




## 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

# 開發加強式現地生物整治技術處理鉻

## 污染地下水

期末報告（定稿）

主辦單位： 行政院環境保護署  
專案執行單位：元智大學／生物科技與工程研究所  
專案主持人：簡志青教授  
專案執行期間：108 年 1 月 4 日起至  
108 年 11 月 30 日止

中華民國 108 年 12 月 印製





# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書   ☐期中報告   ☒修正計畫書   ☒期末報告   **審查意見回覆對照表**

計畫年度	108 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input 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：簡志青   NO：B3	
計畫名稱	開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水		
委員審查意見		計畫單位回覆	
<p>委員一</p> <p>1. 本期末報告對計畫執行現況、流程及方法說明具體。</p> <p>2. 計畫後續執行工作項目及內容已於 p.69 說明。</p> <p>3. 計畫執行進度與預定進度查核表大致相符。</p> <p>4. 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。</p> <p>5. 本期末報告所提出的研究內容與計畫目的相符。</p> <p>6. 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。報告書中指出 (p.66)Cr 的轉化是以還原為主，而非生物吸附，此為相對重要的現象觀察。還原態的 Cr 與微生物顆粒之間的關係</p>		<p>1. 感謝委員的審查與評述。</p> <p>2. 感謝委員的審查與評述。</p> <p>3. 感謝委員的審查與評述。</p> <p>4. 本計畫執行進度大致上均符合計畫書規劃，並無落後之情事。計畫執行期間除了於期中報告前，因為實場地下水之取得因素，抽取鉻污染地下水總 DNA 已進行宏基因組分析之實驗較原本規劃慢約一個月，但後續實驗與分析已趕上規劃之進度，因此亦無重大之困難點，此部分補充於修正稿結論 (請參見修正稿 p. 69)。</p> <p>5. 感謝委員的審查與評述。</p> <p>6. 感謝委員的建議，修正稿在結論與建議章節已再作補充說明，以期更為具體 (請參見修正計畫書 pp. 69-71)。誠如委員所指出，六價鉻減少的轉化主要為還原所導致，為非常重要之觀察現象。許多微生物可還原金屬並合成奈米金屬顆粒，可利用穿透式電子顯微鏡觀察還</p>	



建議說明。本系統的操作方式也建議討論(例如是 P&T 或是 in situ... 等)(還原態若被自然條件所改變，Cr 的行為是否受影響?)。

原之金屬與微生物之間的交互作用 (e.g. 胞內或胞外累積)。本計畫雖未探討此部分，然而本實驗室目前仍致力於微生物還原金屬並合成為奈米金屬顆粒之研究，目前主要聚焦在銅與貴金屬，將來有機會也會再檢視鉻還原之機制。

本研究之操作為在溶液中進行之微生物金屬還原作用，目前以 P&T 為主。當然若能在 in situ 操作，對實場會更具應用性，因此本計畫也初步探討固定化菌株之還原能力(請參見修正稿 p. 63-67)，以其將來可應用於 in situ 操作。被微生物還原後之  $\text{Cr}^{3+}$  一般而言，不易再被氧化，可降低生物利用度與對生物的毒性。

7. 本計畫執行有研究人員(學生或助理)參與。

7. 在執行計畫的同時，培育人才一直是研究所教育的重點。本實驗提供參與之學生一個完整的工作平台。直接提供參與人員各種新的生物科技研究方法，得到微生物學與環境生技的知識與技能之培訓。實驗室參與其他研究計畫之學生，以及與本實驗室有互動之其他實驗室同學，亦能從此研究中提供更多面向的環境微生物與生物整治關聯之知識與思考。

8. 本計畫的學術產出為：本期末報告與國內外研討會論文。

8. 本計畫的學術產出與規劃符合，包括期中報告與期末報告，以及國內外研討會論文。另外目前也亦開始撰寫將投稿於 SCI 期刊之論文，預計明年第一季可完成投稿。

9. 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。

9. 在執行計畫的同時，培育人才一直是研究所教育的重點。本實驗提供參與之學生一個完整的工作平台。直接提供參與



<p>10. 本期末報告並未對研究成果提出專利申請的說明，也未說明技術轉移的情況。</p> <p>11. 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>人員各種新的生物科技研究方法，得到微生物學與環境生技的知識與技能之培訓。實驗室參與其他研究計畫之學生，以及與本實驗室有互動之其他實驗室同學，亦能從此研究中提供更多面向的環境微生物與生物整治關聯之知識與思考。</p> <p>10. 本計畫之成果並未規畫申請專利，目前計畫之成果亦尚未移轉。本計畫部分為延續先前與富立業工程顧問公司執行之科技部應用型產學計畫，本實驗室長期與富立業工程顧問公司保持良好之產學互動關係。將來希望有機會能將此計畫之成果推廣出去，並繼續進一步的研究相關技術。</p> <p>11. 目前對重金屬鉻污染的規範，仍然以總鉻濃度為主，因此雖然本計畫可降低鉻污染對生物毒性的影響，對現階段政策上無法有具體的影響與效益。將來可進一步探討毒理的效應，以及細胞固定化技術以期將還原後之六價鉻從環境中移除，方能彰顯其效益。</p>
<p>委員二</p> <p>1. 此報告之圖及表之格式及陳述說明仍須改進，以提升報告品質。例如圖表陳述有些與表格間有空行有些則無、圖表陳述格式跳頁未加調整、圖標 AB 等不符一般性標示、圖表陳述竟有討論說明在其中、文字與圖表之排版雜亂、檢量線範例圖未有 XY 軸座標說明且標題出現 5 ppm 標示等。</p> <p>2. 此計畫整體成果仍屬於研究性質階段，以廢水處理之角度進行探討。然而此計畫補助之最終目標為提供實務應用上之技術，請明確於結論中擴大</p>	<p>1. 感謝委員的審查與提醒。在修正稿已依委員之建議改進圖表之陳述說明，包括委員提到表格間空行問題，圖表陳述格式調整與標示排版等，也同時重新檢視所有圖表的格式與陳述說明，並盡力提升報告品質。</p> <p>2. 感謝委員的審查與指導，本計畫研提時即將屬性定位為研究型計畫，並開發將來可供應用之技術，因此現階段之成果尚無法直接應用於工程實務上，後續之規劃與建議依委員之建議說明於結論與</p>



<p>說明此計畫之成果，並且針對研究成果與地表下污染整治工程實務應用關聯進行說明或工程應用上如何執行提出規劃建議。</p> <p>3. 結果呈現說明皆未有任何與文獻間之討論，多以所獲得之結果直接描述，此部分可加強。</p>	<p>建議章節（請參見修正稿 pp. 69-71）。</p> <p>3. 感謝委員的建議，在修正稿中已加強與最新相關文獻之討論。</p>
<p>委員三</p> <p>1. 根據六價鉻濃度對菌株生長及抑制作用之試驗結果，是否可依菌株生長及 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 之濃度變化間，歸納或建議研究選用之菌株最佳之生長與轉換 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 之條件。</p> <p>2. 請補充說明 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 之轉換率為何？未來應用於實場時，諸多環境因子將會影響 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 之轉換，期中 <math>\text{Cr}^{+3}</math> 是否會再氧化成 <math>\text{Cr}^{+6}</math>？微生物代謝過程之產物變化，是否亦會影響 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 之還原或是 <math>\text{Cr}^{+3}</math> 之氧化作用？</p> <p>3. 計畫結論提及可應用於實場生物整治，是否可具體提出建議或執行方案，以利後續執行成果之展現。</p>	<p>1. 感謝委員的審查與建議，從目前所得到的研究結果，在培養基中以 <i>Ochrobactrum</i> sp. strain 71 較佳，其轉換 <math>\text{Cr}^{+6}</math> 在富營養源的條件(如豐富培養基及添加適當電子供應者之緩衝液)下效率極高，然而固定化後在實際地下水轉換之效率則稍低(約 50%)，後續可針對此一部份作進一步的探討。</p> <p>2. 兩株菌在富營養源的條件((如豐富培養基及添加適當電子供應者之緩衝液)，<math>\text{Cr}^{+6}</math> 之轉換率極高，能達到幾乎 100%，在無豐富營養源(無電子供應者)之緩衝液則無法還原 <math>\text{Cr}^{+6}</math>。固定化後在實際地下水轉換之效率則稍低(約 50%)。被微生物還原後之 <math>\text{Cr}^{3+}</math> 一般而言，不易再被氧化，可降低生物利用度與對生物的毒性。</p> <p>3. 感謝委員的建議，由於目前對重金屬鉻污染的規範，仍然以總鉻濃度為主，因此雖然本計畫可降低鉻污染對生物毒性的影響，現階段之成果尚無法直接應用於工程實務上。將來可進一步探討毒理的效應，以及細胞固定化技術以期將還原後之六價鉻從環境中移除，方能彰顯其效益，後續之規劃與建議說明於結論與建議章節。</p>





#### 委員四

- |  |  |
|--|--|
| <p>1. 計畫擬開發生物菌株，應用於鉻污染地下水之整治。完成之工作包含 2 株菌分離、定序、含鉻水中生長曲線及還原鉻的能力，營養源對鉻之還原能力影響，鉻污染地下水中微生物生物相，固定化菌株對地下水中鉻之還原能力等實驗測試。實驗工作方向多。</p> | <p>1. 感謝委員的審查與評述。本研究依計畫書規畫執行，完成進度與計畫預定查核表大致均相符。</p>  |
| <p>2. 本計畫應用基因組定序技術，分析地下水中微生物生物相，是一個很好之嘗試；建議可以探討主要微生物在鉻污染地下水中扮演之角色。</p>   | <p>2. 感謝委員寶貴的意見，誠如委員所提到，基因組定序技術目前已廣泛應用於環境生物技術。我們也規劃將來能從 NGS 得到的微生物族群數據。分析並探討在污染現址微生物可以扮演的角色。</p>   |
| <p>3. 本計畫工作方向多，建議後續可以針對重要研究子題，深入研析。例如，膠體固定化菌株，為何選用 TMOS 及 MTMS？有無其他替代材料？固定化後，使用期限及效率，實場水質影響，以及優化使用操作條件等。</p>                 | <p>3. 感謝委員的審查與寶貴的建議，的確本計畫最重要的一個延續子題為固定化菌株於實場污染整治的應用，限於本計畫期程，我們僅初步探討選用之固定化材質與還原效率(請參見修正稿 pp. 29-30；pp. 63-65)，後續將再爭取研究計畫與經費，納入委員在建議的方向，延續此一子題，期望能與實務應用整合。</p> |

#### 委員五

- |   |  |
|---|--|
| <p>1. 整體而言，期末報告進度符合預期且報告內容成果豐碩，為整體報告撰寫品質及編輯可再加強。</p>  | <p>1. 感謝委員的審查與評述。修正稿已參照委員之建議加強撰寫品質與編輯，包括圖表的格式與排版及陳述，盡力提升報告品質。</p>  |
| <p>2. 建議本計畫應針對所開發技術未來實際應用於重金屬污染地下水整治的策略進行整體概念說明，如果是 pump-and-treat 方式，本計畫所開發技術和現行使用技術的優劣比較為何？</p> | <p>2. 本計畫目前使用之實驗均為實驗室進行，為離地之策略，較接近 P&amp;T 方式。本計畫也初步探討固定化菌株之還原能力(請參見修正稿 pp. 63-65)，以其將來可應用於 in situ 操作。目前對重金屬鉻污染的規範，仍然以總</p> |



<p>3. 建議應以研究結果(圖 4.19-4.20)說明篩選菌株之還原鉻重金屬之機制為何？</p> <p>4. 應說明清楚圖 4.21 中篩選菌株對總鉻重金屬吸附機制。是否有針對吸附之總鉻進行脫附後再量測並進行總鉻質量平衡以釐清是否為吸附或吸收。</p> <p>5. 有關 4.6 節 應說明圖 4.24 的目的，並說明為何最後選定 75%之 MTMS? 另外固定化的實驗設計、過程與結果亦應說明清楚。圖 4.26 的說明亦應再釐清。為何還原六價鉻重金屬在 12 小時左右即停止？是還原或吸附吸收？</p>	<p>鉻濃度為主。本計畫針對毒性較強之六價鉻進行生物還原，可降低生物利用度與對生物的毒性。降低鉻污染對生物毒性的影響，將來可進一步探討毒理的效應，以及細胞固定化技術以期將還原後之六價鉻從環境中移除，進行實場鉻污染之整治。</p> <p>3. 感謝委員的建議，委員所言甚是，圖 4.19 與圖 4.20 可用來解釋，電子供應者是微生物還原六價鉻必須之成分，我們已將此機制加入修正之期末報告(請參見修正稿 pp. 53-55)。</p> <p>4. 感謝委員的指導，本研究篩選之兩株本土菌株均可產生胞外多醣體，應有部分與重金屬吸附相關，然微生物吸附重金屬之機制非常複雜，吸附之金屬亦無法簡單步驟將其脫附，實無法僅以此研究計畫所進行的幾個實驗釐清其機制，但委員之意見非常切入探討微生物與重金屬交互作用之核心問題，也是我們將來希望繼續深入探討的領域。</p> <p>5. 感謝委員的指導，選定 75%之 MTMS 是因為其膠體軟硬度最適合使用(請參見修正稿 p. 64)。固定化的實驗設計與過程詳述於修正稿第三章研究方法與過程(請參見修正稿 pp. 28-30)。關於固定化菌株還原六價鉻停止，是還原或吸附吸收，唯一非常重要且中肯之問題。初步觀察應為還原作用(或還原後吸附)，在後續設計固定化菌株研究的實驗時，將會特別重視此一議題。</p> <p>6. 感謝委員的指導，圖 4.27(A)Y 軸座標為 concentration (ppm)，已在修正稿中</p>
--	---





<p>6. 圖 4.27(A)的 Y 軸座標？圖 4.27 結果亦應說明清楚有關六價鉻重金屬是被還原或吸附吸收？</p>	<p>修正。圖 4.27 顯示測量總鉻與六價鉻，經菌株處理後，總鉻減少的比例較六價鉻濃度減少的比例少非常多，指出污染地下水之六價鉻確實被菌株還原成較為無毒性之三價鉻(請參見修正稿 p. 67)。</p>
--	---



<b>專案性質</b>		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		<b>專案類別(單選)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	
<b>研究主題</b>		<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他					
<b>申請機構系所</b>		元智大學 生物科技與工程研究所					
<b>機構地址</b>		桃園市中壢區遠東路 135 號					
<b>專案主持人</b>		簡志青		<b>職等／職稱</b>		教授	
<b>協同主持人</b>				<b>職等／職稱</b>			
<b>專案名稱</b>	<b>中文</b>	開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水					
	<b>英文</b>	Development of enhanced in situ bioremediation strategy for chromium contaminated groundwater					
	<b>關鍵字</b>						
<b>執行期程</b>		自 民 國          1 0 8          年          1          月          4          日 起 至 民 國          1 0 8          年          1 1          月          3 0          日 止					
<b>專案主持人</b>		姓名：簡志青                      Email： <a href="mailto:ccchien@saturn.yzu.edu.tw">ccchien@saturn.yzu.edu.tw</a> 專線：03-3638800 轉 2184 手機：					
<b>專任助理</b>		姓名：                      Email： 專線： 手機：					
<b>經費分析總表</b>  (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)		<b>實際支用經費</b>		<b>第一年金額</b>	<b>第二年金額</b>	<b>編列說明</b>	
		<b>1.</b>	<b>人事費用</b>	332,000		(1~5 項相加之 50%為限)	
		<b>2.</b>	<b>貴重儀器使用含維護費</b>	0		(與計畫實驗相關)	
		<b>3.</b>	<b>消耗性器材與主要費用</b>	337,819		(與計畫主體相關)	
		<b>4.</b>	<b>其它研究相關費用</b>	0		(含差旅與租賃費用)	
		<b>5.</b>	<b>雜支費用</b>	12,000		(1~6 項相加之 5%為限)	
		<b>6.</b>	<b>行政管理費</b>	68,181		(1~5 項相加之 10%為限)	
		<b>7.</b>	<b>自籌款</b>	0		(自行籌備款項)	
		<b>申請補助金額(1~6 項)</b>		750,000		<b>總金額：750,000</b>	
<b>計畫總金額(1~7 項)</b>		750,000		<b>總金額：750,000</b>			

專案主持人(簽名及蓋章): \_\_\_\_\_ 日期: \_\_\_\_\_



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水



## 研究成果中英文摘要

### 中文摘要

重金屬的污染是造成環境浩劫的重要主因之一，在綠色科技被已開發國家視為極重要之研究課題的今天，對於重金屬造成的環境污染的問題當然也日益受到重視。由於工商業的迅速發展與廢水不當排放或有害廢棄物不當棄置，土壤與地下水的污染也伴隨而來。近年來台灣較受到關注的重金屬包括鎘(Cd)、鉻(Cr)、銅(Cu)、汞(Hg)、鋅(Zn)、鎳(Ni)、鉛(Pb)及砷(As)等並列入台灣「土壤及地下水污染整治法」之規範。鉻存在於環境中以六價鉻之毒性最高，而六價鉻則多以具高溶解性、高毒性且具致癌性之鉻酸鹽形態存在，因此受六價鉻污染的環境與地下水必須立即加以整治，以避免造成環境生態的衝擊進而危害到人體之健康。傳統的整治技術以物理及化學方法為主。相較於物理與化學整治方法，生物整治法具有操作容易、高經濟效益以及環境友善等易受社會大眾接受的優點。因此，開發使用或結合生物整治的復育技術為經濟可行之方案，在應用上亦最具發展潛力。

本計畫之研究目的為開發可應用於鉻污染之生物整治的微生物族群與建置適合於用於整治微生物之生存環境。執行成果包含本土污染環境之鉻耐受菌之篩選與分離純化培養以及將其應用於地下水六價鉻還原成較無毒性三價鉻。同時也評估生物刺激法(例如添加還原鉻酸鹽之營養源)與生物強化法(本土鉻還原菌與產氫菌的培養與固定化)之可行性。評估結果顯示本實驗室由鉻污染土壤分離之本土菌株(*Ochrobactrum* strain 71)具有極強之六價鉻還原能力。由次世代定序分析鉻污染地下水顯示仍具有極豐富之微生物多樣性，但鉻還原菌之族群數量以及環境不足以提供六價鉻之還原。添加營養源或電子供應者(如 NADH)可提供微生物還原六價鉻之環境。細胞固定化與生物刺激法的成果在未來將可提供協助規劃鉻污染地下水之生物整治策略。

關鍵字：鉻污染、微生物復育、生物刺激法、生物強化法、次世代定序





## 英文摘要 (Abstract)

Heavy metal contamination is one of the main concerns of environmental hazards, and become an important issue in sustainable green technology. Soil and groundwater pollutions is accompanied by the rapid development of commerce and industry and also from improper disposal of waste water and hazardous materials. Metals include arsenic, cadmium, chromium, mercury, nickel, lead, zinc and copper are major concerns in Taiwan in recent years and is under the regulation of the “Soil and Groundwater Pollution Remediation Act”. In the environment, hexavalent chromium Cr (VI) is existed in the form of chromate and is highly soluble, toxic and carcinogenic. Therefore, groundwater and environment when contaminated by hexavalent chromium, actions need to apply immediately to avoid the adverse impact of environmental ecology and human health. Traditionally, physical and chemical process are widely applied for remediation for heavy metal contamination. Compared to physical and chemical process, bioremediation is an environmentally friendly, easy to operate and very economic and so is more acceptable to general public.

The aim of this study is to develop a microbial consortium and a suitable environment that can be applied to the bioremediation of chromium pollution. The results of this project include: (1) Collection and characterization of chromium contaminated groundwater; (2) Isolation and characterization of indigenous chromium reducing bacteria for application of bioremediation of hexavalent chromate contaminated environment; (3) Cultivation of acidophilic bacteria (*Acidithiobacillus* sp.); (4) Extraction of total microbial DNA and analysis of microbial community of contaminated groundwater; (5) Evaluation of chromate reduction ability by resting cells; (6) Immobilization of cells in silica gel for bioremediation purpose and (7) Evaluation of chromate reduction using chromium contaminated groundwater by immobilized cells. The outcome of this project will be able to provide the microbial diversity of chromate contaminated environment and advise the strategy for bioremediation.

Keywords: Chromate contamination, Bioremediation, Biostimulation, Bioaugmentation, Next Generation Sequencing



# 行政院環境保護署

## 土壤及地下水污染研究與技術提補(捐)助計畫

### 目次

	頁次
計畫成果中英文摘要(簡要版).....	I
中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目次 .....	III
表次與圖次.....	IV
表次 .....	IV
圖次.....	V
(一)前言與文獻回顧.....	1
(二)研究目的 .....	17
(三)研究方法與過程.....	19
(四)結果與討論.....	31
(五)結論與建議.....	69
(六)附錄.....	73
(七)參考文獻.....	81
專案成果績效自評表.....	87



## 表次與圖次

### 表次

表 1.1 工程之生物復育技術一般所需之基礎條件.....	3
表 1.2 生物復育技術之相關整治工程法及原理.....	4
表 1.3 生物復育技術之優劣勢.....	5
表 1.4 六價鉻於國際組織之列管危害類型及劑量限值.....	7
表 3.1 MTFM (Modified Thiobacillus Ferroxidans Medium)培養基.....	22
表 3.2 菌株分離所使用之土壤重金屬之濃度(ppm).....	24
表 3.3 PBS buffer 配方.....	26
表 3.4 16S rRNA 基因 V3-V4 PCR 使用之引子與實驗條件.....	28
表 4.1 環保署列入規範的重金屬及管制標準濃度.....	31
表 4.2 土壤及地下水之八大重金屬污染物質現行制標準.....	32
表 4.3 地下水之水質基本性質分析.....	33
表 4.4 本實驗使用之工業電鍍廢水所含之各種重金屬含量.....	35
表 4.5 地下水樣本微生物菌相以 16S rRNA 基因進行 NGS 之有效序列分析...	59
表 4.6 檢體(S6-2 與 Syuan-2)在不同分類階層的菌種比對.....	59
表 4.7 檢體 S6-2 在不同分類階層的菌種比對.....	60
表 4.8 檢體 Syuan-2 在不同分類階層的菌種比對.....	61



## 圖次

圖 1.1 微生物抵抗鉻離子毒性之機.....	9
圖 1.2 細菌中具催化還原六價鉻之氧化還原酶.....	11
圖 1.3 非經培養方式探討微生物多樣性的主要方法與策略.....	14
圖 1.4 利用次世代定序(NGS)技術評估環境樣本之菌相流程示意圖.....	15
圖 3.1 本年度之研究架構圖.....	19
圖 3.2 本年度研究之工作進度甘梯圖.....	20
圖 3.3 用來篩選純化本土嗜酸菌之樣本來源.....	22
圖 3.4 Strain 71 與 strain 73 之 16S rRNA 基因序列與其它相關菌株 16S rRNA 基因序列比對之親緣樹狀圖 .....	25
圖 3.5 本年度研究之工作進度甘梯圖.....	29
圖 4.1 本計畫所收集將用於後續實驗之鉻污染地下水.....	34
圖 4.2 含有電鍍廢水的培養基培養 5 天後，溶液顏色的變化.....	36
圖 4.3 在相位差顯微鏡下，所觀察到的電鍍廢水培養出來之細菌.....	36
圖 4.4 含有硫磺谷泥土水之 MTFM 培養 5 天後，溶液產色的變化.....	37
圖 4.5 在相位差顯微鏡下，所觀察到的硫磺谷泥土水培養出來之細菌.....	37
圖 4.6 菌株 CK-D 與菌株 CK-W 之 DNA 萃取結果.....	39
圖 4.7 菌株 CK-D 與菌株 CK-W 16S rRNA 基因與其它相關菌株之 16S rRNA 基因序列比對之親緣樹狀圖.....	39
圖 4.8 菌株 CK-D 和 CK-W 在不同溫度下的生長曲線.....	40
圖 4.9 二苯基二氮脒 (1,5-Diphenylcarbazide).....	41
圖 4.10 以二苯基二氮脒 (1,5-Diphenylcarbazide) 檢測六價鉻之濃度及檢量	



線.....	42
圖 4.11 本研究使用於檢測六價鉻與總鉻之攜帶型多參數比色計.....	43
圖 4.12 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 (A) 與 <i>Microbacterium</i> strain 73 (B) 在含有 50 ppm 的各種重金屬之 LB 生長情形.....	45
圖 4.13 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 (A)與 <i>Microbacterium</i> strain 73 (B) 在含 5 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原.....	47
圖 4.14 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 與 <i>Microbacterium</i> strain 73 在含 50 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原.....	49
圖 4.15 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 在含 100 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原.....	50
圖 4.16 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 在含 200 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原.....	51
圖 4.17 使用生長至對數期之 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS)中進行六價鉻還原.....	52
圖 4.18 使用生長至對數期之 <i>Microbacterium</i> strain 73 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS)中進行六價鉻還原.....	53
圖 4.19 使用生長至對數期之 <i>Ochrobactrum</i> strain 71 細胞在添加不同營養源之磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS)中進行六價鉻還原.....	54
圖 4.20 使用生長至對數期之 <i>Microbacterium</i> strain 73 細胞在添加不同營養源之磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS)中進行六價鉻還原.....	55
圖 4.21 靜息細胞添加不同營養源還原六價鉻前後緩衝液所含之總鉻含量....	57
圖 4.22 鉻污染地下水之總 DNA 16S rRNA 基因增幅之結果.....	58
圖 4.23 鉻污染地下水之菌相分析柱狀圖.....	63
圖 4.24 不同比例之 MTMS 及 TMOS 組成之膠體對於產氫菌之氫氣釋放效率..	64





圖 4.25 以 MTMS 及 TMOS 組成之膠體固定菌株.....	65
圖 4.26 以膠體固定之菌株用於實場鉻污染地下水之還原實驗.....	65
圖 4.27 含鉻之污染地下水經固定化之菌株處理後總鉻與六價鉻濃度.....	67





## (一) 前言與文獻回顧

### 環境重金屬污染與生物整治

重金屬的污染是造成環境浩劫的重要主因之一，對於重金屬造成的環境污染問題日益受到重視的今天，在已開發國家綠色科技均已被視為極重要之研究課題。。近年來由於工商業的迅速發展與廢水不當排放或有害廢棄物不當棄置，土壤與地下水的污染也伴隨而來，在台灣較嚴重並且受到關注的重金屬包括由工業廢水排出之鎘(Cd)、鉻(Cr)、銅(Cu)、汞(Hg)、鋅(Zn)、鎳(Ni)、鉛(Pb)及砷(As)等。

目前針對受重金屬污染之土壤及地下水已有許多不同的整治復育技術，整治的技術一般可分為三類：物理、化學及生物處理法。物理整治法包括如土壤清洗/酸洗法及土壤混合稀釋/排土/客土法等；化學整治法則如萃取法、土壤固化/安(穩)定化法等；生物復育處理則有植生復育法等。除此之外，重金屬污染的整治亦包含電化學及熱處理法等 [Dixit et al., 2015]。重金屬污染整治技術又可分為現地(In-situ)、離場(Off-site)及離地(Ex-situ)三種處理類型。現地處理技術多是運用不開挖或不將受污染土壤移離地區之狀況下，來進行場址整治工作。離地處理技術則大多是透過先將污染區域之土壤挖除後，再選擇適當的程序進行污染處理(包含於現場進行處理或直接運載至適當之機構進行後續處置)，經由處置淨化後的土壤則可再回填、再利用於污染現地或利用掩埋方式進行處理[黃等人, 2011]。

重金屬污染的整治工法目前仍是以化學處理法(包括萃取法、安定化法)以及工程技術法(包括排土與客土法、現地淋洗土壤法、現地電熔法等)為主。除了物理與化學整治工法外，由於綠色科技與環境永續保育觀念的突起，生物科技應用於環境保護，亦即生物復育(Bioremediation)已是目前在污染環境整治工法最重要的一環，也日漸引起社會大眾以及科學界的關注。

生物復育(bioremediation)乃是以生物性處理方法來補救環境污染方面的問題，屬於環境生物技術(environmental biotechnology)應用的新穎領域。在生物處理法方面，植生復育法是目前較常被用來整治重金屬污染的土壤。植生復育法是



一種利用植物來清理環境中污染的方法，植生復育的效率會受到許多因素影響，包括使用的植物在重金屬的吸收能力、土壤重金屬濃度（植生復育法較適用於處理低至中污染量）、土壤物化性質等。另外植生復育的成果需要有長期的復育時間。利用微生物處理重金屬污染的生物整治法近年來也益受重視，微生物對於重金屬的作用主要是氧化還原與吸附，另外有些微生物可藉由改變環境之酸鹼度來促進重金屬從土壤中釋放出來，或是使重金屬在土壤環境中更為穩定。這些微生物的作用對於某些具有毒性的重金屬離子而言，可藉由重金屬價數改變來降低其毒性或減少其生物利用度(bioavailability)，而達到生物復育的目的。然而即使許多微生物具有非常高的重金屬吸附效率與能力，微生物在土壤重金屬污染整治的應用，目前尚無法廣泛應用。

在實際應用上，生物復育技術亦可分為現地生物復育及非現地生物復育之處理，兩者較大差異在於是否於現地進行整治，或是動土或抽水工程需求。現地生物復育較為經濟[Aulenta et al., 2006; Fuller et al., 2015; Pradhan et al., 2017]、塵污及污染物釋出較少、可一次性處理較大量土壤及地下水、通透性土壤處理效果尤佳可，缺點則較費時、技術困難性；而非現地生物復育則必須動用土壤及地下水離地工程進行後續處理，相較前者唯一較優勢則具有較大之操作彈性。

現地生物處理一般可分為：自然生物處理(natural bioremediation)(如自然衰減)；及加強式生物處理(enhanced bioremediation)(如生物整治牆、生物氣提法、抽取處理法、生物添加或通氣法、抽取處理及回注、植生復育、營養鹽或電子接受者注入法等)[Bedient et al., 1999]，其主要特點包括符合自然環境機制特色、對於吸附之污染物具降解性、技術所需的設備易取得、地表所需設施相對較少、污染物於地表危害風險性較低、處理經費相對較為經濟、場址之破壞影響較少、與同為生物抽除處理法相較生物復育較為快速、容易與其他整治技術整合處理及衍生之污染防制相較輕易等 [盧，2002]。

在工程技藝方面，現地生物復育技術乃是應用工程化的方式以加強生物降解(轉換)之效應，工程使用上的生物復育系統一般採行方式有：(1) 添加微生物，(2)添加營養鹽，(3)添加電子供體，及(4)添加電子接體 [Joutey et al., 2015]。表 1.1 簡要說明工程之生物復育技術一般所需之基礎條件。



表 1.1 工程之生物復育技術一般所需之基礎條件  
(盧，2002; 2004; Joutey et al., 2015)

工程化復育方法	方法說明
(1) 添加微生物	於地下水添加增殖後的原生菌或非原生菌，保持系統於好氧或厭氧條件。
(2) 添加營養鹽	於缺乏之地下水體中添加微生物生長所必須的營養鹽，並維持環境於好氧或厭氧的條件。
(3) 添加電子供體	以添加添加有機污染物(如 TCE 等)，於好氧環境中進行共代謝作用。 亦有將釋氫物質投入地下水中，藉氫為電子供體於厭氧環境下行脫氯反應(如 DNAPL 的厭氧脫氯)。
(4) 添加電子受體	一般生物通氣法中是以補助氧(空氣)或過氧化物(釋氧物質)予以進行好氧分解。也可添加硝酸鹽等方式進行厭氧脫氯。

關於污染場址的整治與復育，在改善場址方面，由於必須要針對污染物及現地場址之特性、現行法規規範及要求、全場整治費用、整治時程及場址用途等關鍵因素而進行選擇與決策，通常並不容易評估所使用的工法其優劣好壞，因此在實際選擇、設計與操作解決污染場址時，並無任何一種技術適用於所有類型之污染案例，亦少有污染場址非必要應用單一或特定一項工法才可以進行整治之情況。而隨著全球對環境保護的日益重視，綠色地球的概念深入人心，世界各國也更加講求永續經營的行動，運用微生物來處理環境上之污染所造成的衝擊及減少負面影響的運用也越來越被重視。微生物生物復育(microbial bioremediation)是以生物性處理方法來補救環境污染方面的問題，乃屬於環境生物技術(environmental biotechnology)應用的新穎領域之一。

除了上述的整治技術之外，還有許多利用生物復育技術改善土壤及地下水之相關工程與原理的開發與運用，如表 1.2 所列。表 1.3 則為以生物復育作為整治技術考量基礎，針對其生物復育法之優劣情況之彙整。





表 1.2 生物復育技術之相關整治工程法及原理  
(Farhadian et al., 2008; 梁等, 2012)

整治技術中文名稱	英文名稱	原理簡介
現地生物復育	in-situ bioremediation	運用適宜之工法，促使土水中的微生物生長及繁殖，以降解或移除溶解在水相或吸附於土壤孔隙之污染物。
生物堆肥法 (亦稱物細胞法)	Composting	污染土壤由開挖、空氣注入於土堆中或定期翻堆曝氣，應用土壤中好氧微生物之呼吸機制而達到污染物去除之目的。
生物泥漿法	Bioslurry	使污染土壤孔隙間填充適量的水後，土壤介質處於泥漿態，使污染物溶解於水相中被微生物降解。
生物攪動法 (亦稱生物氣體注入法)	biosparging	將空氣灌注於地下水，供好氧微生物降解污染物足夠之氧氣進行分解處理。
生物漱洗法 (亦稱生物吸啜法)	bio-slurping	運用真空吸引是抽汲技術之整治有機揮發性污染物，主要為生物通氣與污染物回收法兩種機制組成。
植生復育法	phytoremediation	利用植物根區微生物活性促進作用將土壤之污染物移除、分解、吸收或穩定。
生物通氣法	bioventing	將空氣注入非飽和土壤層，以刺激現地土壤中微生物之活動，而提高污染物的生物降解速率。
土地農耕法 (亦稱土壤處理或土地應用程序)	Landfarming (Land treatment or land application)	於地表受污染之土壤層鋪成一薄層，並加以曝氣、添加礦物質、補充營養鹽及水份刺激土壤層好氧微生物之活性。
生物堆法 (亦稱生物格或生物丘及堆肥堆)	Biopile (biocells or biomounds and compost piles)	此法係結合土耕法及成堆堆肥之技術，與處理方式土耕法極為相似，此法唯一不同處是將受污染土壤堆至成堆處理。



表 1.3 生物復育技術之優劣勢

---

生物復育工法之優勢：

- 
1. 較符合自然界環境之機制，僅有分解速率快慢及是否於現地進行之差異。
  2. 可使用大部分的有機污染物降解及少部份無機污染物之去除。
  3. 可應用於整治污染強度較低之場址。
  4. 較不易產生有害之中間產物，而整治過程中衍生之風險較低。
  5. 生物復育並不易產生致病性之微生物。
  6. 不需要額外建構反應槽，污染場址本身就可作為生物分解反應槽。
  7. 本地特性破壞性較低，整治完畢後亦較易恢復原場具有特性。
  8. 對於其他整治工法之處理費用較為經濟。
  9. 可將大部分之有機及重金屬污染物進行礦化，並達到完全整治之功效。
  10. 較易於與其他整治程序結合運用。
- 

生物復育工法之劣勢：

- 
1. 微生物為活體生物，易受到污染物特性衝擊而危及其生物活性。
  2. 污染現址之微生物所需生長因子不當時，需要耗費較高之整治費用用以改善不適之環境因子。
  3. 污染物濃度或毒性較強時，此工法通常會失效。
  4. 微生物生長過於旺盛時，其可能造成阻塞問題，使長期整治成效不彰或失敗。
  5. 不適用於黏土含量比例高之場址。
  6. 添加營養鹽不當(如磷酸鹽過剩)可能會影響原地下水水質。
-



- 
7. 所運用之微生物在衰亡後，可能造成臭味問題。
  8. 對於生物較分解之污染物，生物復育技術成效不佳，可能造成整治時程過長。
- 

參考資料來源：經濟部工業局，土壤與地下水污染整治技術手冊—生物處理技術，2004。

---

### 重金屬鉻之毒性與環境污染

鉻是一種無臭無味之金屬元素，在自然界中可存在於岩石、植物、土壤、火山灰以及動物中。工業上則可見於使用在製造鋼及其他合金、染料和顏料、皮和木材防腐、冷卻塔水添加劑等。在環境中的重金屬污染，鉻也是非常常見的金屬污染物之一。

鉻和鉻鹽是重要的工業原料，可見於化工、電子、冶金、電鍍、鞣革製品、電鍍、塗料等行業或經由加工製造之各式各樣不同產品。鉻可以以幾種氧化態存在，範圍從  $\text{Cr}^{2+}$  到  $\text{Cr}^{6+}$ ，於環境天然水體中最常見的形式是以金屬鉻、三價鉻 ( $\text{Cr}^{3+}$ ) 和六價鉻 ( $\text{Cr}^{6+}$ ) 存在。但在土壤中，最穩定和常見的形式是三價鉻  $\text{Cr}(\text{III})$  和六價鉻  $\text{Cr}(\text{VI})$ ，其化學性質和影響生物體有非常顯著的不同。就毒性而言，六價鉻(VI)毒性最大，且六價鉻化合物對人體有害，易為人體吸收而且在體內積蓄。其具水溶性、高導電性、高腐蝕及水體高移動性特徵(吳等，2007)。而三價鉻(III)則為人體及微生物之必需微量元素 [Baruthio, 1992; Eastmond et al., 2008]。國際癌症研究中心 (The International Agency for Research on Cancer, IARC) 及美國環保署 (US Environmental Protection Agency, U.S. EPA) 確定過量六價鉻的攝取會對人體造成毒性及癌症 [Puzon et al., 2005; Wang et al., 2011]。六價鉻是具有致突變 [Puzon et al., 2002]，致癌 [Codd et al., 2003] 及致畸胎 [Asmatullah et al., 1998] 特性，為必須控制污染物之一。鉻污染在國內外之場址已不在少數，並且已備受各國之關注 (表 1.4) [陳，2015]。



表 1.4 六價鉻於國際組織之列管危害類型及劑量限值

組織單位	列管類型	管制限值
國際癌症研究署 (IARC)	人類致癌物 (Group)	飲用水中鉻總量限值為 0.05 毫克/升
美國環保署 (USEPA)	吸入性暴露的六價鉻列為 人類致癌物	—
美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health)	可能之人類致癌物 (National Toxicology Program, NTP, 2008)	推估六價鉻對人體口服 致癌效力 (slope factor) 為 0.5 (mg/kg/day)

備註：「—」表示無特別陳述或列出

鉻存在於環境中以六價鉻之毒性最高，而六價鉻則多以具高溶解性、高毒性且具致癌性之鉻酸鹽形態存在，因此受六價鉻污染的環境與地下水必須立即加以整治，以避免造成環境生態的衝擊進而危害到人體之健康。目前常用的傳統整治技術較多以地下水抽出處理及現地化學還原。然而，抽取處理在長期操作下除操作維護成本增加外，六價鉻和土壤的吸附將使處理效益無法提升。而現地化學還原因大量注入還原劑，將使地下水水質惡化。此外，還原劑可能無法有效地擴散，也會造成整治難度的提高。另外利用物理或化學方法進行污染物整治成本亦較高。因此，開發使用或結合生物整治的復育技術為經濟可行之方案，在應用上亦最具發展潛力。

#### 環境微生物與重金屬鉻之交互作用

從許多受污染的環境中針對微生物多樣性的研究結果顯示，即使在含有具有生物毒性污染物的環境中，仍然可以分析得到非常豐富的微生物多樣性。雖然重金屬(特別是在高濃度下)對於微生物普遍具有毒性，不過微生物也演化利用各種不同的機制來克服重金屬毒性對細胞造成的衝擊，包括(1)利用主動外流 (active efflux) 的作用將毒性金屬離子排出細胞外；(2)利用酵素 (通常利用還原



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

金屬離子)來降低金屬毒性及 (3)利用生物累積 (bioaccumulation) 或隔離 (sequestration) 金屬離子的方法降低重金屬對細胞的影響 [Nies, 2003; Mejare and Bulow, 2001]。除此之外也有許多微生物包括格蘭氏陽性菌和格蘭氏陰性菌及一些酵母菌能夠吸附重金屬 [Teizel and Paresk, 2003]。

在含有外源性污染環境的微生物族群中，研究發現很多不但能夠適應這些具有毒性的污染物，並且能夠在這些環境下繼續繁殖生長，甚至使用這些污染物作為生長所需要的基質。在遭受鉻污染之環境，均可鑑定出有還原六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )至三價鉻( $\text{Cr}^{3+}$ ) 能力及耐受六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )毒性微生物，統稱為鉻(酸鹽)還原/耐受菌 (chromate reducing/tolerant bacteria, CRB/CTB) [Das et al. 2014]。

微生物對抗生長環境中鉻離子毒性的方式與其耐受其他有毒重金屬的機制類似，主要包括減少鉻金屬離子進入細胞內。六價鉻如果以鉻酸根離子 ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ )存在，由於其結構與硫酸根離子( $\text{SO}_4^{2-}$ )類似，可以經由硫酸鹽的運輸路徑進入微生物細胞內。處於含鉻酸根離子環境的微生物則可以透過改變硫酸鹽的運輸路徑 [Qi et al., 2000]來降低  $\text{Cr(VI)}$ 的攝入。除了降低鉻金屬離子進入細胞內，微生物亦可利用主動外流 (active efflux) 的作用，將細胞內六價鉻移出，增加菌株對  $\text{Cr(VI)}$ 的耐受性。在可耐受鉻離子毒性的微生物菌株，常帶有 *chr* operon，其中 *chrA* 基因為六價鉻運送蛋白基因，此蛋白能利用氫離子梯度將菌體內六價鉻移出 [Ramírez-Díaz et al., 2008]。另外將毒性高的六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )還原成毒性低的三價鉻( $\text{Cr}^{3+}$ )，是微生物對抗有毒之鉻酸鹽主要機制之一。微生物會利用 *chrR*、*yieF*、*nemA*、Ferredoxin-NADP oxidoreductase 等細胞內氧化還原基因以有氧方式或 cytochrome 系統或以厭氧方式將  $\text{Cr(VI)}$ 還原成  $\text{Cr(III)}$ 以降低鉻酸鹽毒性。微生物抵抗鉻離子毒性之機制如圖 1.1 所示 [Thatoi et al., 2014]。



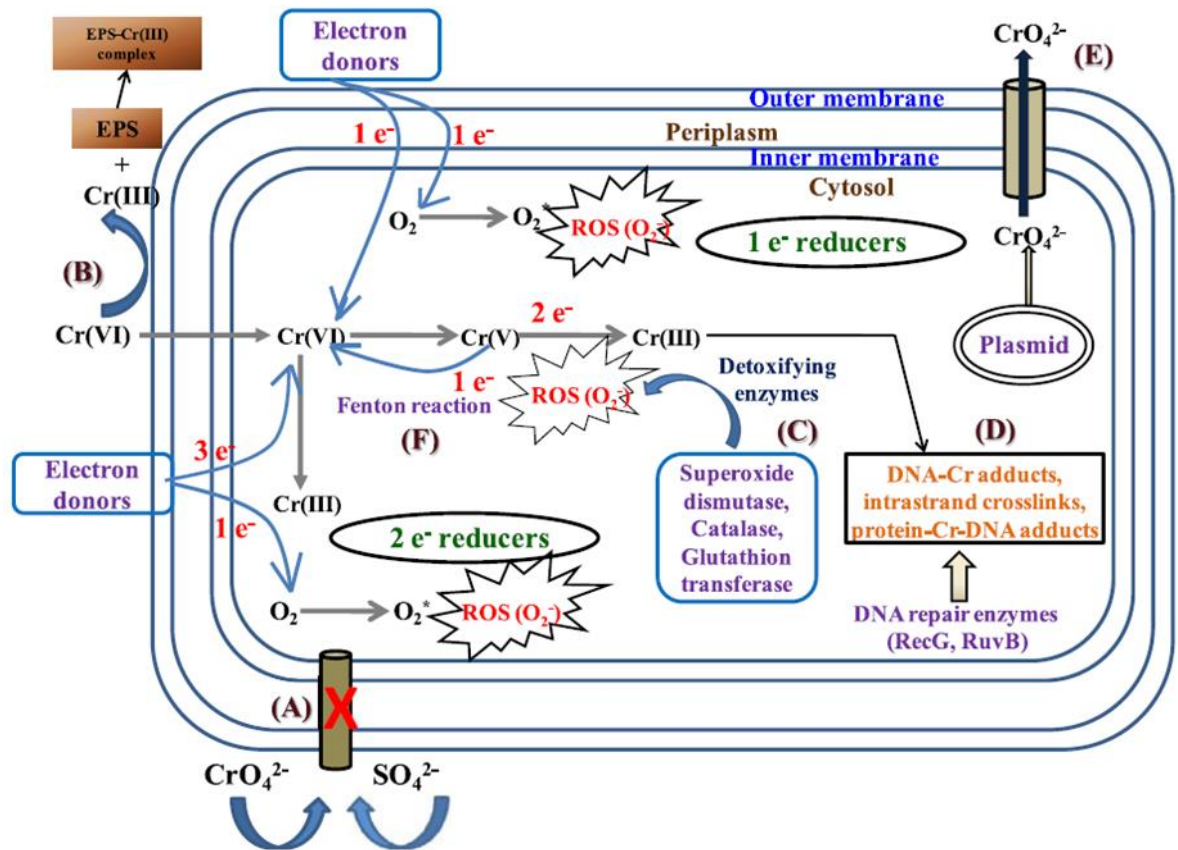


圖 1.1 微生物抵抗鉻離子毒性之機制 [Thatoi et al, 2014]

(A) 硫酸鹽攝入運輸蛋白基因突變；(B) 胞外六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )還原成三價鉻( $\text{Cr}^{3+}$ )；(C) 胞內鉻酸鹽還原酶催化六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )還原成三價鉻( $\text{Cr}^{3+}$ )；(D) SOS 還原系統功能降低活性氧物質造成影響；(E) 主動排出機制，鉻酸鹽從細胞質排出；(F)降低活性氧物質造成的氧化壓力衝擊。

### 鉻還原菌與鉻酸鹽還原酶對六價鉻之作用

鉻還原菌對於六價鉻不僅具有還原能力外，對於六價鉻的毒性及降解過程產生之副產物皆具有很強的耐毒及排出現象。這些鉻還原菌和相關的代謝酵素均可用來開發鉻污染的生物整治[Fernández et al., 2018]。



在受污染的地下水或土壤場址，一般都缺乏溶氧。六價鉻厭氧還原主要靠鉻還原菌作用，而在厭氧環境中，同時可能有脫硝反應、硫酸還原及甲烷生成菌的活動，鉻還原菌需適應在這些微生物族群及代謝的環境中；例如當硫酸還原發生時，其最終產物多為硫化氫氣體，而該產物經常與金屬離子作用而形成硫化物沉澱，可有效幫助鉻之沉澱作用。此外，鉻還原菌還原六價鉻只需提供碳水化合物、蛋白質、脂肪酸、氫氣及 NAD(P)H，就可以將六價鉻還原成三價鉻[Joutey et al., 2015]。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反應進行的關鍵因子，因此氫是鉻還原菌行還原反應時，最直接且有利之電子供給者。

許多梭狀芽胞桿菌屬(*Clostridium*)在厭氧的環境下可利用發酵作用來產生氫氣[Laurinavichene et al., 2016]。一般地下水中氫氣可被當作電子供應者，提供厭氧呼吸的微生物電子以加快去除污染物 [Joutey et al., 2015]。在開始代謝時，由於氫氣足夠，污染物的去除或轉換較為快速，等到氫氣逐漸被消耗殆盡，污染物去除的效率便會慢慢降低，此時額外的添加氫氣將可以幫助微生物繼續進行還原作用，但額外添加氫氣的成本相對較高，利用生物整治的生物強化法概念，添加可釋放氫氣之梭狀芽胞桿菌屬之菌種如 *C. butyricum* 或 *C. pasteurianum* [Valentine et al., 1963]，藉由這些微生物產生氫氣來幫助微生物去除污染物。這類梭狀芽胞桿菌屬為產氫之厭氧菌，然而對氧氣耐受性仍較一般厭氧菌高，在實際應用上應更具可行性及潛力。因此，探討產氫菌作為鉻還原代謝之電子供應者唯一具有新穎性及潛力之研究主題。

細菌參與六價鉻還原最主要是由某些酶的作用導致，像是一些氧化還原酶，已被指出細菌會藉由一些不同的代謝功能，將六價鉻催化還原，氧化還原酶包括硝基還原酶(nitroreductase, NR)、鐵還原酶(iron reductase, IR)、醌還原酶(quinone reductases, QR)、氫化酶(hydrogenases, HG)及黃素還原酶(flavin reductases, FR)與 NAD(P)H 相關的還原酶等[Thatoi et al., 2014]。圖 1.2 為文獻中整理之細菌中具催化還原六價鉻之氧化還原酶 [Patra et al., 2010]。



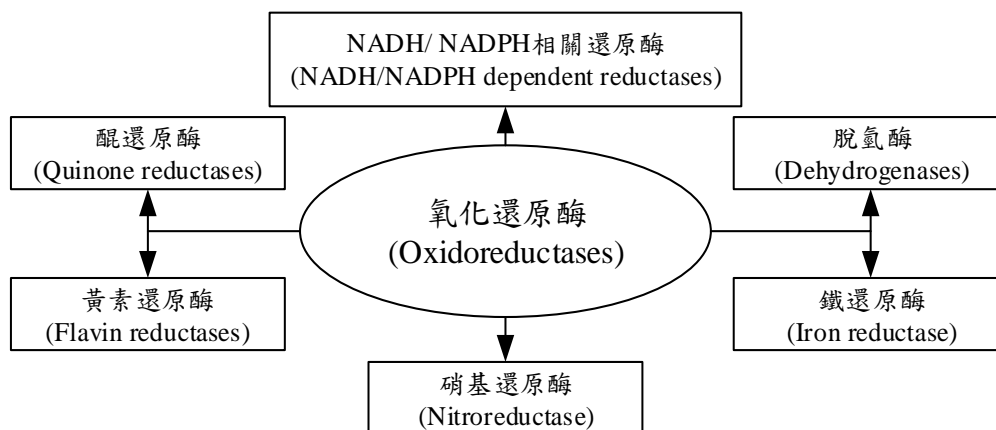


圖 1.2 細菌中具催化還原六價鉻之氧化還原酶 [Patra et al., 2010]。

鉻酸鹽還原酶 (Chromate reductases) 在微生物中的類型取決於菌株所處的自然環境所進行還原反應狀態，可以是在有氧的環境(好氧)或無氧的環境(厭氧)下，鉻酸鹽還原酶可存在於鉻酸鹽還原菌的細胞膜上或細胞質中。不同的微生物鉻酸鹽還原酶有不同催化六價鉻還原的方式；可溶性還原酶無論是在細胞外或胞內皆牽涉六價鉻還原 [Elangovan et al., 2010; Das et al., 2014]，而胞外還原方式以依賴膜上的還原酵素與六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )的鍵結催化還原。在胞外作用部分，細胞會產生六價鉻還原酶附著於胞外，並將其引至介質中而造成六價鉻的還原效應[Das et al., 2014]。例如 *Pseudomonas putida* 細胞質中的鉻酸鹽還原酶(chromate reductases)是以胞外方法還原六價鉻，可觀察到細菌依靠胞外程序，將膜上結合的酶催化六價鉻促進活化還原[Pradhan et al., 2017; Das et al., 2014]。在胞內作用時，六價鉻是依賴細胞質中可溶性還原酶使之還原，這些酵素在生物電子傳遞獲得能量的過程是扮演著電子供應者的中間角色並參與反應過程，胞內還原電子供應者包括 NADH 及 NADPH，其經常被當作還原劑使用 [Joutey et al., 2015]。可藉胞內反應將六價鉻催化還原的革蘭氏陰性菌包括有 *Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas* sp. CRB5、*E. coli* ATCC 33456、*Rhodobacter sphaeroides*、*Alcaligenes*、*Enterobacter* 和 *Pseudomonas fluorescens* LB300 等；革蘭氏陽性菌則有 *Bacillus subtilis* 與 *Streptomyces* sp. MC1 等菌 [Polti et al., 2011; Tahri Joutey et al. 2014]。



## 微生物生物浸出與重金屬污染整治

利用生物浸出法(bioleaching)是重金屬污染的生物復育的另一種整治技術，生物浸出具有成本低，操作簡便，能源需求低以及環境友善等優勢 [Akinci and Guven, 2011]。在可以利用生物浸出處理的重金屬污染，大多數的去除效率通常可高於 85%，然而在鉻污染的去除效率通常卻低於 40% [Blais et al., 1993; Sreekrishnan et al., 1993]。目前使用生物浸出法應用於鉻之重金屬污染的研究報告與相關文獻仍然非常有限。在進行生物浸出的過程中，常需會以添加外源性的微生物，包括添加單一菌株或者是組合菌群，以增強其浸出能力與效率。嗜酸菌等菌種常被用於金屬的生物浸出實驗，包括能夠進行硫或亞鐵氧化的單一菌株或是特定的組合菌群是最常被用於生物浸出的應用[Hocheng et al., 2014]，但是其培養與菌群的維持亦相當不易 [Zeng et al., 2016]。關於土壤中鉻的化學態以及結合形式對生物浸出效率的影響迄今為止仍少有報導。然而，Zeng 等在 2016 年證明使用生物浸出方法結合氧化硫化物菌群可顯著增加鉻洗出效能 [Zeng et al., 2016]。雖然嗜酸菌在地下水重金屬鉻污染的復育較無直接應用的機會，然而在工業或礦業的酸性污泥中，嗜酸菌或許可扮演重金屬鉻污染之生物復育之重要菌種。因此，培養收集本土之嗜酸菌將有助於將來評估與開發全方位鉻污染之生物復育技術。

## 環境微生物族群與多樣性的分析與監控

在生物復育的場址中，微生物族群的變化與監控常常是復育效率與是否能成功的關鍵因素。傳統研究環境中的微生物族群的方法乃是透過培養方式，將可培養出之菌種純化，再藉由顯微鏡觀察以及生理與生化特性，將微生物分類並加以鑑定。但是環境中能被培養出的微生物相當稀少，因此藉由傳統培養技術來探討環境中微生物多樣性，結果將與實際微生物族群相距甚遠。近年來分子生物技術快速發展，利用分子生物技術進行微生物的鑑定與多樣性分析的策略也應運而生，在細菌方面，最普遍被使用的基因標記即為 16S rRNA 基因。針對非培養的微生物多樣性分析方法很多，如變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、片段長度多型性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)以及應用近年發展的次世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS)的宏基因體學來描繪環境微生物相 (圖 1.3) [Chien 2013]。利



用 PCR 的方式放大 16S rDNA 之後，搭配 NGS 來獲得微生物的組成群落，是目前最有效率且精準的方式（圖 1.4）。

次世代定序技術是最新且高通量的核酸定序技術，可完整的檢測及量化整個基因體，也可應用於環境菌相變化之高效能分子生物定序技術。在污染的環境中，可分解污染物的微生物廣泛地分佈在這些環境，進一步進行污染物的分解代謝。在環境中鮮少有單一微生物完成所有的代謝反應，進而降解環境污染物。因此，微生物族群的動態，結構和功能在生物復育的過程中，便益形重要[Shah et al., 2011]。完整的菌相分析可提供不同的微生物或可共同交互執行所有的代謝反應的微生物族群[Shah et al., 2011]，為設計生物整治工法強而有力的基石。

在一個污染環境中存在的微生物族群，有可能是相互合作降解環境污染物，但也不是所有菌種均在參與降解污染物的代謝鏈，可藉由 metagenomics 分析污染場址內具有分解污染物潛力菌種種類和其在所有菌種種類分佈比率，以及宏觀的微生物族群組成。這類研究也可以評估內生性土壤及水體微生物群落，並監測受污染的場址之微生物復育前和後的菌相分析，當我們對於環境中菌相的分佈以及優勢菌種有非常完整瞭解後，便可有利於特定菌種的分離、純化與培養，並進而利用這些菌種來進行各類環境污染的生物復育。

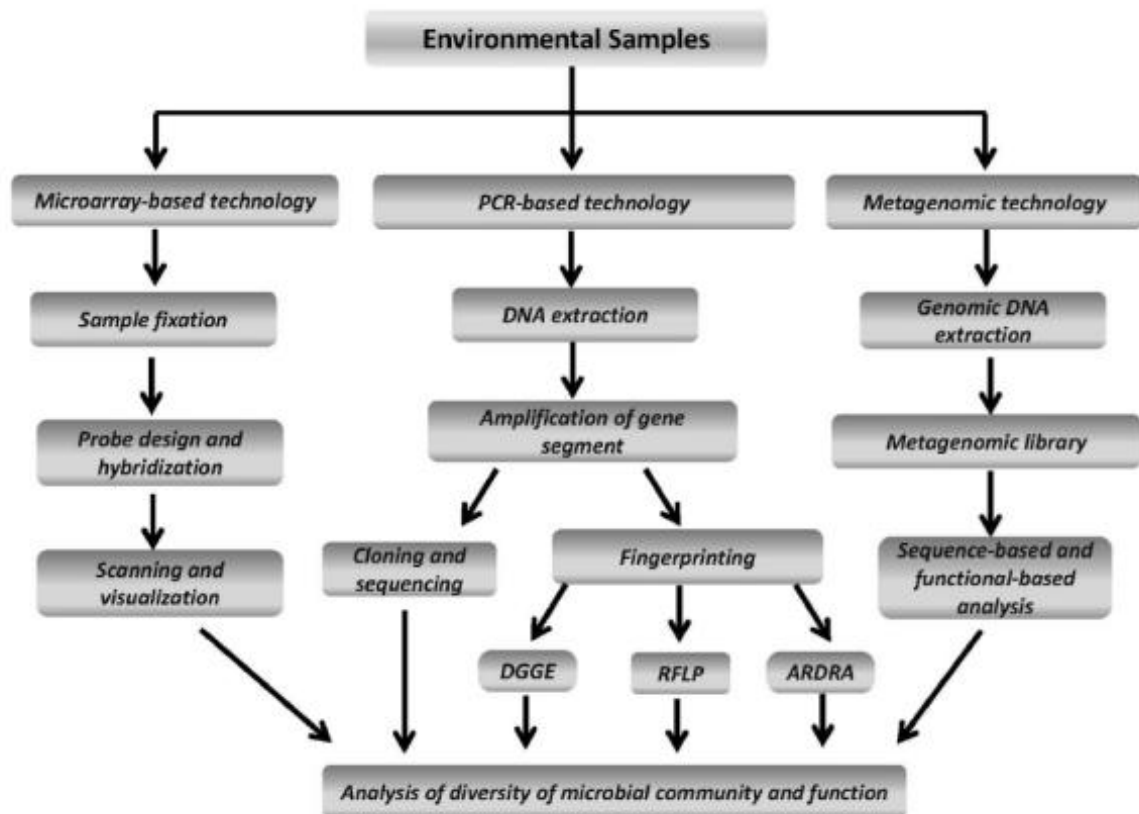


圖 1.3 非經培養方式探討微生物多樣性的主要方法與策略 [Chien, 2013]。

除了監控污染場址在生物復育過程中的菌相外，另外一個可應用於生物整治非常具有效率的分子生物技術工具為即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time PCR；qPCR)。在開發鉻污染生物整治的過程，可使用 qPCR 評估鉻還原菌和產氫菌特徵基因的變化，目標基因如氫化酶(hydrogenase) 的基因 *hydA* [Wang et al., 2008]，鉻還原酶(chromate reductase)基因 *chrR*、*yieF* 等。

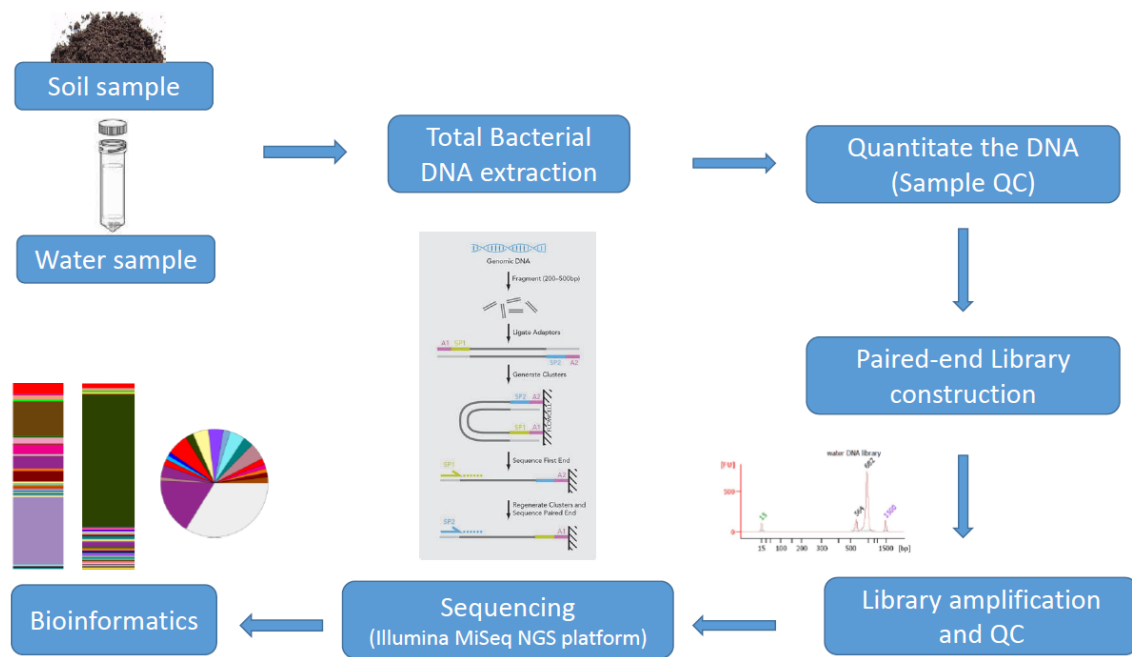


圖 1.4 利用次世代定序(NGS)技術評估環境樣本之菌相流程示意圖

不同於一般傳統的 PCR 無法了解 DNA 的含量，只能將目標的 DNA 進行放大，利用 agarose 膠體電泳進行跑膠，最後用溴化乙錠(ethidium Bromide, EtBr)進行染色，再用 UV 光判斷使否有 DNA 產物 (DNA 的定性分析)。Real-time PCR (qPCR)為可即時定量的 PCR 技術。此技術主要是利用螢光物質偵測 PCR 循環後產物總量，改善傳統 PCR 只能定性的缺點。常使用的兩種分別為 SYBR Green 法以及 TaqMan 法。將已知的基因進行 DNA 的濃度測定，利用序列稀釋的方式稀釋 DNA 之樣品，並以特定的引子針對已經序列稀釋的 DNA 樣品定量作為標準曲線，再利用此公式來求出樣品中目標基因(例如六價鉻還原基因)的含量 [Ritalahti et al.,2006]。

$$\text{gene copies per L sample} = \frac{(\text{gene copies per reaction mix}) \times (\text{volume of DNA } [\mu\text{L}])}{(2\mu\text{L DNA per reaction mix}) \times (\text{ml sample used})}$$





另一種方法為 TaqMan 法，此法必須先設計一段 DNA 探針(probe)，而 5' 端接一個 FAM(6-carboxyfluorescein)為 fluorophore，3'端接上 TAMRA (tetramethylrhodamine)為 quencher。TaqMan 法比較準確的原因為探針必須先找到特定 DNA 並結合上去，此時引子藉由聚合酶從 5'端延長到 3'端，將探針水解使 FAM 與 TAMRA 分離，游離的 FAM 開始發出螢光，而機器就可偵測到，因此比較不會有誤判的情況發生[Ryu et al., 2014]。

### 固定化技術與微生物在生物整治之應用

固定化技術為使用物理或化學方法將具有特定生理功能的游離微生物或酵素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生化工程技術。固定化技術可用於優勢菌，當固定在選定之載體上可使其具活性高、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。許多污染物無法使用單一菌種代謝，可以藉由固定化技術，將可協同處理污染物之混和菌屬，依所需之比例族群固定於載體。除了全菌株的固定化，參與生物整治的主要酵素，例如六價鉻還原酶，亦可使用固定化酵素程序進行胞外(in vitro) 進行還原之可行性。

細胞固定化的優點在於能夠提供高生物量，提高遺傳穩定性，並可回收及再利用細胞以減少成本。固定化技術可提供高體積生產率，以及提供適合的微環境條件，同時避免細胞損壞，提高耐毒性化學品，pH，溫度，溶劑和重金屬 [Bayat et al., 2015]。在選擇固定化細胞的載體材質時，需具有無毒，無污染，不可具生物降解行等重要特質。優良的固定化細胞載體同時應具有高濃度菌數載重能力，機械，生物和化學的穩定性高，能夠長期保存且成本低及易於處理與再生等特性 [Bayat et al., 2015]。

藻酸鹽(Alginate)具有易於處理，對人類無害，對環境傷害低，可大量生產且價格便宜等優點，在固定化過程中細胞不會發生極端的物理化學變化，也不會影響凝膠反應體系統和通透性，因此廣為目前大多數固定系統選擇的聚合物 [Buque et al. 2002]。目前常使用的細胞固定形式包括、吸附、共價結合、包埋與包封等形式，已被廣泛研究 [Jack and Zajiv, 1977]。



## (二) 研究目的

伴隨著工業的發展，土壤與地下水的污染也層出不窮，許多工業如電鍍業等需大量使用重金屬鉻。然而由於過去管理不慎與偷排廢水等情形，台灣在長期操作營運的工廠及土地利用在世代交替下之移轉，存在為數不少重金屬鉻的污染場址。

環境中的鉻常以三價鉻 ( $\text{Cr}^{3+}$ )和六價鉻 ( $\text{Cr}^{6+}$ )形式存在，其中六價鉻對人體有高毒性與高致癌性，具有致突變 [Puzon et al., 2002]，致癌 [Codd et al., 2003]及致畸胎 [Asmatullah et al., 1998]等特性，所以被許多管制機構優先列管為必須控制污染物之一。

許多微生物具有能將六價鉻還原成三價鉻之酵素，雖然自然界包括遭受鉻污染的環境中，存在相當多樣化之微生物菌種，一般微生物降解污染物速率通常是非常緩慢的，在降低污染環境六價鉻及其毒性緩不濟急，因此對於利用這些微生物進行鉻污染地下水污染復育過程實際的可行性的應用將備受限制 [Whiteley and Lee, 2006]。

為了達到使用微生物復育遭受鉻污染之環境，強化微生物(特別是原生菌株)還原六價鉻的能力是可行的策略之一。在加強生物復育的工法，通常可分為兩大類：生物刺激法 (Biostimulation)與生物強化法 (Bioaugmentation)。生物刺激法是將特定營養物質添加於污染場址中，使可降解污染物之菌株之數量與污染分解能力增加；生物強化法則是利用人工培養再添加方法，將具有降解污染物能力之菌株添加入污染場址，此兩種方法亦可結合使用以達到快速降解污染物的目的。

本研究之目的為開發可應用於鉻污染之生物整治的微生物族群與建置適合於用於整治微生物之生存環境。研究重點除了篩選可應用於鉻污染地下水生物復育之本土鉻還原菌並分析其特性外，同時評估添加微生物還原鉻所需之營養源，如添加鉻還原酵素所需之電子供應者，以用於生物刺激法 (biostimulation)之效率。另外也將導入生物強化法(bioaugmentation)之概念，培養厭氧產氫菌，與鉻還原菌之固定，評估其在地下水鉻污染生物復育之可行性。在本計畫執行期間，也將同時篩選培養本土之嗜酸菌，文獻報導嗜酸菌可應用於土壤重金屬生物復育。





本研究另一個工作要點為在實驗室中進行實場鉻污染地下水整治評估之實驗。進行實驗室鉻污染還原實驗可協助我們了解（1）污染場址中微生物還原標的污染物(六價鉻)之能力；（2）維持該生物之還原過程所需要之環境條件及營養鹽需求等；（3）理想條件及實場條件間差異及改善方法；（4）理想狀態下，微生物還原六價鉻的速率及程度；（5）現地原生菌對於標的污染物之還原能力；（6）是否添加微生物之必要性及必要時之添加量與（7）實場運用下，所欠缺或不足之條件的可能改善程度等資訊，提供後續實場整治之規劃。

分析污染場址完整的微生物菌相可提供於生物復育所需要的重要背景資料。傳統分析微生物相的方法如培養法，random cloning 乃至於變性梯度凝膠電泳(DGGE)等，均無法全面性的分析微生物群落的動態。近年來體學(omics)技術應用的導入，許多研究報告均指出以 metagenomics 分析之菌相結果，與其他方法相比可更全面性的分析污染環境之微生物族群，並篩選出更適合針對污染物質進行生物復育之菌種。本研究計畫也規畫利用 Metagenomics 分析鉻污染地下水場址菌相，以作為本土菌株還原鉻污染地下水之六價鉻的佐證。

綜而言之，本計畫之研究目的如下：

- (1) 收集鉻污染場址之土壤/地下水及基本性質分析。
- (2) 利用 metagenomics 概念分析污染場址樣本微生物族群。
- (3) 使用增濃培養(enrichment culture)技術，篩選、純化與鑑定鉻還原菌株。
- (4) 鉻還原菌株與產氫菌株之培養與特性分析。
- (5) 嗜酸菌培養技術的建立。
- (6) 應用於實場鉻污染地下水整治評估之實驗。
- (7) 以創新固定化技術將產氫菌株與鉻還原菌固定。
- (8) 開始使用從實場取得之鉻污染地下水，作為研究樣本以進行本計畫開發之菌株與平台之生物整治評估。
- (9) 評估固定化技術應用在鉻污染生物整治之可行性。



### (三) 研究方法與過程

#### 3.1 研究架構流程與工作進度甘梯圖

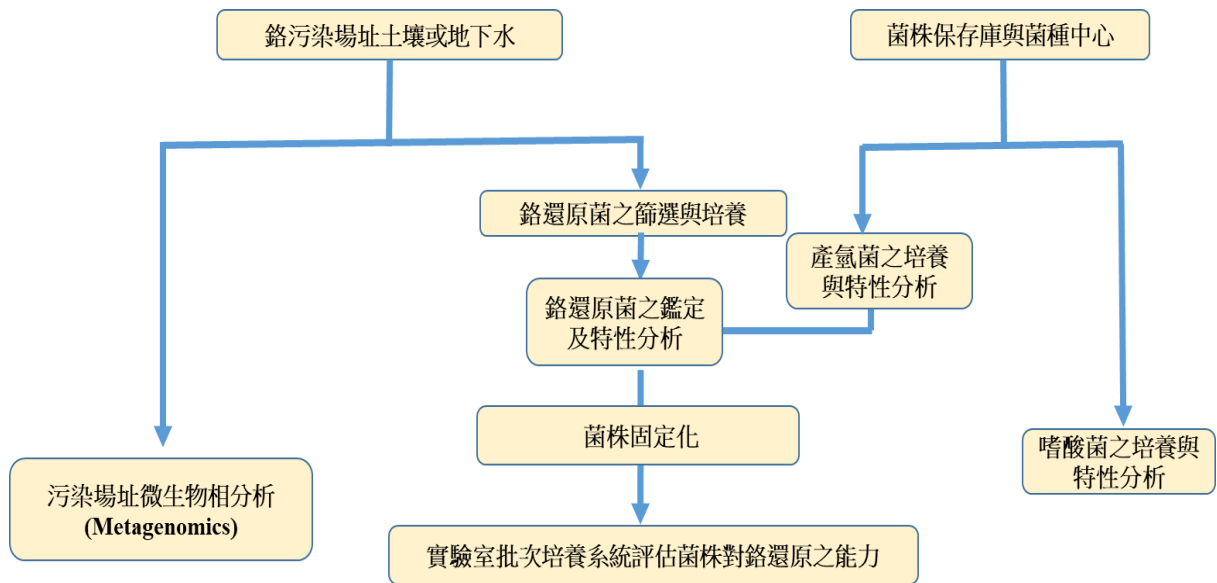


圖 3.1 本年度之研究架構圖。研究具體目標請參見 Chap. 2。



## 開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

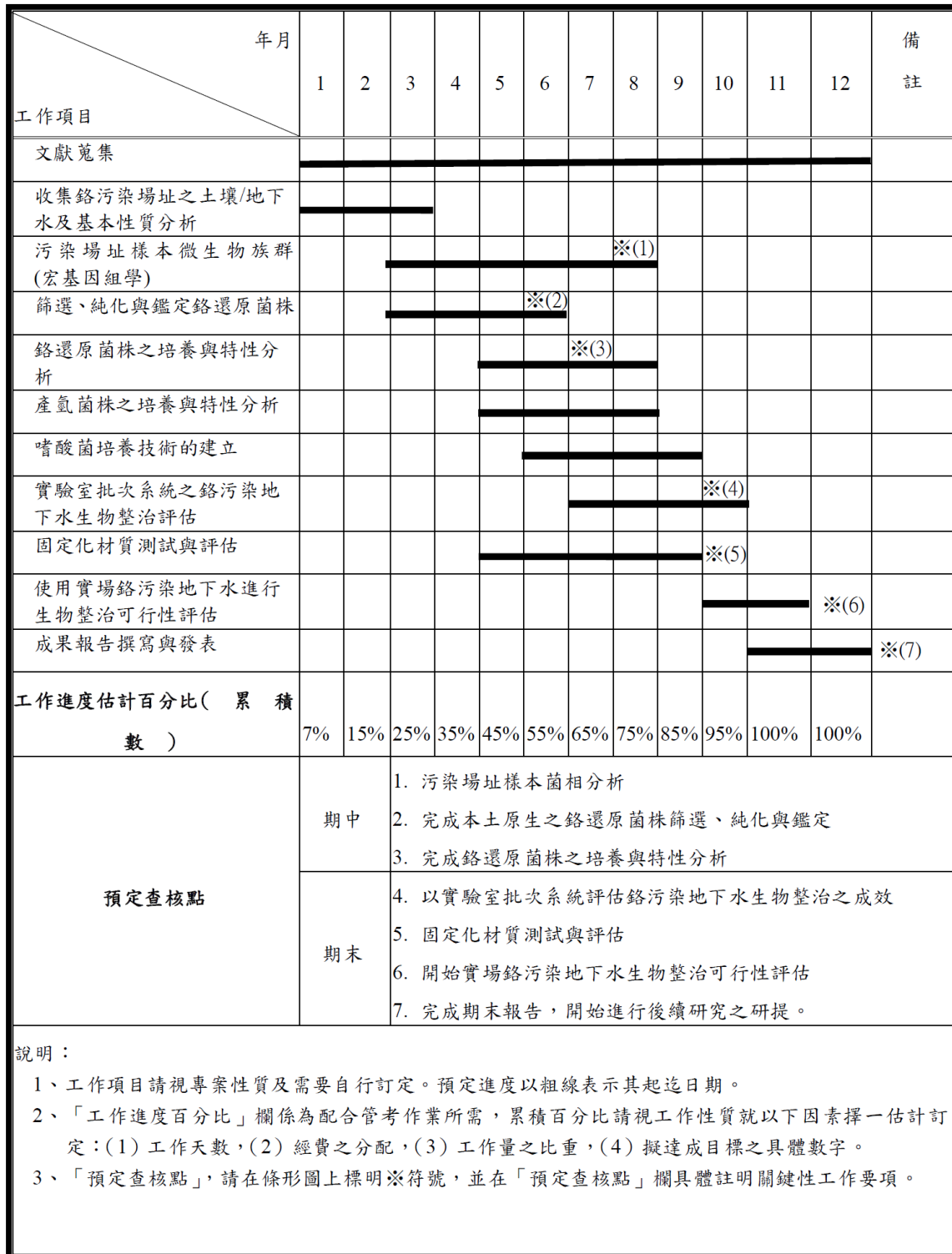


圖 3.2 本年度研究之工作進度甘梯圖。



### 3.2 菌株來源與培養方式

本研究之菌株來源分別包括 (1) 由污染環境篩選純化之本土菌株；(2) 本研究團隊歷年來由環境篩選純化之菌株與 (3) 購自 BCRC 之標準菌株。

從鉻污染環境的土壤中分離本土菌株，利用增濃培養(enrichment culture)技術，將 0.5 g 土壤加入添加含 40 ppm  $\text{Cr}^{6+}$  nutrient broth (NB) (50 ml)混和，以 200 rpm 30°C 進行現地地下水菌種培養，過程中利用分光光度計以吸光值  $\text{OD}_{600}$  進行量測，待吸光值大於 0.5 後取菌液與含 40 ppm  $\text{Cr}^{6+}$  nutrient broth (NB)以 1:9 比例混和進行繼代，再以 200 rpm 30°C 進行培養，待吸光值大於 0.5 時，重複繼代步驟，第二次繼代完成菌液培養即可作為後續菌株分離純化，從其中篩選，培養與鑑定本土原生鉻耐受菌株，並分析其還原六價鉻之能力。

鉻污染地下水微生物之篩選與培養，則以等比 (v/v)1:1 添加於含 40 ppm  $\text{Cr}^{6+}$  nutrient broth (NB)混和，以 200 rpm 30°C 進行現地地下水菌種培養，過程中利用分光光度計以吸光值  $\text{OD}_{600}$  進行量測，待吸光值大於 0.5 後取菌液與含 40 ppm  $\text{Cr}^{6+}$  nutrient broth (NB)以 1:9 比例混和進行繼代，再以 200 rpm 30°C 進行培養，待吸光值大於 0.5 時，重複繼代步驟，第二次繼代完成菌液培養至吸光值大於 0.5 時，即可作為後續菌株分離純化。

本土嗜酸菌的篩選與純化培養：分別從電鍍工廠廢水以及硫磺谷之污水篩選嗜酸菌 (圖 3.2)。嗜酸菌的分離篩選與培養使用之培養基為 MTFM 培養基(表 3.1)。在無菌操作台中，取出 8 ml 的 MTFM(A) 溶液加至試管後再加入 2 ml MTFM(B)，然後從廢水中取 1 ml 的溶液加至含有培養液的試管後，放在溫度 25 °C，轉速 165 rpm 的培養箱中培養 7-14 天，在培養的過程中須觀察溶液的顏色，以及沉澱物沉澱的情況，由於培養液本身會變得混濁，所以必須用正立顯微鏡觀察細菌生長的情況。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水



(A)



(B)

圖 3.3 用來篩選純化本土嗜酸菌之樣本來源：電鍍工廠廢水(A)  
與硫磺谷之污泥水(B)。電鍍廠取得之廢水具強酸性，

表 3.1 MTFM (Modified Thiobacillus Ferroxidans Medium)培養基成分與配置方法

Solution A 800 mL

Solution B 200 mL

Aseptically combine Solutions A and B. (A yellow precipitate is normal; it becomes darker as the iron oxidizes.)

**Solution A:**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.8 g
Modified Wolfe's Mineral Solution	5.0 mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.4 g
Distilled water	800.0 mL
Adjust Solution A to pH 2.3 with $\text{H}_2\text{SO}_4$ .	



## Solution B:

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20.0 g
Distilled water	200.0 mL

Stir Solution B to dissolve and quickly filter-sterilize.

## Modified Wolfe's Mineral Solution(g/L) pH7.0

Nitrilotriacetic acid	1.5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
NaCl	1.0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01

Add nitrilotriacetic acid to approximately 500 ml of water and adjust to pH 6.5 with KOH to dissolve the compound. Bring volume to 1.0 L with remaining water and add remaining compounds one at a time.

## 3.3 重金屬分析（三價鉻、六價鉻、總鉻）

(1) 總鉻分析: 研究分析方法以水中金屬及微量元素檢測方法—感應耦合電漿原子發射光譜法方法為主要分析等比縮小並修飾進行分析。首先取 10 mL (或適當體積) 於適當容器中, 將其均勻混合之原地下水樣, 加入 200  $\mu$ L (1 : 1) 硝酸及 100  $\mu$ L (1 : 1) 鹽酸混勻, 置入至加熱裝置上進行消化, 並控制溫度不至沸騰將其濃縮至原體積五分之一後, 蓋上錶玻璃且提高溫度至樣品稍微沸騰, 並加熱迴流一小時後, 在將消化處理水樣加入適量的 0.1 M 稀硝酸溶液, 再以超音波震盪 1 小時後, 以 5 mL 量瓶進行定量裝至適當 PE 瓶中, 以感應耦合電漿原子發射光譜儀(ICP-AES)進行分析得出濃度並紀錄其值 (mg TCr/L)。



(2) 六價鉻分析：在酸性溶液中，六價鉻與二苯基二氮脲（1,5-Diphenylcarbazide）反應生成紫紅色物質，以分光光度計在波長 540 nm 處，量測其吸光度並定量之(NIEA W320.52A)。研究分析採用方法是參考 NIEA W320.52A 及 APHA, AWWA, WEF 方法以等量比例方法縮小整合之方法，其方法檢測概念以不違背標準檢測方法為主。先取 4.7 mL 原地下水樣於室溫下，加入約 12  $\mu$ L 濃磷酸及 0.1 M 硫酸溶液調整至 pH 介於  $2.0 \pm 0.5$ ，再加入 100  $\mu$ L 二苯基二氮脲溶液，混合均勻並以去離子試劑水(deionized water)定量至 5 mL 量瓶。靜置 10 分鐘後，再以分光光度計於波長 540 nm 讀取吸光度且紀錄數值，再以六價鉻檢量線 ( $R_{sq} \geq 0.9995$ ) 求得濃度值 ( $\text{mg Cr}^{6+}/\text{L}$ )。

(3) 三價鉻分析：本實驗方法以理論推斷方式得出三價鉻濃度值，一般鉻的分佈以三價鉻、六價鉻及總鉻為主。理論質量平衡是六價鉻及三價鉻濃度總質量等同於總鉻總質量，故三價鉻濃度質即為總鉻分析濃度扣除六價鉻濃度，即為求出所得值 ( $\text{mg Cr}^{3+}/\text{L}$ )。

### 3.4 本土菌株耐受鉻與還原六價鉻之能力

本研究因考慮時效性，除了同步從鉻污染地下水篩選可耐受重金屬鉻毒性以及具還原六價鉻之本土微生物外，也檢視目前實驗室所收藏之具耐受重金屬本土菌株。選用執行科技部應用型產學計畫時從重金屬污染土壤分離純化之兩株菌株用於此計畫。菌株分離自遭重金屬污染之土壤(表 3.2)，分別為 *Ochrobactrum* sp. strain 71 與 *Microbacterium* sp. strain 73 (圖 3.3)。

表 3.2 菌株分離所使用之土壤重金屬之濃度(ppm)，鉻之濃度高達 2000 ppm

	鎳	銅	鋅	砷	鎘	汞	鉛	鉻
土樣	36	58.9	388	<LOD	<LOD	<LOD	1351	2286
	30	57.7	383	13	<LOD	<LOD	1342	2270



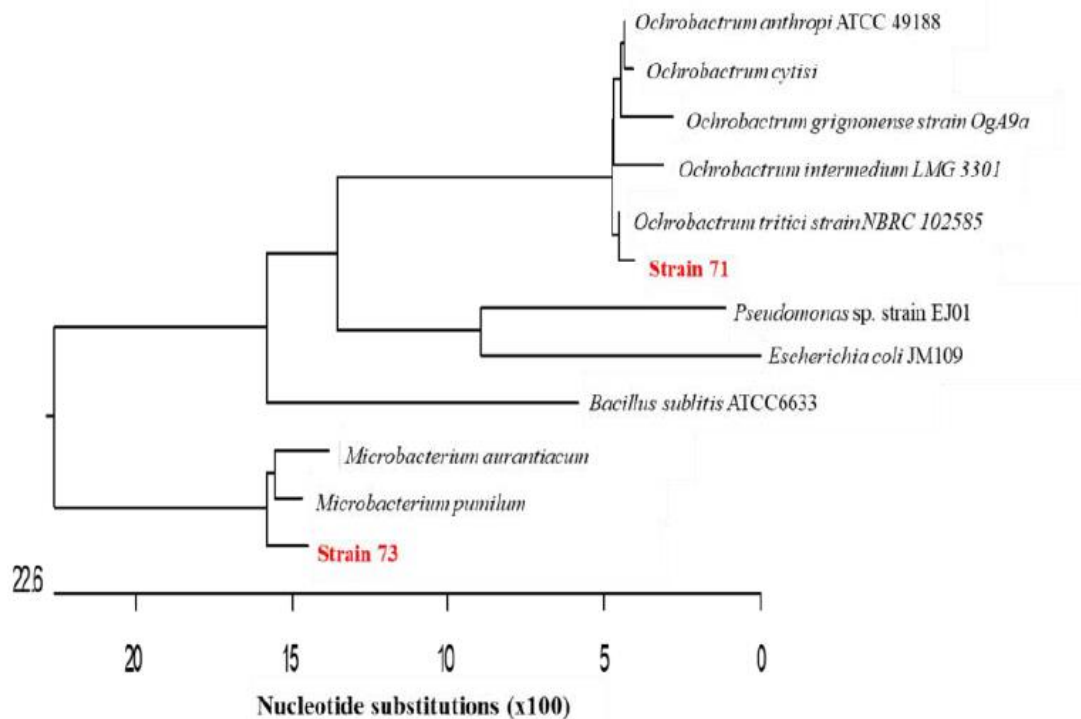


圖 3.4 Strain 71 與 strain 73 之 16S rRNA 基因序列與其它相關菌株之 16S rRNA 基因序列比對之親緣樹狀圖，顯示此兩株本土菌株分別屬於 *Ochrobactrum* sp. 與 *Microbacterium* sp.。

菌株對重金屬鉻的耐受性，將菌株培養在含 50 ml 的 LB medium 三角瓶內，30°C，150 rpm，並添加各種不同濃度之重鉻酸鉀 ( $K_2Cr_2O_7$ )，添加的濃度( $Cr^{6+}$ )為 5 ppm、50 ppm、100 ppm 與 200 ppm。菌液起始濃度  $OD_{600}$  值為 0.01，。以分光光度計測量吸光值  $OD_{600}$  進行量測，讀取吸光度且紀錄數值來測量細胞濃度，依吸光度脂數值描繪生長曲線，同時在細胞生長時和評估六價鉻還原之情形。

### 3.5 靜息細胞還原六價鉻能力之探討

先以 LB medium 進行前培養，於玻璃試管中加入 5 mL LB medium 並各別接種 *Ochrobactrum* strain 71、*Microbacterium* strain 73 兩株菌株，以 150 rpm，30°C 中培養 16 小時後，取出 1mL 菌液。用 1,000 xg 離心兩分鐘後，去除上層液，加入 2 mL ddH<sub>2</sub>O 回溶細胞，重複一次，此時細胞外不含任何 LB



medium，再將 2 mL 菌液接入含有 200 mL 之含鉻(50 ppm)之 LB medium 的 500 mL 錐形瓶中，以 150 rpm，30°C 中培養。培養至對數期生長之細菌後取 50 mL，以 15°C，6,000 rpm 離心 30 分鐘，離心後倒去上清液，再以 1 倍 PBS buffer (PH=7) 回溶，洗去殘餘之 medium，重複一次。最後再以含有重鉻酸鉀 (50 ppm) 之 PBS buffer 回溶至 50 mL，回溶後測量其吸光值，以及固定時間間距取樣，利用二苯基二氮脲測量溶液中六價鉻之殘留量。PBS 的配方如表 3.3 所示。

表 3.3 PBS buffer 配方 (per liter)

Content	Concentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
NaCl	8.01 g
KCl	0.20 g
ddH <sub>2</sub> O	補水至 1L

### 3.6 探討添加不同電子供應者(養分)於靜息細胞還原六價鉻之能力

在上述 PBS 實驗系統中，除了細胞外，添加不同的養分供應微生物細胞，以作為進行金屬還原反應之電子供應者。添加之營養源分別如下 (2 g/L)：葡萄糖、果糖、乳糖、醋酸與檸檬酸，以及電子供應者 NADH。

靜息細胞的製備如下所述，菌株 71 及菌株 73 細胞在 LB 培養液中培養至濃度 ( $OD_{600} = 1.07 \sim 1.24$ )，以 1,000 xg 離心 10 分鐘後，將細胞以 PBS 緩衝溶液洗滌回溶，將反應混合物放入 50 mL 離心管中，然後將其放置在 28 °C 的恆溫箱中，反應混合物的最終體積為 10 mL，通過添加 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 形式的 Cr(VI) 進行鉻酸鹽還原試驗，所有實驗的對照組都加入了菌株 71 及菌株 73 之細胞以外的其他成分，定期取樣，並對上清液中殘留的 Cr(VI) 進行分析，觀察細胞與 Cr(VI) 還原研究。



將靜息細胞以含有重鉻酸鉀 (5 ppm)之 PBS buffer 回溶至 50 mL，回溶後測量其吸光值，以及固定時間間距取樣，利用二苯基二氮脒測量溶液中六價鉻之殘留量以及總鉻量，評估各種營養源與電子供應者提高本土菌株在六價鉻還原之能力。

### 3.7 地下水樣本總 DNA 之萃取與菌相分析

將採樣後保存於 4°C 之地下水(3-5 公升)經由 022  $\mu\text{m}$  孔徑之濾膜過濾，過濾膜可暫存於 -80°C 冰箱保存，之後利用去離子水沖提濾膜上之微生物再利用不同的 DNA 萃取試劑萃取 DNA。用於地下水 DNA 萃取的試劑包括有 FavorPrep® Soil DNA Isolation Mini Kit； PowerWater® DNA Isolation kit； DNeasy PowerWater Kit (Qiagen)，詳細操作流程可參考 Qiagen 網站 (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=bb731482-874b-4241-8cf4-c15054e3a4bf&lang=en>)。

使用 Primer 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG)及 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) 進行 16S rDNA V3 /V4 region 的擴增 (增幅之 PCR 產物長度為 465 bp)。

將經過品質檢測 DNA 使用 Primer 341F E01,F01 及 805R 進行 Barcoding PCR，實驗條件設計如表 3.4，構築 16S rRNA 基因庫 V3-V4 region 擴增以便進行 metagenome 之分析。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

表 3.4 16S rRNA 基因 V3-V4 PCR 使用之引子與實驗條件

PCR condition				
Initiation	95°C	3 min		
Denaturation	98°C	20 sec		5 cycles
Annealing	57.5°C	20 sec		
Extension	72°C	20 sec		
Final extension	72°C	3 min		
F Primer	Sequence		R primer	Sequence
341F-E01	CACgTCTACCTACgggNggCWgCAg		805R	GACTACHVGGGTATCT
341F-F01	AgCTAgTgCCTACgggNggCWgCAg			AATCC

利用 MiSeq System 進行 2 x 301 bp Paired – end Sequencing，經由合併 (merge) 雙端序列可獲得較長的 read，可模擬 Roche 454 long read 平台，因此所構築之 library 便以 Illumina MiSeq System 上機進行 2 x 301bp Paired – end Sequencing 定序。

### 3.8 產氫菌株與鉻還原菌的固定化

固定化(矽利康)膠體製作

TMOS: tetramethoxysilane (40%)

MTMS: methyltrimethoxysilane (60%)

HCL: 5 mM

SNP: silica nanoparticles



### 產氫菌的固定化

TMOS 為 98%純度液體、MTMS 為 98%純度液體(購自 Sigma-Aldrich)、矽奈米顆粒(Ludox TM-40 colloidal silica nanoparticles, 直徑 22 nm 的二氧化矽)、菌液為含有丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*) $1 \times 10^9$  或並懸浮於磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)中。將 TMOS 與 MTMS 以 1:3 的體積比例混合後(75% MTMS), 再將(TMOS+MTMS)與 5 mM 鹽酸以 1:1 的體積比例混合, 使 MTMS 與 TMOS 進行水解數小時, 獲得烷氧溶液。將烷氧溶液、矽奈米顆粒與菌液以 2.5:2.5:1 的體積比例混合, 使烷氧溶液、菌液以及矽奈米顆粒開始進行縮合, 同時倒入模具中成形, 以獲得包埋微生物膠體。成形之後可以 PBS 清洗包埋微生物膠體, 以移除副產物甲醇, 其步驟如下圖(圖 3.5)所示。

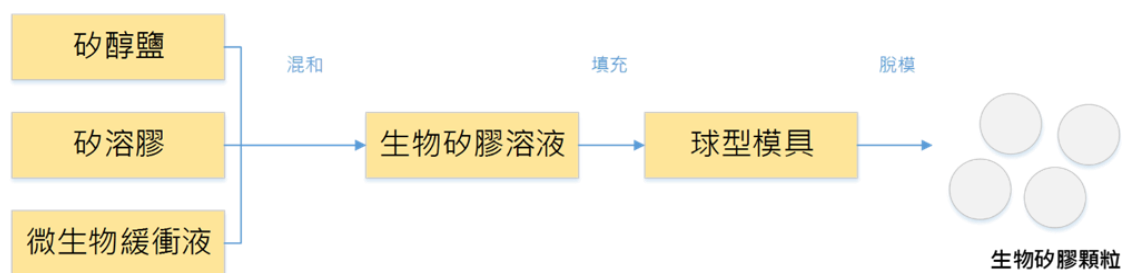


圖 3.5 固定化膠體製作步驟

### 銻還原菌的固定化

使用菌株 71 及菌株 73 在 LB 培養液中, 至原始濃度 ( $OD_{600} = 1.5 - 2.5$ ), 以 1000 xg 離心 10 分鐘後, 將細胞以 PBS 緩衝溶液洗滌回溶保存, 即為實驗使用靜息細胞, 最終之細胞濕重為 0.5 g/ml。

以混合比例 (TMOS+MTMS)/HCL=1:1 為 A, 攪拌兩小時後, 將 A:SNP:靜息細胞=2.5:2.5:1 混合, 成膠體後以 PBS 洗滌 30 秒去除甲醇。



#### 開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

以固定化菌株之膠體進行六價鉻還原之實驗，以收集之實場地下水為實驗樣本，實驗過程與方法與靜息細胞相同。除了評估六價鉻還原成三價鉻之能力外，同時也測量總鉻與六價鉻存留於地下水的濃度，以初步評估菌株是否具吸附鉻(包括總鉻與六價鉻)之能力。



## (四) 結果與討論

### 4.1 菌株的培養與污染場址樣本

本研究分離菌株之樣本來源分別為三個不同的樣本，篩選具耐受重金屬鉻毒性且具有還原六價鉻之細菌是以重金屬污染之土壤以及鉻污染地下水為樣本來源，而分離純化培養嗜酸菌樣本來源則為電鍍廠廢水與硫磺谷之泥水。

台灣「土壤及地下水污染整治法」中列入規範的有鎘、鉻、銅、鋅、鎳、鉛、汞及砷八種 [張，2002]。在列入規範的重金屬及管制標準濃度一般土地管制標準與食用作物農地管制標準如表 4.1 所列。而根據土壤及地下水污染整治法記述，地下水之八大重金屬管制標準規定六價鉻管制值則如表 4.2 所列，於第一類及第二類地下水質限值分別為 0.05 mg/L 及 0.50 mg/L。

表 4.1 環保署列入規範的重金屬及管制標準濃度

項 目	一般土地管制標準 (毫克/公斤)	食用作物農地管制標準 (毫克/公斤)
砷(As)	50	—
鎘(Cd)	20	5
鉻(Cr)	250	—
銅(Cu)	400	200
汞(Hg)	10	2
鎳(Ni)	200	—
鉛(Pb)	2000	500
鋅(Zn)	1000	600





表 4.2. 土壤及地下水之八大重金屬污染物質現行制標準

八大重大屬污染物	地下水水質分級及管制值 (mg/L)	
	第一類 <sup>a</sup>	第二類 <sup>b</sup>
砷(As)	0.050	0.50
鎘(Cd)	0.0050	0.050
<u>鉻(Cr)</u>	<u>0.050</u>	<u>0.50</u>
銅(Cu)	1.0	10
鉛(Pb)	0.010	0.10
汞(Hg)	0.0020	0.020
鎳(Ni)	0.10	1.0
鋅(Zn)	5.0	50

a. 第一類：飲用水水源水質保護區內之地下水。

b. 第二類：第一類以外之地下水。

參考資料來源：行政院環保署，土壤及地下水整治法之地下水污染管制標準，2015。

本研究收集之地下水（由富立業工程顧問股份有限公司提供，圖 4.1）所含之鉻金屬濃度約 0.8 -1.5 ppm。由於在地下水中微生物需透過營養鹽及其它有機碳等提供其代謝、生長與還原能力。碳源不足時，微生物難以大量生長。也因此進行生物整治時，相關文獻指出，常需注入乳化油至受污染之地下水層時，可有效處理污染物。其所加入之乳化油可以經由發酵後產生之氫氣及低分子量之脂肪酸(醋酸鹽、乳酸鹽、丙酸及丁酸)，用以提供厭氧生物降解污染物時所需之碳源及能量[Joutey et al., 2015]。地下水質基本性質表 4.3 所列，顯示污染場址地下水中碳源明顯不足，微生物難以大量生長，也因此萃取水中總 DNA 困難度相對較高。



表 4.3 本研究收集的地下水之水質基本性質分析

分析項目		單位	檢測數值
酸鹼值 (pH)		—	6.2 ~ 6.5
溶氧 (DO)		mg/L	3.45 ~ 3.8
導電度 (EC)		μmho/cm	519~594
氧化還原電位 (ORP)		mV	146
重金屬	鉻	mg/L	1.56
	砷	mg/L	ND
	鎘	mg/L	ND
	銅	mg/L	< 0.002
	鋅	mg/L	0.02
	鉛	mg/L	ND
	汞	mg/L	ND
	鎳	mg/L	ND
總溶解性有機碳 (TDOC)		mg/L	0.6
總硬度 (以 CaCO <sub>3</sub> 計)			186
氯鹽		mg/L	25.8
氨氮		mg/L	0.02
硝酸鹽氮		mg/L	12.7
亞硝酸鹽氮		mg/L	0.004
硫酸鹽		mg/L	49.7



圖 4.1 本計畫所收集將用於後續實驗之鉻污染地下水。樣本之水質分析請參見表 4.3。

當溶液中氧化還原電位為正值時代表溶液呈現氧化態；若為負值則代表溶液呈現還原態，若反應環境中氧化物種與還原物種濃度比值愈高、pH 愈低、溫度愈低、溶氧愈高，電子釋放傾向愈大則氧化還原電位越高，六價鉻在還原時 ORP 氧化還原電位數值不需太低即可將其轉化為三價鉻。另外在地下水中微生物可透過營養鹽及其它有機碳等提供其代謝、生長與還原能力，分析水樣總有機碳濃度有助於評估基質濃度變化。

由表 4.3 可知，我們取得之地下水總溶解性有機碳含量不高，可能無法提供微生物足夠之營養生長以及進行生物整治功能。而氧化還原電位則應可滿足六價鉻之還原。

嗜酸菌的篩選與分離純化部分，所使用的電鍍廠廢水其 pH 值僅有 1.7，金屬含量則如表 4.4 所列，含有極高濃度之重金屬鉻。



表 4.4 本實驗使用之工業電鍍廢水所含之各種重金屬含量。除了高濃度的重金屬鉻外，電鍍廢水也含有其他重金屬。此電鍍廢水具極酸性，pH 約 1.7。

**電鍍廢水金屬含量**

鎳 (mg/L)	0.645
鉛(mg/L)	0.935
銅(mg/L)	7.8
鉻(mg/L)	228
鎘(mg/L)	ND
鋅(mg/L)	ND

電鍍廢水加至含 MTFM 培養基試管培養 5 天後，培養出可氧化培養基中之鐵離子之微生物，可以明顯的看出培養基顏色之改變，含有電鍍廢水的培養基中明顯有微生物的生長(圖 4.2)。圖 4.3 則為在相位差顯微鏡下觀察到從電鍍廢水所培養之微生物。嗜酸菌之定量較無法使用傳統吸光度測量其生長量，因此本研究採用細菌計數盤，直接計算培養液中細菌之數目。同樣的，使用硫磺谷所取得泥土水培養，也同樣在培養 5 天後即可在培養基中觀察到微生物的生長(圖 4.4)，圖 4.5 則是在相位差顯微鏡下觀察培養之微生物的情形。

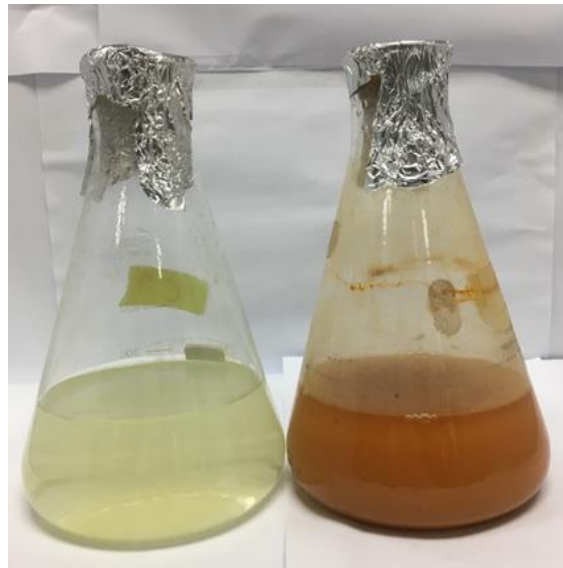


圖 4.2 含有電鍍廢水的培養基培養 5 天後，溶液顏色的變化。左邊是 250 ml MTFM Medium，右邊是 250 ml MTFM Medium+5 ml 電鍍水。

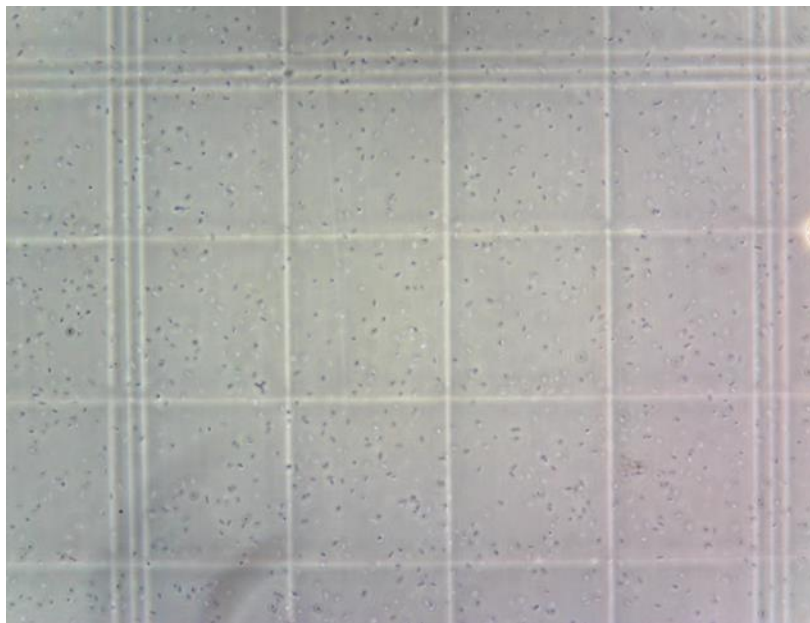


圖 4.3 在相位差顯微鏡下，所觀察到的電鍍廢水在 MTFM 培養出來之細菌。從鏡檢觀察可看到培養出之嗜酸菌。



圖 4.4 含有硫磺谷泥土水之 MTFM 培養 5 天後，溶液產色的變化，左邊的是 250 ml MTFM Medium；右邊的是 250 ml MTFM Medium + 5 ml 硫磺谷泥土水。



圖 4.5 在相位差顯微鏡下，所觀察到的硫磺谷泥土水在 MTFM 培養出來之細菌。



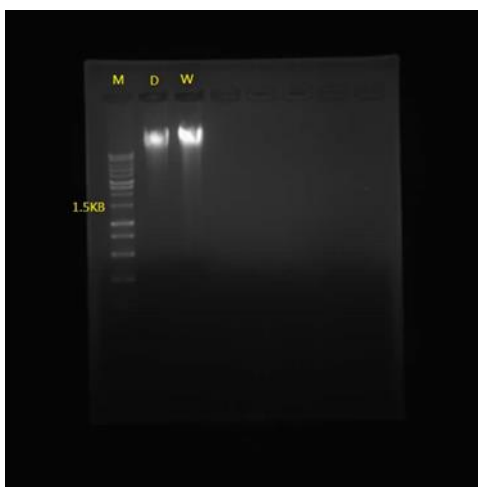


嗜酸菌的生長較慢，因此無法直接使用分光光度計測量細胞濃度。培養之嗜酸菌計數乃是在顯微鏡下直接觀察，在有界線的載玻片(Petroff Hausser Counting Chamber)上計算微生物細胞的總數量。菌數的計算如下 (cells/ml)：

$$\{ [(顯微鏡下的菌數/所數的格數) \times 16] \times 25 / 0.02 \} \times 1000$$

兩株嗜酸菌由工業電鍍廠廢水以及硫磺谷泥土水中分離出來，分別命名為菌株 CK-D (strain CK-D) 與菌株 CK-W (strain CK-W)。菌株的初步鑑定為使用 16S RNA 基因序列分析。利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 增幅其 16S RRNA 基因，PCR 所使用的引子為 16S1 (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') 和 16S2 (5' - TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T - 3')，PCR 反應的條件為：95°C，5 分鐘，94°C denature 1 分鐘，50°C annealing 1 分鐘和 72°C extension 1 分鐘，共 35 個循環，最後 72°C 10 分鐘，保存在 4°C。利用這對引子所增幅菌株 CK-D 與菌株 CK-W 之 16S RNA 基因片段見圖 4.6。所增幅之片段經定序分析後初步鑑定此兩菌株均屬 *Acidithiobacillus* spp.。菌株 CK-D 與菌株 CK-W 之 16S RNA 基因序列見附錄 1。圖 4.7 為 CK-D 與菌株 CK-W 之 16S RNA 基因序列與相關菌株之 16S rRNA 基因分析比對之親緣樹狀圖。

(A)



(B)

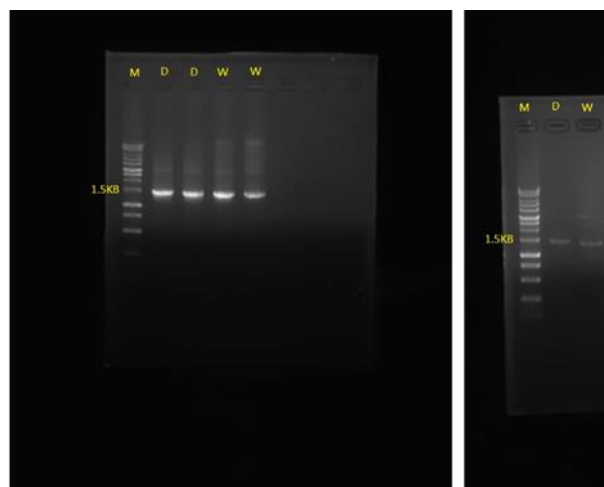




圖 4.6 初步鑑定培養純化之本土嗜酸菌乃是採用 16S rRNA 基因定序並與資料庫比對而得。純化之本土嗜酸菌(菌株 CK-D 與菌株 CK-W)之 DNA 萃取結果顯示於(A)圖。(B) 則為利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 將其 16S rRNA 基因增幅之結果 (菌株 CK-D； W: 菌株 CK-W)

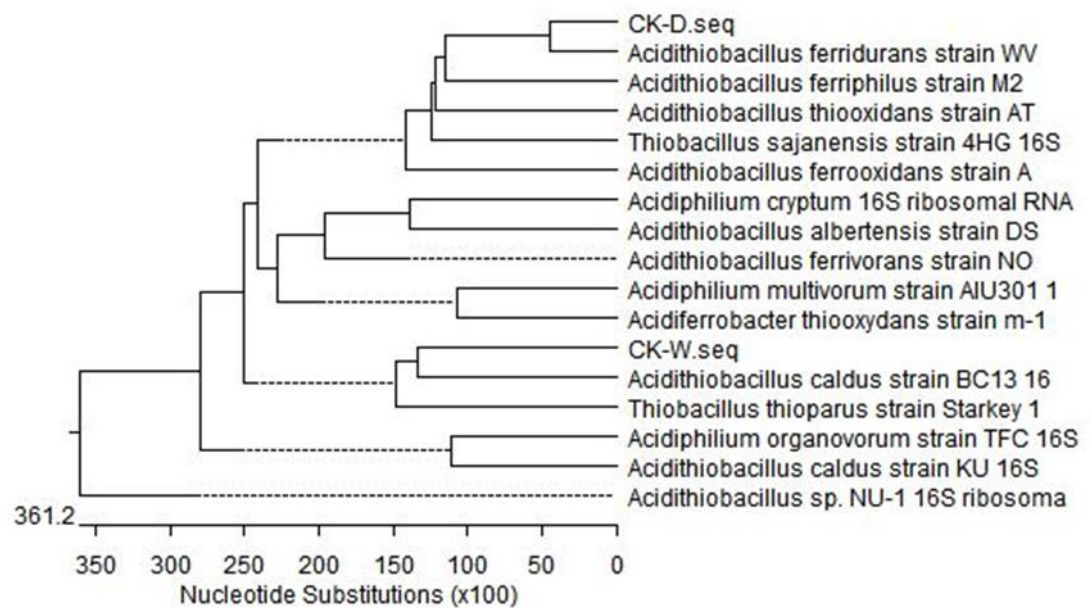


圖 4.7 菌株 CK-D 與菌株 CK-W 16S rRNA 基因與其它相關菌株之 16S rRNA 基因序列比對之親緣樹狀圖。由親緣樹狀圖可確認，兩株純化菌株均屬於 *Acidithiobacillus* 菌屬。

不同溫度下(25°C; 30°C; 37°C)菌株 CK-D 與菌株 CK-W 培養在 MTFM 培養基中的生長情形顯示菌株 CK-D 在 25°C 下生長情況最理想，而菌株 CK-W 則顯示在 25°C 與 37°C 生長情形均較好。兩株菌株在 30°C 的生長相對均較差。菌株之生長測量乃是使用細菌計數器(Petroff-Hausser Counting Chamber)，直接在顯微鏡下觀察計數，以所計算到之微生物細胞的總數量做生長曲線，結果如圖 4.8 所示。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

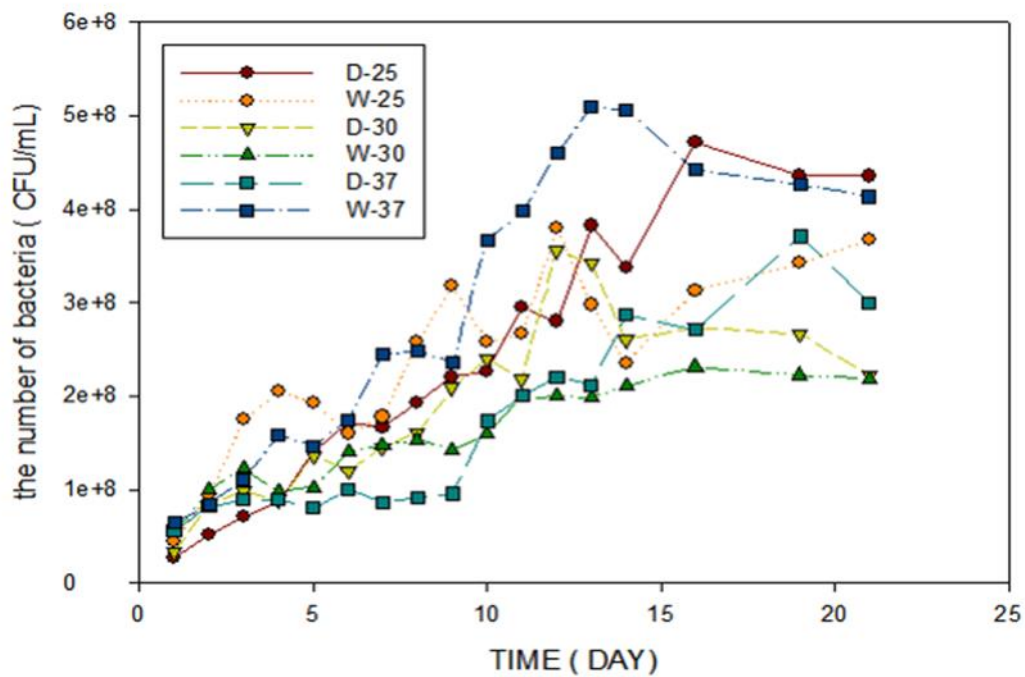


圖 4.8 菌株 CK-D 和 CK-W 在不同溫度下的生長曲線。(D：菌株 CK-D；W：菌株 CK-W。25：25°C；30：30°C；37：37°C)。

## 4.2 重金屬分析

六價鉻的檢測，可以使用二苯基二氮脒 (1,5-Diphenylcarbazide) (圖 4.9)。二苯基二氮脒 (1,5-Diphenylcarbazide) 具有未配對的氮原子 (N)，是一種螯合劑，在酸性溶液中，六價鉻與二苯基二氮脒反應生成紫紅色物質。以分光光度計在波長 540 nm 處，量測其吸光度便可定量六價鉻之濃度。圖 4.10 是以二苯基二氮脒檢測六價鉻(0-5 ppm) 之濃度的檢量線。

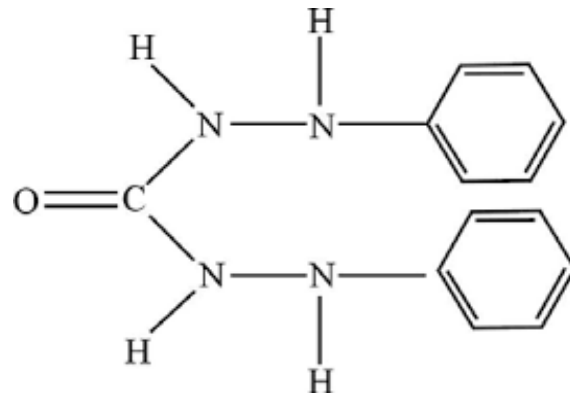
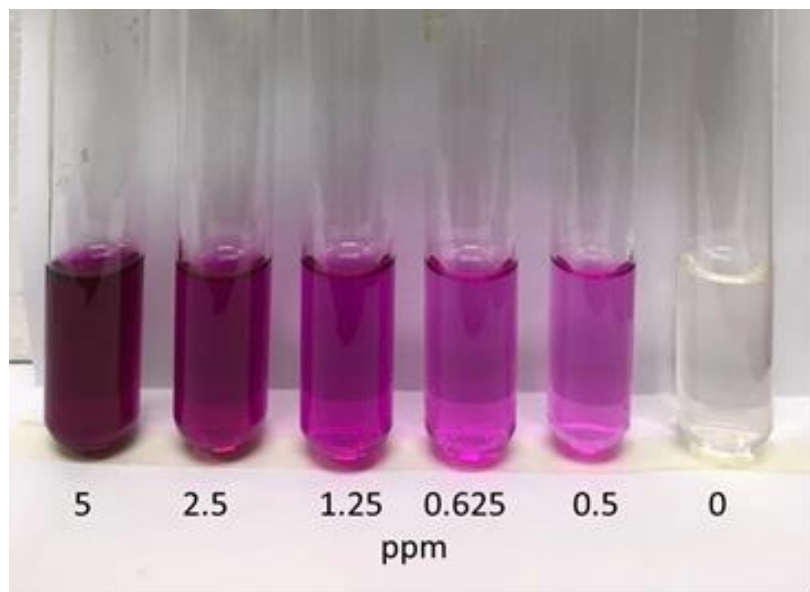


圖 4.9 二苯基二氮脲（1,5-Diphenylcarbazide）之結構式，可與六價鉻反應形成紫紅色物質，做為檢測六價鉻濃度之標準。





開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

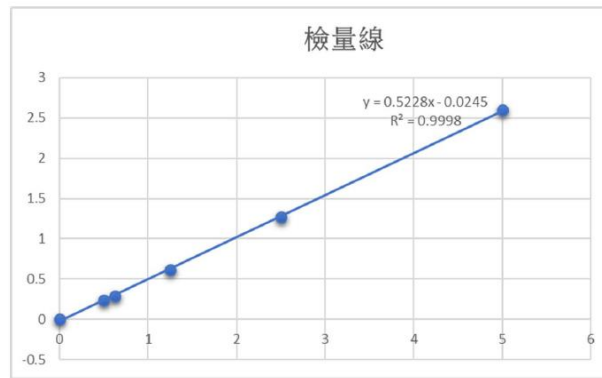


圖 4.10 以二苯基二氮脲（1,5-Diphenylcarbazide）檢測六價鉻之濃度及檢量線。

傳統以二苯基二氮脲（1,5-Diphenylcarbazide）檢測六價鉻，反應及檢測較為繁瑣。目前有許多能針對特定重金屬或許多化合物進行快速檢測的簡易型多參數比色計，非常適合初步判讀樣本的重金屬含量，包括六價鉻與總鉻。本研究後續由於樣本量漸漸的會增多，因此樣本檢測初步將使用市面上的 DR 900 攜帶型多參數比色計(圖 4.11)，其原理仍是採用比色法，但方便性較傳統方法進步很多。可在現場快速、簡便的測量六價鉻與總鉻，於污水處理、環境監測、水處理等應用非常的方便。



圖 4.11 本研究使用於初步檢測六價鉻與總鉻之 DR900 攜帶型多參數比色計。

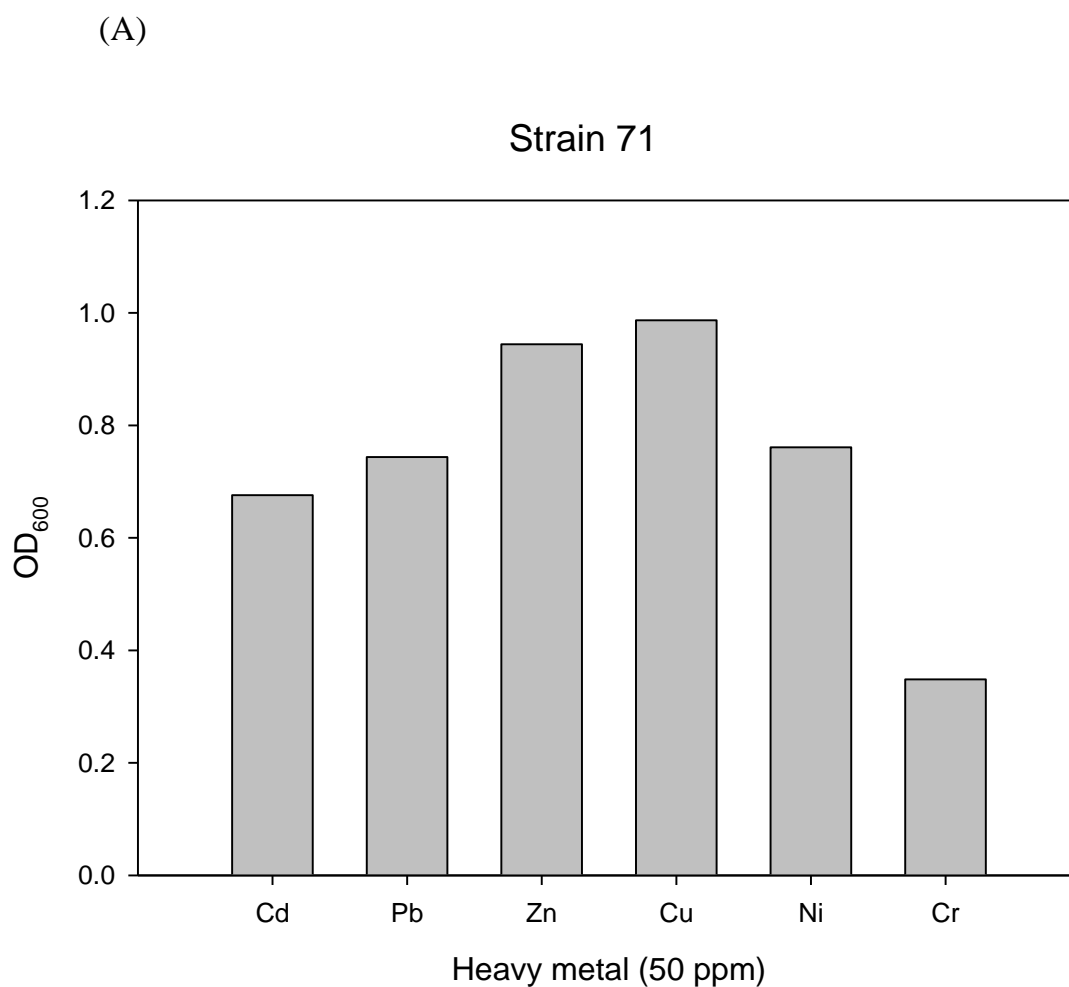
#### 4.3 本土菌株耐受鉻與還原六價鉻之能力

蒼白桿菌 (*Ochrobactrum* strain 71) 與微桿菌 (*Microbacterium* strain 73) 為實驗室源自鉻金屬污染土壤馴化分離並保存的菌種。本實驗首先測試此兩株本土菌株在不同重金屬 (50 ppm) 生長情形。將菌株 71、73 於 LB 培養基於 30°C，150 rpm 培養至對數生長期 (前培養)。在含所欲測試之各重金屬離子濃度 (50 ppm) 之 LB 培養基中，加入前培養菌液達起始濃度 OD<sub>600</sub> 值為 0.01，置於培養箱中 30°C，150 rpm，24 小時，利用分光光度計 (OD<sub>600</sub>) 記錄生長狀況。所測試之重金屬包括 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Cr)，CuCl<sub>2</sub> (Cu)，ZnCl<sub>2</sub> (Zn)，Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Pb)，和 CdCl<sub>2</sub> (Cd)。





結果如圖 4.12 所示，*Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 在含有 50 ppm 的各種重金屬均能生長。除了鉻以外，這兩株菌株亦能耐受相當程度之其他重金屬濃度，因此在實務整治上，若污染場址含有其他重金屬，此兩株本土菌株仍有機會可以應用作為生物整治使用菌株。



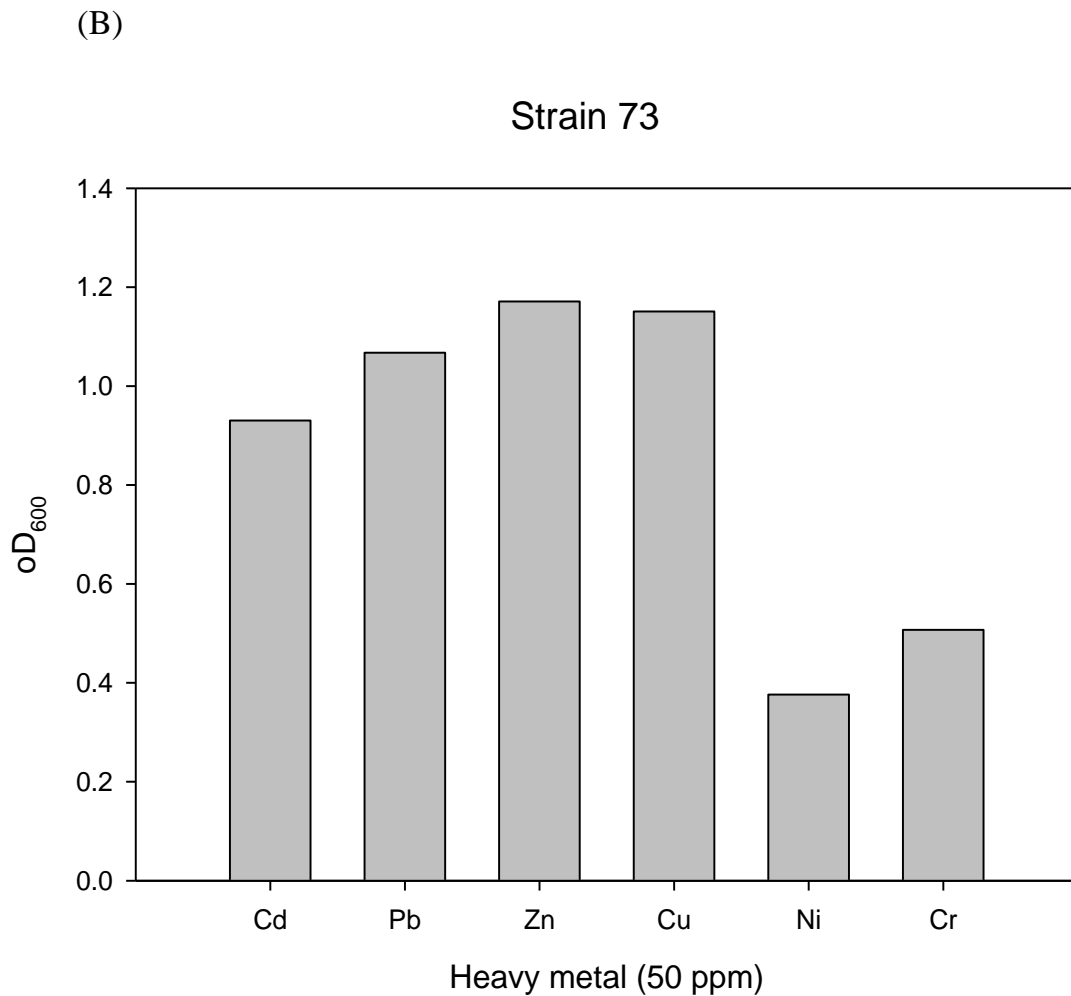


圖 4.12 *Ochrobactrum* strain 71 (A) 與 *Microbacterium* strain 73 (B) 在含有 50 ppm 的各種重金屬之 LB 生長情形

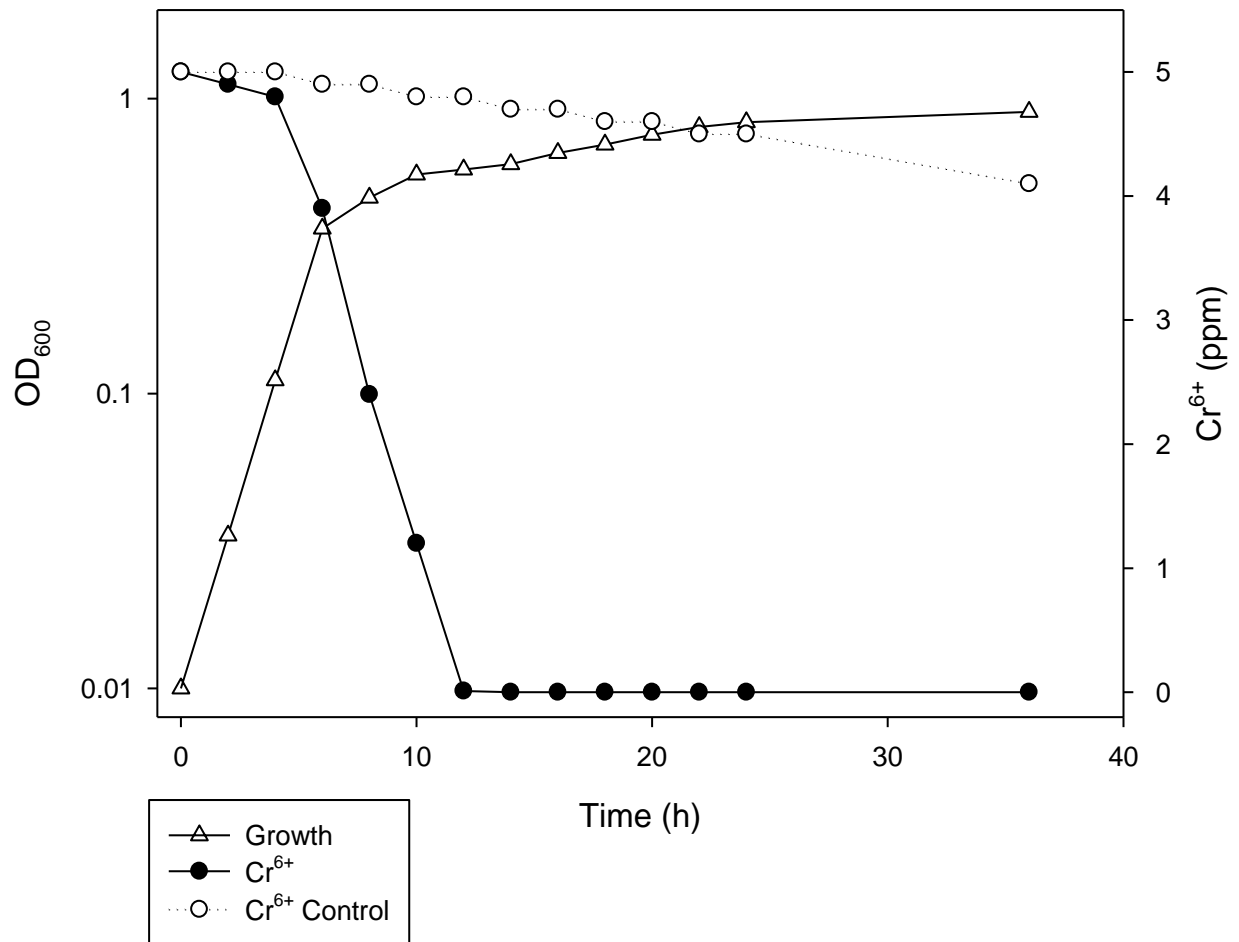
*Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 在含鉻的培養基生長時，具有還原六價鉻之能力。在污染的地下水超過 0.5 ppm 即超過管制標準。本實驗分別檢視 *Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 在含 5 ppm, 50 ppm, 100 ppm 以及 200 ppm 重鉻酸鉀 ( $\text{Cr}^{6+}$ ) 的 LB 培養基中還原六價鉻的情形。在培養基中，這兩株本土菌株均可快速的還原六價鉻，圖 4.13 為 *Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 在含 5 ppm 重鉻酸鉀的 LB 生長情形以及生長時六價鉻還原的狀況。兩株菌株在培養基中均能很快的還原六價鉻，而 strain 71 的效率顯然又較 strain 73 為佳。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

(A)

*Ochrobactrum* strain 71





(B)

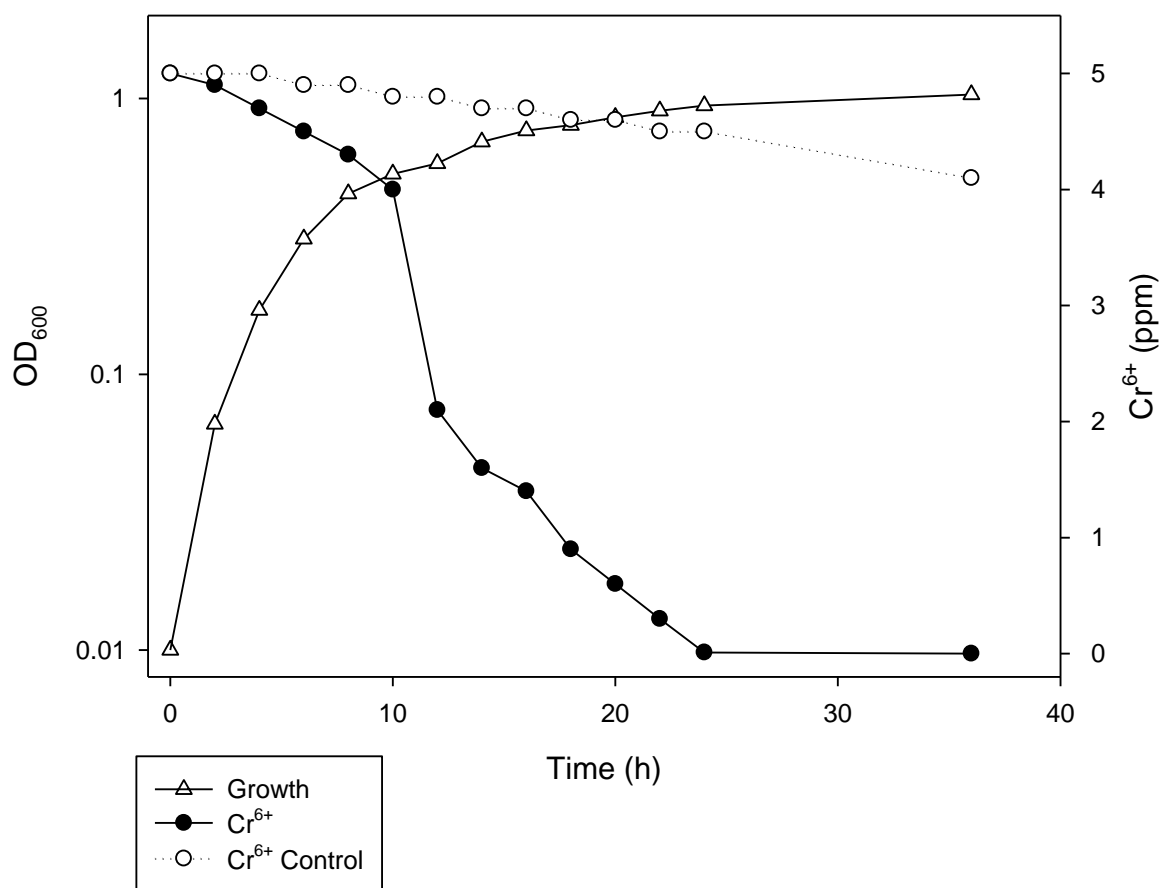
*Microbacterium* strain 73

圖 4.13 *Ochrobactrum* strain 71 (A)與 *Microbacterium* strain 73 (B) 在含 5 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原。

在 5 ppm 的 LB 培養基中生長時，*Ochrobactrum* strain 71 生長速度較 *Microbacterium* strain 73 更快，同時也具較快之還原六價鉻之能力 (12 h vs 24 h)。兩株菌均能將 5 的六價鉻完全還原。

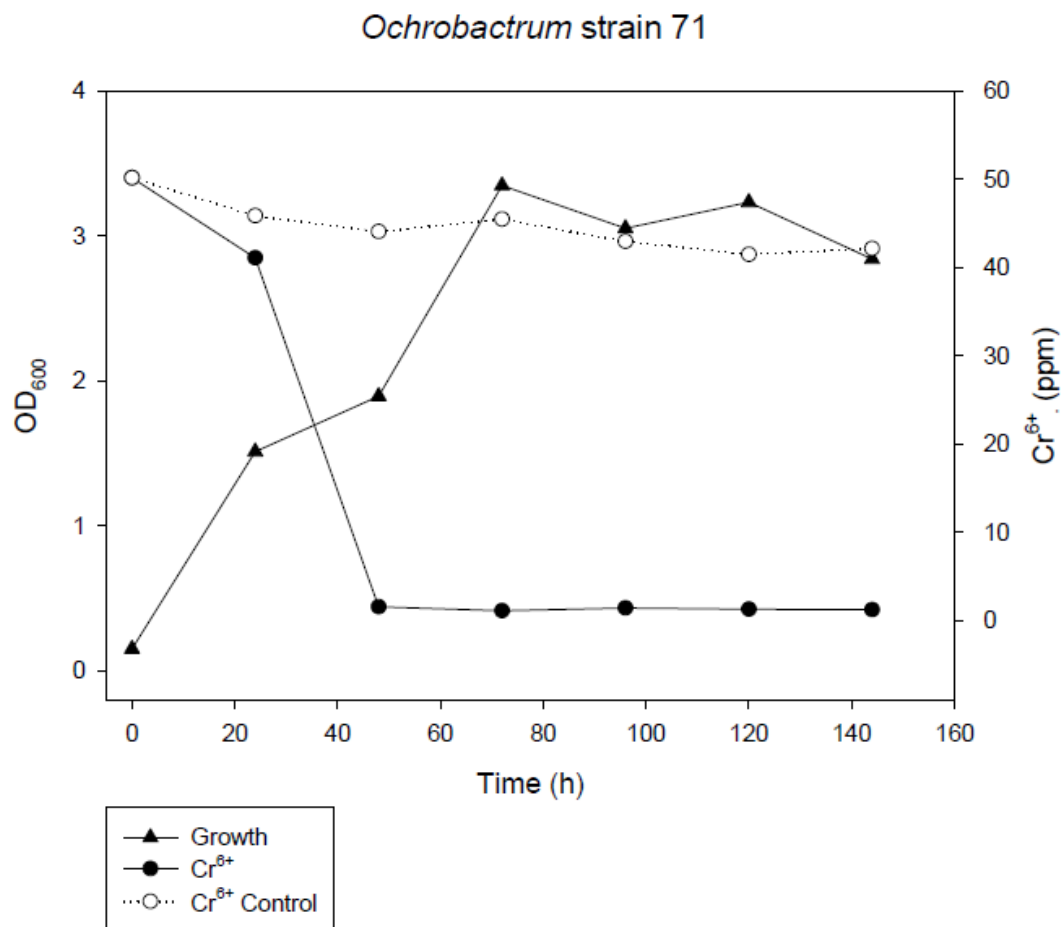
當培養基中所含之六價鉻離子濃度增加至 50 ppm，這兩株菌仍然可以生長並成功的將其還原成三價鉻。不過濃度增加時，其生長較低濃度時慢，也需



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

要較長的時間才能將培養基的六價鉻離子還原。然而當濃度增加到 50 ppm 時，*Ochrobactrum* strain 71 不論是在生長速度與還原六價鉻的能力，都比 *Microbacterium* strain 73 來得好很多（圖 4.14）。當濃度提升至 50 ppm 時，很明顯的 strain 71 還原六價鉻之能力較 strain 73 為佳。有可能當培養基中鉻濃度增加時，開始對菌株生長與代謝能力(特別是 strain 73) 產生抑制作用。在含 50 ppm 鉻離子的 LB 培養基生長時，*Microbacterium* strain 73 僅能還原培養基中大約 80% 的六價鉻，而且所需時間長達 120 h。在還原六價鉻離子的能力，*Ochrobactrum* strain 71 較具優勢，因此在含 100 ppm 與 200 ppm 鉻離子培養基的生長與還原實驗，僅針對 *Ochrobactrum* strain 71 進行評估。

(A)





(B)

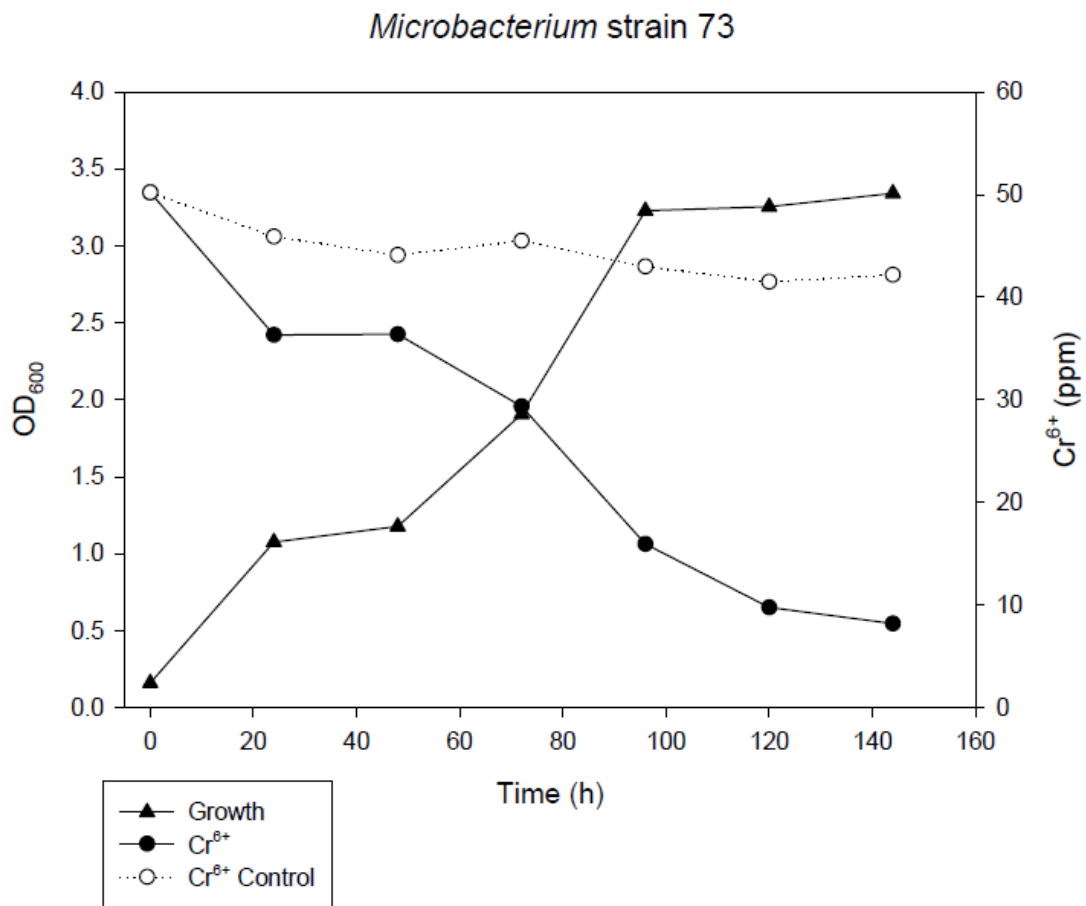


圖 4.14 *Ochrobactrum* strain 71(A)與 *Microbacterium* strain 73 (B)在含 50 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原。

當培養基中種鉻酸鉀濃度增高時，菌株生長明顯受到影響，且需較長時間才能完全還原培養基中之六價鉻。培養基中鉻離子濃度增加到 100 ppm 時，雖然 *Ochrobactrum* strain 71 仍然能夠幾乎完全將培養液中之六價鉻還原，但是需要非常長的時間(超過 10 天)才能生長至穩定期 (Stationary phase)及完全還原培養基中之六價鉻(圖 4.15)。當培養基的鉻離子增加至 200 ppm 時，需要非常長的時間 *Ochrobactrum* strain 71 才能生長，經過 20 天的培養，也僅能還原培養基中約 50% 的六價鉻 (圖 4.16)，顯示當培養基中鉻離子達到高濃度時，對菌株的生長與鉻還原能力開始有一定的抑制效應。





開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

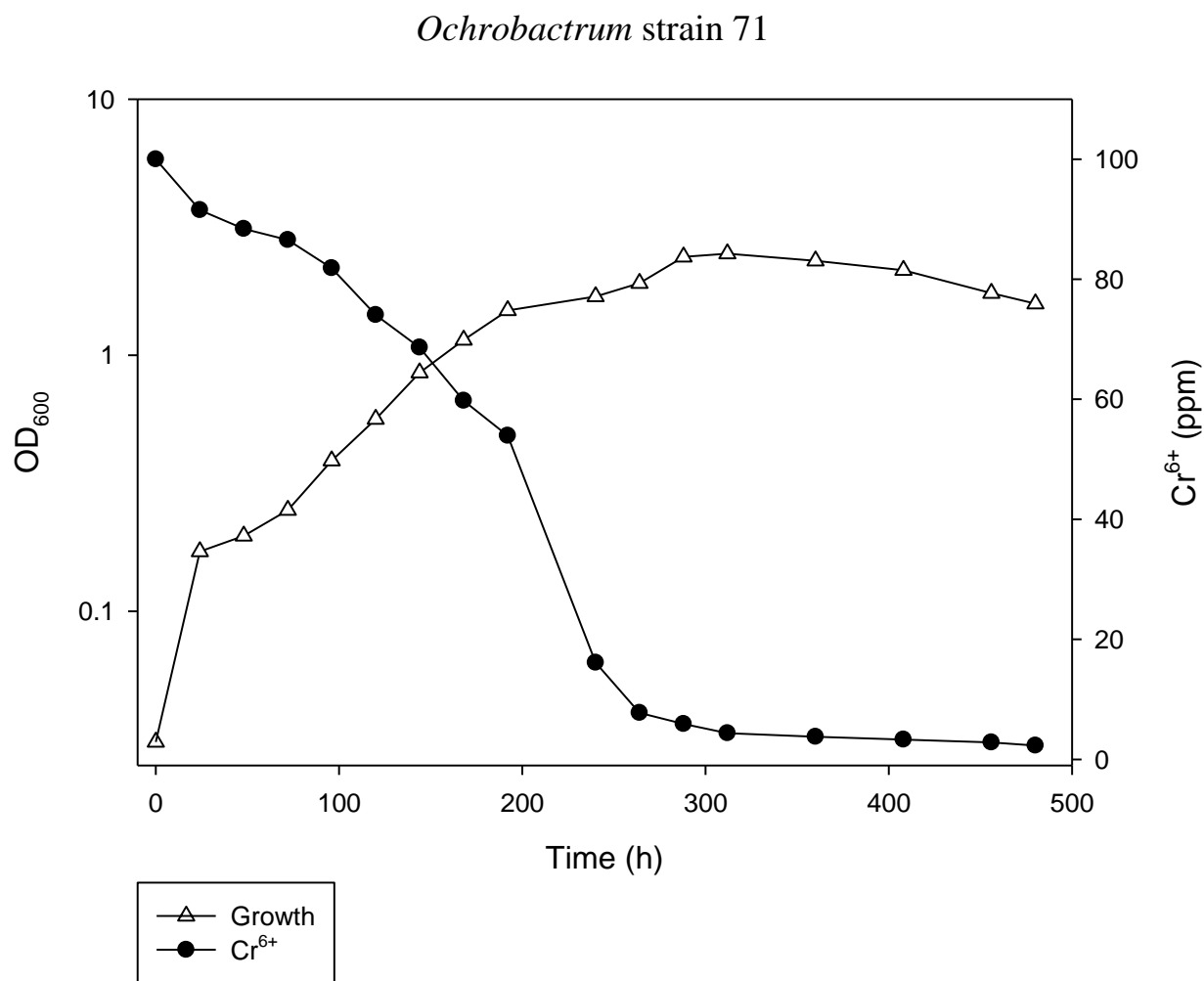


圖 4.15 *Ochrobactrum* strain 71 在含 100 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原。

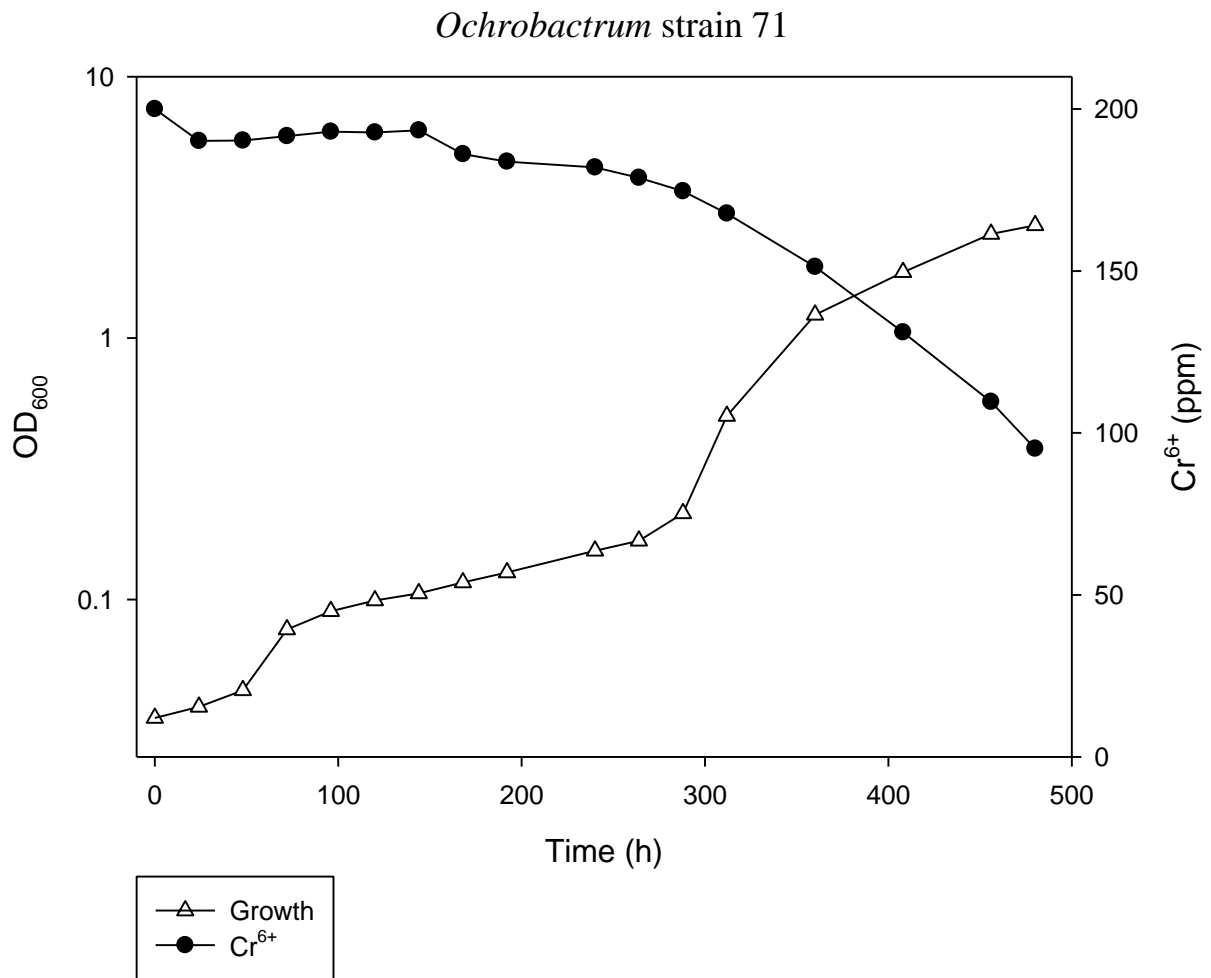


圖 4.16 *Ochrobactrum* strain 71 在含 200 ppm 六價鉻(重鉻酸鉀)的 LB 生長以及六價鉻之還原。

#### 4.4 菌株 71 與菌株 73 之靜息細胞還原六價鉻能力

利用 *Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 的靜息細胞 (Resting cells) 在未添加任何營養源的磷酸緩衝液(Phosphate Buffer, PBS)無法快速的還原六價鉻 (圖 4.17 與圖 4.18)。文獻亦指出微生物在還原六價鉻時，常常需要外源的電子供應，因此我們也添加不同的營養源如 NADH 及其他營養源作為電子供應者來提供電子還原六價鉻之可行性。

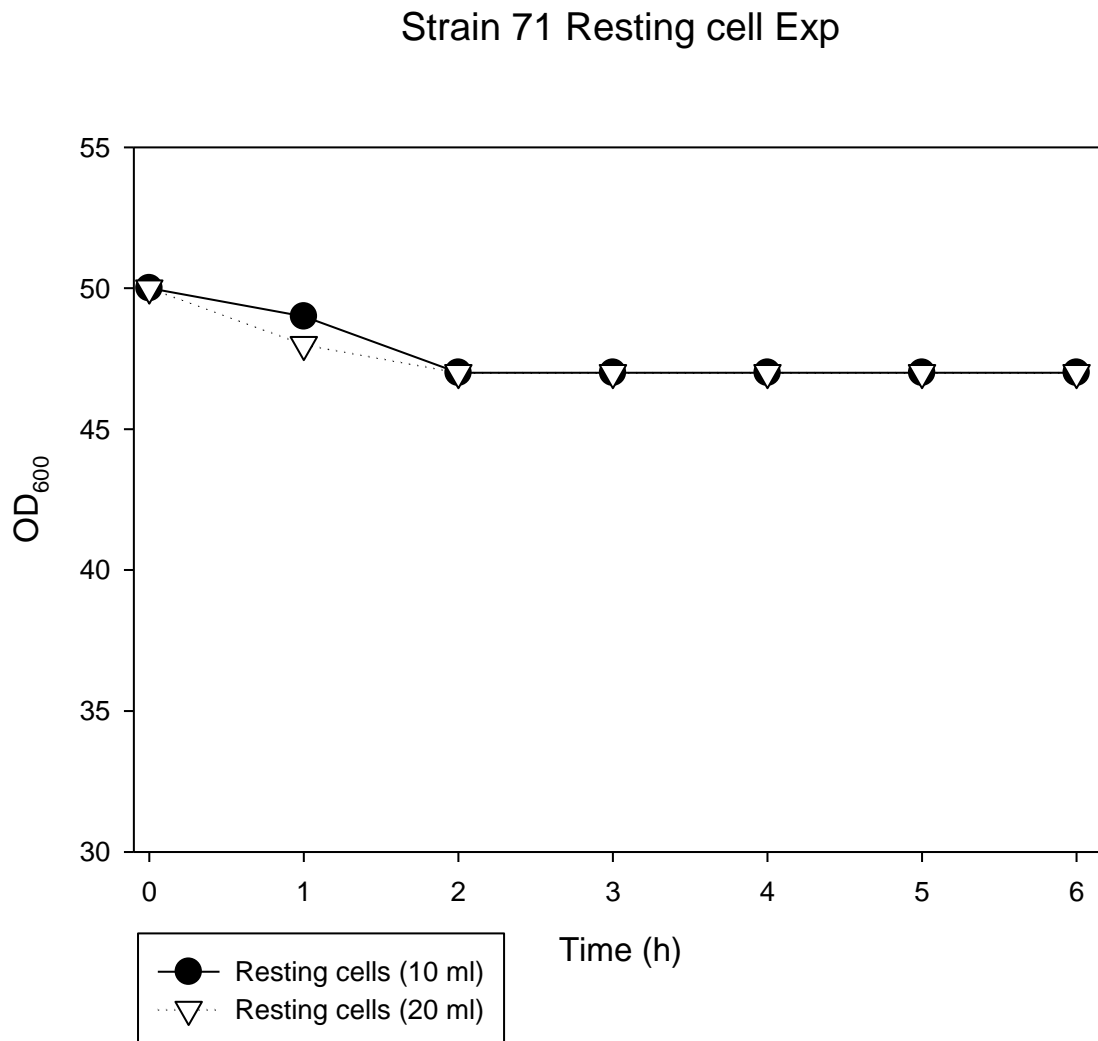


圖 4.17 使用生長至對數期之 *Ochrobactrum* strain 71 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS) 中進行六價鉻還原，在未添加任何營養源(電子供應者)，菌株幾乎無法還原六價鉻。

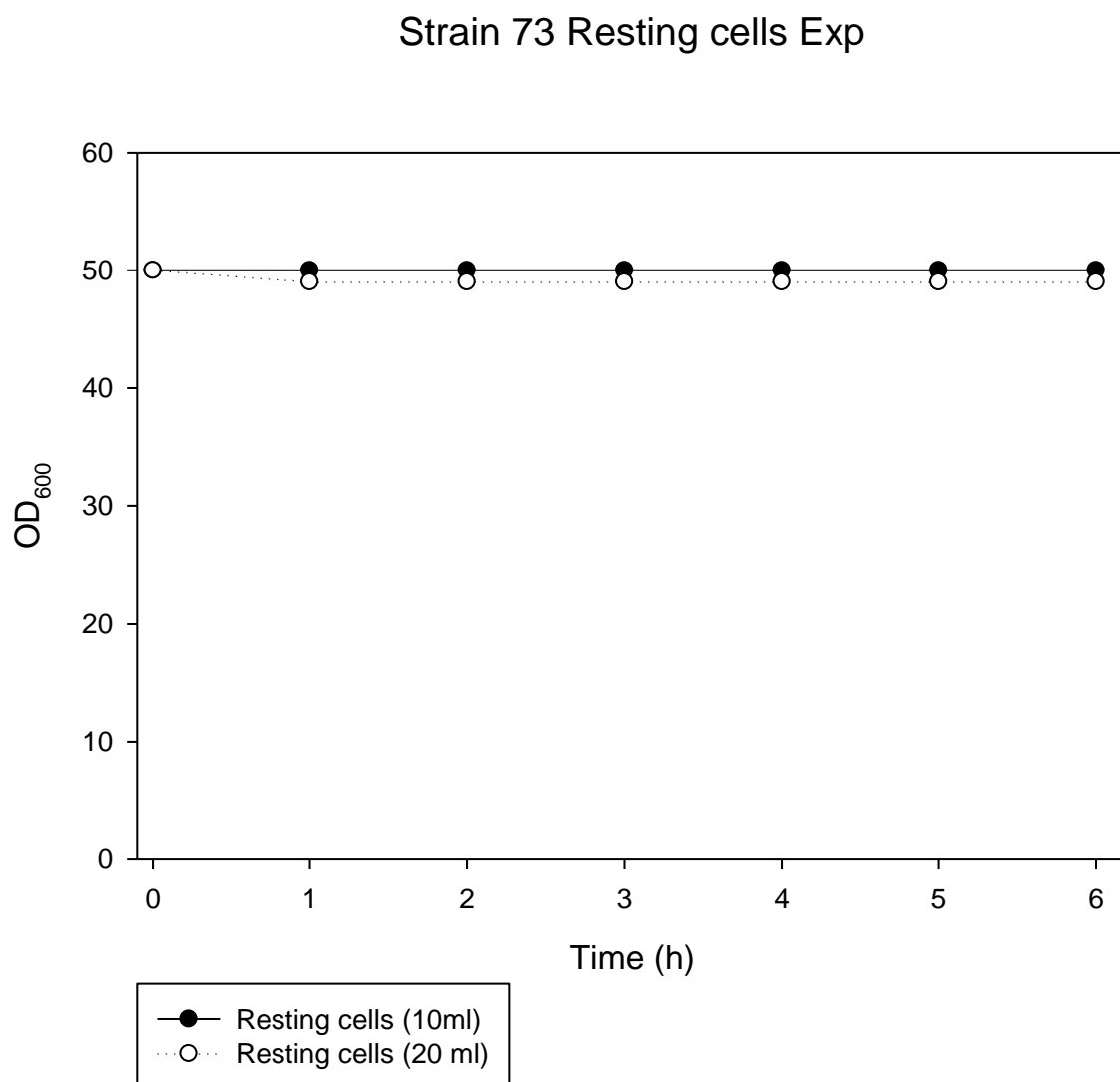


圖 4.18 使用生長至對數期之 *Microbacterium* strain 73 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS) 中進行六價鉻還原，在未添加任何營養源(電子供應者)，菌株幾乎無法還原六價鉻。

使用 *Ochrobactrum* strain 71 與 *Microbacterium* strain 73 的靜息細胞 (Resting cells) 在含六價鉻(重鉻酸鉀)的磷酸緩衝液(Phosphate Buffer, PBS)中，添加不同營養源或電子供應者 (2 g/L；葡萄糖、果糖、乳糖、醋酸、檸檬酸或 NADH)，可以觀測到菌株 71 與菌株 73 之靜息細胞可還原緩衝液之六價鉻，雖然其還原能力相較於培養在富含養分之培養基(如 LB 培養基)仍顯遜色很多(圖 4. 19 與 4. 20)。

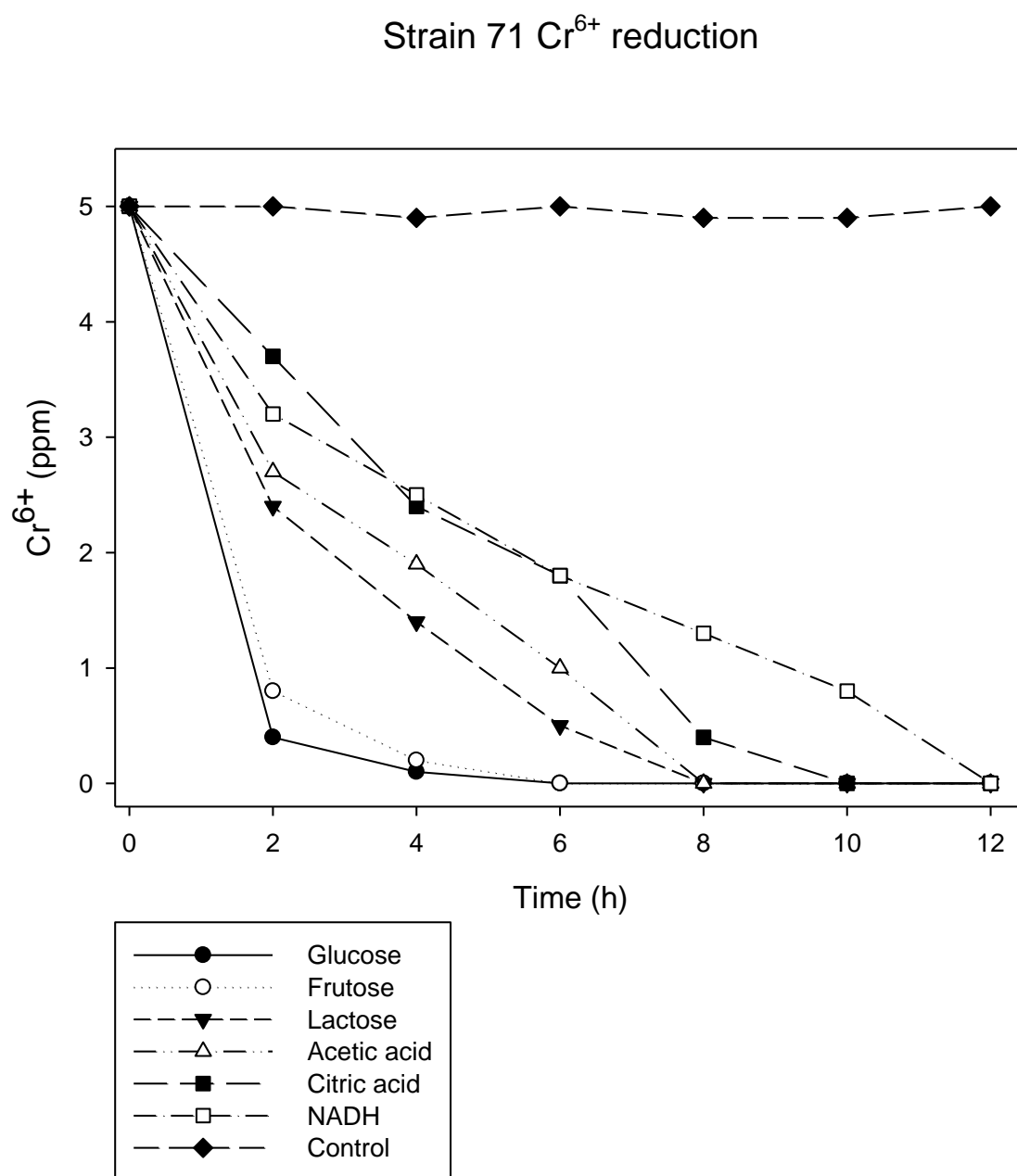


圖 4. 19 使用生長至對數期之 *Ochrobactrum* strain 71 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS) 中進行六價鉻還原，添加不同之營養源(電子供應者)，包括葡萄糖(Glucose)；果糖 (Fructose)；乳糖(Lactose)；醋酸(Acetic acid)；檸檬酸 (Citric acid) 以及 NADH。



## Strain 73 with E donor

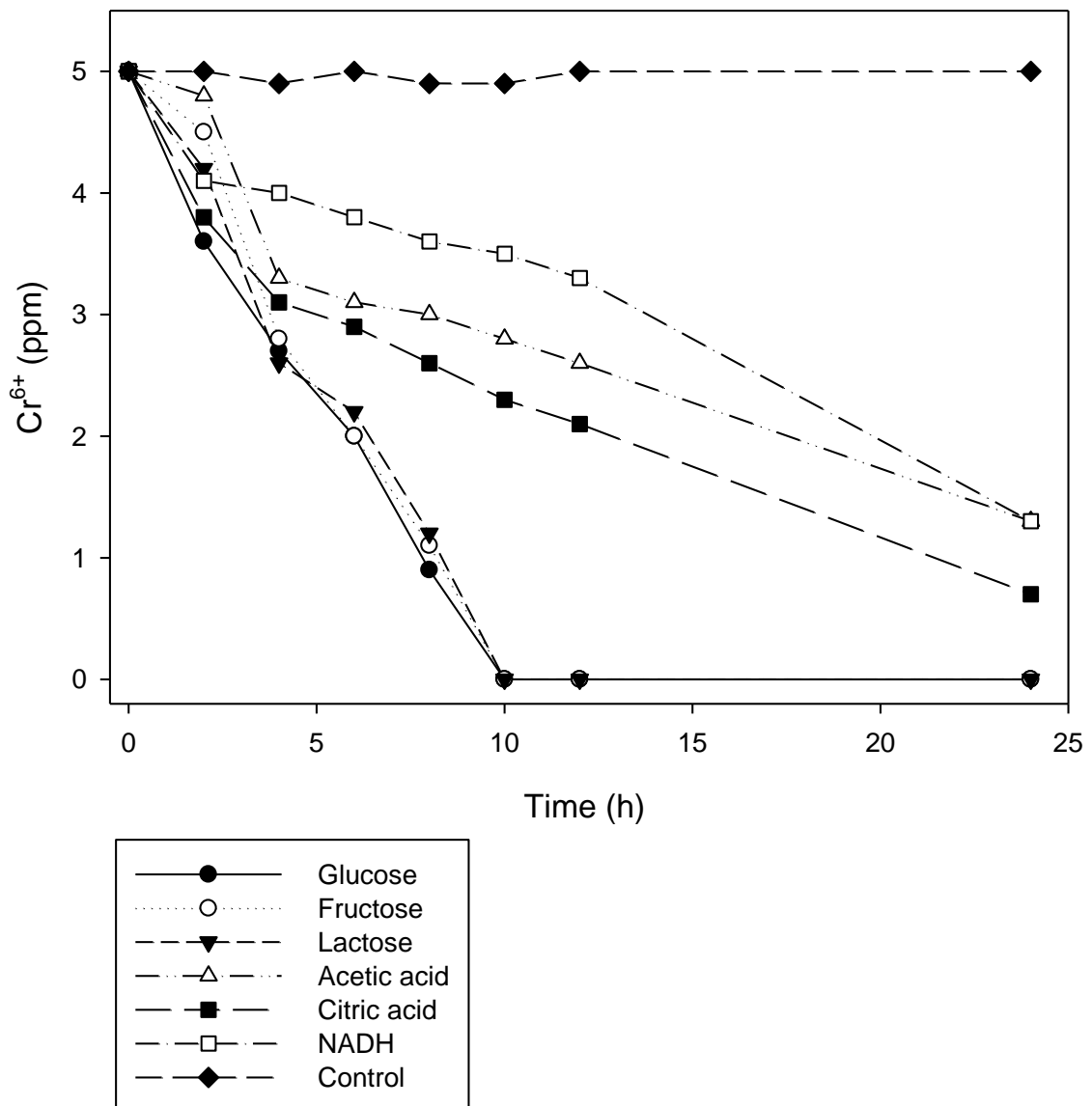
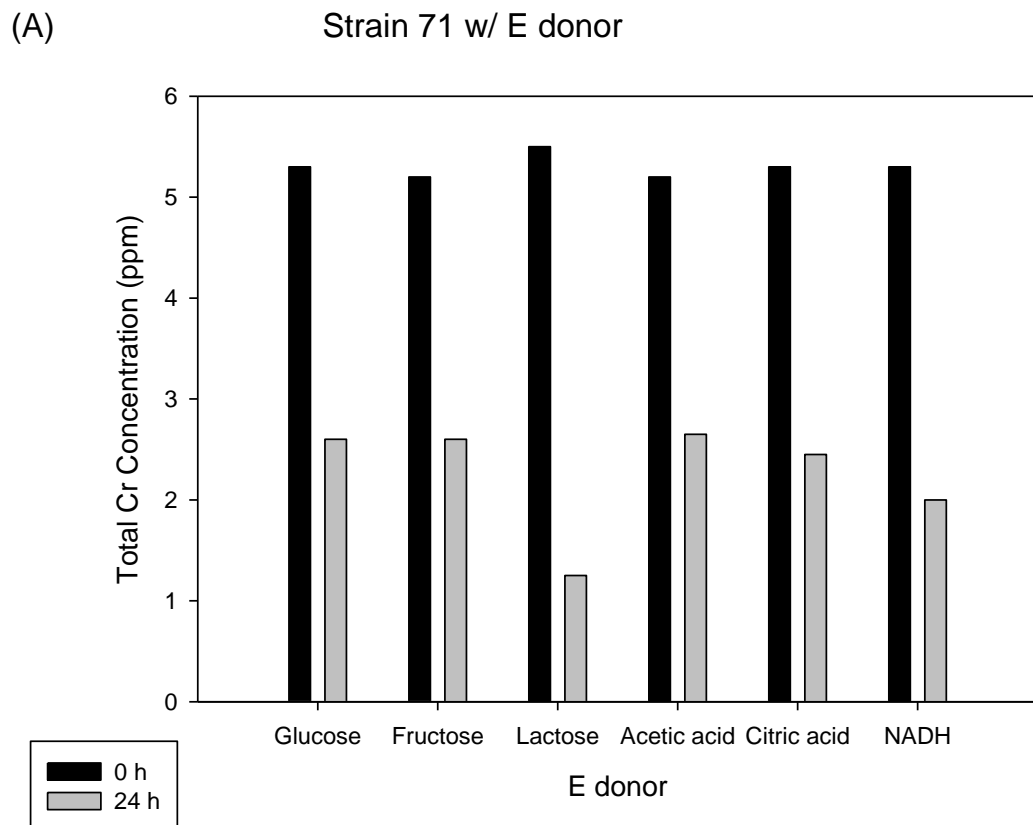


圖 4. 20 使用生長至對數期之 *Microbacterium* strain 73 細胞在磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PBS) 中進行六價鉻還原，添加不同之營養源(電子供應者)，包括葡萄糖(Glucose)；果糖 (Fructose)；乳糖(Lactose)；醋酸(Acetic acid)；檸檬酸 (Citric acid)以及 NADH。





雖然在添加不同營養源或電子供應者 (2 g/L; 葡萄糖、果糖、乳糖、醋酸、檸檬酸或 NADH) 的磷酸緩衝液中, 菌株 71 與菌株 73 之靜息細胞可快速地還原六價鉻(重鉻酸鉀), 然而經還原後之三價鉻是否會被微生物吸附, 抑或是遺留於緩衝液中? 經由檢測還原六價鉻前與還原後緩衝液所含之總鉻含量, 我們可以發現在緩衝液中的鉻離子明顯的減少, 推估應是被菌體吸附 (圖 4.21)。這兩株鉻還原本土菌株還原六價鉻與吸附鉻離子的基本生理與分子機制在未來非常值得進一步探討, 以及其可能在鉻污染環境減毒與作為生物整治的應用。



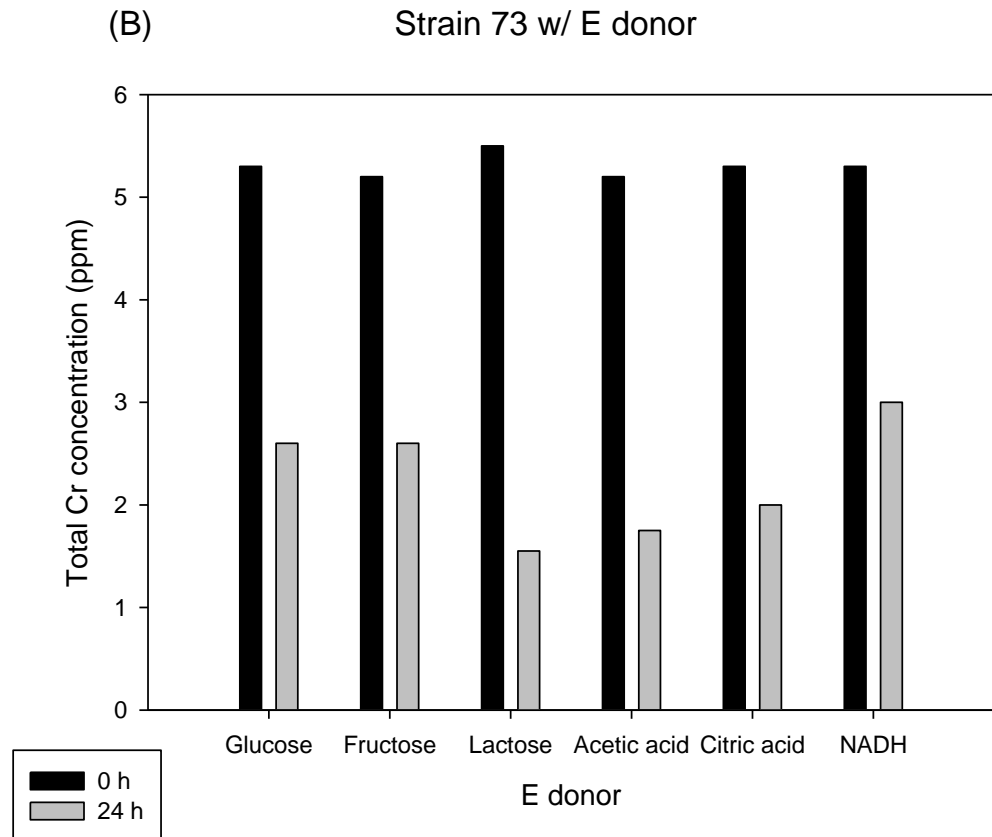


圖 4.21 菌株 71(A)與菌株 73(B)之靜息細胞添加不同營養源或電子供應者（葡萄糖、果糖、乳糖、醋酸、檸檬酸或 NADH），還原六價鉻前與還原後緩衝液所含之總鉻含量。

#### 4.5 地下水樣本總 DNA 之萃取與菌相分析

環境污染對當地的微生物族群與組成常有非常大的衝擊 [Stiborova et al., 2020]。因此探討含污染物場址的微生物族群在學術與實務應用上均極為重要。本研究將經過濾後沖提之微生物與濾渣利用 FavorPrep® Soil DNA Isolation Mini Kit 與一般萃取細菌 DNA 的試劑萃取樣本總 DNA，結果均未獲得足夠進行後續宏基因組實驗之 DNA 的量與質。而使用 PowerWater® DNA Isolation kit 與 DNeasy PowerWater Kit (Qiagen) 萃取地下水 DNA，則成功的萃取出地下水之總 DNA，以萃取之總 DNA 進行 16S rRNA 基因增幅，可成功增幅出預期產物，用來進行後續定序及菌株分析研究（圖 4.22）。

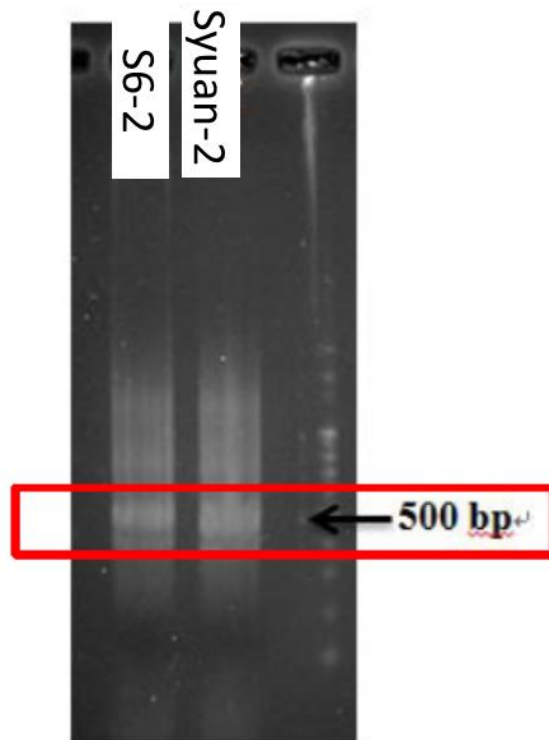


圖 4.22 鉻污染地下水之總DNA經萃取後進行16S rRNA 基因增幅之結果

本研究選取兩組總DNA樣本(分別為S6-2與Syuan-2)，以NGS利用宏基因組學技術進行菌相分析。針對兩個樣本進行16s rRNA基因區域分析，將增幅出的片段以MiSeq 2\*301bp進行測序，進行資料分析。方法為將所獲得原始數據混和同時先將兩端數據合併(merge)為單一條較長的序列(merge read)，過濾掉測序品質差的序列後，即為有效序列(effective reads)，再將這些有效序列進行叢集(cluster)，將序列相似的歸類為同一個OUT(Operational Taxonomic Unit；操作分類單元)，最終再將所獲得的OTU進行菌種分類(Annotation reads)，結果如下表(表4.5)所示。



表 4.5 地下水樣本微生物菌相以 16S rRNA 基因進行 NGS 之有效序列分析

Sample Name	Raw paired Reads*	Merge Reads	Effective Reads	Annotation Read	Annotation Read Percentage
S6-2	52,688	45,372	43,542	37,840	71.82%
Syuan-2	51,904	49,487	46,609	38,461	74.10%

有效序列分析共 8,569 個 OUT (S6-2：4135；Syuan-2：4690)，分類結果可鑑別出 38 門，97 綱，145 目，216 科，446 屬，516 種，以及其餘 unclassified。

表 4.6 為 Normalization 後，檢體(S6-2 與 Syuan-2)在不同分類階層的菌種所比對到的 reads 數以及菌相分布百分比前 25 種含量最高的菌種。

表 4.6 檢體(S6-2 與 Syuan-2)在不同分類階層的菌種所比對到的 reads 數以及菌相分布百分比前 25 種含量最高的菌種

Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Total	Total
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Simkaniaceae	Simkania	negevensis Z	19634	25.94%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	unclassified	unclassified	4309	5.69%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Duganella	nigrescens	3589	4.74%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	unclassified	2488	3.29%
Bacteria	OD1	ZB2	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	2414	3.19%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Filomicrobium	insigne	2366	3.13%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	delafieldii	2241	2.96%
Bacteria	OP1	Acetothermia	Acetothermales	unclassified	unclassified	unclassified	2162	2.86%
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	unclassified	unclassified	1803	2.38%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Ellin6067	unclassified	unclassified	unclassified	1764	2.33%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	unclassified	unclassified	1751	2.31%
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20	unclassified	unclassified	unclassified	1395	1.84%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	MND1	unclassified	unclassified	unclassified	1110	1.47%
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophobacteraceae	unclassified	unclassified	887	1.17%
Bacteria	OD1	ABY1	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	790	1.04%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Solimonas	solii	782	1.03%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	quinlivanii	722	0.95%
Bacteria	TM7	SC3	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	699	0.92%
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Rhabdochlamydiaceae	Candidatus_Rhabdochlamydia	unclassified	697	0.92%
Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	682	0.90%
Bacteria	TM7	TM7-1	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	669	0.88%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-6	CCU21	unclassified	unclassified	unclassified	650	0.86%
Bacteria	Chloroflexi	TK17	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	639	0.84%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	unclassified	590	0.78%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	unclassified	unclassified	532	0.70%



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

檢體 S6-2 與檢體 Syuan-2 在不同分類階層的菌種所比對到的 reads 數以及菌相分布百分比前 25 種含量最高的菌種則分別列於表 4.7 與表 4.8。

表 4.7 檢體 S6-2 在不同分類階層的菌種所比對到的 reads 數以及菌相分布百分比前 25 種含量最高的菌種

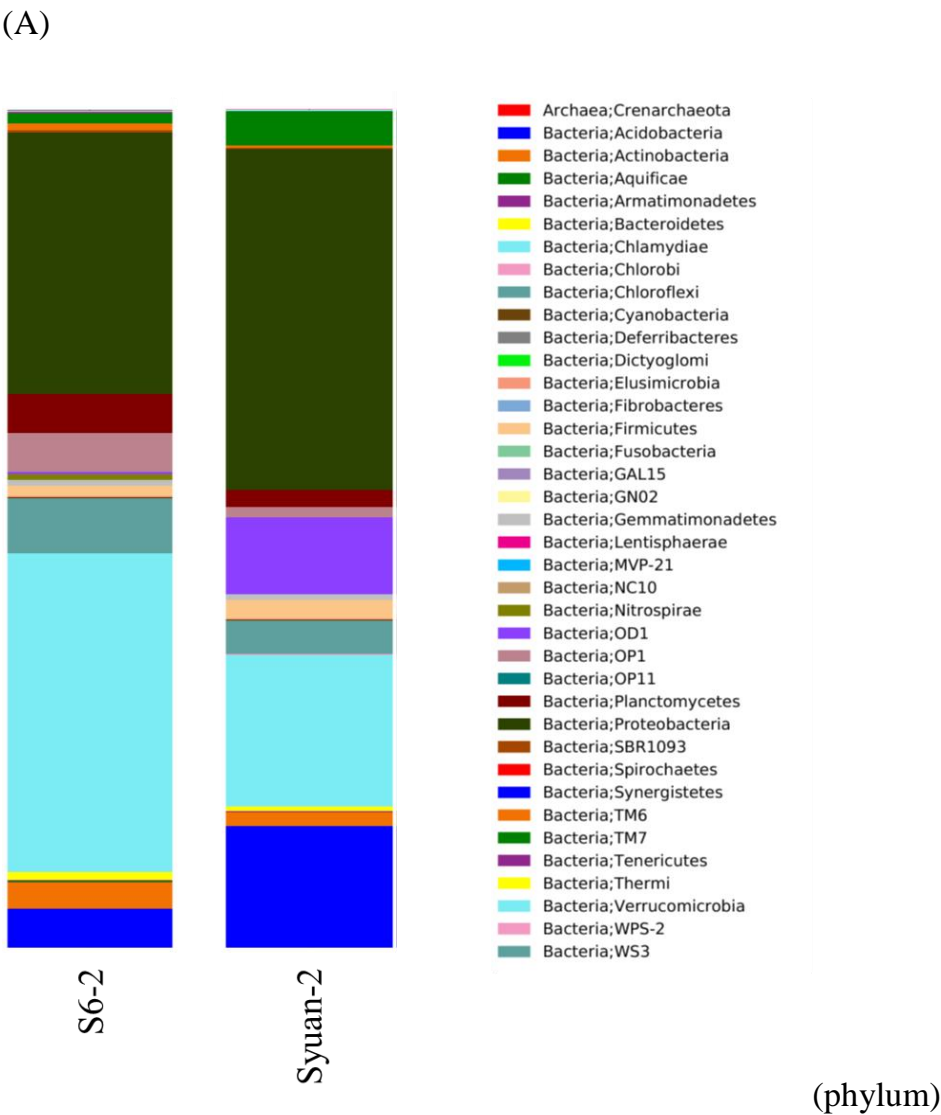
Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	S6-2	S6-2
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Simkaniaceae	Simkania	negevensis Z	13468	35.59%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	delafeldii	1830	4.84%
Bacteria	OP1	Acetothermia	Acetothermales	unclassified	unclassified	unclassified	1746	4.61%
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	unclassified	unclassified	1379	3.64%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Duganella	nigrescens	1379	3.64%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Filomicrobium	insigne	1187	3.14%
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20	unclassified	unclassified	unclassified	772	2.04%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Aquabacterium	unclassified	562	1.49%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-6	CCU21	unclassified	unclassified	unclassified	553	1.46%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	unclassified	unclassified	532	1.41%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	unclassified	unclassified	521	1.38%
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Rhabdochlamydiaceae	Candidatus_Rhabdochlamydia	unclassified	407	1.08%
Bacteria	Chloroflexi	TK17	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	401	1.06%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	unclassified	unclassified	366	0.97%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Oceanibaculum	indicum	348	0.92%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	brunescens	344	0.91%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Kaistobacter	unclassified	340	0.90%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Ellin6067	unclassified	unclassified	unclassified	340	0.90%
Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Iamiaceae	Iamia	unclassified	320	0.85%
Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	317	0.84%
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Neochlamydia	hartmannellae	296	0.78%
Bacteria	Chloroflexi	Chloroflexi	Roseiflexales	Kouleothrixaceae	unclassified	unclassified	286	0.76%
Bacteria	TM7	SC3	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	236	0.62%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Aquicella	unclassified	232	0.61%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Perlucidibaca	unclassified	222	0.59%



表 4.8 檢體 Syuan-2 在不同分類階層的菌種所比對到的 reads 數以及菌相分布百分比前 25 種含量最高的菌種

Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Syuan-2	Syuan-2
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Simkaniaceae	Simkania	negevensis Z	6166	16.29%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	unclassified	unclassified	3943	10.42%
Bacteria	OD1	ZB2	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	2394	6.33%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	unclassified	2379	6.29%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Duganella	nigrescens	2210	5.84%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Ellin6067	unclassified	unclassified	unclassified	1424	3.76%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	unclassified	unclassified	1219	3.22%
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Filomicrobium	insigne	1179	3.12%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	MND1	unclassified	unclassified	unclassified	1019	2.69%
Bacteria	OD1	ABY1	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	737	1.95%
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	unclassified	unclassified	737	1.95%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Solimonas	solis	685	1.81%
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	Legionella	quinlivanii	676	1.79%
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SHA-20	unclassified	unclassified	unclassified	623	1.65%
Bacteria	TM7	TM7-1	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	610	1.61%
Bacteria	TM7	SC3	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	463	1.22%
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	unclassified	unclassified	424	1.12%
Bacteria	Acidobacteria	DA052	HDB_SIOH1004	unclassified	unclassified	unclassified	420	1.11%
Bacteria	OP1	Acetothermia	Acetothermales	unclassified	unclassified	unclassified	416	1.10%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	delafieldii	411	1.09%
Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	365	0.96%
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Candidatus_Koribacter	unclassified	359	0.95%
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ramlibacter	unclassified	354	0.94%
Bacteria	OD1	SM2F11	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	295	0.78%
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Rhabdochlamydiaceae	Candidatus_Rhabdochlamydia	unclassified	290	0.77%

由以上結果可以觀察到污染地下水的總 DNA 萃取透過宏基因組定序，可以獲得非常完整與繁複的微生物相組成。即便是從同樣來源的污染地下水抽取之總 DNA 分析之菌相，以宏基因組觀點來看，當然不可能完全相同，但是我們可以發現許多主要菌群在兩批萃取的 DNA 均可發現。以次世代定序技術 (Next Generation Sequencing ; NGS) 透過宏基因組定序進行菌相分析所得之結果，做成長條圖表(Bar chart)比較，也可以看出菌相的分布情形 (圖 4.23)。了解微生物群的分布有助於鉻酸鹽還原菌的分離 [Liu et al., 2019]。





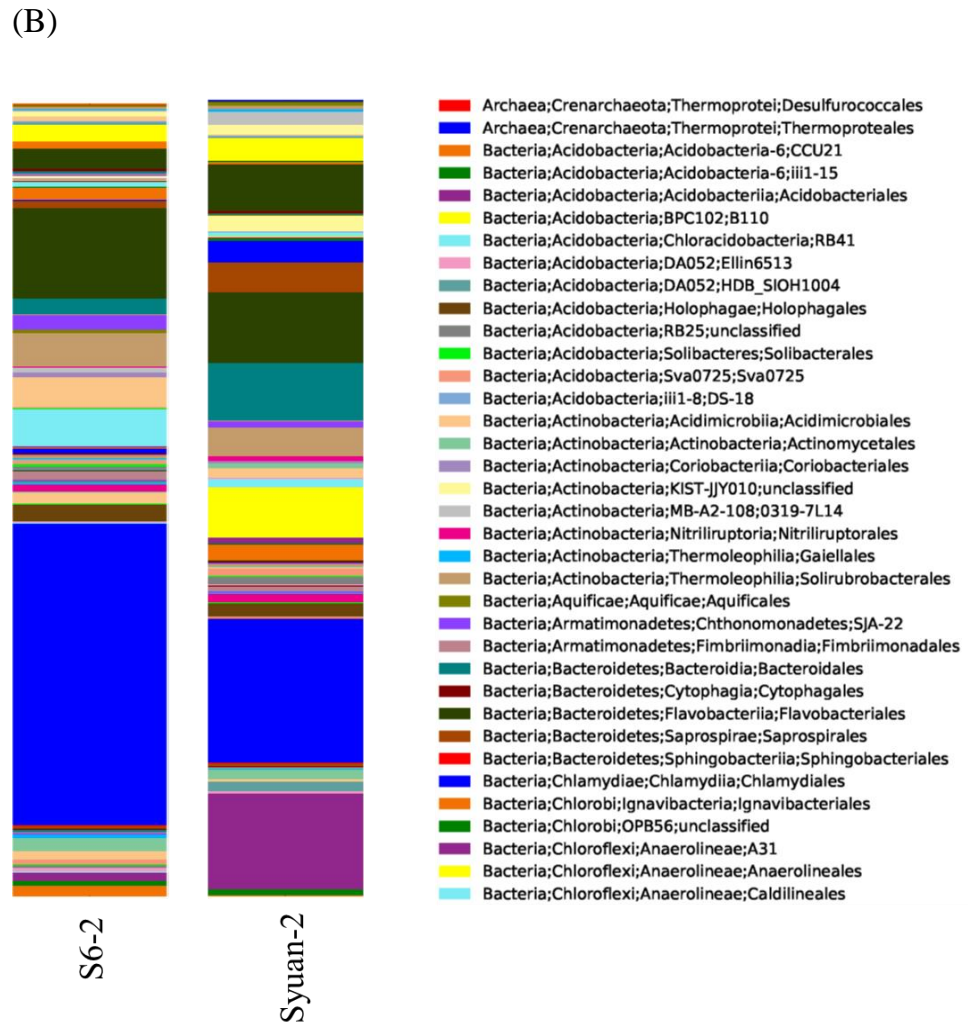


圖 4.23 鉻污染地下水之菌相分析柱狀圖：(A) 分類層級-門(phylum)；(B) 分類層級-目(order)

#### 4.6 產氫菌株與鉻還原菌固定化的製備

本研究所使用之產氫菌為從本土地下水中篩選出來之 *Clostridium butyricum* (中央大學提供)，屬於梭狀芽胞桿菌屬。此菌在厭氧的環境下可利用發酵作用來產生氫氣(Wang et al., 2008)。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，本株菌含有之與資料庫菌種比對後相似度高達99%的氫化酶基因(hydA) (Wang et al., 2008)。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

測試不同比例之 MTMS 及 TMOS 組成之膠體對於產氫菌之氫氣釋放效率，產氫菌於膠體之菌量為  $1 \times 10^8/\text{mL}$ ，將含有產氫菌之膠體加入含有乳糖之豐富培養液之厭氧瓶，以氮氣充滿血清瓶上空後，蓋上橡膠蓋並以鋁蓋密封，靜置於  $37^\circ\text{C}$  培養 7 天，測得其上空之氫氣濃度並做比較。膠體 MTMS 比例及氫氣濃度之結果如圖 4.24，可以見得當膠體 MTMS 含量越多，則頂空產氫量則越少。但是考量到軟硬度以及使用性，75% 之 MTMS 比例其膠體硬度則為最適合使用。

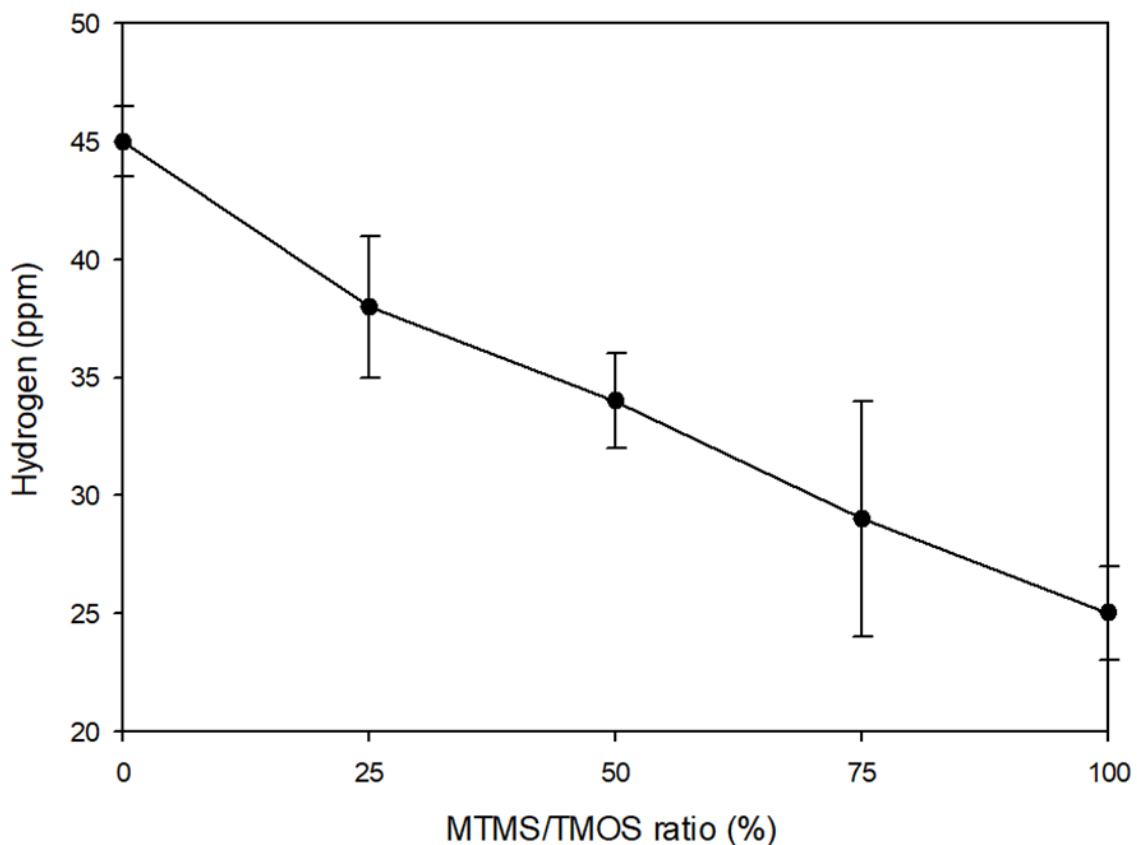


圖 4.24 不同比例之 MTMS 及 TMOS 組成之膠體對於產氫菌之氫氣釋放效率

將菌株 71 與 73 以 MTMS 及 TMOS 組成之膠體固定(圖 4.25)用於實場鉻污染地下水之還原實驗。初步結果顯示，經固定化後之細胞具有還原六價鉻之能力，在含有 2 ppm 鉻之污染地下水，經固定化之菌株在 24 小時可還原約 50% 的價鉻(圖 4.26)。



圖 4.25 以 MTMS 及 TMOS 組成之膠體固定菌株

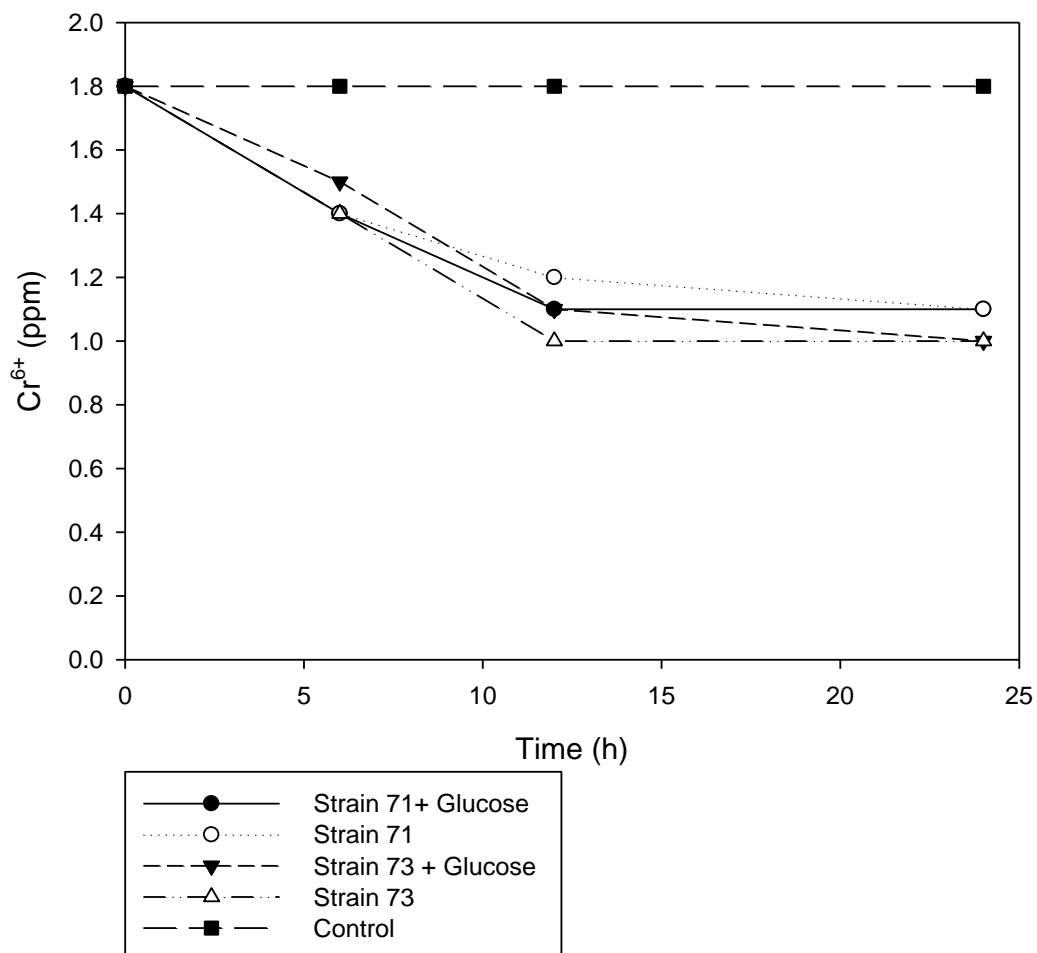
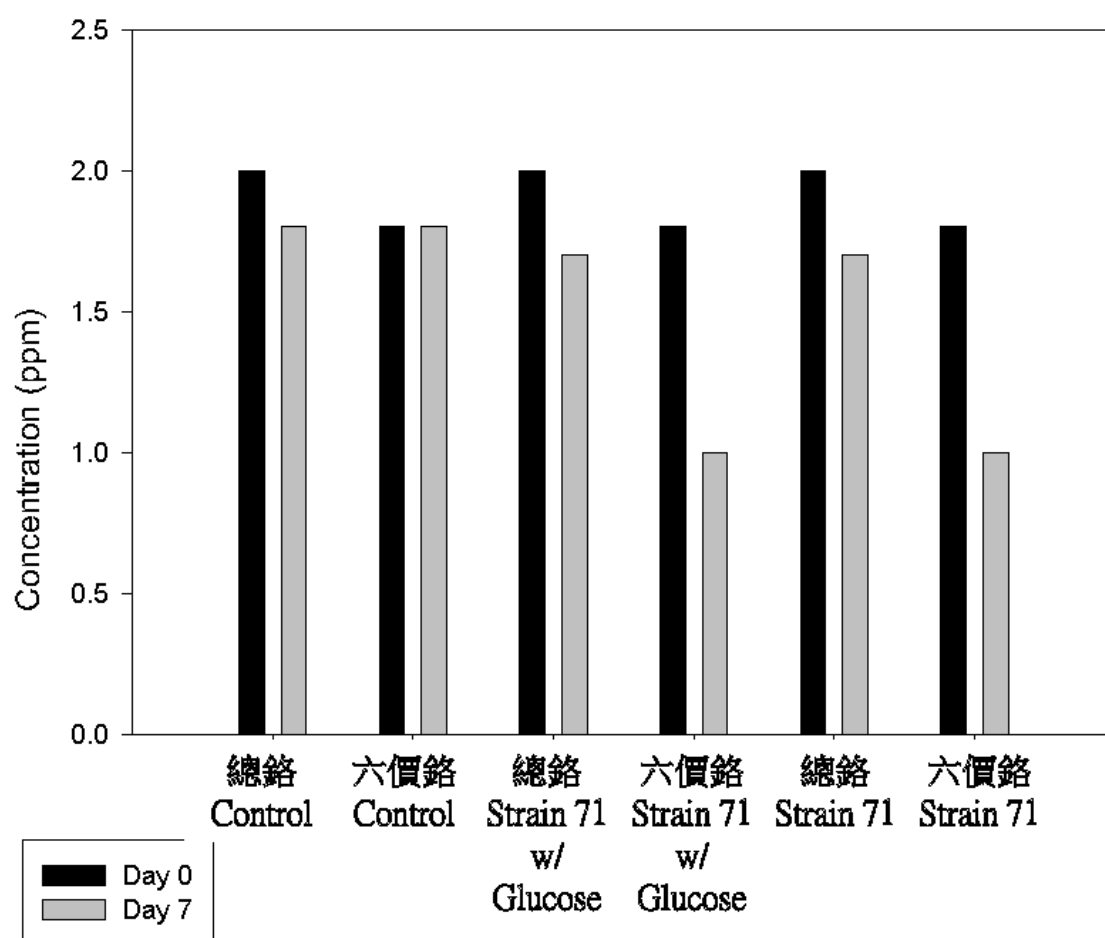


圖 4.26 菌株 71 與 73 以 MTMS 及 TMOS 組成之膠體固定(圖 4.25)用於實驗場鉻污染地下水之還原實驗。



為了釐清地下水所含的鉻是否為六價鉻，以及經微生物處理後所減少之六價鉻是被還原為三價鉻，抑或是被菌體吸收而減少，含鉻之污染地下水經固定化之菌株處理後，分別測量其總鉻與六價鉻，結果顯示經菌株處理後，總鉻減少的比例較六價鉻濃度減少的比例少非常多，指出污染地下水之六價鉻確實被菌株還原成較為無毒性之三價鉻(圖 4.27)。

(A)





(B)

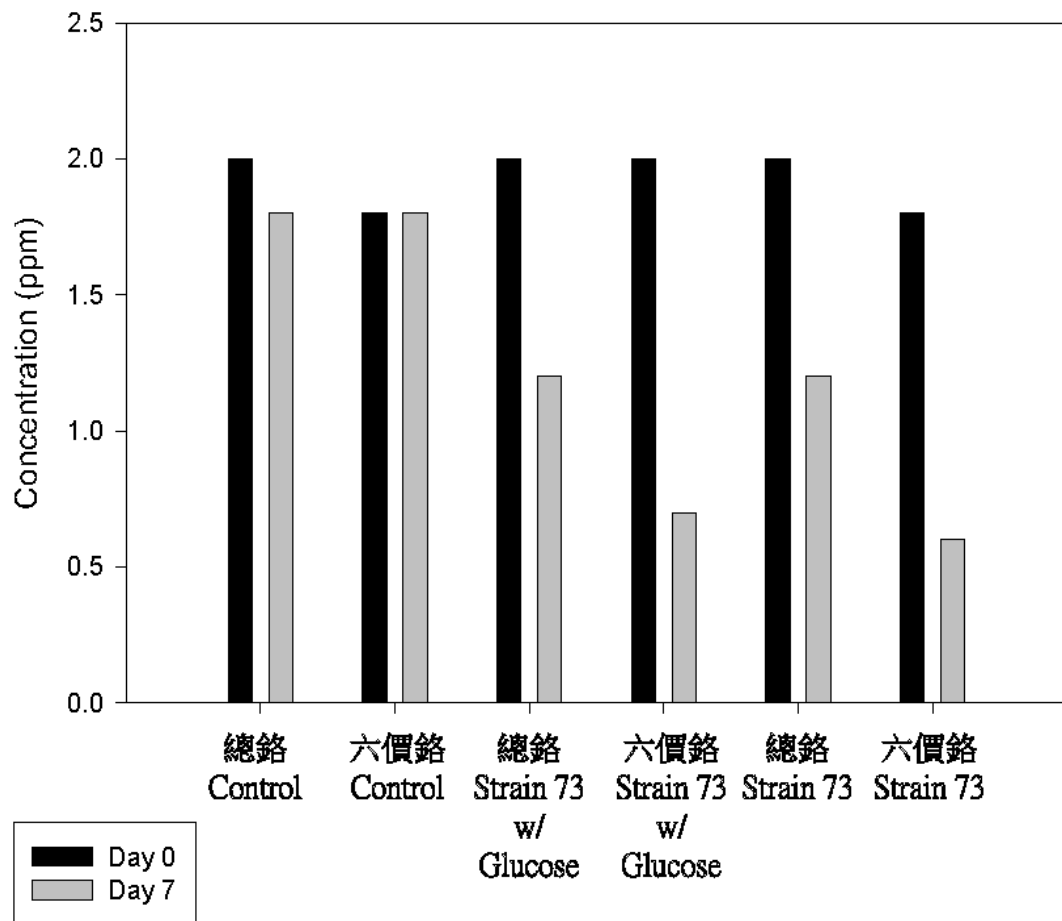


圖 4.27 含鉻之污染地下水經固定化之菌株處理後，測量之總鉻與六價鉻濃度：(A) 菌株 71； (B) 菌株 73



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水



## (五) 結論與建議

本計畫執行之進度與成果大致與計劃書吻合。計畫執行期間之進度大致上均符合計劃書規劃，並無落後之情事。除了於期中報告前，因為實場地下水之取得因素，抽取鉻污染地下水總 DNA 已進行宏基因組分析之實驗較原本規劃慢約一個月，但後續實驗與分析以趕上規劃之進度。

針對兩株先前由鉻污染土壤分離純化之本土菌株進行六價鉻還原之測試，結果顯示此兩菌株還原六價鉻之能力極具潛力，可持續用於整治鉻污染地下水開發之菌株。本研究也使用從污染場址取回之地下水(鉻濃度約 2 ppm)，檢視目前已有之菌株經固定化後，運用於實場樣本之效率，以及實場樣本中微生物族群之分析。在此同時，產氫菌與鉻還原菌的固定化以及固定化後產氫與還原六價鉻也進行了初步的評估。經固定化後之本土鉻還原菌在含鉻污染的地下水仍具有還原六價鉻之能力，然而在初步的實驗環境中，其還原六價鉻之能力較游離菌株為低(僅約 50%)，後續將可針對此部分，進行固定化材質的改進與添加營養源的調配。

由於目前對重金屬鉻污染的規範，仍然以污染場址總鉻濃度為主，因此雖然本計畫可降低鉻污染對生物毒性的影響，現階段之成果尚無法直接應用於工程實務或與污染整治工程實務應用直接有所關聯。將來可進一步探討還原後之三價鉻對生物利用度(bioavailability)與毒理效應的關聯，以及加強細胞固定化技術，以期將還原後之六價鉻從環境中移除，方能彰顯其在生物整治重金屬污染之效益。

本計畫執行之成果與結論可歸納如下：

- (1) 鉻污染場址之土壤/地下水收集與特性分析。
- (2) 本土鉻還原菌株的培養與特性分析，*Ochrobactrum* sp. strain 71 與 *Microbacterium* sp. strain 73 均為從鉻污染土壤分離純化之本土菌株，並具有極佳之六價鉻還原能力。
- (3) 從電鍍廠廢水與溫泉土中，分離純化可氧化金屬之嗜酸菌，將來可應用於金





開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

屬浸出研究。

- (4) 抽取實場鉻污染地下水微生物之總 DNA 並以次世代定序技術(宏基因組學)分析鉻污染地下水微生物態(Microbiota)。
- (5) 本土鉻還原菌株在無供應電子的來源環境(如含鉻之磷酸緩衝液)對六價鉻之還原不顯著，但在添加適當之電子供應者(如 NADH、乳糖、檸檬酸等)作為營養源，則可快速地還原液體中之六價鉻。
- (6) 以創新固定化技術將產氫菌株與鉻還原菌固定。
- (7) 經固定化後之本土鉻還原菌在含鉻污染的地下水仍具有還原六價鉻之能力，但其還原六價鉻之能力較游離菌株為低(僅約 50%)。本計畫開發之菌株與平台將來應可應用減低六價鉻毒性(將其還原為三價鉻並降低生物可利用性)之生物整治。

由本計畫的成果顯示，從污染環境中，可分離純化應用於該污染源整治之微生物本土菌株。然而宏基因組分析的微生物態發現，可應用於生物整治的菌種(如鉻還原菌)並非主要菌群，因此若要進行生物整治，建議導入生物強化法(bioaugmentation)或生物刺激法(biostimulation)之概念。以達到加強現的生物整治技術開發。

利用游離細胞 (free-living cells)雖可處理污染物，然而微生物散佈在環境中無法收集會造成在應用上的困難，因此發展細胞固定化可進一步評估在污染場址使用生物強化法的可行性。本計畫初步可固定化鉻還原菌，以及將鉻還原菌與所需營養源如葡萄糖固定在一起，評估其還原能力。目前雖然只有部分初步成果，卻顯示出固定化技術在加強式生物整治的潛力，建議將來可試著將不同的基質與菌株，包括混和菌株如鉻還原菌與產氫菌等，共同固定在同一膠體，以進行生物整治過程。固定化所使用的材質(包括比例)也仍有很多探討的空間。

目前所進行的研究乃針對污染之地下水，雖然本研究計畫未涉及底泥或土壤之重金屬污染議題，但是因為文獻有報導利用嗜酸菌浸出金屬的能力應用於土壤重金屬的例子，而本實驗室亦有以循環經濟觀點進行使用嗜酸菌浸出廢棄電路板之(貴)金屬之應用研究，因此也藉由此計畫，分離純化本土之嗜酸菌，將來或許可應用於底泥或土壤之鉻污染。



綜而言之，本計畫使用從污染場址分離純化之本土菌株，以宏基因組學分析污染場址的微生物族群(微生物態)，配合創新之固定化技術，以及添加不同的電子供應者(營養源)，初步奠定了進行加強式生物整治的可行性。這些技術將來再進一步的最佳化，便可應用於實場生物整治效率的評估。



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水



## (六) 附錄

## 附錄一 期中報告審查意見回復表

☐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 checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input 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： 簡志青    NO：B3
計畫名稱	開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一			
1. 研究計畫的執行現況、流程及方法已具體說明(Chap.3 )。		1. 感謝委員的審查與評述。	
2. 計畫後續執行工作項目及內容並未說明。		2.感謝委員提醒，已在修正稿增加「後續執行工作項目及建議」之章節說明後續執行工作項目及內容（修正稿 Chap. 5；pp. 51-52)	
3. 計畫執行進度與預定進度符合，執行進度並無延遲。		3. 感謝委員的評述，後續將依照計畫書按進度執行。	
4. 依期中報告所說明的成果，研究內容與計畫目的相符。		4. 感謝委員的評述，後續將持續依據計畫書規劃之內容與目的進行研究工作。	
5. 建議說明是生物性轉化或是生物性吸附(機制的討論)。		5.本計畫之主要目標為探討微生物將較具毒性之六價鉻還原成低生物毒性之三價鉻，因此著重在生物轉化(鉻酸鹽還原酶之作用)，雖然本實驗室亦有進行微生物吸附重金屬機制之研究，但並非是本計畫之重心。	
6. 表 4.3 的 ORP&DOC 對本計畫的影響，建議討論。		6.當溶液中氧化還原電位為正值時，代表溶液呈現氧化態；若為負值則代表溶液呈現還原態。若反應環境中氧化物種與	



與還原物種濃度比值愈高、pH 愈低、溫度愈低、溶氧愈高，電子釋放傾向愈大則氧化還原電位越高，六價鉻在還原時 ORP 氧化還原電位數值不需太低即可將其轉化為三價鉻。已在修正稿中增加此部分之討論（請參見修正稿 p. 30）。

在地下水中微生物可透過營養鹽及其它有機碳等提供其代謝、生長與還原能力，分析水樣總有機碳濃度有助於評估基質濃度變化。

7. 本次報告屬於期中報告，完整的研究成果尚待於期末報告中說明。建議期末報告能根據研究內容提出具體的討論與建議，並建議說明研究成果與工程實務應用的關係。（例如是 P&T？或是 *in situ*？）

8. 依期中報告的成果所示，本計畫目前的研究成果符合預期。

9. 有助理(或學生)參與本計畫的執行，符合土水污染人才培育的預期。

10. 土水污染為國內目前所面臨的議題，本計畫的執行對污染整治技術發展，環境整治政策與社會經濟發展有所助

7. 感謝委員的建議，我們將在期末報告依委員建議，說明研究成果與實務應用的可行性。本計畫除了將評估應用在抽水處理法(pump-and-treat)的可行性外，也將探討評估將微生物固定化後，應用於 *in situ* 的可能。

8. 感謝委員的審查與評述，將持續依計畫書之規劃進行研究。

9. 在執行計畫的同時，培育人才一直是研究所教育的重點。本實驗提供參與之學生一個完整的工作平台。直接提供參與人員各種新的生物科技研究方法，得到微生物學與環境生技的知識與技能之培訓。實驗室參與其他研究計畫之學生，以及與本實驗室有互動之其他實驗室同學，亦能從此研究中提供更多面向的環境微生物與生物整治關聯之知識與思考。

10. 感謝委員的審查與評述，土水污染確為環境永續發展所面臨的一個重要課



益。	題，本實驗室將來也會持續進行相關領語的研究與技術開發，以裨益社會與環境。
<p>委員二</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 對於研究目標應明確定義，可採條列式說明(P.18)。</li> <li>2. 內文中之表格式宜有一致性。整體而言報告撰寫品質有提升之空間。</li> <li>3. 所有圖、表之說明陳述宜有專業性表達。</li> <li>4. 未有結論與建議章節。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員的建議，我們在修正稿已增加採條列式之具體目標（請參見修正稿 pp. 17-18）。</li> <li>2. 感謝委員的提醒與建議，在報告修正稿以及期末報告，我們會特別注意報告的一致性，並盡力提升撰寫品質。</li> <li>3. 感謝委員的建議，在修正稿中我們已針對圖表做進一步較詳盡之說明。</li> <li>4. 在修正稿中已增加「後續執行工作項目及建議」之章節，包含結論與建議。（修正稿 Chap. 5；pp. 51-52）</li> </ol>
<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本計畫期中報告之摘要內容，並未敘明期中之研究成果，請予以修正。另亦應敘明初步成果及後續工作重點為何？</li> <li>2. 本計畫於現地篩選出之菌株，於後續試驗中之規劃為何？請予以敘明。</li> <li>3. <math>\text{Cr}^{6+}</math> 濃度降低，建議宜分析 <math>\text{Cr}^{3+}</math> 之濃度，以確認菌株之還原能力，並可驗證 Cr 之轉換與平衡結果。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員的建議，已在摘要加入期中報告之成果，後續工作重點亦敘明於新增之「後續執行工作項目及建議」之章節（修正稿 Chap 5；pp. 51-52）。</li> <li>2. 現地篩選出之菌株將測試其對重金屬耐受性以及是否具六價鉻還原之能力。若具有還原六價鉻能力之菌株，將繼續用於本研究計畫之評估。所有分離純化之菌株均會保存於本實驗室之菌種收藏，將來亦可用於供其它研究使用。</li> <li>3. 感謝委員的建議，誠如委員所提到，在探討微生物還原金屬離子時，其轉換與平衡之驗證至為重要。由於三價鉻的檢測較不容易，目前本研究乃是採取檢測</li> </ol>





樣本中之總鉻濃度與六價鉻濃度，再計算其差值即為三價鉻之濃度，詳細轉換與平衡結果將在期末報告一併討論。

#### 委員四

1. 本計畫擬開發生物菌株，應用於鉻污染場址整治。目前已完成 2 株嗜酸菌之分離、定序、及不同溫度生長曲線，六價鉻分析套件測試，以及兩株本土菌在不同重金屬中之耐受度及鉻還原實驗。

2. P.28 中，提及顯示污染場址碳源不足，微生物難以大量生長。建議提供相關文獻，並說明適合較大量生長之條件。

3. 目前尚無法由地下水樣品中抽出足量之 DNA，以供分析，建議後續強化此部分工作。

4. 報告中建議補充初步結論及後續研究工作說明。

1. 感謝委員的審查與評述，本實驗室將持續開發可應用於生物整治之本土菌株。

2. 感謝委員的建議，在地下水中微生物需透過營養鹽及其它有機碳等提供其代謝、生長與還原能力。碳源不足時，微生物難以大量生長。

在進行生物整治時，相關文獻指出，當注入乳化油至受污染之地下水層時，可有效處理污染物。其所加入之乳化油可以經由發酵後產生之氫氣及低分子量之脂肪酸(醋酸鹽、乳酸鹽、丙酸及丁酸)，用以提供厭氧生物降解污染物時所需之碳源及能量(Joutey et al., 2015)。已在修正稿中加入相關之說明(請參見修正稿 p. 28)。

3. 感謝委員的建議，此一部分我們已經使用不同的萃取方法與試劑組，成功地抽出足量之環境地下水樣本之 DNA，並進行宏基因組之分析，以探討地下水原生菌組之族群，將在期末報告整理並完整呈現。

4. 感謝委員的建議，在修正稿中已增加「後續執行工作項目及建議」之章節，包含結論與建議。(修正稿 Chap. 5；





	pp51-52)。
<p>委員五</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 整體而言，期中報告進度符合預期且報告內容成果豐碩。</li> <li>2. 建議本計畫應針對所開發技術未來實際應用於重金屬污染地下水整治的策略進行整體概念說明，是否採用 pump-and-treat 方式？如果是，本計畫所開發技術和現行使用技術的優劣比較為何？</li> <li>3. 請說明研究中所測試的鉻濃度是否與地下水中所觀察到的濃度相符？</li> <li>4. 本研究僅針對鉻重金屬污染地下水整治進行探討，但現實中受到重金屬污染地下水可能含有多種重金屬，是否會影響本研究所研究之微生物的處理效能？</li> <li>5. 報告中應針對其中進度提出結論與建議。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 感謝委員的審查與肯定。</li> <li>2. 感謝委員的建議。我們將在期末報告依委員建議，針對所開發技術說明研究成果與實務應用的可行性。本計畫除了將評估應用在抽水處理法(pump-and-treat)的可行性外，也將探討評估將微生物固定化後，應用於 <i>in situ</i> 的可能。</li> <li>3. 配置之培養基含鉻濃度依實驗需求將有各種不同之濃度，也會測試菌株在不同濃度的含鉻溶液中還原六價鉻之能力。在進行地下水鉻還原之測試時，我們直接使用取自鉻污染場址之地下水，因此鉻濃度應與地下水中所觀察到的濃度相符。</li> <li>4. 感謝委員的提醒。誠如委員所提到，污染場址常常含有多種重金屬。我們除了會測試分離純化之菌株對其它重金屬之耐受性外，同時也會檢測菌株再從實場取回之地下水實際處理效能，以模擬在現實中重金屬污染地下水的處理效能。</li> <li>5. 感謝委員的提醒，在修正稿中已增加「後續執行工作項目及建議」之章節，包含結論與建議。(修正稿 Chap. 5; pp.51-52)</li> </ol>
<p>委員六</p> <p>鑑於 2 種菌株試驗結果，後續試驗將如何依照場址特性選擇菌種？同時，針對</p>	<p>感謝委員的審查與建議:(1)目前所分離純化之兩株菌株均為從本土鉻污染土壤分</p>



## 開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

高濃度鉻環境造成菌株還原能力下降情事部分，有無對應解決方式？建請補充說明。

離之菌種，若還原能力足夠，應可應用於鉻污染地下水場址。本計畫同時也會應用次世代定序技術，分析場址中微生物族群概況，廠址中微生物多樣性之資訊亦可協助我們未來選擇菌株之參考；(2) 高濃度鉻環境造成菌株還原能力下降可能是鉻濃度太高，抑制微生物的生長與作用。然而一班污染環境鉻濃度應不至於那麼高，若真的高過於微生物可容忍的濃度，可考慮以抽水處理法進行生物還原整治。已將此部分增列於修正稿之 Chap 5. ; pp. 51-52。

專案主持人：\_\_\_\_\_（簽名及蓋章）



## 附錄二 CK-D 16S rRNA 基因序列

GTGGATGGCGCATGCTTACACATGCAGTCGCACGGGCGAGGGCAACCATGT  
CAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATCCTTGGGTGGGGGA  
CAACCGTGGGAAACTACGGCTAATACCGCATGATCCCTGAGGGGGCAAAGG  
CGAAAGTCGCCTGAGGAGGAGCCTGCGTCTGATTAGGTAGTTGGTGGGGT  
AAAGGCCTACCAAGCCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGGATGAA  
GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTCCTTTTGGCGGGGACGATGATGACGGTAC  
CCGCAGAATAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAA  
GGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGA  
CGGCACAGTCAGGCGTGAAATTCCTGGGCTCAACCTGGGGACTGCGTCTG  
AGACGTGTTGTCTTGAGTATGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCCAGTGTAGAG  
GTGAAATTCGTAGATATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCT  
GGTCCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGTGC  
TTAGCACTTCAGTGTCGTAGCTAACGCGGTAAGCACACCGCCTGGGGAGTA  
CGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGATTT  
GACATGGGGAGTACCGGTCCAGAGATGGACTTTCCCGCAAGGGGCTCCCG  
CACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTCAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGG  
GCACTCTGAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGAC  
GTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC  
GGTGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCTGATCTCAAAAAGCCG  
TCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCT  
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA  
CACCGCCCGTCACACCATGGGATTTGGTTTGACCTTAAGTTGGTGCTGTTA  
ACCCGCAAGGGAGGCAGCCAACCACGGTCGTCAGAGACTT



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

### 附錄三 CK-W 16S rRNA 基因序列

GGGCATGCGCATGCTTACACATGCAGTCGCACGGGCAGGGCAACCTGTCA  
GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATCCTTGGGTGGGGGACA  
ACCGTGGGAAACTACGGCTAATACCGCATGATCCCTGAGGGGGCAAAGGCG  
AAAGTCGCCTGAGGAGGAGCCTGCGTCTGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAA  
AGGCCTACCAAGCCTGCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA  
ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGGATGAAGA  
AGGTCTTCGGATTGTAAAGTCCTTTTGGCGGGGACGATGATGACGGTACCC  
GCAGAATAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG  
GGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGAC  
GGCACAGTCAGGCGTGAAATTCCTGGGCTCAACCTGGGGACTGCGTCTGA  
GACGTGTTGTCTTGAGTATGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCCAGTGTAGAGG  
TGAAATTCGTAGATATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG  
GTCCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGTGCTT  
AGCACTTCAGTGTCGTAGCTAACGCGGTAAGCACACCGCCTGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGG  
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGATTTG  
ACATGGGGAGTACCGGTCCAGAGATGGACTTTCCCGCAAGGGGCTCCCGC  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTCAGTTGCCAGCATGTTTGGGTGGG  
CACTCTGAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
TCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG  
GTGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCTGATCTCAAAAAGCCGT  
CTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTA  
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
ACCGCCCGTCACACCATGGGATTTGGTTTGACCTTAAGTTGGTGCGCTAAC  
CCGCAAGGGAGGCAGCCAACCACGGTCGTCAGAGCTGGG



## (六) 參考文獻

- Akinci, G., Guven, D.E. (2011) Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Desalination* 268 (1–3), 221–226.
- Asmatulla, S., Qureshi N., Shakoori A. R. (1998). Hexavalent chromium induced congenital abnormalities in chick embryos. *J Appl Toxicol.* 18, 167-172.
- Aulenta, F., Majone, M., Tandoi, V. (2006) Enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents: environmental factors influencing microbial activity and their relevance under field conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1463-1474.
- Baruthio, F. (1992). Toxic effects of chromium and its compounds. *Biol Trace Element Res.* 32(1-3), 145-153.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., Cappello, S. (2015) Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A mini review. *Open Microbiol. J.* 9,48-54.
- Bedient, P.B., Holder, A.W., Enfield, C.G., Wood, A.L. (1999) Enhanced remediation demonstrations at Hill Air Force Base: Introduction. In: *Innovative subsurface remediation : field testing of physical, chemical and characterization technologies.* ACS symposium series, 725, 36-48.
- Blais, J.F., Tyagi, R.D., Auclair, J.C. (1993) Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics. *Water Res.* 27 (1), 101–110.
- Buque, E.M., Chin Joe, I., Straathof, A.J.J., Jongejan, J.A., Heijnen, S.J. (2002). Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 656-664.
- Chien, C-C. (2013) Heavy Metal Niches: Microbes and Their Metabolic Potentials. In: *“Applications of Microbial Engineering.”* CRC Press, USA. pp. 342-366.



- Codd, R., Irwin J. A., Lay P. A. (2003). Sialoglycoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity. *Curr Opin Chem Biol.* 7(2), 213-219.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N. N., Thatoi, H. N. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya D., Pandiyan K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K. Lade, H., Paul, D. (2015) Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental process. *Sustainability*, 7, 2189-2212.
- Eastmond, D. A., MacGregor, J. T., Slesinski, R. S. (2008). Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Cri Rev Toxicol.* 38(3), 173-190.
- Elangovan, R., Philip, L., Chandraraj, K. (2010) Hexavalent chromium reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi*-RE. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(1), 81-97.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology*, 99(13), 5296-5308.
- Fernández, P.M., Viñarta, S.C., Bernal, A.R., Cruz, E.L., Figueroa, L.I.C. (2018) Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere* 208:139-148.
- Fuller, S. J., Burke, I. T., McMillan, D. G., Ding, W., Stewart, D. I. (2015). Population changes in a community of alkaliphilic iron-reducing bacteria due to changes in the electron acceptor: implications for bioremediation at alkaline Cr (VI)-contaminated sites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(6),



1-15.

- Hocheng, H., Su, C., Jadhav, U.U. (2014) Bioleaching of metals from steel slag by *Acidithiobacillus thiooxidans* culture supernatant. *Chemosphere* 117, 652–657.
- Jack, T.R., Zajic, J.E. (1977) The enzymatic conversion of L histidine to urocanic acid by whole cells of *Micrococcus luteus* immobilized on carbodiimide activated carboxymethylcellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 19(5), 631-648.
- Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., El Ghachtouli, N. (2015) Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 233 (pp. 45-69). Springer International Publishing.
- Laurinavichene, T., Laurinavichius, K., Shastik, E., Tsygankov, A. (2016) Inhibited growth of *Clostridium butyricum* in efficient H<sub>2</sub>-producing co-culture with *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(24): 10649-10658.
- Liu, B., Su, G., Yang, Y., Tao, Y., Huang, Y., Hu, L., Zhong, H., He, Z. (2019) Vertical distribution of microbial communities in chromium-contaminated soil and isolation of Cr(VI)-Reducing strains. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180: 242-251.
- Mejare, M., Bulow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19(2):67-73.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):313-339.
- Patra, R.C., Malik, B., Beer, M., Megharaj, M., and Naidu, R. (2010). Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10), 1857-1863.





- Polti, M.A., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2011) Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water, Air, and Soil Pollution* 214(1-4), 49-57.
- Pradhan, D., Sukla, L.B., Sawyer, M., Rahman, P.K.S.M. (2017) Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 55, 1-20.
- Puzon, G. J., Petersen, J. N., Roberts, A. G., Kramer, D. M., Xun, L. (2002). A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium (III)–NAD<sup>+</sup> complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 294(1), 76-81.
- Puzon, G. J., Robert, A. G., Kramer, D. M., Xun, L. (2005). Formation of soluble organo-Cr(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics. *Environ Sci Technol.* 39(8), 2811-2817.
- Qi, W., Reiter, R.J., Tan, D.X., Garcia, J.J., Manchester, L.C. (2000) Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ Health Perspect.* 108(5):399-402.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 21(3):321-32.
- Ritalahti, K.M., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E. (2006) Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4), 2765-2774.
- Ryu, H., Elk, M., Khan, I.U.H., Harwood, V.J., Molina, M., Edge, T.A., Domingo, J.S.(2014) Comparison of two poultry litter qPCR assays targeting the 16S rRNA gene of *Brevibacterium* sp. *Water Research* 48(1), 613-621.
- Shah, V., Jain, K., Desai, C., Madamwar, D. (2011) Metagenomics and integrative omics technologies in microbial bioremediation: current trends and potential



- applications. from: Metagenomics: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press, U.K. (pp. 211-240)
- Sreekrishnan, T.R., Tyagi, R.D., Blais, J.F., Campbell, P.G.C. (1993) Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge — I. Effects of process parameters. *Water Res.* 27 (11), 1641–1651.
- Stiborova, H., Strejcek, M., Musilova, L., Demnerova, K., Uhlik, O. (2020) Diversity and phylogenetic composition of bacterial communities and their association with anthropogenic pollutants in sewage sludge. *Chemosphere* 238,124629.
- Tahri Joutey, N., Bahafid, W., Sayel, H., Ananou, S., El Ghachtouli, N. (2014) Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco). *Environmental Science and Pollution Research* 21(4), 3060-3072.
- Teizel, G.M., Paresk, M.R. (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 69(4):2313-2320.
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B.P., Das, N. (2014) Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *J Environ Manage.* 146, 383-399.
- Valentine, R.C., Mortenson, L.E., Carnahan, J.E. (1963) The Hydrogenase System of *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* 1963 238: 1141-1144.
- Wang, X., Son, Y. O., Chang, Q., Sun, L., Hitron, J. A., Budhraj, A., Zhang, Z., Ke, Z., Chen, F., Luo, J., Shi, X. (2011). NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium. *Toxicol Sci.* 123(2), 399-410.
- Wang, M.Y., Tsai, Y.L., Olson, B.H., Chang, J.S. (2008) Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *Inter J Hydrogen Energ* 33(18): 4730-4738.



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

Whiteley, C.G., Lee, D.J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3), 291-316.

Zeng, J., Gou, M., Tang, Y.Q., Li, G.Y., Sun, Z.Y., Kida, K. (2016) Effective bioleaching of chromium in tannery sludge with an enriched sulfur-oxidizing bacterial community. *Bioresour Technol.* 218, 859-866.

黃智，吳勇興，林淑滿，鍾裕仁。(2011) 土壤清洗技術於土壤污染整治應用。中興工程, (110), 53-61.

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

盧至人. (2004). 地下水現地生物復育和廢污水生物處理的特性探討. 台灣土壤及地下水環境保護簡訊, (14), 7-15.

梁書豪，簡華逸，郭育嘉，楊宗翰，及高志明. (2012). 土壤及地下水整治技術發展簡介。

吳培堯，劉沛宏，許益源，陳怡君，楊致。(2007) 鉻酸場址整治, (22), 4 – 8.

陳嘉隆。(2015) 應用鉻酸鹽還原菌處理鉻污染地下水。國立中山大學 環境工程研究所 碩士論文。

張尊國。(2002) 台灣地區土壤污染現況與整治政策分析。財團法人國家政策研究基金會國政分析報告，永續（析）091-021。



**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： 年 月 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"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
申請機構系所	元智大學生技所	專案主持人	簡志青
專案名稱			
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	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
<b>A 學術產出及活動</b>	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	2	0	2		
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	0		論文撰寫中
		(2)研討會論文					
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告	2	1	2		期中與期末報告
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
<b>B 人才培</b>	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2		
		(2)博士					
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊					



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

目標達成程度 項目			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
育		(3)形成研究中 心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



## (二) 產業面

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



開發加強式現地生物整治技術處理鉻污染地下水

## (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	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因 或 其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

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

由於工業的快速發展，重金屬污染在國內對環境以及人們的健康造成非常大的威脅與影響，處理重金屬污染土壤的整治方法目前仍以物理或化學方式為主。採用傳統物理或化學的方式，雖然較具效率，然亦需要較高之整治經費。在重金屬污染整治策略應用上，除了效率外，尚有經濟考量與環境二次污染等疑慮。生物復育具有低成本、操作方便與環境友善等特性，較易被一般大眾所接受，因此生物整治也成為一種較務實的方式。環境中某些微生物可將毒性較強之六價鉻還原成較不具毒性之三價鉻，另外也可利用微生物吸附能力來移除污染環境之重金屬，本研究探討評估使用混和微生物菌株，配合細胞固定化技術，並開發可用於生物復育之基質，以期提升重金屬鉻污染環境生物整治之效率，建立一個以生物復育為基礎之創新重金屬污染環境整治技術。