預定工期為 106 年 4 月至 107 年 7 月，已展延至 107 年 12 月，目前計畫區現況如圖 8.3-3 所示。

物轉專區範圍內之地下水污染區為地下水受污染使用限制區，非屬於地下污染控制場址之管制區，依目前相關法令，並無要求工程開發前應提送相關文件予



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

環保主管機關審查或核備之規定，惟為避免污染擴大，地政局於規劃階段即向環保局提送「臺南市永康物流及轉運專區地下水污染防治應變必要措施計畫書」，提出施工期間每月定期執行5口監測井採樣分析，及設置污水處理設施，以處理因開挖作業如抽水作業抽出之地下水。



圖 8.3-1 本計畫場址分區



第八章：補充資料

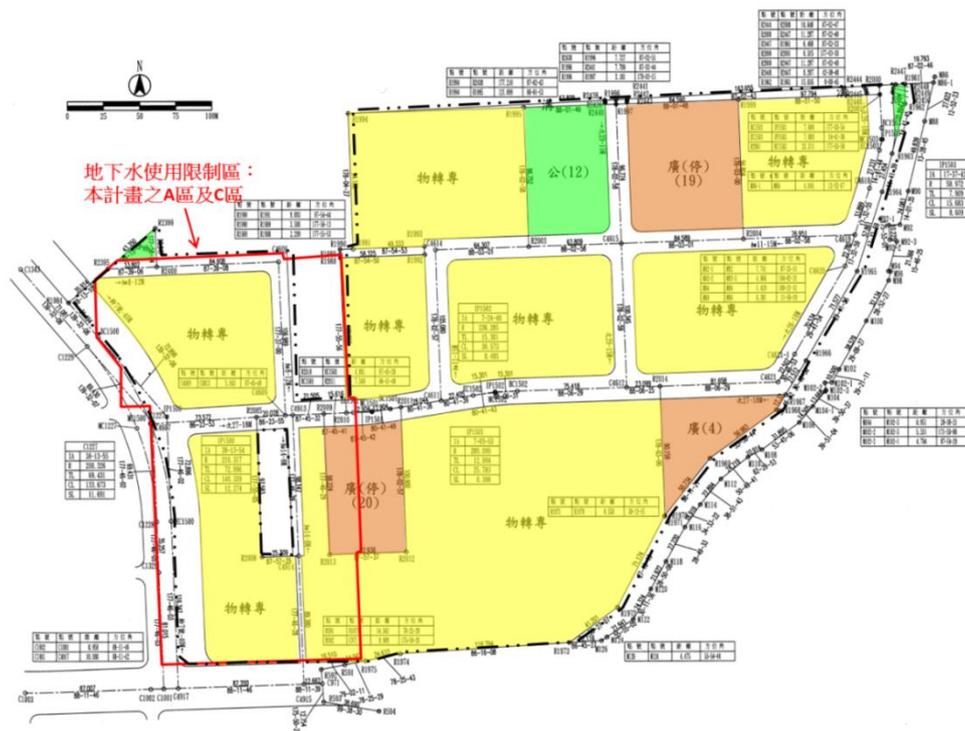


圖 8.3-2 物轉專區與本計畫地下水使用限制區位置圖



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

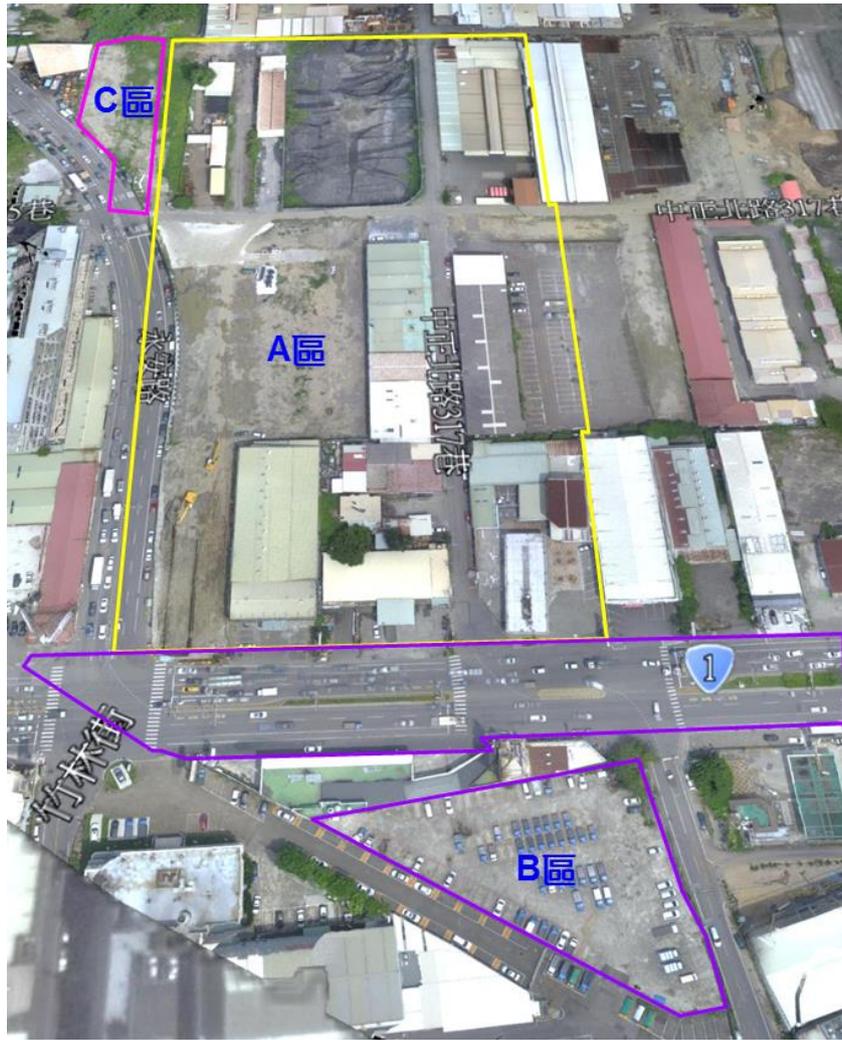


圖 8.3-3 本計畫區目前土地使用狀況空拍圖

8.3.3 運作歷史

本計畫場址運作歷史係節錄自「99 年度臺南縣永康市地下水受污染使用限制地區應變計畫」及「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」。「99 年度臺南縣永康市地下水受污染使用限制地區應變計畫」調查結果及全國事業廢棄物管理系統 (IWMS) 與環境保護許可管理資訊系統 (EMS) 製程調閱結果顯示，場址範圍內既存工廠並無使用含氯溶劑之記錄。因此，101 年度計畫進行場址內歷年所可能使用含氯有機溶劑之工廠追查作業，利用比對歷年航照資料與民眾訪談方式，蒐集歷年工廠所在地籍地號或工廠名稱，以釐清可能污染源為何。比對民國 64 年至民國 100 年航照資料 (如圖 8.3-4 及圖 8.3-5 所示)，將疑似工廠區域進行編號，各場區代碼之行業類別如表 8.3-2，並透過地籍資料調閱及工商查詢其歷年使用狀況，以釐



清可能污染源。

民國 64 年航照圖中可以發現，當時土地利用多屬於農地，在場址範圍內工廠位於 A 區的「鋼鐵廠」、「鋼鐵廠 A」、及位於 B 區的「錶殼製造業」及「瓦楞紙製造業」等 4 間。時至民國 71 年可發現於 A 區增加「製藥公司」，及現今鹽行段 1427 地號出現工廠，經訪談結果應為「廢油回收工廠」，在空拍圖中依稀可見油桶儲放。時至民國 85 年後，隨著永安路設置後（民國 75 年）都市更新發展及土地利用的重劃，場址區域內也出現許多工廠及民宅，在 A 區中得生製藥搬遷變為「汽車修護場」，新增「傢俱製造公司」、「水泥工廠」及「貨運公司」；而在 B 區的「錶殼製造業」已經解散，在 C 區新增三家「汽車修護場」。時至民國 91 年後，場址區內工廠大致無異。民國 95 年後，除在 A 區「汽車修護場」旁新增「皮革業」（皮革染色公司）外，時至現在場址內工廠沒有變異。

歷年航照結果顯示，場址內曾有工廠或現存工廠類別包括鋼鐵廠、汽車修理業、皮革業、加油站業、傢俱販賣、汽車販賣、錶殼製造業、水泥業、運輸業、瓦楞紙製造業、製藥業等行業，其中以鋼鐵廠、汽車修理業、皮革業、加油站業及錶殼製造業及製藥廠污染潛勢較高。

一、鋼鐵廠

場址內部共計有兩間鋼鐵廠，分別位於地號 1364 至 1367 等地號及 1368、1497 等地號，根據 EMS 及 IWMS 資料調閱顯示兩間鋼鐵廠製程皆為鋼線鍍鋅之流程。一般金屬加工於表面清洗時會採用溶劑或酸液進行表面油脂去除，經事業廢棄物清理計畫書及其製程調查訪談結果得知，此兩間鋼鐵廠皆採用酸液進行油脂去除，並非屬於高污染潛勢工廠。

二、汽車修理業

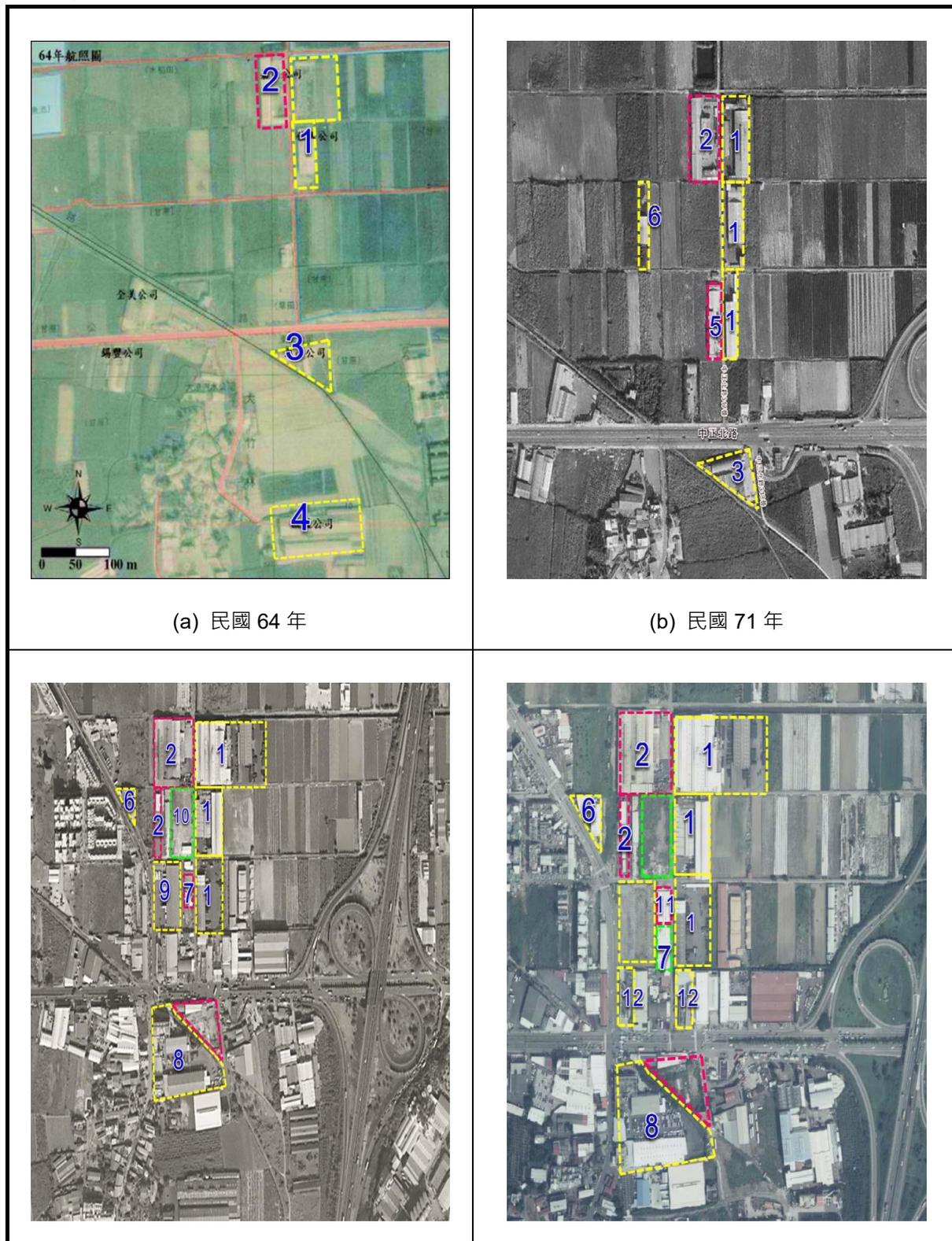
場址周邊有許多汽車保養廠，根據相關資料可知零件修護過程中，可能使用含氯溶劑，但經環境訪查後，所有汽車保養廠產生之廢棄溶劑、機油均由代清除業者統一收集處理。臺南市政府執行 99 年度應變計畫時，亦曾針對場址內各汽車修理業之廢棄物（廢棄溶劑及機油）進行抽驗，已排除含氯有機溶劑使用可能性。

三、皮革業



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

場址目前有 1 間皮革加工廠，位於地號 1496-4，該廠區製程乃針對動物皮革進行清洗及染色。由於該工廠設立時間較晚，其製程中所使用之溶劑亦非屬於含氯有機溶劑，且亦非位於高污染區域，非屬於含氯有機污染物之污染來源。

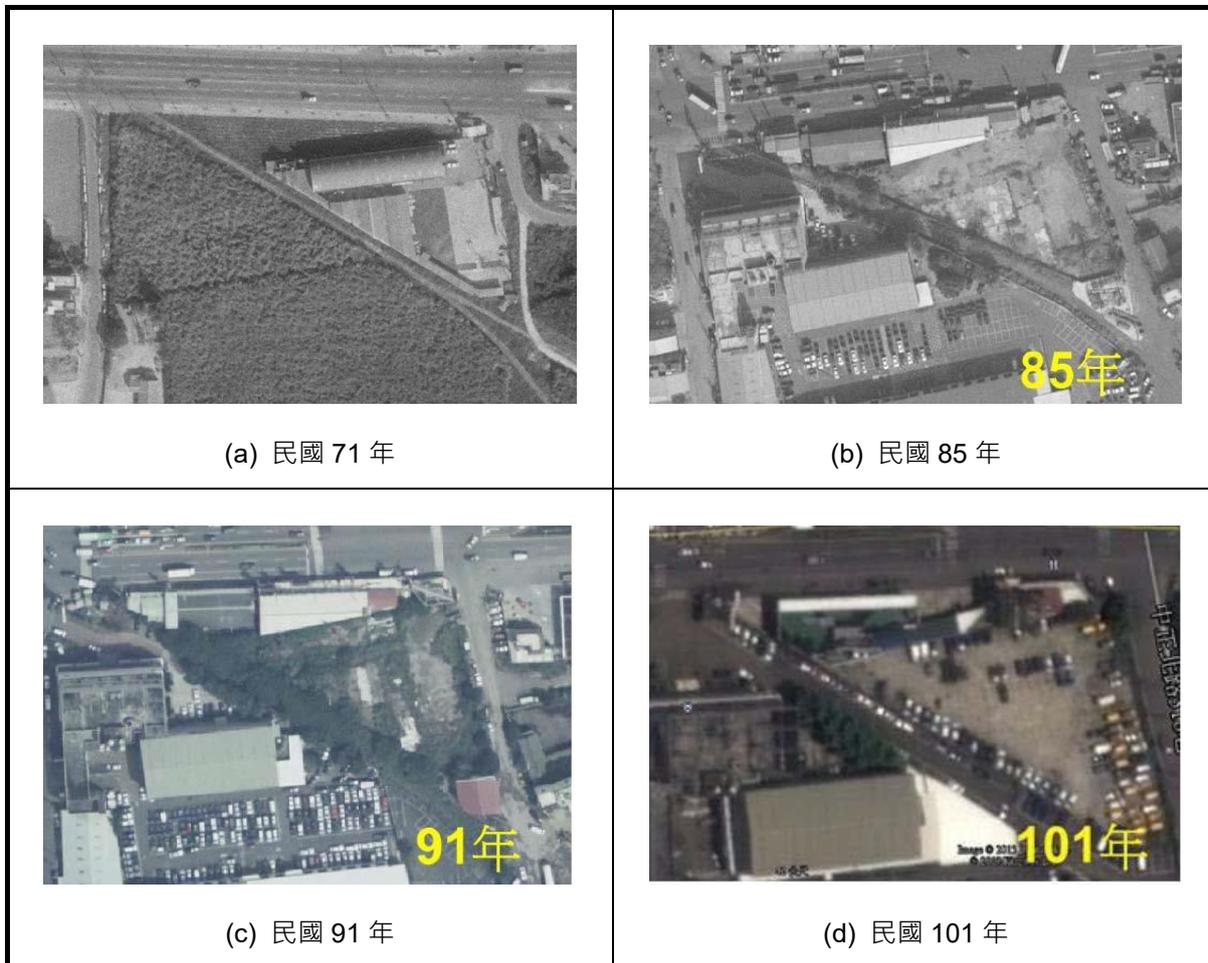




(c) 民國 85 年	(d) 民國 91 年
-------------	-------------

資料來源：「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」，臺南市環保局，102

圖 8.3-4 場址歷年航照圖



資料來源：「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」，臺南市環保局，102

圖 8.3-5 鹽東段 817 地號歷年航照圖

表 8.3-2 航照圖廠商編號類別對照表

編號	行業別	原物料使用	備註
1	鋼鐵業	鋅、黑鐵線、鹽酸、潤滑粉	
2	鋼鐵業 A	鋼線、鹽酸、氫氧化鈣、氫氧化鈉、石灰	
3	錶殼製造業	不明	
4	瓦楞紙製造業	不明	
5	製藥廠	中藥材、植物精油、基質、自來水、不織布、砒啶	



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

6	廢油回收	不明	
7	汽車修護廠	機油	
8	汽車販賣場	無	
9	貨運公司	無	
10	水泥公司	不明	
11	皮革加工	皮革、樹脂、塗料、染料、光油、溶劑	
12	加油站	汽油、柴油	

資料來源：「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」，臺南市環保局，102



四、加油站業

場址內共計曾有 3 間加油站，其中 1 間已廢棄。加油站使用原料為汽油及柴油，並無需使用含氯溶劑，僅有於管線或油槽清洗時可能會使用含氯溶劑進行清洗。然根據訪談結果顯示，加油站業者皆採用同類油品進行油槽清洗，且污染時間及地理位置與加油站相關性低，應可排除含氯有機溶劑污染來源。

五、錶殼製造業

錶殼製造業（東南公司）成立於民國 62 年並已於民國 85 年解散，工廠位於地號 817 地號，主要產品為手錶零件，因其具有錶殼製造之營業項目，錶殼之製做清洗脫脂是必需之設備，常用之脫脂劑包含溶劑類脫脂劑、鹼性脫脂劑及乳化劑脫脂劑等三種，其中溶劑脫脂劑最常使用之溶劑為 PCE、TCE 或二氯甲烷（MC），因此該區域為高污染潛勢工廠。

六、製藥廠

製藥公司在民國 64 年（1975 年）成立於臺南縣永康市、開始設廠，工廠設置位置為 1496 地號。主要研發製造之產品包括：高科技水性貼布、油性貼布、彈性透氣貼布、美容護膚貼片、生物科技保養品及健康食品。於民國 82 年於遷至永康工業區，目前有二個廠房生產產品中。

101 年度計畫彙整上述工廠相關製程及歷年調查成果，配合污染團分布位置判別其含氯污染之潛勢如表 8.3-3 所示，結果顯示錶殼製造業、製藥業及廢油回收之高污染潛勢場區目前皆已改變用途。

東南公司於 62 年於現在之鹽東段 817 地號設置錶殼製造工廠，由航照圖研判，64 年時附近除錶殼製造工廠外，其餘週遭應為農地。至民國 85 年該工廠拆除後 817 地號由航照圖判別為空地，其旁側 833 地號則成立汽車販賣中心迄今。817 地號由民國 85 年至民國 101 年期間之航照圖皆顯示為無人使用之空地，至民國 101 年後迄今則為汽車停放之區域，自 85 年迄今皆無設置疑似廠房或住宅等建築物。該地號地籍資料及 101 年度當地居民訪談顯示，自民國 64 年起地號 817 地主登記為東南股份有限公司，於民國 85 年時轉賣為私人地主而後作為銀行貸款抵押，至 95 年後方由協新汽車公司將其買下，作為其停車場用途使用迄今。



應用產氫菌提升產氫量以加強含氯有機污染物還原脫氯效率：現地模場試驗

表 8.3-3 污染潛勢工廠篩選

公司名稱	業務種類	靠近污染源	採含氯製程	99 年調查結果	污染潛勢
鋼鐵業	鋼絲鍍鋅	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
鋼鐵業 A	鋼絲鍍鋅	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
錶殼製造業	錶業清洗	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	高
造紙業	瓦楞紙生產	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
製藥廠	貼布生產	<input checked="" type="checkbox"/>	未明朗	<input type="checkbox"/>	中
廢油回收	--	<input checked="" type="checkbox"/>	未明朗	<input type="checkbox"/>	中
汽車修護廠	汽車修護	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
汽車販賣	汽車販賣	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
貨運公司	轉運站	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低
水泥公司	--	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	低

資料來源：「101 年度臺南市永康區鹽行段及鹽東段地下水受污染使用限制地區污染源調查、查證及應變必要措施計畫」，臺南市環保局，102

8.4 場址可能污染來源

本計畫區 3 列管場址污染具有相關性，有 2 處場址為可能污染來源，分別位於本計畫 B 區之鹽東段 817 地號及 C 區之鹽行段 1426-5 地號附近區域。如 8.3 節所述，由地籍圖及航照圖皆指出設於鹽東段 817 地號之東南公司為高潛勢污染區域，然鑒於該公司於民國 85 年即已清算，其相關製程等資料皆無法取得。根據臺南市政府「99 年度臺南縣永康市地下水受污染使用限制地區應變計畫」調查結果顯示該工廠其營業項目包含錶殼之製造及買賣、各種精密機械及其零件之買賣及前各項有關之進出口業務，而其中錶殼製造製程中包括金屬清洗設備，常使用有機溶劑清洗錶殼上之油脂，含氯有機溶劑因具有易回收、損失小、滲透性強、易與水分離等優點，常被使用於金屬清洗製程中。101 年度計畫曾與前東南公司沖床操作員訪談，根據口述，在清洗錶殼製程確有使用溶劑，根據該員工研判該溶劑為 TCE。此外，根據訪談者口述該溶劑氣味與早期乾洗業使用之溶劑相似，乾洗業常使用之溶劑亦包含 PCE。訪談中亦提到東南公司建廠之前，土地前身為製酸工廠，但根據文獻探討，製酸製程並不會產生 PCE 及 TCE，**研判污染來源應為東南公司，並經環保局確認**。本計畫 A 區污染物多以 *cis*-1,2-DCE 及 VC 存在，且僅於 A 區與 B 區交界處曾發現有 TCE 之污染，由於代謝產物 *cis*-1,2-DCE 及 VC 於地下水中傳輸速率大於 TCE 及 PCE，因此 A 區污染來源多為 B 區污染源



之代謝產物，並隨地下水流向擴散至 A 區。

由污染物種類研判及 101 年度計畫同位素鑑識結果，C 區污染不同於 B 區及 A 區，屬於另一污染源。由民國 71 年航照圖可發現於現今鹽行段 1427 地號出現工廠，101 年度計畫時訪談結果應為「廢油回收工廠」，歸為具中等污染潛勢。隨著永安路設置後（民國 75 年）都市更新發展及土地利用的重劃，目前屬於永安路之 1427-1 地號為原來廢油回收工廠使用土地分割出來之土地，永安路之 1426-5 地號則為與原 1427 地號毗鄰之 1426 地號所分割出來，而本計畫區歷年地下水質調查，顯示此區域永安路道路區為 C 區可能污染源區。