




行政院環境保護署

111 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

結合電化學及營養物選殖生物刺激複合 技術進行含氯有機物污染場址之整治效 能評析

期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：國立中正大學 地球與環境科學系
專案主持人：許昺慕教授
專案執行期間：111 年 9 月 1 日起至 112 年 8 月 31 日止

中 華 民 國 1 1 2 年 0 8 月 印 製



目錄

審查意見回覆對照表.....	3
專案基本資料表.....	12
111 年度專案成果績效自評表.....	13
二、計畫摘要	
中文部分.....	18
英文部分.....	19
三、計畫目的	
(一)背景.....	21
(二)國內外相關執行情形.....	23
(三)執行進度及已獲之研究成果.....	24
四、研究方法及步驟	
(一)三氯乙烯(TCE)污染場址和泥火山樣點的樣本採集.....	26
(二)結合微盤培養及菌群代謝預測之 TCE 代謝菌群培養組學技術.....	26
(三)微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells, MFC)模組的建立並評估各模組 TCE 分解 之生物刺激效力.....	26
(四)使用氣相層析質譜儀(Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS)進行化學 特徵分析.....	31
(五)細菌群落生理分析、序列分析及 MFCs 代謝功能分析.....	32
五、結果與討論	
(一)研究發表證明.....	34
(二)本期泥火山場址採樣點說明及分析結果.....	35
(三)TCE 污染場址之含氯有機污染物分析結果.....	43
(四)微生物燃料電池(MFC)模組建立並評估各模組 TCE 分解效力.....	45
六、結論與建議.....	54
七、參考文獻.....	56
八、研究進度及預期完成之工作項目(甘特圖).....	62



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	111 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他	主持人：許曷慕 NO：	
計畫名稱	含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選		
委員審查意見		計畫單位回覆	
經審閱階段成果報告已依申請計畫書定稿本執行，符合預期執行進度。		謝謝。	
本署審查意見		計畫單位回覆	
文中敘述「以釐清其降解機制及各類細菌在不同污染物降解所扮演之角色。」，建議釐清研究目標生物僅限於各類細菌，還是有包含其他種類的微生物？		謝謝委員建議。本計畫中提及之目標生物僅限於各類細菌，已根據委員建議會在後續修正計畫書及報告中清楚定義。	



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」

□構想書 □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	111 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：許曷慕 NO：C1
計畫名稱	結合電化學及營養物選殖生物刺激複合技術進行含氯有機物污染場址之整治效能評析		
審查意見		執行單位回覆	
委員一 1. 研究成果豐碩。 2. 有關泥火山研究成果與本研究計畫之關聯性為何?建議應說明。 3. 有關 MFC 的研究，建議應考量未來放大之規劃與可行性評估。		1.感謝委員鼓勵。 2.在脫氯還原反應中，厭氧發酵過程產生的氫氣可作為直接電子供體，進而加速了 TCE 的降解速度。然而，環境中產生的氫氣也會被各種微生物群競爭代謝，因而導致脫氯細菌無法有效利用氫離子，造成 TCE 脫氯效率降低，這個問題可藉由甲烷氧化菌改良劑加以解決。泥火山是一個由甲烷和二氧化碳作為氣相主要組成的惡劣環境。環境中伴隨之碳氫化合物是甲烷氧化菌的主要碳源。因此，若由含有甲烷氧化菌組成的泥火山樣本作為污染 TCE 土壤和地下水的原位生物復育所需之生物刺激物，學理上乃為可行之策略。相關學理將在期末報告中說明。 3.本計畫經固相/液相/混和相之三氯乙烯生物燃料電池模組設計評估微生物結合電動力整治技術之可行性。評估結果將建議該系統應用於地下水汙染整治以離場(off-site)整治輔以固相/液相 MFC 系統較為可行。本團隊將於下一期計畫進行 MFC 系統放大測試。	
委員二 1. 請以預定進度及查核點說明期中報告達成狀況。 2. 建議詳細說明研究設計與執行流程，實驗 QA/QC。 3. 請匯整本研究六項步驟初步結果之關聯性，將如何運用電化學及營養物選殖生物刺激複合技術進行含氯有機物污染(TCE)之整治，也就是泥漿火山的嗜甲烷菌應用於 MFC 模組，建議將各研究操作參數彙整說明。		1.本計畫期中報告預定進度及查核點項目包括(1)進行第三代定序結果分析、(2)泥火山分析、(3)Biolog 微盤應用分析、(4)生物燃料電池開發評估，皆已依計畫書規劃達成期中報告進度。 2.感謝委員建議。將於期末報告之”研究方法及步驟”及”結果與討論章節”說明研究設計與執行流程並呈現實驗 QA/QC。 3.本計畫五項執行項目為:(1)三氯乙烯(TCE)污染場址和泥火山樣點的樣本採集(2)結合微盤培養及菌群代謝預測之 TCE 代謝菌群(3)微生物燃料電池模組的建立並評估各模組 TCE 分解之生物刺激效力(4)使用氣相層析質譜儀進行化學特徵分析(5)細菌群落生理分析、序列分析及 MFCs 代謝功能分析。研究目的為欲達成兩項重點:(1)結合微盤培養基及菌群代謝預測分析技術，紀錄	



<p>4. 請彙整說明期中已完成之結果與後續預定執行工作。</p>	<p>TCE 降解過程的生態位。(2) 藉由改變含 TCE 污染物樣本之電子供體及受體提供率，提升微生物降解 TCE 污染物之速率。相關研究參數及實驗成果將於期末報告中呈現。</p> <p>4.本計畫於期中預定執行工作之執行進度如下: (1)實驗方法建置與生物燃料電池系統開發(執行進度 50%)、菌群之生物資訊分析(執行進度 40%)、不同整治方法整合評估(執行進度 50%)、泥火山之功能性微生物菌群檢測與篩選(執行進度 40%)、現地整治技術於實驗室測試及改良(執行進度 50%)、化學分析評估(執行進度 80%)、Biolog 微盤培養及代謝探討及整治評估(執行進度 50%)、固相/液相/混合相之三氯乙烯分解生物燃料電池模組設計與測試(執行進度 50%)、微生物燃料電池對 TCE 降解效力及其電極對降解 TCE 微生物菌群之影響評估(執行進度 20%)。相關結果呈現於期中報告”執行進度及已獲之研究成果”，本計畫後續執行工作為將未完成部分完成，並呈現於期末報告。</p>
<p>委員三</p> <p>1. 本案期中報告書請補充目錄以利審閱。</p> <p>2. P.11(二)國內外相關執行情形，第六行「...添加”而”額外菌株」贅字，請刪除。</p> <p>3. P13 所述本案已進行 2 年計畫，發表於國際期刊獲得認可，並整體規劃為六年期研究型/模場型研究計畫，本案預計可形成一個跨機構研究團隊，後續若進入模場研究可加強產業面合作推廣。</p> <p>4. P.17 最後一行「...稀釋每個樣品”。，“”；P.29 第四行「...28”。”90 天」符號誤植，請修正。</p>	<p>1.感謝委員建議及鼓勵。</p> <p>2.勘誤部分將進行修正。</p>
<p>委員四</p> <p>1. 已完成樣品收集、MFC 模組組裝及第一階段 0-90 天的觀察與計算，達到期中報告查核目標。</p>	<p>感謝審查委員審閱。</p>



委員五

1. 本報告在背景資料中多處談及 TCE 「二氯化」、「二氯化還原反應」或「二氯還原反應」。請補充說明何謂「二氯化」?依目前含氯化物整治工法對於 TCE 降解主要是以「脫氯」一詞表示請在討論二氯化其適宜性。
2. P.21 頁圖 5 與 P.22 頁圖 6，照片與標題有誤。
3. 表 3 標題「污染場址 6 處採樣點土壤分層 PID 測量結果最高之樣本其 TCE 關聯性化合物檢測結果」建議修改為「污染場址 6 處採樣點土壤含氯及苯類化合物檢測結果」，原因如下：
 - (1) 苯類化合物非 TCE 降解產物或其前驅物是屬非關聯化合物。
 - (2) 土壤分層採 PID 數值最高值之樣品進行最終 VOC 檢測僅是手段之一，表 2 之 PID 數值與表 3 之 VOC 數值並無相關性，建議表 2 增加 1 欄位並在各點位分層 PID 最高者旁打勾，並註明打勾者為送實驗室進行分析。
4. 續上，表 3 請標示單位。
5. 續上，土壤管制標準 TCE 為 60mg/kg，表 3 所列之 6 個土壤樣品其 TCE 濃度是否符合試驗預期目標請再討論。
6. 本計畫污染場址所得土壤樣品非僅 TCE 單一化合物，未來實驗如何表達 TCE 或整體含氯化物脫氯降解成效請再討論。
7. 續上，污染場址所得土壤樣品原已存在菌群如何排除或納入實驗結果討論，請在後續報告中補充說明。

1. 感謝委員指正，相關名詞將於期末報告進行修正。
2. 照片與標題錯誤部分將於期末報告進行修正。
3. 感謝審查委員對於表 3 標題修正之指導，本團隊將於期末報告中進行修正。
4. 針對委員第 5 點及第 7 點之指教，本計畫所選擇之污染場址乃為環保署公告整治之場址。但在樣本採樣過程，即使選擇 TCE 濃度最高之樣本，仍未能採集到超過土壤管制標準之樣本。也因此於本計畫之 MFC 實驗項目中 TCE 必須以外加方式處理。這也說明 TCE 污染場址，土壤整治部分通常不是問題，因污染場址之現地土壤微生物即有能力分解。因此在本計畫中我們乃將污染場址所得土壤樣品當作 TCE 分解菌之基底菌群，藉由 MFC 之電化學環境及添加泥火山灰作為生物刺激之改良劑，希望得到 TCE 降解效率更好之菌群組合。
5. 委員第 6 點之問題確實是含氯污染整治研究之一大罩門。由於相關採樣及分析費用所費不貲，因此目前在本計畫之外，我們試著與其他污染整治公司合作，由他們提供完整含 TCE 分解過程中間產物分析數據，而本實驗室負責進行關聯性菌群與代謝分析，以擴大樣本及數據規模。



委員六

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 建議後續可加強說明本技術研發後於國內污染場址之應用性。 2. 透過泥火山特殊地質環境篩選出之特殊含氣有機物降解菌種，是否能於一般地質環境下存活並發揮其降解效能，抑或須將污染物抽出於特定環境條件下讓此特殊菌群以離地方式處理污染物？ 3. 建議表 3 增加說明所分析樣品採樣點的深度，以與表 1 之數據比對，另文中提及表 3 的土壤樣品係於設置表 2 地下水監測井時取樣，建議表 2 及表 3 之編號可加註對應之關係以利比對參考。 4. 建議說明以泥漿火山樣品作為嗜甲烷菌來源製備微生物燃料電池（MFC）模組，如何維持菌群於模組中之活性以及長期發電之效能。 5. 並無後續工作說明內容。 6. 請檢附申請計畫書回覆意見對照表，及依徵求書附件 12 格式補充主要研究人力、產業界資源投入表。 | <ol style="list-style-type: none"> 1.感謝委員建議，相關說明將於期末報告中呈現。 2.感謝委員提點，本團隊期望能在後期模廠試驗計畫中進行驗證。 3.感謝委員對於表中內容呈現方式給予之建議，本團隊將在期末報告中做修正。 4.由研究結果得知，本模組無法長期發電，操作條件將是給予最佳 TCE 分解效率之菌群一穩定電壓(外加)來維持其 TCE 分解效率。 5.感謝委員提醒。本計畫於期中預定執行工作之執行進度如下: (1)實驗方法建置與生物燃料電池系統開發(執行進度 50%)、菌群之生物資訊分析(執行進度 40%)、不同整治方法整合評估(執行進度 50%)、泥火山之功能性微生物菌群檢測與篩選(執行進度 40%)、現地整治技術於實驗室測試及改良(執行進度 50%)、化學分析評估(執行進度 80%)、Biolog 微盤培養及代謝探討及整治評估(執行進度 50%)、固相/液相/混合相之三氯乙烯分解生物燃料電池模組設計與測試(執行進度 50%)、微生物燃料電池對 TCE 降解效力及其電極對降解 TCE 微生物菌群之影響評估(執行進度 20%)。本計畫後續執行工作為將未完成部分完成，並呈現於期末報告。 6.感謝委員建議，遵照辦理。 |
|--|---|



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」

☐構想書 ☐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	111 年度	計畫類型	<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他	主持人：許曷慕 NO：C1	
計畫名稱	結合電化學及營養物選殖生物刺激複合技術進行含氯有機物污染場址之整治效能評析		
審查意見		執行單位回覆	
委員一		1.感謝委員建議，已新增結論與建議章節進行描述。對於研究成果實際應用於汙染場址之建議，將於下一期計畫中進入模場型計畫類型之規劃。	
1. 建議計畫執行仍應以未來能實際應用於汙染場址之整治為目標。		2.關於委員生物碳吸附三氯乙烯後續降解策略，本團隊將於後續計畫中進行探討。	
2. 建議可以針對未來應用於實場時建立操作參數條件。		3.感謝委員建議，已在期末報告修正版本中進行績效說明。	
3. 建議可以探討以生物碳吸附三氯乙烯後續降解策略。			
4. 建議應針對本計畫成果產出績效做說明。			
委員二		1.謝謝，已依委員建議進行情末報告修正，並特別針對「研究方法實驗步驟」內容進行修正，且增加「結論與建議」以呈現具體研究成果。	
1. 報告撰寫格式及撰寫方式，建議修正以利閱讀。同時在研究方法實驗步驟的設計，請明確分類並具有邏輯性，最後期末報告應包含「結論與建議」方能具體呈現研究成果未來的發展潛力。		2.感謝委員建議，已在新修正期末報告之「研究方法實驗步驟」對實驗操作參數進行彙整。	
2. 報告中建議應整理說明各項實驗處操作參數彙整，作為後續應用的依據。		3 已修正勘誤。	
3. 自評報告勾選『期中』？		4 已進行修正。	
4. MFC 實驗的反應與培養時間第 36 頁 37 頁，說明「液-液」、「固-固」、「固-液」對 T CE 的微生物降解結果，第 36 頁第一段、第二段，第 37 頁第一段，結果描述三段比較結果都不同，請確認研究結果文字內容的正確性。		5 本計畫中研究環境條件與特定細菌群落及其功能之間的關聯性乃以典型對應分析（Canonical Correlation Analysis, CCA）法計算，該方法是利用綜合變量對之間的相關關係來反應兩組指標之間的整體相關性的多元統計分析法。環境因子與潛在的氯化物降解菌、甲烷氧化菌及其功能之間的相關性分析，乃根據 Spearman 相關性分析法進行計算，該法是用來衡量兩個變數的相關性的無母數指標，並利用單調函數評價兩個統計變數的相關性。相關說明已於新修正期末報告中進行補充敘述。本計畫類型仍屬「研究型」類別，對於未來的應用性以及場址整治的條件以目前得到之實驗結果，較難深入著墨。由於本期計畫已與環境污染整治廠商實質合作，對於研究成果實際應用於汙染場址之建議，將於下一期計畫中進行模場型整治計畫	
5. 本文最後一段說明「...微生物活性在 TCE 降低解中添加泥火山作為修正劑對 MFC 陰極室中降解產生了顯著正向影響」。然而在結果分析中並未做任何統計分析，以呈現結果的顯著性，所有研究成果沒有提供量化數據與進一步比較分析，建議應加強說明本研究			



<p>未來的應用性、以及場址整治的條件，方能具體呈現研究成果未來的發展潛力。</p>	<p>類型之規劃。</p>
<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本案成果績效自評表中，國內研討會論文投稿目標 1 篇，惟期末達成數為 0，請說明未達成原因。 2. 本案摘要僅說明完成相關試驗分析及驗證，建議摘錄相關研究成果重點，另計畫書內容建議，綜整最終重點成果並增加結論及建議章節。 3. P. 12 所述本案已進行 2 年計畫，發表於國際期刊獲得認可，並整體規劃為六年期研究型/模場型研究計畫，預計形成一個跨機構研究團隊，後續若進入模場研究可加強產業面合作推廣。 4. 本案期末報告書請補充目錄以利審閱，P. 21 圖 5 照片採樣點標號，建議與 P20. 樣品編號一致。 5. P. 11(二)國內外相關執行情形，第六行「…添加”而”額外菌株」贅字，請刪除；P. 18 第(五)點第六行「…稀釋每個樣品”。，“”」；P. 35 第三行「…28”。”90 天」符號誤植，請修正，另其後文字「到目前為止，我們已經在 0 天和 7 天的時間間隔內收集了各種樣本」，依 P. 37 圖 16 顯示以達 60 天數據，建議調整用語，並說明未顯示 90 天數據原因。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.國內研討會論文投稿目標 1 篇，期末達成數為 1，已作修正。 2.感謝委員建議，摘要已依據委員之建議進行修正。另已於期末修正版本新增結論與建議章節。 3.感謝委員之鼓勵。 4.已針對圖 5 進行採樣點標號，目錄已建構。 5.已針對委員建議進行勘誤，非常感謝。
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 英文標題及摘要都亂七八糟，應該是學生寫的，教授沒有仔細看就送出，要重寫。 2. 本計畫應是提供電力促進氯化物分解，此與 MFC 功能完全不同，請勿誤用。 3. 電化學機制實驗條件都未說明，預備執行之分年工作與預期結果均無。P.35 中要執行的 8 項成果在哪?第 36 頁在一堆文字敘述數 	<ol style="list-style-type: none"> 1.非常抱歉，英文摘要誤放修正前版本，已作取代更新。 2.本研究之 MFC 並無供應外加電力促進氯化物分解。提供固定電壓之外加電力實驗模組，是另一熱門的研究模式，本研究群將在未來進行研究。 3.本計畫之主要電化學機制、分年工作、預期結果已在計畫背景中交代。本計畫原內容執行方法敘述錯誤部分(8 項成果)，已做修正。本研究 MFC 模組試驗中每一模組三氯乙烯的原始濃度



<p>據在哪?圖 17 的條件及試驗設計分組為何? 降解速率是什麼?土壤中的三氯乙烯 0.1 到 0.2 ppm 要做什麼模場?</p> <p>4. 2023 年 1 月在 Environmental research 發表文章未提及 TCE 及電化學, 其中發現菌種為好氣性甲烷氧化細菌是要做什麼?TCE 降解是要還原菌。</p>	<p>為 5,000 ppm, 添加受三氯乙烯污染的土壤(三氯乙烯濃度介於 0.1 到 0.2 ppm)是作為 TCE 降解菌種來源, 非為 MFC 各模組之三氯乙烯原始濃度。降解率是指三氯乙烯降解之效率, 非速率。針對委員第 3 點提及之文字敘述與數字疑義部分已於期末報告修正版中進行文字修正。</p> <p>4.泥火山環境中富含的甲烷氧化菌(有好氧菌亦有厭氧菌)所含之酵素 Methane Monooxygenase (MMO)能將甲烷氧化成甲醇, 再氧化為甲醛, 最終形成二氧化碳, 而這個酵素 MMO 亦具有開解三氯乙烯雙鍵之功能。因此, 是否能由富含甲烷氧化菌組成的泥火山基質作為受 TCE 污染的土壤和地下水之生物刺激物, 乃為本研究之主要假設。</p>
<p>委員五</p> <p>1. P3 頁自評表之填表日期 112 年 1 月 17 日與專案執行期程勾選可能有誤, 請再查證。</p> <p>2. 本報告並未參考期中審查意見修正請再討論, 例如 P20 頁與 P21 頁圖片相互誤植等。</p> <p>3. P35 頁提到 MFC 實驗以批次處理模式運作 90 天, 但 P37 頁圖 16 之培養天數僅表示至 60 天, 請補充說明。</p> <p>4. 續上, 圖 16 展示有 LL-C、LL-T、SL-C、SL-T、SS-C、SS-T 等 6 條實驗關係線, 但整本報告內文並未有相關說明代號代表之意義。</p> <p>5. P7 頁計畫摘要提及「...7 月中旬獲得資料進行後續分析」請再補正後續結果資料以使本報告更加完善。</p>	<p>感謝委員協助勘誤</p> <p>1.已修正勘誤。</p> <p>2.已修正勘誤。</p> <p>3.已修正為 60 天。</p> <p>4.圖 16&17 已附註。</p> <p>5.已補正後續結果, 並對摘要內容進行修正, 謝謝。</p>
<p>委員六</p> <p>1. p. 3 成果績效自評學術面國內論文預估數為 1、研發技術改良預估為 1, 期末達成數均為 0, 與 p. 6 學術面成果不一致, 請確核。</p> <p>2. p. 16 “樣本土壤以混合均勻後分讓重量”, 詞句建議修正。</p> <p>3. p. 21 “在培養 168 小時期間的 31 種碳源的”底物”利用率顯示在圖 2B 中。</p>	<p>感謝委員協助勘誤</p> <p>1.國內研討會論文投稿目標 1 篇, 期末達成數為 1, 已作修正。</p> <p>2.已修正, 謝謝。</p> <p>3.已修正勘誤。</p> <p>4.已修正, 謝謝。</p> <p>5.非常抱歉, 該文義是指硫化物暗氧化反應(Dark sulfide Oxidation 以及 Dark Oxidation of Sulfur Compound), 已作修正。</p> <p>6.感謝委員建議, 已於期末修正版本新增結論與</p>



- | | |
|---|---|
| <p>P. 36:在添加相應的”底物”後。P. 36:和它們從”底物”中的有機物到陰極的高效電子傳遞具有顯著性影響。請確認”底物”一詞否正確，抑或以”基質”表示較為適當。</p> <p>4. p. 22 請確認文義:”微生物群落利用基質的方式因，所泥漿火山樣本的具體位置而異”</p> <p>5. P. 25 請確認文義:”與 MV1-2、MV2-2、MV3-1 和 MV4-1 相關的最常見微生物代謝功能是硫化物黑色氧化和硫化物的黑色氧化”，意思是此類菌群的代謝功能為讓硫化物氧化為黑色？</p> <p>6. 建議本報告應於最後一節明確說明計畫執行之成果，例如自泥火山中篩選出那些菌群，經試驗後確認有哪些菌群確實具 TCE 之降解代謝能力。</p> <p>7. P. 56-57 期中報告審查意見，委員五問題 1、3~7 及委員六問題 2~3 均未於期末報中修改或回覆處理。</p> <p>8. p. 3 專案執行期程應為期末請修正。p. 22 建議報告中有關”CO₂”均請修正為”CO₂”。P. 23 圖 6 名稱”探源”請修正為”碳源”。p. 31 減少大氣中溫室氣體”的”溢散”。”溢散”應為”逸散”。</p> | <p>建議章節，明確說明計畫執行成果。</p> <p>7.謝謝，已對期中報告委員意見進行修正勘誤。其他非勘誤之問題(A.本計畫污染場址所得土壤樣品非僅 TCE 單一化合物，未來實驗如何表達 TCE 或整體含氯化物脫氯降解成效請再討論。B.污染場址所得土壤樣品原已存在菌群如何排除或納入實驗結果討論，請在後續報告中補充說明。C.透過泥火山特殊地質環境篩選出之特殊含氯有機物降解菌種，是否能於一般地質環境下存活並發揮其降解效能，抑或須將污染物抽出於特定環境條件下讓此特殊菌群以離地方式處理污染物？)修正回覆如下:A.由於相關採樣及分析費用所費不貲，因此目前在本計畫之外，我們試著與其他汙染整治公司合作，由他們提供完整含 TCE 分解過程中間產物分析數據，而本實驗室負責進行關聯性菌群與代謝分析，以擴大樣本及數據規模。B.針對委員第 5 點及第 7 點之指教，本計畫所選擇之汙染場址乃為環保署公告整治之場址。但在樣本採樣過程，即使選擇 TCE 濃度最高之樣本，仍未能採集到超過土壤管制標準之樣本。也因此於本計畫之 MFC 實驗項目中 TCE 必須以外加方式處理。這也說明 TCE 汙染場址，土壤整治部分通常不是問題，因汙染場址之現地土壤微生物即有能力分解。因此在本計畫中我們乃將汙染場址所得土壤樣品當作 TCE 分解菌之基底菌群，藉由 MFC 之電化學環境及添加泥火山灰作為生物刺激之改良劑，希望得到 TCE 降解效率更好之菌群組合。C.感謝委員提點，本團隊期望能在後期模廠試驗計畫中進行驗證。</p> <p>8.謝謝，已修正勘誤。</p> |
|---|---|



專案基本資料表

專案性質		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別(單選)		<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	
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		國立中正大學 地球與環境科學系					
機構地址		621 嘉義縣民雄鄉大學路一段 168 號					
專案主持人		許昌慕		職等／職稱		特聘教授	
協同主持人		陳榮盛		職等／職稱		助理研究員(博士級)	
協同主持人		呂榮俊		職等／職稱		董事長	
協同主持人		黃士偉		職等／職稱		副教授	
專案名稱	中文	結合電化學及營養物選殖生物刺激複合技術進行含氯有機物污染場址之整治效能評析					
	英文	Assessment and Analysis of Degradation Efficiency at Sites Contaminated with Chlorinated Organic Pollutants Using Hybrid Technologies: Electrochemistry and Nutrient-Selected Biostimulation					
	關鍵字	微生物燃料電池、生物刺激、泥火山、微生物菌群、三氯乙烯					
執行期程		自民國 111 年 9 月 1 日起至民國 112 年 8 月 31 日止					
專案主持人		姓名：許昌慕		Email：bmhsu@eq.ccu.edu.tw		專線：052720411#66218 手機：0952840868	
專任助理		姓名：林重延		E-mail：nmsaulin@gmail.com		專線：05-2720411#61233 手機：0929402267	
經費分析總表	專案變更後經費		第一年金額	第二年金額	編列說明		
	1.	人事費用	336,000		(1~5 項相加之 50%為限)		
	2.	貴重儀器使用含維護費	0		(與計畫實驗相關)		
	3.	消耗性器材與主要費用	438,000		(與計畫主體相關)		
	4.	其它研究相關費用	0		(含差旅與租賃費用)		
	5.	雜支費用	0		(1~6 項相加之 5%為限)		
	6.	行政管理費	86,000		(1~5 項相加之 10%為限)		
	7.	自籌款	0		(自行籌備款項)		
	申請補助金額(1~6 項)		860,000		總金額：860,000		
計畫總金額(1~7 項)		860,000		總金額：860,000			

專案主持人(簽名及蓋章)：_____ 日期：_____



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

111 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：112 年 08 月 26 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	研究主題	
申請機構系所	國立中正大學地球與環境科學系	專案主持人	許曷慕
專案名稱	結合電化學及營養物選殖生物刺激複合技術進行含氯有機物污染場址之整治效能評析		
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)
A 學術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	0	0	0		
		(2)研討會論文	1	0	1		
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	2		
		(2)研討會論文	0	0	0		
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	0	0	0		
		(2)研究報告	1	0	1		
	4.專著 (本數)		0	0	0		
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會	0	0	0		
		(2)成果發表會	0	0	0		
		(3)論壇	0	0	0		
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術	1	0	1			
	(2)技術平台	0	0	0			
B 人 才 培 育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2		
		(2)博士	1	1	1		
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊	0	0	0		
		(2)跨機構團隊	1	0	1		
		(3)形成研究中 心	0	0	0		
		(4)形成實驗室	0	0	0		
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



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)



(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	0	0	0		
			新型/設計	0	0	0		
			合計	0	0	0		
		申請中	發明	0	0	0		
			新型/設計	0	0	0		
			合計	0	0	0		
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數		0	0	0		
		授權金(仟元)		0	0	0		
		衍生利益金(仟元)		0	0	0		
	3.技術移轉 (專利)	件數		0	0	0		
		授權金(仟元)		0	0	0		
		衍生利益金(仟元)		0	0	0		
	4.技術移轉 (應用技術)	件數		0	0	0		
		授權金(仟元)		0	0	0		
		衍生利益金(仟元)		0	0	0		
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)		0	0	0		
		(2)品種/系(件數)		0	0	0		
C 產學研合作	6.促成合作 研究	件數		0	0	0		
		金額(仟元)		0	0	0		
	7.促成投資	件數		0	0	0		
		投資金額(仟元)		0	0	0		
	8.促成取得 業界科專	件數		0	0	0		
		業界投資金額(仟元)		0	0	0		
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	1	1		
		收入(仟元)	0	0		
	2.諮詢服務	次數	2	1	2	
		收入(仟元)	0	0	0	
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策	0	0	0	
		(2)法規	0	0	0	
		(3)規範	0	0	0	
		(4)標準	0	0	0	
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、請依前述學術面、產業面、政策面等預期量化成果，具體敘明研究成果對本署政策推動之助益。（200 字為限）

學術面(如國內外研討會、期刊投稿件數、或人才培育碩博士生說明)

1. 投稿國際期刊 2 篇、參與國內研討會發表論文 1 篇。
2. 培育 2 名碩士生、1 名博士生。
2. 微生物燃料電池(MFC)模組建立並評估各模組 TCE 分解效力
3. 由中正大學與正修科技大學形成跨機構研究團隊。

產業面(如合作研發產業、申請專利、洽談技術移轉廠商件數說明)

1. 協助產業加速整治與整治方法開發。
2. 洽談產業合作開發(科林環境科技股份有限公司)Hybrid 電動力之生物整治技術。

政策面(如整治費用降低、特定污染物整治效益提升、或提供政府作為監測/管制標準、污染址管理等政策及法規研訂之參考)

1. 務實改善含氯污染物降解速率，降低長期營運成本並有效提升處理率。
2. 增進混合式整治方法開發，對污染物降解及現地整治有正面的助益。



二、計畫摘要

(一) 中文部分：

本計畫結合了電化學及營養物選殖生物刺激技術，進行含氯有機物之整治效能評估與分析。本研究的重點包括：(1)以菌群代謝預測分析技術，記錄三氯乙烯(TCE)降解過程的生態位。(2)藉由改變含 TCE 污染物樣本之電子供體及受體提供率，提升微生物降解 TCE 污染物之速率。本研究中作為生物刺激添加劑的泥火山樣本菌群代謝功能分析結果顯示，最常見之代謝機制是化學異營及硫化物暗氧化反應。葡萄糖類降解較少的泥火山樣本，其甲烷氧化相關代謝功能的菌群相對較高。而 Ecoplate 分析結果可作為樣本的碳源添加依據。利用 KEGG 數據庫進行甲烷氧化和硫代謝相關的潛在酶的特定基因分析結果，亦為泥火山樣本之硫代謝和甲烷氧化基因的存在提供驗證。泥火山樣本之 Spearman 相關性分析結果顯示，許多硫還原細菌與甲烷氧化相應的基因 *pmoA*、*pmoB* 和 *pmoC* 呈顯著正相關。在 pH 和 ORP 較高的條件下，甲烷氧化菌能更有效率進行甲烷氧化。在本研究之微生物燃料電池(MFC)模組試驗中發現，*Dehalococcoides mccartyi* 和 *Dehalobacter* 一旦在 MFC 陰極定殖，可以加速對 TCE 進行還原脫氯。添加泥火山灰的 MFC 樣本組，會增加甲烷氧化和甲基營養代謝路徑。這兩種代謝路徑對 TCE 降解具有正面影響。在三種不同類型之 MFC 模組中，以含火山灰的固-液相 MFC 模組其 TCE 代謝效率最佳。

關鍵字：微生物燃料電池、生物刺激、泥火山、微生物菌群、三氯乙烯



二、計畫摘要

(二)英文部分：

In this study, a well-designed experimental framework was established to integrate electrochemistry and biostimulation for effectively exploring the degradation efficiency of chlorinated organic compounds. The experimental setup encompasses the following key components: (1) Ecological Niche Exploration in Trichloroethylene (TCE) Degradation Process: A comprehensive investigation was conducted into the ecological niche associated with the TCE degradation process. This involved a combination of microplate medium utilization and an analysis of projected microbiota metabolism. Insights into the ecological conditions conducive to TCE degradation were gained through the analysis of microbiota metabolic activity. (2) Microbial Degradation Rate Assessment: The overall rates of TCE degradation enhancement were quantified through controlled manipulation of electron donor and acceptor supply rates. The metabolic functionalities within mud volcano samples reveal various mechanisms, with chemolithotrophy and anaerobic sulfide oxidation reactions emerging as the most prevalent. Furthermore, the presence of genes relevant to methane oxidation and sulfur metabolism in the mud volcano samples is confirmed through our analysis of specific genes associated with these processes, utilizing the KEGG database. The mud volcano samples with lower rates of glucose degradation exhibit a comparatively higher abundance of microbial communities associated with metabolic functions related to methane oxidation. The Ecoplate analysis findings provide a practical foundation for the introduction of carbon sources to the samples. A strong positive relationship between a multitude of sulfur-reducing bacteria and genes responsible for methane oxidation (*pmoA*, *pmoB*, and *pmoC*) is demonstrated by the Spearman correlation analysis. Additionally, methane-oxidizing bacteria are observed to function more efficiently under conditions of higher pH and ORP. Within our Microbial Fuel Cell (MFC) module experiments, the colonization of the MFC cathode by *Dehalococcoides mccartyi* and *Dehalobacter* accelerates the reductive dechlorination of TCE.



Upon the incorporation of mud volcano samples into the MFC configuration, a noticeable increase in methane oxidation and the methylotrophic metabolic pathways is observed. Both of these pathways contribute positively to the dechlorination of TCE, underscoring their potential for environmental applications. Among the three distinct types of MFC modules tested, the solid-liquid phase MFC module containing mud volcanic ash emerges as the most efficient in TCE metabolism.

Keywords: Microbial Fuel Cell (MFC), Biostimulation, Mud Volcanoes, Microbiota, Trichloroethylene (TCE)



三、計畫目的

(一)背景

由於氯化碳氫化合物(氯化烴)在工業生產中普遍使用，部分化合物因為處置不當，滲漏到土壤及地下水層。這些氯化烴因屬緻密的非水相液體(dense non-aqueous phase liquid, DNAPL)，具密度比水高，水中溶解度低的特點，因此成為土壤和地下水及其沈積物的常見污染源，對環境和人類健康構成威脅。在這些氯化烴中，以三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)最受到廣泛的關注，其對人類有很強的致癌性，也是地下水中最常檢測到的氯化烴之一 (Sun et al., 2020)。近年來，生物復育法已成功地從環境中去除數種含氯有機污染物，包括氯苯、多氯聯苯、氯乙烯、氯酚和鹵代烷。在厭氧條件下，四氯乙烯 (PCE) 和三氯乙烯 (TCE)可經由生物修復法透過二氯還原反應降解為乙烯或乙烷。根據文獻調查，大多數細菌屬，包括；脫硫單胞菌屬(*Desulfuromonas*)、脫硫桿菌屬(*Desulfitobacterium*)和脫鹵桿菌屬(*Dehalobacter*)，可以將地下水中部分的 TCE 經由脫氯還原為順式-二氯乙烯(DCE)。目前，已確認有兩種細菌屬：脫鹵單胞菌屬(*Dehalogenimonas*)和脫鹵球菌屬(*Dehelococcoides*)可將 TCE 轉換成氯化程度較低的乙烯，因此可視為 TCE 降解潛力菌 (Ottosen et al., 2021)。在厭氧環境下，許多 TCE 污染場址因為缺乏可用的電子傳遞供體/受體，經常導致不完全脫氯反應。這樣的情況會造成順式 1、2-二氯乙烯 (cis-1, 2-dichloroethylene, cDCE) 或氯乙烯 (vinyl chloride, VC) 等中間產物在環境中積累。這些中間產物已被證實對人類亦具毒性和致癌性，例如：VC。因此，將 TCE 完全脫氯為較少或無害的最終產物(如：乙烯)，對於消除這些化合物造成人類和環境健康風險極其重要。因此，考量到清理污染場址和評估污染降解的可行決策，首要的研究方針就是確實了解氯污染物降解的機制。先前已有報告顯示，使用 Biolog (MT2) 可作為快速識別出能降解環境污染物的潛在微生物物種(Kadali et al., 2012; Krishnan et al., 2018)，本研究將選定 Biolog 微盤培養基進行具潛力的降解微生物菌群代謝物及可能代謝途徑辨識。

在有機鹵化物呼吸細菌協助下進行原位生物修復時，通常會使用有機酸或乳化植物油作為電子供體，用以加速受 TCE 污染的土壤或地下水的脫氯還原反應。在脫氯還原



反應中，厭氧發酵過程產生的氫氣可作為直接電子供體，進而加速了 TCE 的降解速度。從氯化氫中要去除一個氯原子，需要一個氫分子和兩個電子的作用。然而，環境中產生的氫氣也會被各種微生物群競爭代謝，因而導致脫氯細菌無法有效利用氫離子，造成 TCE 脫氯效率降低。近期研究顯示，產甲烷菌已證明是脫氯細菌電子供體(包括氫)的核心競爭者 (Lin et al., 2021; Wen et al., 2020)。這個問題可藉由甲烷氧化菌改良劑加以解決，將甲烷轉化為氫氣和二氧化碳。在此情況下，較高的氫氣產量可以提高 TCE 的降解率。甲烷氧化菌廣泛分佈在與甲烷共存的自然環境中。含氯有機溶劑(包含 TCE)的生物降解可在酸性含水層等惡劣環境中發生。例如在好氧或是厭氧條件下，經由甲烷氧化菌或是通過抑制產甲烷菌的活性進而發生的生物降解(Lin et al., 2021)。同樣類似的情況，泥火山是一個由甲烷和二氧化碳作為氣相主要組成的惡劣環境。環境中伴隨之碳氫化合物是甲烷氧化菌的主要碳源。因此，若由含有甲烷氧化菌組成的泥火山基質作為污染 TCE 土壤和地下水的原位生物復育所需之生物刺激物，似乎為可行之策略。

在受氯化物污染的土壤和地下水中，電化學技術已廣泛用於生物復育中各種頑固污染物的分解 (Chen et al., 2019; Liu et al., 2021)。其中，微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells, MFCs)的使用，因為可加速降解，具環保、可持續性和成本效益等優點，引起許多的關注。在電活化細菌存在的情況下，此技術可利用陽極作為電子供體，而基質因厭氧發酵導致釋放自由電子和氫離子。另外，也因陽極端氧化步驟的作用，會促進陰極端對 TCE 進行脫氯還原作用。MFC 的潛力已被證實可有效將 PCE 和 TCE 還原為鹵代較少的化合物，如；順式二氯乙烯(cis-dichloroethylene, cis-DCE)、VC 或最終的非鹵代的乙烯 (ethylene, ETH) (Chen et al., 2019; Liu et al., 2021)。陰極端會通過調節陰極電位產生有利的氧化還原環境，增加電子傳遞以供行有機鹵化物呼吸的微生物產生脫氯還原反應。而反應速率乃取決於 TCE 和陰極呼吸脫氯微生物的濃度。因此，若陰極呼吸脫氯菌在原位修復中微生物群落的存量不足的話，可能會影響在污染場地的三氯乙烯的脫氯還原反應。因此，直接馴化污染場地多樣化的微生物群落，並尋找出高效 TCE 分解微生物菌群組合，可以促進土壤和地下水中 TCE 的完全脫氯還原反應。

並非全部的微生物群落均能參與環境污染物的生物降解，宏基因體學與培養組學方



法的結合不僅可以用於評估微生物群落對污染物的分解效率，還可以辨識出潛在降解物種與土壤或地下水中污染物的關聯作用。最後，使用這些方法可協助確認那些特定微生物參與 TCE 及其副產物降解生化反應途徑的關鍵步驟。這將有助於依據受污染土壤和地下水中的 TCE 及其副產物的濃度研擬出原位復育策略。此外，利用改變營養源(選擇性培養)的方法來探索潛在降解物種代謝活性也是必要的，此法將有助於促進原位生物修復，將 TCE 從受污染的土壤和地下水去除。

(二)國內外相關執行情形

目前雖有許多物理，化學和生物學方法已用於消除工業廢水中的有機氯化物，其中仍以化學方法相對有效且快速，但因成本較為昂貴，且容易產生具危害之副產物，乃為其缺點。生物整治法通常比化學方法便宜，且被喻為自然、環保及節能的處理技術，也是目前環境污染整治的趨勢。美國環保署及其許多州政府皆將自然生物處理當作污染場址整治之最優先選擇。加強式生物整治法是一種於現地藉由添加微生物生長所需之基質如碳源及營養鹽或添加額外菌株，進而加速自然生物處理的方法，可區分為生物刺激(Biostimulation)及生物強化(Bioaugmentation)兩種模式。地下水中的含氯有機溶劑因毒性強，一般微生物無法像分解石油烴烴類一樣容易。一旦地下水遭受含氯溶劑的污染，就很難單靠地下水中的現有微生物自然分解，往往須藉由微生物共代謝方式將其分解去除(Lee et al. 2008)。生物整治方法較為人詬病的是因其有不可回復性，外加細菌可能造成的生態問題。但是許多國內外文獻均指出，在一般有機物自然衰減的污染場址就有具降解能力之菌群存在其土壤環境中。於有機氯化物污染場址常見的細菌包括鞘氨醇單胞菌屬 (*Sphingomonas* spp.)、產鹼菌屬 (*Alcaligenes* spp.)、紅球菌屬 (*Rhodococcus* spp.)、假單胞菌屬 (*Pseudomonas* spp.)、脫鹵菌屬 (*Dehalococcoides* spp.)、甲烷營養細菌 (Methanotrophic bacteria) 及乙烯營養菌 (Etheneotrophic bacteria)，大多為厭氧細菌，其中 *Dehalococcoides* 菌屬被認為是降解氯乙烯類化合物的關鍵細菌，在厭氧環境下可以有效的降解四氯乙烯或三氯乙烯等較高毒性氯乙烯化合物，但對於氯乙烯的還原分解則以甲烷營養細菌以及乙烯營養菌共代謝作用 (Cometabolism) 最為有效。以長遠角度而言，建立台灣本土有機氯化物污染降解之微生物資料庫有其前瞻性與重要性，可作為有機氯化物污染場址整治時本土菌種之添加依據。相關

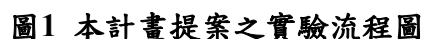


研究更可了解菌株特性與其有機氯化物毒性降解能力，進而作為污染場址選擇自然降解或加強式降解之參考依據。另外，透過現地調查與菌種分析，亦可估算選擇自然降解所需之時間。本研究在前一年度已累積台灣有機物污染場址數個不同深度土壤及地下水中微生物菌群及與含氯有機物代謝具關連性菌群之背景資訊，透過菌株代謝路徑預測分析與分離培養，可做為篩選添加菌種/群或土壤改質之參考。目前化學整治方法仍有其限制，例如：化學轉化效率與地下水流等化學動力問題等，但目前許多期刊指出在自然降解情況下，只要改變地下水中微生物生長之環境條件，即可透過本身微生物將水中氯乙烯等污染降解。故生物整治法應用於有機氯化物污染場址有其重要性，但為了消除微生物物種污染之疑慮，對於台灣本土污染場址的背景調查與本土(現地)功能菌群篩選就顯得相當重要。另外，本研究強調利用本土菌株進行整治及現地整治技術開發，將著重於瞭解現地狀況，透過基質改良來改善現地微生物組成，以強化整治速率並兼顧生態永續議題。

(三)執行進度及已獲之研究成果

本計畫會結合電化學及營養物選殖生物刺激複合技術，進行含氯有機物生物降解技術之效能評析。本年度計畫中選定了四氯乙烯及三氯乙烯公告污染場址之污染樣本進行生物整治作為目標，並邀請「科林環境科技股份有限公司」董事長-呂榮俊博士擔任本計畫協同主持人。本團隊在現有生物整治技術評估完成後，將可直接作為下年度模場整治之示範地點。本研究於第一年及第二年計畫執行期間已針對三處現地污染場址進行一系列含氯有機物之化學分析，並檢測受四氯乙烯及三氯乙烯土壤及地下水體的微生物群落，透過高通量檢驗分析瞭解其菌相分布。後續已透過生物資訊學與化學分析數據進行相關氯代謝功能基因預測、菌種預測及四氯乙烯等相關化學數據關聯性分析，並配合傳統PCR檢測定性，了解氯相關代謝菌種及主要含氯有機物之代謝基因。第二年計畫已使用qPCR及mRNA PCR技術探討代謝基因與脫鹵菌之數量與活性，且針對泥火山樣本進行菌群分析與功能基因數量探討，可作為後續基質改良與本土菌群篩選、泥火山添加試驗等之依據。本研究團隊目前已於台灣兩處污染場址發現含氯有機物代謝相關細菌及代謝基因，並且於國際期刊 *Journal of Hazardous Materials* 發表文章(Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-

如圖 1 所示。





四、研究方法及步驟

本研究依據具體目標分為五個分項執行步驟。

(一) 三氯乙烯(TCE)污染場址和泥火山樣點的樣本採集

選定「科林環境科技股份有限公司」目前負責整治之 TCE 污染場址為本研究主要評估場址。樣本來源乃配合科林環境科技股份有限公司新開採井時同步收集。每個採樣點將採集1 kg 土壤收集在滅菌採樣袋中，在低溫保存下運送到實驗室，進行 TCE 關聯性化學成分分析。泥火山樣點之選擇，本研究團隊已針對高雄甲仙(JS)、高雄烏山頂8號(WST-H)、台東雷公火(LGH)、花蓮羅山1號(LS1a)、烏山頂7號/新養女湖(WSD7)及嘉義中崙溫泉(CLHS)共計6處泥火山噴發點樣本進行次世代分析，結果顯示赤山斷層區域泥火山土壤(新養女湖)適合作為 TCE 降解菌群之培養添加物。本年度主要以科林環境科技股份有限公司污染土壤作為 TCE 降解菌群基底，以新養女湖泥火山樣本作為生物刺激添加劑進行添加試驗，並以微盤培養及第三代定序分析泥火山樣本，作為後續添加試驗之依據。

(二)結合微盤培養及菌群代謝預測之 TCE 代謝菌群培養組學技術

本項次之研究目的是要評估 TCE 污染場址土壤中微生物菌群在泥火山土壤添加及改變 TCE 濃度與營養基質之選擇性增殖條件參數改變下，對 TCE 分解菌群的組成及代謝效率之影響。(1)將預計作為改質添加劑的泥火山樣本置於 Biolog 96-Microplates 微盤系統(21124 Cabot Blvd., Hayward, CA 94545. United States of America)之反應孔，分別在好氧及厭氧條件下於 30°C 定溫培養箱培養至少一周，分析不同基質增殖條件對微生物菌群分解 TCE 效能之影響。(2)最終將由微盤分析結果對照樣本第三代定序菌群分析結果，了解 TCE 降解率高之菌群其降解過程的代謝途徑及其生態位。

(三)微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells, MFC)模組的建立並評估各模組 TCE 分解之生物刺激效力

1. 實驗設計原理與操作條件架構

本項次之研究目的是設計微生物燃料電池(MFC)，評估在三種組合模組下之 TCE 降解效力及電子供體與受體改變對降解 TCE 微生物菌群的影響。整體實驗設計及操作條



件架構如圖2所示。

本研究選擇玻璃材質的單室/雙室 MFC 並選擇鈦基板及碳棒作為電極，設計出三種相別之 TCE 降解 MFC 模組。單室 MFC 將用於 TCE 污染土壤的生物復育，而雙室 MFC 將用於地下水 TCE 污染和土壤/液相混合相之生物復育。雙室 MFC 模組將以質子交換膜分隔兩室，並與外部電路連接。在 MFC 模組實驗中，陽極用作電子供體，其中基質的厭氧發酵會導致在電活性細菌存在下釋放自由電子和氫氣。另一方面，陰極利用陽極氧化步驟中產生的自由電子和氫離子將可促進 TCE 的降解。在目前本研究的 MFC 實驗設置中，我們添加了醋酸鹽作為營養物質，以刺激原生細菌的生長。此外，添加泥火山樣品作為嗜甲烷菌的來源並增加陽極氫氣的產生，從而提高 TCE 在陰極的降解速度。

於 TCE 降解 MFC 模組60天的操作期間，將定期監測和評估 TCE 降解性能以及陰極與陽極周遭微生物菌群與菌相之變化。TCE 溶液添加濃度為5,000 ppm 進行分解效率測試，污染場址含 TCE 之土壤樣本混合均勻後亦依操作條件需求添加於 MFC 模組。在泥火山灰添加實驗中，也將泥火山均質後進行添加，並透過後續統計分析，瞭解整體 TCE 降解成果來自於那些微生物組成之變因，以利後續技術開發。

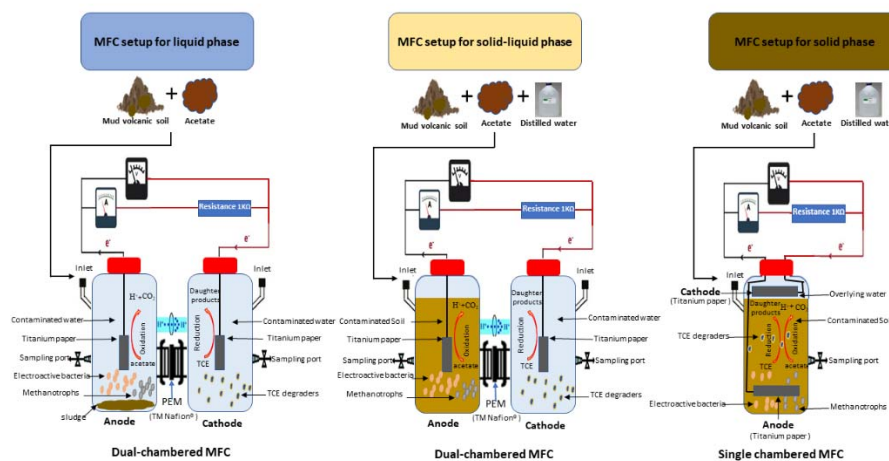


圖2 液相、固相和組合相三種微生物燃料電池模組的 TCE 降解效力及降解 TCE 微生物菌群分析之實驗設計及操作條件

2. MFC 實驗模組之組裝與實驗操作



我們由台灣實際 TCE 污染場址共收集 13 個地下水樣和 13 個土壤樣本(如圖 3 所示)。另外由養女湖泥火山區域收集之泥火山樣本如圖 4 所示。後續進行之 MFC 填充及效能測試。MFC 系統監測之參數包括:溫度、電導率(EC)、氧化還原電位(ORP)、pH 值、TOC、VOC 和溶解氧(DO)。



圖 3 TCE 污染場址收集的土壤和水樣

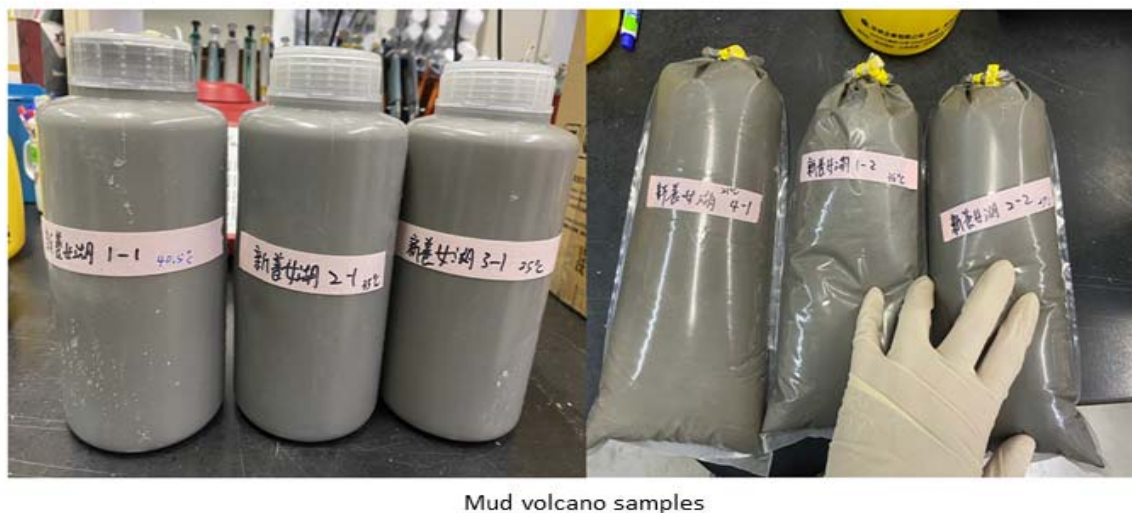


圖 4 養女湖泥火山區域收集之泥火山樣本

本研究使用的 MFC 模組之單槽體積為 100 mL。除了對照組(空白組)沒有添加任何泥火山土壤【如圖 5(A)】，用於雙相系統【液-液相(Liquid-Liquid phase)和固-液相(Solid-Liquid phase)】的 MFC 處理組(實驗組)實際配置如圖 5(B)及圖 5(C)所示。雙相 MFC 模組由鈦基陰極室和陽極室組成。使用的鈦基板被切成圓形(直徑 3 公分)，並在使用前用丙酮清洗。在固-液雙相的 MFC 模組中，陽極室添加了 60 克來自 TCE 污染場址的土壤，陰極添加固定濃度之 TCE 之溶液(5,000 ppm)。在液-液相 MFC 模組中，陽極電解液的主



要成分是磷酸鹽緩衝鹽水(PBS, 5 mM, pH = 7)、乙酸鹽(2.5 g/L)、泥火山樣本(10 g)、維生素以及微量元素。陰極電解液主要由固定濃度之 TCE 溶液(5,000 ppm)、維生素和微量元素溶液組成。通過加入 1 mole/L HCl 或 1 mole/L NaOH 溶液，使陰極電解液 pH 保持在 7.2 ± 0.2 。實驗進行前，先將陰極電解液和陽極電解液滅菌。MFC 室通過質子交換膜(PEM) (Nafion 112, 杜邦公司, 美國)和用橡膠密封件和不鏽鋼螺栓密封的開放式框架連接，以確保氣密性。微生物燃料電池操作時間為連續 60 天並進行參數量測與收集。

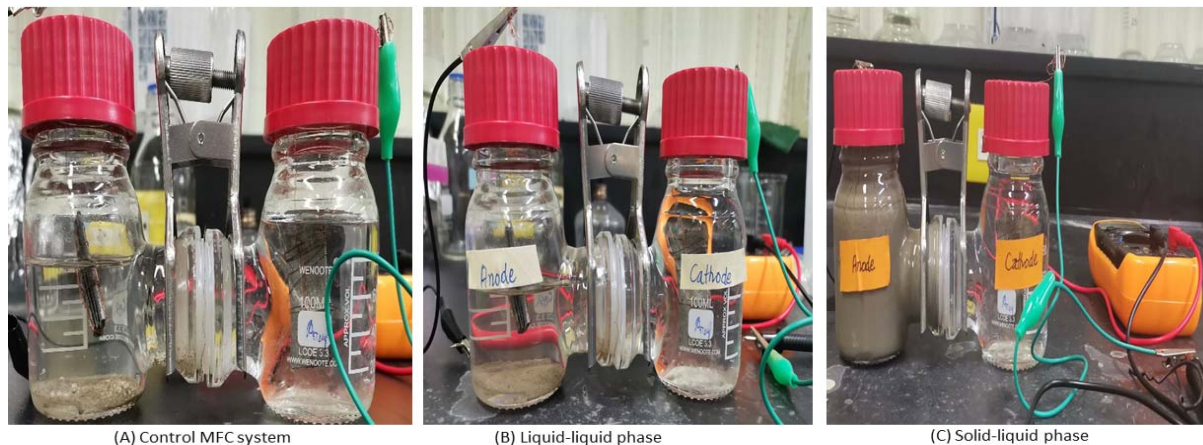


圖 5 用於雙相雙室的 MFC 實驗模組

固相 MFC 實驗模組是由以下主要項目組成(圖 6): 鈦電極、含有 80% 土壤和含 20% 水分的 TCE 樣本(80g, TCE 濃度調整至 5,000 ppm)、泥火山樣本(10g)、乙酸鹽(2.5g)和維生素以及微量元素溶液。此外，在陽極和陰極之間放置了質子交換膜。陽極被埋在 MFC 內的上層污泥中，然後添加醋酸鹽作為電子產生物的來源。陰極被放置在污泥水相的最上層。

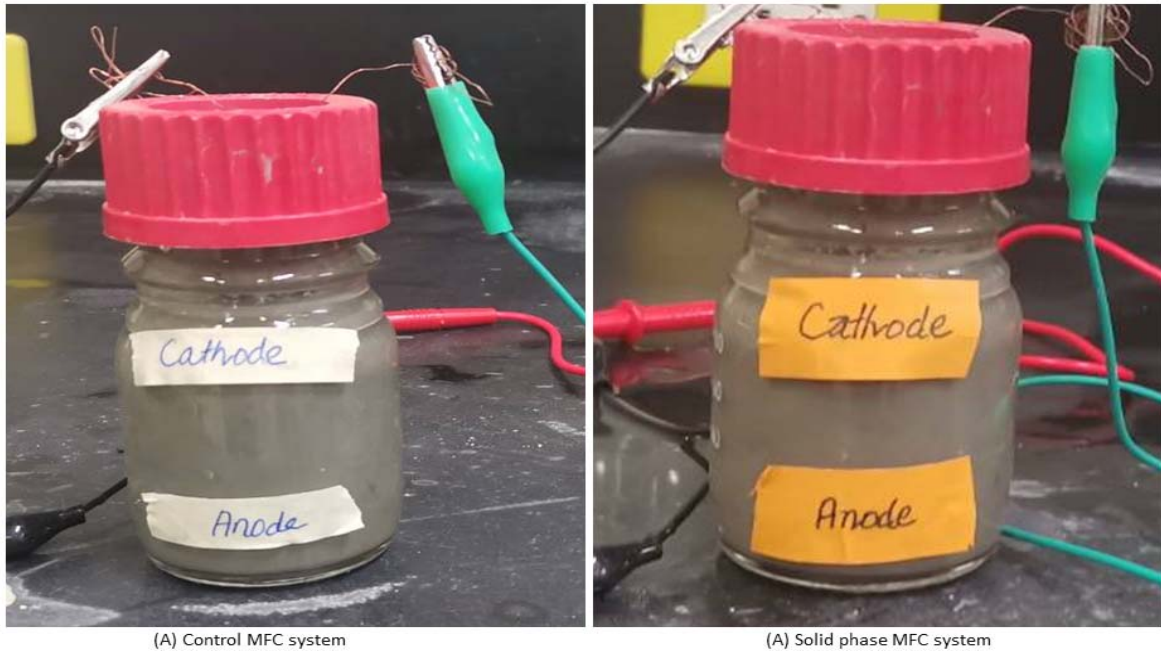


圖 6 TCE 污染土壤的 MFC 系統設置圖片 (A) 對照模組 (B) 試驗模組

3. MFC 實驗研究操作條件

MFC 系統以批次模式運作 60 天。操作中的樣品將按固定時間間隔(即 0、15、30、45、60 天)從 MFC 系統中採樣，分析項目包括：

- (1) TCE 濃度的變化。
- (2) MFC 陰極細菌群落分析。
- (3) 估算嗜甲烷菌、甲烷氧化菌和電活性細菌的細菌種群比例。
- (4) 記錄 MFC 系統中電壓隨時間之變化(圖 7)。

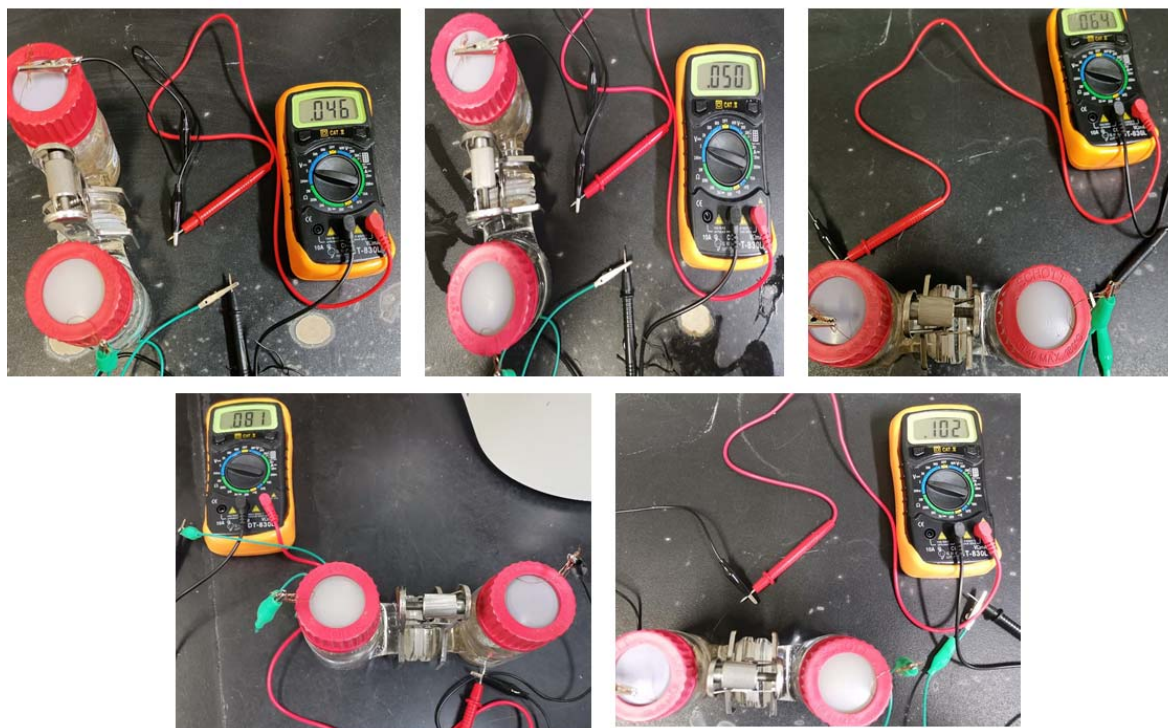


圖 7 MFC 實驗模組設置期間之電壓量測

(四)使用氣相層析質譜儀(Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS)進行化學特徵分析

地下水管制標準之含氯有機物測項進行水質分析，分析方法將遵照環檢所之公告方法進行。本場址主要污染物種為1,2二氯乙烷、氯苯、二氯甲烷、氯乙烯、三氯乙烯、四氯乙烯 VOCs 以 NIEA W785.55B 水中揮發性有機化合物檢測方法—吹氣捕捉／氣相層析質譜儀法進行檢測。土壤樣本則採用 M155.01C/M711.03C 公告方法進行氯化物相關檢測，上述均由協同主持人於正修科技大學超微量中心進行。本方法乃將含揮發性有機物之水樣以自動進樣設備注入吹氣捕捉裝置的吹氣管中，於室溫下通以氮氣進行吹氣，被吹氣出來的成份通過一連接管線進入捕捉管中，當吹氣完成後，將捕捉管加熱並以氦氣逆吹洗，使其上的待測樣品成份被脫附出來後，立即導入氣相層析儀管柱中，利用昇溫程式將每一待測化合物分離，並以界面連結之質譜儀來偵測化合物，以每個化合物相對滯留時間及電子撞擊質譜來確認樣品中的待測物，再以待測物與內標準品的主要離子相對強度及所建立的檢量線來定量待測物。氣相層析儀：Agilent Technologies 7890A Network GC system，層析管柱：Agilent 122-1364，DB-624：60 m ×0.25 mm 內徑，1.4



μm 膜厚，內覆 6 % Cyanopropyl-phenyl，94 % Dimethyl polysiloxane 屬於中極性管柱適用溫度範圍 $-20 \sim 260^{\circ}\text{C}$ 或同級品。質譜儀：Agilent Technologies 5973 Network MSD / 5975VL MSD，設定掃描範圍 $40 \sim 350\text{ amu}$ ，掃描速率 4.58 Scans/sec ，當注入 25 ng GC/MS 儀器校準標準品 4-溴氟苯 (BFB) 時，必需能產生符合要求之 BFB 質譜。採樣後前處理完畢之樣本乃由協同主持人於正修科技大學進行有機氣分析。

(五)細菌群落生理分析、序列分析及 MFCs 代謝功能分析

使用 Biolog EcoPlate™ (Hayward, CA, USA) 探索主要碳源利用的微生物群落生理分析。每個微盤培養基包含常用的 31 種碳源可供土壤樣本物種群落分析。從各個 MFC 收集的土壤樣本會分析 TCE 相關微生物群落的碳源利用模式。使用 Biolog EcoPlate™ (Hayward, CA, USA) 探索主要碳源利用的微生物群落生理分析。每個微盤培養基包含常用的 31 種碳源可供土壤樣本物種群落分析。以 150 rpm 搖動 1 至 2 小時後，以 1:4 的比例用去離子水中稀釋每個樣品。將 10^{-3} 稀釋倍率的處理液取 $150\text{ }\mu\text{l}$ 樣品接種到每一個 Biolog EcoPlate 孔洞中， 30°C 避光培養。最後，在培養 0、24、32、48、72 和 96 小時測量 EcoPlate 的光密度讀數。所有相關的步驟已經在之前的研究中標準化 (Koner et al., 2022; Koner et al., 2021)。

本研究細菌群落序列分析將採 PacBio 定序技術分析微生物群落的 16S rRNA 全序列。利用 gDNA 提取試劑 NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) 進行 MFC 裝置的土壤和水樣萃取細菌基因體 DNA，再透過 Nanodrop 1000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 確認萃取 DNA 的質量和濃度。對於細菌 g-DNA 資料庫的建立，會使用的 PacBio 系統取得全長 16S-rRNA 序列用於探索細菌群落組成和豐富度。27F-1492R 引子對會用於 PacBio 資料庫構建和定序 (27F: AGGRGTTYGATYMTGGCTCAG 和 1492R: RGYTACCTTGTTACGACTT)。在放大 PacBio 16S 全長原始擴增子序列後，會使用 QIIME 2 pipeline 分析每個 MFC 相關的細菌分類和豐度。此外，部分樣本會使用 qPCR 偵測特定功能基因來量化潛在降解物種。此外，本計畫將利用 PICRUSt2 pipeline (<http://picrust.github.io/picrust/>) 預測與 TCE 及其各自副產品與 MFC 的代謝功能關聯性。再者，本研究會使用 Kyoto Encyclopedia of



Genes and Genomes (KEGG) 的參考數據庫用於解析細菌的功能預測 (<https://www.genome.jp/kegg/>)。最後，透過使用 Pearson 或 Spearman 統計的相關性去分析預測代謝功能與潛在的降解物相關聯性。



五、結果與討論

(一) 研究發表證明

本研究團隊研究成果於 2023 年 1 月 1 日發表於 Environmental Research (IF:8.431)，【圖 8(A)】，題目為 Systematic assessment of mineral distribution and diversity of microbial communities and its interactions in the Taiwan subduction zone of mud volcanoes，主要內容包含在赤山斷層帶裡面的烏山頂泥火山、甲仙泥火山、養女湖泥火山；在古亭坑背斜結構裡面的小滾水泥火山、大滾水泥火山、月世界泥火山；觸口斷層帶裡面的中崙泥火山、中崙溫泉；花東縱谷斷層帶裡面的雷公火泥火山、羅山泥火山。結果在赤山斷層的泥火山中細菌微生物多樣性及豐度最高，而變形菌門是在所有樣本中佔比都是最高的一個細菌門。中崙溫泉區域則以與硫/硫代硫酸鹽代謝相關的菌屬最多。整體而言，對於汙染整治來說最有有關的菌屬甲烷氧化菌以花東縱谷及赤山斷層比例最高，其中常見的菌屬有 *Methylobacter*、*Methylobacterium*、*Methylomonas* 以及 *Methylosoma*。泥火山環境中富含的甲烷氧化菌(有好氧菌亦有厭氧菌)所含之酵素 Methane Monooxygenase (MMO) 能將甲烷氧化成甲醇，再氧化為甲醛，最終形成二氧化碳，而這個酵素 MMO 亦具有開解三氯乙烯雙鍵之功能。因此，是否能由富含甲烷氧化菌組成的泥火山基質作為受 TCE 汙染的土壤和地下水之生物刺激物，乃為本研究之主要假設。故本研究團隊考量區域便利性及菌種的特性，選定赤山斷層的養女湖區域作為後續汙染整治添加試驗的主要場址。本團隊已於 112 年 1 月進行採樣，針對泥火山樣本進行初步菌種評估後，進行混參試驗。

而關於本團隊 TCE 汙染場址相關研究成果已撰寫為下列主題之論文「Underpinning the ecological response of mixed chlorinated volatile organic compounds (CVOCs) associated with contaminated and bioremediated groundwaters: A potential nexus of microbial community structure and function for strategizing efficient bioremediation」，並已於 2023 年 9 月發表於 Environmental Pollution (IF:8.9) 【圖 8(B)】。本研究目的是要藉由深入了解微生物群落的結構、動態和功能。其方法是透過高通量 16S rRNA 測序法，了解含氯化揮發性有機化合物(CVOCs)汙染場址的微生物種類與分布的動態變化。由實驗結果中觀察到了汙染場址部分菌群【如變形菌門(Proteobacteria)和酸杆菌門(Acidobacteriota)】的衰減，可視為受



污染物影響之脆弱菌群。而對於 CVOCs 耐受性強的菌群【例如彎曲菌門 (Campilobacterota)】則在污染場址樣本中明顯豐富度提高。在關聯性分析顯示，在較高程度的 CVOCs 污染樣本中，硫代螺旋菌屬 (*Sulfurospirillum*)、*Azospira*、三氯硝基菌屬 (*Trichlorobacter*)、酸性菌屬 (*Acidiphilium*) 和磁性螺旋菌屬 (*Magnetospirillum*)，表現出較高之生存韌性，而 pH 值、氧化還原電位和溫度則對其豐度和分布則產生負面影響。脫氯單胞菌屬 (*Dechloromonas*)、硫黃桿菌屬 (*Thiobacillus*)、假埃西細菌屬 (*Pseudarcicella*)、氫氧化菌屬 (*Hydrogenophaga*) 和硫細菌屬 (*Sulfuritalea*) 與 CVOCs 污染濃度呈現負相關，突顯了它們對 CVOCs 污染的敏感性。

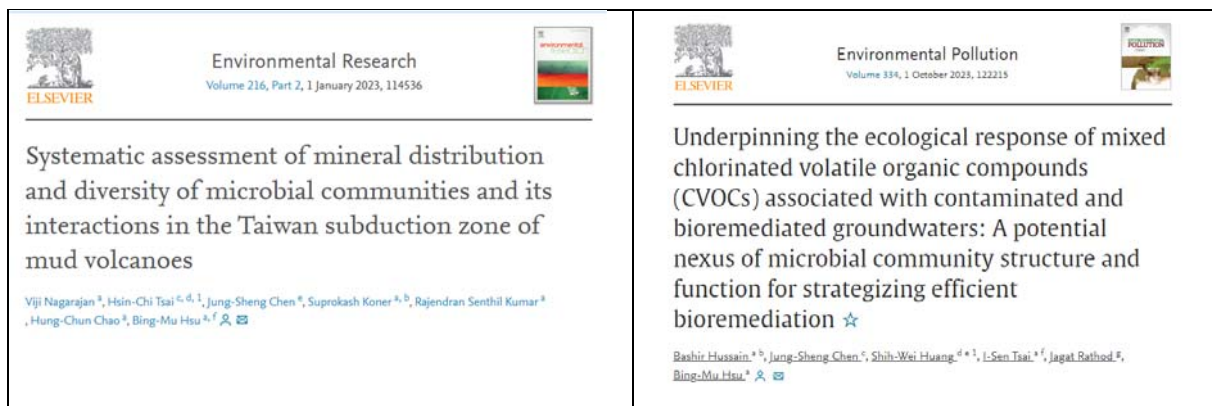


圖 8 研究成果發表證明(A) Environmental Research (B) Environmental pollution

(二) 本期泥火山場址採樣點說明及分析結果

根據先前研究成果，本研究團隊於 112 年 1 月 5 日前往高雄市燕巢區新養女湖進行泥火山樣本採集。總共採集 4 處泥火山(圖 9 之 1, 2, 3, 4 採樣點，樣本編號 MV1、MV2、MV3、MV4)，其中有 2 處持續噴發中(MV1 及 MV2)，故採集該處接近噴發口及其周遭樣本(各 2 個樣本，即 MV1-1、MV1-2、MV2-1、MV2-2)，未活動中的泥火山則僅採集 1 個樣本(即 MV3-1 及 MV4-1)。其中採樣點 1 是在採樣當時最為活躍的樣本點，採集之樣本編號為 MV1-1 與 MV1-2 (圖 10)。其噴發口中心溫度約 42°C，周遭樣本約 35°C，與先前研究時養女湖狀態相似。



圖 9 新養女湖採樣點全景圖



圖 10 新養女湖第一採樣點

1. Biolog EcoPlate™ 和 MicroResp™ 碳源利用分析結果

本研究使用 Biolog EcoPlate™及 MicroResp™碳源利用分析法，分析泥火山樣本土壤微生物群落的代謝活性。圖 11(A)顯示在 Biolog EcoPlate™菌群培養 24-168 小時期間，MV4-1 樣本之整體代謝強度最高，依序是 MV2-2、MV1-1、MV2-1、MV3-1、MV1-2。培養 168 小時期間的 31 種碳源之基質利用率顯於圖 11(B)中，揭示了泥火山樣本的微生物群落對不同碳源利用存在差異。Tween 80 為利用率最高的碳源，其他碳源，如 D-乳糖、D-纖維素和糖原，在大多數泥火山樣本中也表現出相對較高的利用率。另一方面，如丙酮酸甲酯和 β -甲基-D-葡萄糖苷，在所有樣本中都較少被微生物利用，此結果與好氧菌偏少有關。圖 11(C)為針對六大類基質群的消耗趨勢分析，結果顯示 MV4-1 土壤中的微生物具有較大的碳水化合物代謝能力，MV4-1 土壤中的微生物能對氨基酸、羧酸、聚合物、胺類和酚類進行分解代謝，其次是 MV2-2。其他火山土壤樣本相對於前兩者，其樣本中微生物菌群對此六類基質代謝能力較低。由於微生物群落利用基質的機制及效率因泥漿火山樣本取樣位置或其背景環境而有差異。樣本 MV2-1 及 MV4-1 所處環境可歸納為泥火山噴發後一段時間之趨緩狀態，其甲烷氧化菌相對較高，則可考量該類碳源作為整治添加物，進行後續應用。此外，圖 11(D)顯示的結果展示了 MicroResp™ 的分析結果。該法乃以葡萄糖作為碳源，評估泥火山土壤樣本的微生物二氧化碳產生速率。相較於其他土壤樣本，MV2-2 的土壤樣本在 MicroResp™ 的分析中具有最高水平的微生



物二氧化碳產生速率，MV3-1 的微生物群落對葡萄糖的反應則表現出最低的二氧化碳產生速率。

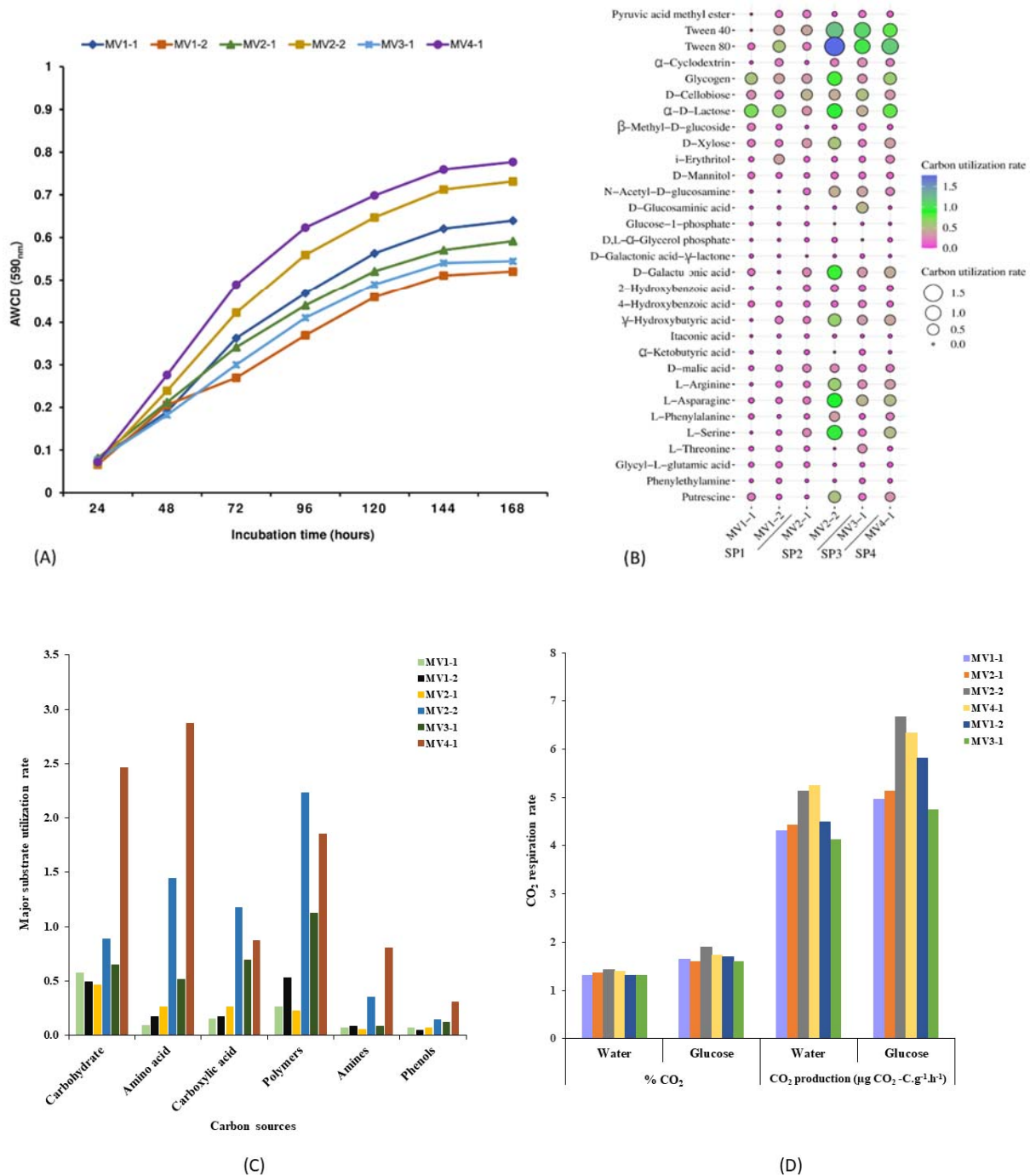


圖 11 新養女湖泥火山樣本之碳源利用代謝分析(A)Biolog EcoPlate™整體碳源利用分析、(B) Biolog EcoPlate™之 31 種基質利用分析、(C) Biolog EcoPlate™之六類主要基質利用分析、(D) MicroResp™之葡萄糖代謝率分析

2. 泥火山樣本菌群在門階層特性描述



本研究使用 16s 細菌全長基因進行序列分析(第三代定序系統)，深入瞭解了來自 4 個不同取樣點的 6 個泥火山樣本中與門層面相關的細菌多樣性。在新養女湖泥火山樣本中，共有 20 個主要細菌門(phyla)，其中 30% 的門分類是在所有類型樣本中都有的【圖 12(A)】。此外，15% 的門，在三個特定的泥火山樣本點 SP1(MV1)、SP2(MV2)和 SP3(MV3)之間是共有的。而 SP2(MV2)和 SP3(MV3)之間的門，其菌門重疊率為 10%，而 SP3(MV3)和 SP4(MV4)之間的共有門的比例相似。所有泥火山取樣點中，單一採樣點獨特門的數量相對較低，此結果表明在門的分類層面下，微生物群落變化較小，換句話說就是泥火山樣本在門這個階層上並無太大的差異性。其原因可能是泥火山的菌群存在共同的生態因素或選擇壓力，影響了門層面上的微生物組成。圖 12(B)為熱圖分析結果，揭示了泥火山樣本中不同門層的相對豐度，其中 MV2-1 樣本中門分類層的豐度最高，再其次是 MV3-1。圖 12(C)顯示各樣本之門層類別之微生物以變形菌門(Proteobacteria)在所有樣本中佔主導地位，而 Bdellovibrionota 在 MV3-1 樣本中排名第二。此外，Campilobacterota 在 MV1-1 和 MV2-1 中為第二位佔比，而 Desulfobacterota 在 MV2-1、MV3-1 和 MV4-1 樣本中顯示第二或第三位佔比。

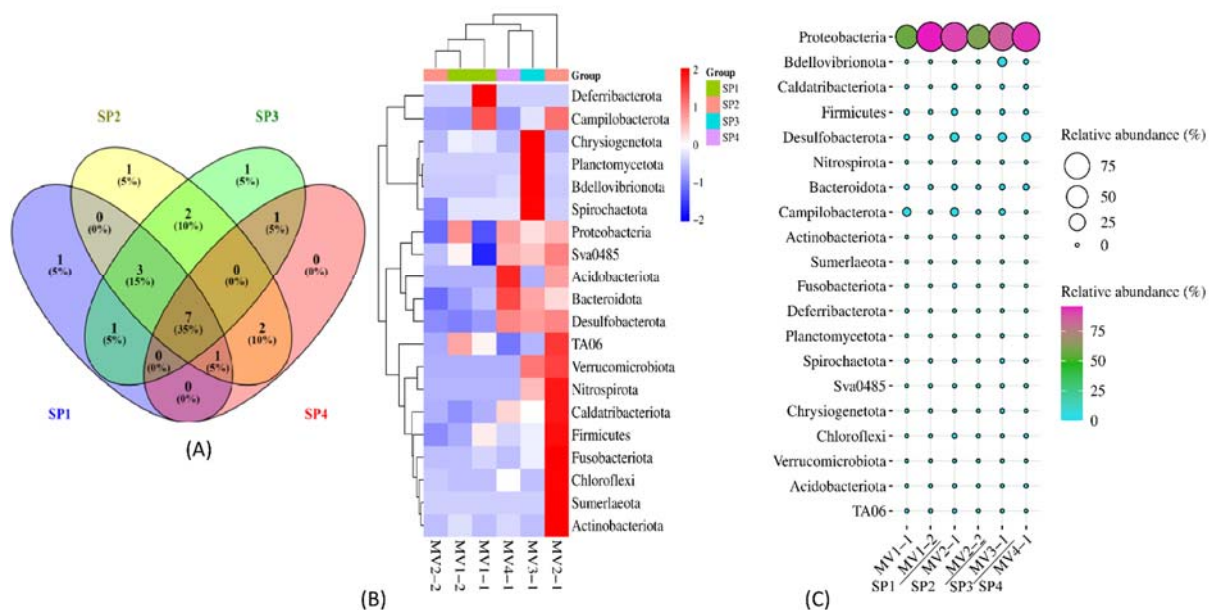


圖 12 新養女湖泥火山樣本菌群之門別分析(A) Venn diagram 分析、(B) Heatmap 分析、(C) 菌群關聯度分析



3. 泥火山樣本菌群在屬階層特性描述

本研究使用 16s 細菌全長基因進行序列分析(第三代定序系統)，深入瞭解了來自新養女湖泥火山 4 個不同取樣點之 6 個樣本的泥火山樣本中與屬(Genus)層面相關的細菌多樣性。在自新養女湖泥火山的採樣點中，圖 13(A)顯示共有 101 個主要細菌屬，其中 21.8% 的屬別是在所有樣本中共有的。SP2(MV2)擁有最多的獨特屬 (22.8%)，其次是 SP4(MV4) (9.9%)。SP3(MV3)和 SP1(MV1)的獨特屬數量較低，分別為 6.9% 和 5.9%。圖 13(B)之熱圖分析進一步揭示泥火山樣本相關的細菌屬別的組成和豐度變化。結果顯示，MV2-1 相較於其他泥火山樣本，顯出較高的豐富度，其次是 MV4-1。其中，有 20 個細菌屬別可歸類為氯代烷降解菌，而兩個屬別可歸類為甲烷氧化菌(如圖 13(C)所示)。這表示泥火山環境具有時擁有烴類降解細菌和甲烷氧化細菌的潛力。其中，假單胞菌(*Pseudomonas spp.*)是最常見的氯代烷降解菌，其次是水素鞭毛菌(*Hydrogenophaga*)和脫硫微菌(*Desulfomicrobium*)。這三個屬別在大多數樣本中都有出現。而甲基微生物(*Methylobacterium*)和甲基飽和菌(*Methylophaga*)這樣的甲烷氧化細菌則僅在 MV2-2、MV3-1 和 MV4-1 樣本中發現。

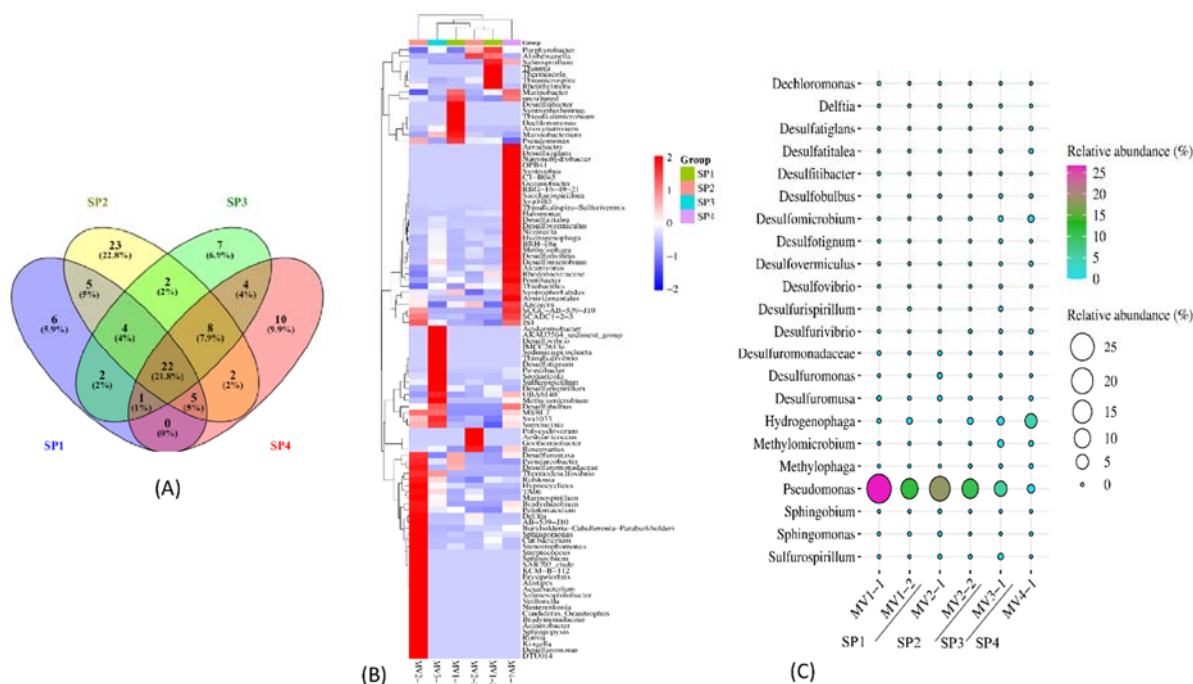


圖 13 新養女湖泥火山樣本菌群之屬別分析(A) Venn diagram 分析、(B) Heatmap 分析、(C) 菌群關聯度分析



4. 泥火山樣本菌群代謝功能預測分析

圖 14(A)為 FAPROTAX 代謝功能預測分析結果，可發現泥火山細菌群落展示了多樣的代謝功能。其中，樣本 MV1-1 和 MV2-1 之菌群顯示最相關的微生物代謝機制是化學異營(Chemoheterotrophy 以及 Aerobic Chemoheterotrophy)，但是與 MV1-2、MV2-2、MV3-1 和 MV4-1 相關的最常見微生物代謝機制則是硫化物暗氧化反應(Dark sulfide Oxidation 以及 Dark Oxidation of Sulfur Compound)。此外，與其他樣本相比，MV3-1 和 MV4-1 中的烴類降解代謝功能較高。且同樣地，MV3-1 和 MV4-1 樣本顯示相關甲烷氧化相關代謝功能，如甲烷利用、甲醇氧化和甲基氧化，也更為豐富。綜合 Biolog EcoPlate™ 及 MicroResp™分析結果，葡萄糖類降解較少的泥火山樣本，其甲烷氧化相關代謝功能的菌群相對較高；而 Ecoplate 分析結果可作為樣本的碳源添加依據(例如 MV3-1 和 MV4-1)。

圖 14(B)乃利用基於 KEGG 數據庫的 PICRUSt2，進行與甲烷氧化和硫代謝相關的潛在酶的特定基因分析。結果顯示，cysI 基因廣泛存在於大多數泥火山樣本中，其中 MV1-1、MV1-2、MV2-1 和 MV3-1 中較高。同樣，cysD 和 cysNC 是在 MV2-1 樣本中豐度較高的基因，而 sat、met3、soxA 和 SoxX 基因則顯示與 MV4-1、MV2-1、MV2-2 和 MV3-1 的存在豐度較高。aprA 和 aprB 基因於所有樣本均存在明顯豐度。進一步分析發現，參與甲烷氧化的特定基因，如 pmoA、pmoB 和 pmoC，僅在 MV2-2、MV3-1 和 MV4-1 樣本中被發現。利用泥火山生態系統中甲烷氧化菌所含之酵素 Methane Monooxygenase (MMO) 同時具有開解三氯乙烯雙鍵之功能的生物修復潛力，讓泥火山土壤做為在不同環境中有效清除三氯乙烯污染物時之生物刺激添加劑，可視為一創新策略。

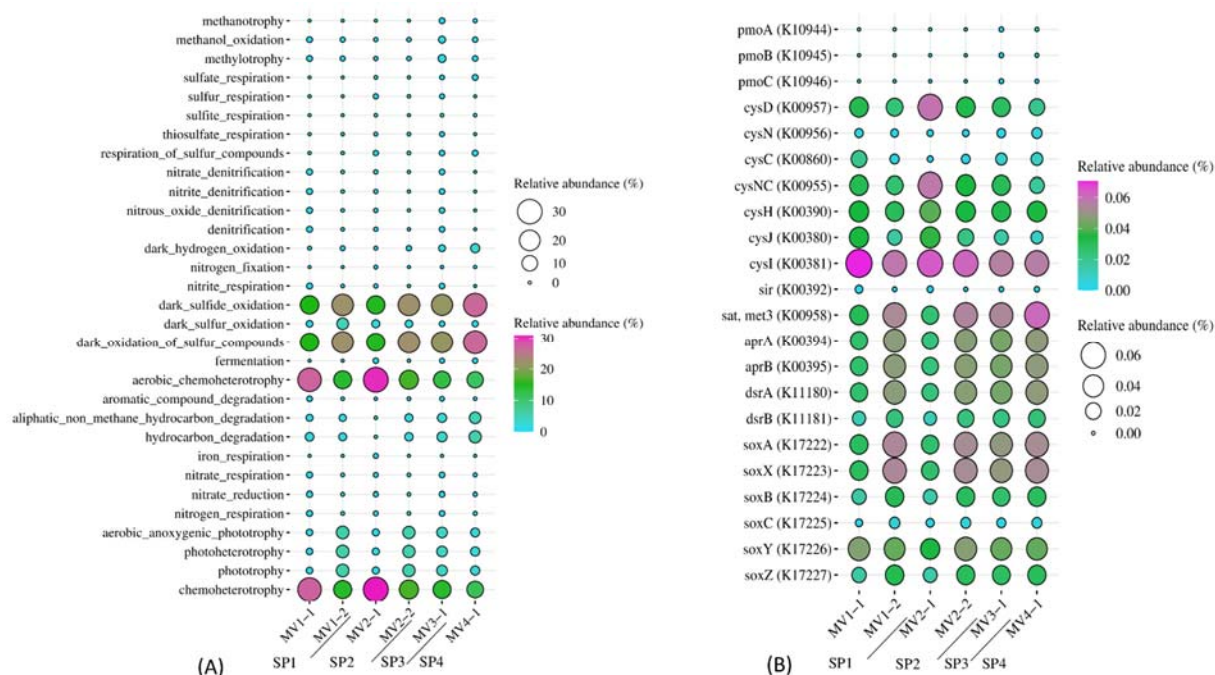


圖 14 新養女湖泥火山樣本菌群功能代謝預測分析(A) FAPROTAX 代謝預測分析、(B)

PICRUSt2 代謝預測分析

5. 泥火山環境因子與潛在的氯化物降解菌、甲烷氧化菌及其功能之間的相關性分析

本研究以斯皮爾曼(Spearman)相關性分析探討潛在的氯化物降解菌、甲烷氧化菌、硫還原細菌以及它們的潛在功能和特定基因之間的關係。它是衡量兩個變數的相關性的無母數指標，利用單調函數評價兩個統計變數的相關性，結果如圖 15(A)所示，*Methylophaga* 和 *Methylobacterium* 這類甲烷氧化菌豐度與甲基氧化及相關的特定基因（如 pmoA、pmoB 和 pmoC）之間呈顯著正相關，表明它們在泥火山生態系統中利用甲烷作為碳源和能源進行甲烷氧化。此外，多種硫還原細菌，包括 *Desulfatitaea*、*Desulbubolus*、*Desulfomicrobium*、*Desulfovermiculus* 和 *Desulfurivibrio*，與硫酸鹽進行呼吸作用和硫化物呼吸作用呈顯著正相關。*Sulfurospirillum* 則與硫呼吸作用和硫代硫酸鹽呼吸作用之間亦呈顯著正相關。*Desulbubolus* 與亞硫酸鹽呼吸作用之間亦呈顯著正相關。另外，許多硫還原細菌，如 *Desulfatitaea*、*Desulfobolus*、*Desulfovermiculus* 和 *Desulfurivibrio* 還與甲烷氧化和相應的基因 pmoA、pmoB 和 pmoC 呈顯著正相關。此一結果暗示了泥火山生態系統可能具硫化物還原和甲烷氧化共代謝的機制。

本研究亦進行典型對應分析 (Canonical Correlation Analysis, CCA)，該方法是利用

[illegible]

菌群與特殊基因熱點圖、(B)典型對應分析 (CCA)



(三) TCE 污染場址之含氯有機汙染物分析結果

本計畫取得「科林環境科技股份有限公司」目前負責整治之 TCE 污染場址 6 處監測井鑽探之土壤分層樣本(S01-S06)。工作人員於現場先以光電離檢測器(PID)測量揮發性有機化合物(VOC)濃度，以獲得各樣本 VOC 初步探測結果(如表 1 所示)。該汙染整治場址之地下水監測井之化學參數及 TCE 關聯物質之分析結果如表 2 所示。本研究團隊亦針對 6 處監測井鑽探之土壤分層樣本於 VOC 濃度初探中選取各點 PID 濃度最高或次高者進行 TCE 關聯性化合物檢測，分析結果如表 3 所示。

本研究目的是預計選取三氯乙烯及四氯乙烯濃度較高的土壤樣本及水樣各三處，進行菌群 16s RNA 基因第三代定序分析，以了解其 TCE 相關降解菌群的種類及比例。此外，這三個受汙染之土壤及地下水樣本，亦將用應於後續 MFC 實驗模組，了解 TCE 污染場址樣本藉由泥火山樣本添加及改變其氧化還原電位，對 TCE 分解菌群及 TCE 分解效力的影響。我們亦針對土壤樣本 TCE 濃度較高之三個採樣點位，進行其不同深度樣本之 TCE 關聯性化學成分與 TCE 降解菌群之分析，以了解再 TCE 因重力因素向下移動的過程，對土壤不同深度剖面的菌群馴化影響。

表 1 TCE 污染場址 6 處監測井鑽探之土壤分層樣本光電離檢測器(PID)測量結果

點位	深度(m)	橈管土壤長(cm)	回收率(%)	PID(ppmV)	菌群分析之採樣段
S01	0.07-1.07	36	36%	11	
	1.07-2.07	30	30%	9.3	✓
	2.07-3.07	32	32%	7.2	
	3.07-3.57	26	26%	4.7	
S02	0.08-1.08	36	36%	7.1	
	1.08-2.08	28	28%	5.8	
	2.08-3.08	20	20%	4.8	
	3.08-4.08	70	70%	4.1	
	4.08-5.08	82	82%	7.9	✓
S03	0.06-1.06	42	42%	5.7	
	1.06-2.06	34	34%	6.1	



	2.06-3.06	22	22%	14	
	3.06-3.36	20	20%	13	✓
S04	0.09-1.09	46	46%	6.1	
	1.09-2.09	16	16%	5.8	
	2.09-3.09	32	32%	30	✓
	3.09-4.09	46	46%	51	
S05	0.09-1.09	22	22%	4.6	
	1.09-2.09	16	16%	100	✓
	2.09-3.09	23	23%	105	
	3.09-4.09	48	48%	44	
	4.09-5.09	38	38%	39	
S06	0.06-1.06	46	46%	17	
	1.06-2.06	23	23%	1863	✓
	2.06-3.06	36	36%	3911	
	3.06-4.06	60	60%	298	
	4.06-5.06	70	70%	16	

表 2 TCE 污染場址 9 處監測井地下水之水質參數及 TCE 關聯性化合物檢測結果

	單位	GM03	GM14	RW30	RW32	GM23	N00430	GM24	GM18	GM02
採樣日期	y/m/d	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22	111/7/22
採樣深度	m	11	9	11	11	11	7	11	11	11
水位	m	3.720	4.130	4.340	4.010	3.680	3.990	3.515	4.025	4.220
pH		7.28	7.01	6.67	7.05	7.16	6.94	7.39	7.08	7.25
EC	μmho/cm	1075	1133	1119	1007	1054	863	829	1296	873
DO	mg/L	0.92	1.44	0.68	0.52	0.81	0.72	1.7	0.84	1.15
ORP	mV	-103	-105	-13	-151	-112	-90	79	-109	-130
三氯乙烯	mg/L	0.0307	0.0228	0.0315	<0.0100	0.0257	0.00243	ND	0.00381	0.0798
順-1,2-二氯乙烯	mg/L	0.648	0.0470	0.0421	0.0292	0.0554	0.0219	0.00308	0.015	0.683
1,1-二氯乙烯	mg/L	0.0721	<0.0100	0.00343	<0.0100	<0.0100	0.00268	ND	<0.001	0.0240



1,1-二氯乙烷	mg/L	0.0506	<0.0100	0.00390	<0.0100	<0.0100	0.00179	ND	0.0102	0.0571
氯乙烯	mg/L	0.0465	0.130	0.0234	0.0174	0.109	0.0219	<0.001	0.0323	0.0542
TOC	mg/L	13.9	1.9	1.6	38.5	2.9	1.1	1.3	1.9	5.2

表 3 污染場址 6 處採樣點土壤含氯及苯類化合物檢測結果 (單位: mg/L)

樣點 編號	苯	甲苯	反-1,2-二 氯乙烯	順-1,2-二 氯乙烯	氯仿	1,2-二氯 乙烷	四氯 化碳	1,2-二氯 丙烷	三氯 乙烯	四氯 乙烯	乙苯	1,3-二 氯苯	1,2-二 氯苯	氯乙 烯	二甲 苯
S01	ND	<0.005	ND	0.21	ND	ND	ND	ND	0.16	0.24	ND	ND	ND	0.02	ND
S02	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S03	ND	ND	ND	0.14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND
S04	ND	ND	ND	0.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND
S05	ND	ND	ND	0.09	ND	ND	ND	ND	0.27	0.14	ND	ND	ND	ND	ND
S06	ND	0.01	ND	0.44	ND	ND	ND	ND	0.17	105	0.01	ND	ND	ND	ND

(四) 微生物燃料電池(MFC)模組建立並評估各模組 TCE 分解效力

1. 連續操作之各類 MFC 系統其產電與 TCE 分解效力評估

在添加相應的基質後，所有 MFC 將進入為期 2 天的生長適應期(遲滯期)，使微生物能夠適應新環境。在第 3 天，三氯乙烯 (TCE) 標準液才會被添加到陽極，並視該日為培養日的第 1 天。圖 16 為 MFC 實驗模組在不同培養天數下電壓變化結果。隨著培養時間的推移，可觀察到所有實驗組的電壓具類似的變化趨勢，約略在第 40 天附近達到最高，隨後電壓快速衰減。在實驗處理組(T)中，固-固相處理組(SS-T)的所產生的電壓最高，其次是固-液相處理組(SL-T)，然後是液-液相處理組(LL-T)。需要注意的是，與未添加泥火山的相應對照組(C)與其對應的處理組(T)相比，電壓產生較低。此一結果顯示，在陽極添加泥火山對微生物的增殖及豐富度以及電子傳遞皆具有顯著影響。

此外，根據三氯乙烯 (TCE) 降解分析顯示，在初始時期(0-15 天)，與其他培養時



期相比，陰極上的 TCE 降解速率較高（圖 17）。此外，觀察到在所有實驗設置中，添加泥火山灰的實驗組(T)的 TCE 降解速率均高於相應的對照組(C)。此結果表明，以泥火山灰作為 TCE 降解之刺激物(Stimulation)，對於增強 MFC 電池陰極中的 TCE 降解具有顯著正向影響。於本實驗中，固-液相(SL)MFC 呈現出最佳之 TCE 降解效率，其次是固-固相(SS)，而液-液相(LL)則呈現最低的降解速率。

從實驗結果顯示，在微生物燃料電池（MFC）的實驗組中，陽極和陰極之間的氧化還原電位（ORP）存在顯著差異。隨著培養時間的增加，ORP 呈現更還原狀態，尤其是與對照組相比，實驗組表現更為明顯。這結果表明，隨著培養時間的延長，還原反應增加。此外，本研究觀察到陽極端 pH 值比陰極低，這一觀察結果意味著在陽極處有機酸之產生。反之，在陰極處，氫氧離子化合物（OH⁻）的生成導致 pH 值較高。總結而言，陽極和陰極之間觀察到的 pH 差異，表明在不同陽極與陰極之電極上發生著不同的微生物反應過程，陽極表現為發酵反應，陰極表現為氫氧化物的生成。

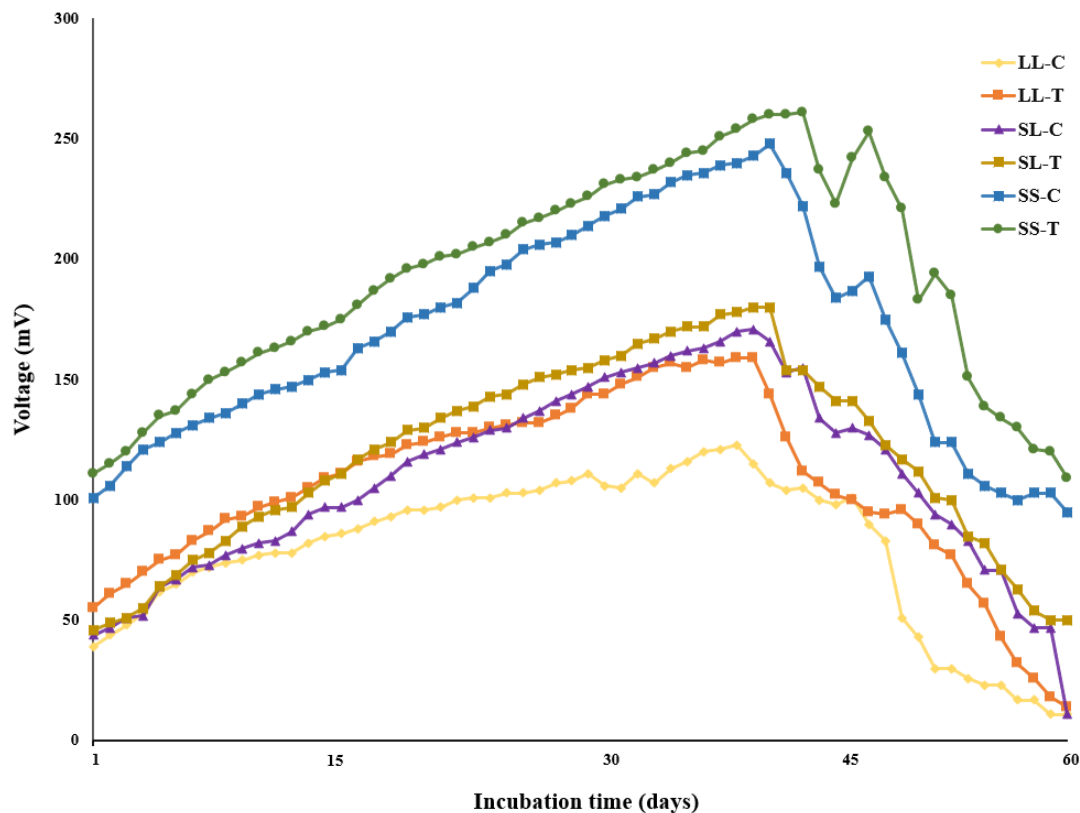


圖 16 MFC 實驗模組培養天數下電壓變化結果(LL-C: 液-液相對照組、LL-T: 液-液相實驗組、SL-C: 固-液相對照組、SL-T: 固-液相實驗組、SS-C: 固-固相對照組、SS-



T: 固-固項實驗組)

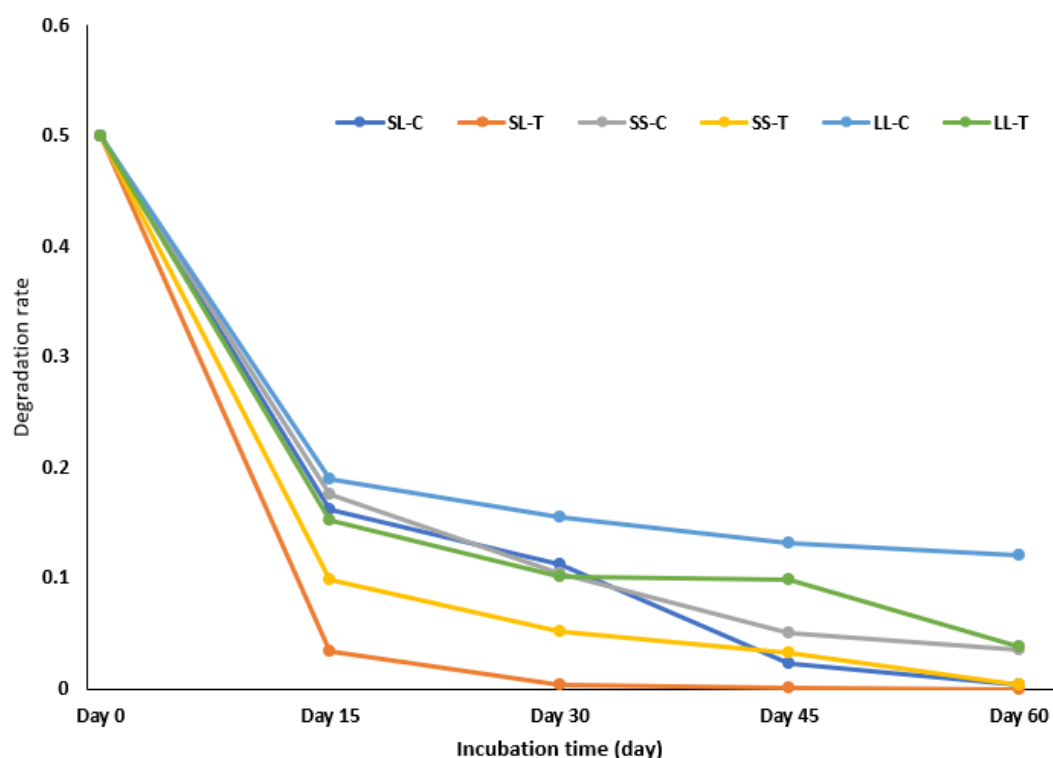


圖 17 MFC 實驗模組培養天數下 TCE 降解速率變化(LL-C: 液-液相對照組、LL-T: 液-液相實驗組、SL-C:固-液相對照組、SL-T:固-液相實驗組、SS-C:固-固相對照組、SS-T: 固-固項實驗組)

2. MFC 固-固相對照組與固-固項實驗組之陰極菌群分析

本研究採用 16S rRNA PacBio 測序(第三代定序法)分析未添加泥火山灰之固-固相 MFC 陰極樣本(SC)與添加泥火山灰之固-固相 MFC 陰極樣本(ST)之細菌種類隨時間之變化。圖 18 顯示固-固相 MFC 陰極樣本的實驗結果，共揭示了 413 種細菌。這些細菌在未添加泥火山灰之固-固相 MFC 陰極樣本(SC)模組之操作過程，在第 0 天顯示含 102 種細菌。細菌種類隨著操作時間而增加至第 30 天。然而，在隨後的操作時間(45 天與 60 天)，細菌種數顯著減少。此一菌群數量變化結果，可能與菌種漸集中於脫氯相關菌群，因此整體細菌種類也隨著培養時間而減少。與固-固相實驗組(添加泥火山樣本)的樣本相比(ST)，該類樣本顯示出較高的初始菌種量(菌種高峰值出現於第 15 天)，而且在進入 TCE 高降解時間時(第 30 天)，與未添加泥火山樣本之對照組相比，固-固相實驗組仍維持高菌種數量，此一結果突顯了添加泥火山改良劑在增強 TCE 降解方面的潛力。

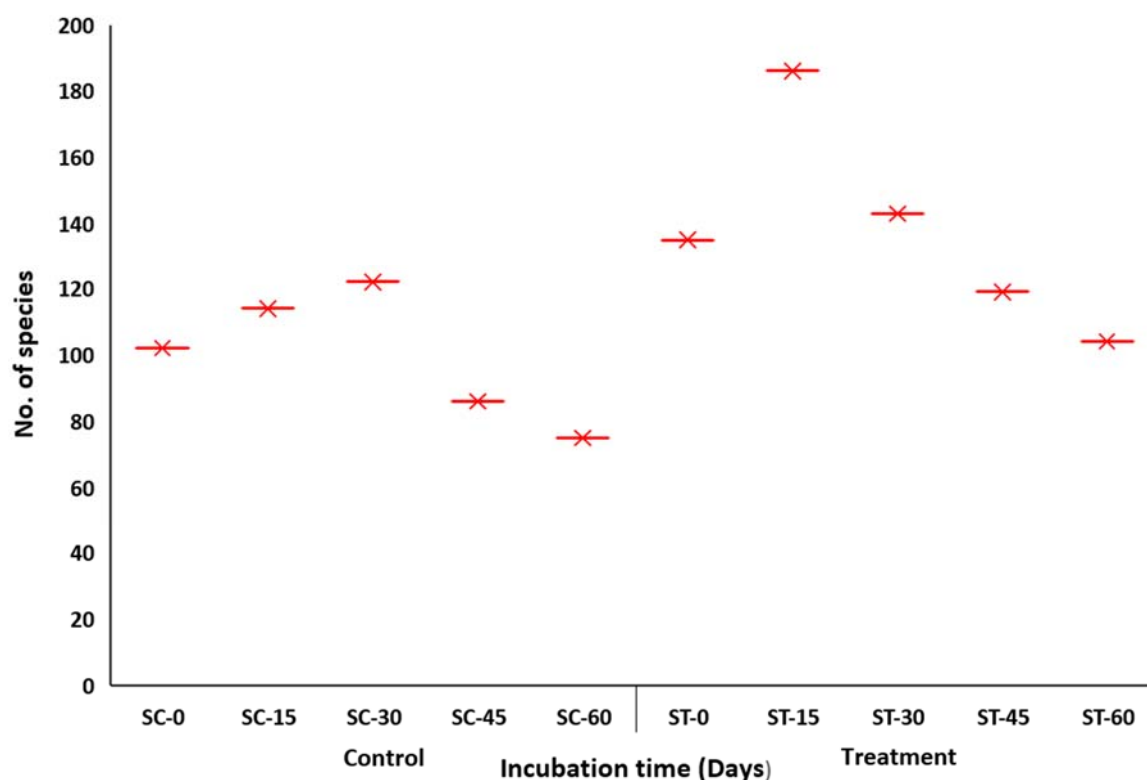


圖 18 固-固相 MFC 陰極之操作時間與菌種數量分佈(SC:未添加泥火山灰之固-固相 MFC 陰極樣本;ST:添加泥火山灰之固-固相 MFC 陰極樣本)

3. 固液相 MFC 陰極菌群分析

未添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本(SLC)與添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本(SLT)其細菌種類隨時間之變化如圖 19 所示(30 天至 60 天)。在不同操作時間與物種數量分佈狀況可發現，在未添加泥火山灰的樣本中(SLC)，細菌種類隨著時間的推移(30 天至 60 天)而減少，但添加泥火山灰的樣本中(SLT)，其菌種數量高峰出現於 45 天。與對照組相比，在各自的培養時間內，與處理組相關的細菌種類數量始終較高。圖 20 顯示添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本(SLC)與添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本(SLT)在各自的培養時間內，其細菌種類的交集與聯集分析。

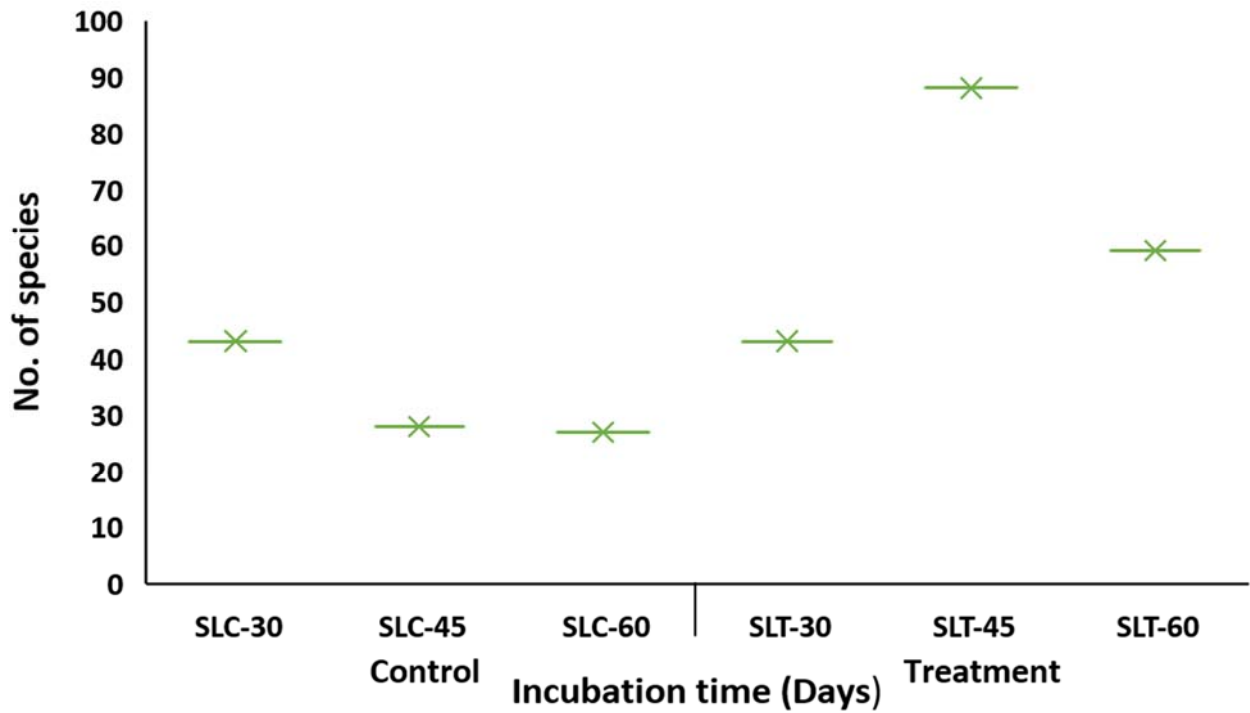


圖 19 固-液相 MFC 陰極之操作時間與菌種數量分佈(SLC:未添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本;SLT 添加泥火山灰之固-液相 MFC 陰極樣本)

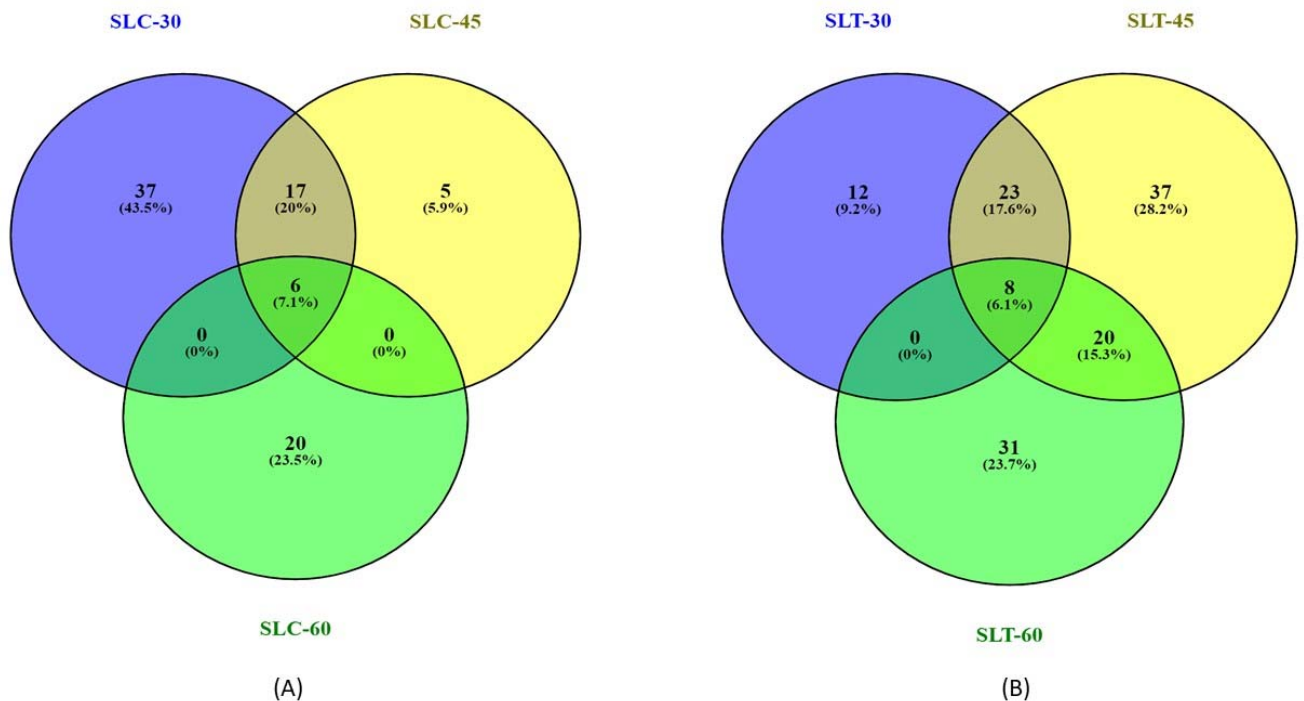


圖 20 固液相 MFC 陰極之對照組(未添加泥火山灰)和處理組(添加泥火山灰)在不同培養時間其菌種之交集與聯集分析



4. 固相和固液相的 MFC 陰極相關的物種水平細菌群落組成和豐度

我們採用熱圖分析，探索前 50 種高豐度細菌物種在不同培養時間與添加/未添加泥火山灰之固-固項及固-液項 MFC 陰極的分佈模式(圖 21)。與固-液相(SL)之 MFC 相比，固-固相 MFC 陰極之細菌物種主要受原始 MFC 中菌種影響，培養時間不致對細菌種類造成太大波動。而在固-液相 MFC 陰極之菌種變化，培養時間乃為其重要因子，因此可由圖 22 中發現，不同固-液相 MFC 樣本相同培養時間具群集效應，這也意謂不同培養時間會出現不同的高豐度細菌種群。

固相和固液相的 MFC 陰極的十大細菌物種豐度如圖 22 所示，*Cupriavidus necator*, *Uncultured bacterium*, *Pseudomonas linyingensis* 以及 *Parphyrobacter sanguineus* 存在於各類樣本。隨著培養時間增加，*Cupriavidus necator* 的豐度持續下降。相反，隨著培養時間增加，*Pseudomonas stutzeri* 豐度增加。另外，*Acidovorax delofieldii* 亦顯現在培養初期最為豐富，而 *Pseudomonas Mexicana* 則在培養晚期較為豐富。

自然界中多種細菌屬(包括脫硫菌(*Desulfuromonas*)、脫硫桿菌(*Desulfitobacterium*)和脫鹵桿菌(*Dehalobacter*)，都具有將土壤及地下水中的 TCE 還原為順式 DCE 的能力，但目前卻只有兩個主要細菌屬—*Dehalogenimonas* 以及 *Dehelococcoides* 能有效再將 TCE 經降解後之中間產物再轉化為乙烯，這應該與氫氣的較低可利用性有關。氫氣被認為是 TCE 降解過程重要的電子供體，並且需要一個氫原子和兩個電子才能從含氯化合物中移除一個氯原子(Rodrigues et al., 2020)。然而，有相當部分的有機碳可透過細菌的厭氧基質降解過程將乙酸鹽轉化為甲烷(Heimann et al., 2006)。這些微生物會消耗氫氣，導致 TCE 降解率降低。在這些微生物中，產甲烷菌(Methanogens)是關鍵的參與者，已被證明是 TCE 降解細菌電子供體的核心競爭對手。它的存在會提升甲烷產量，而不是增加脫氯細菌的生長或啟動脫氯過程(Lin et al., 2021; Wen et al., 2020)。前人研究中也證實了在產甲烷菌存在的情況下，一些脫氯微生物群落的脫氯能力將降低(Kong et al., 2014; Teng et al., 2019)。因此，對於 TCE 污染區的成功降解過程，減少氫氣的消耗或增加脫氯細菌數量乃至關重要。嗜甲烷菌在自然界中分佈廣泛，其在厭氧條件下能將甲烷轉化為氫氣



和二氧化碳。也因此包括 TCE 在內的含氯化合物的生物降解過程，無論是在有氧還是厭氧條件下，通過增加嗜甲烷菌或抑制產甲烷菌的活性應有機會提升 TCE 降解效率(Lin et al., 2021)。

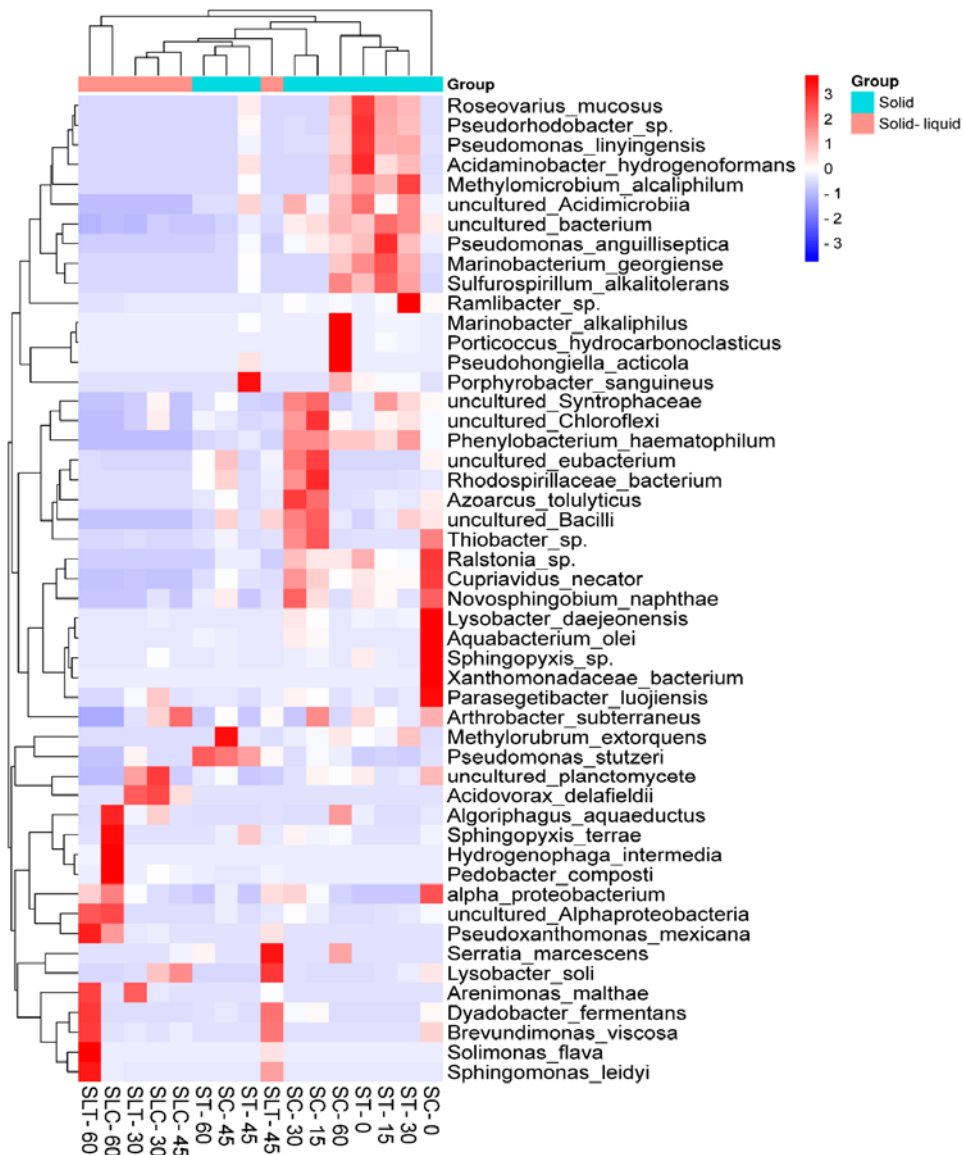


圖 21 固-固相和固-液相 MFC 陰極於不同培養時間間隔下豐度前 50 種細菌類別熱圖分

析

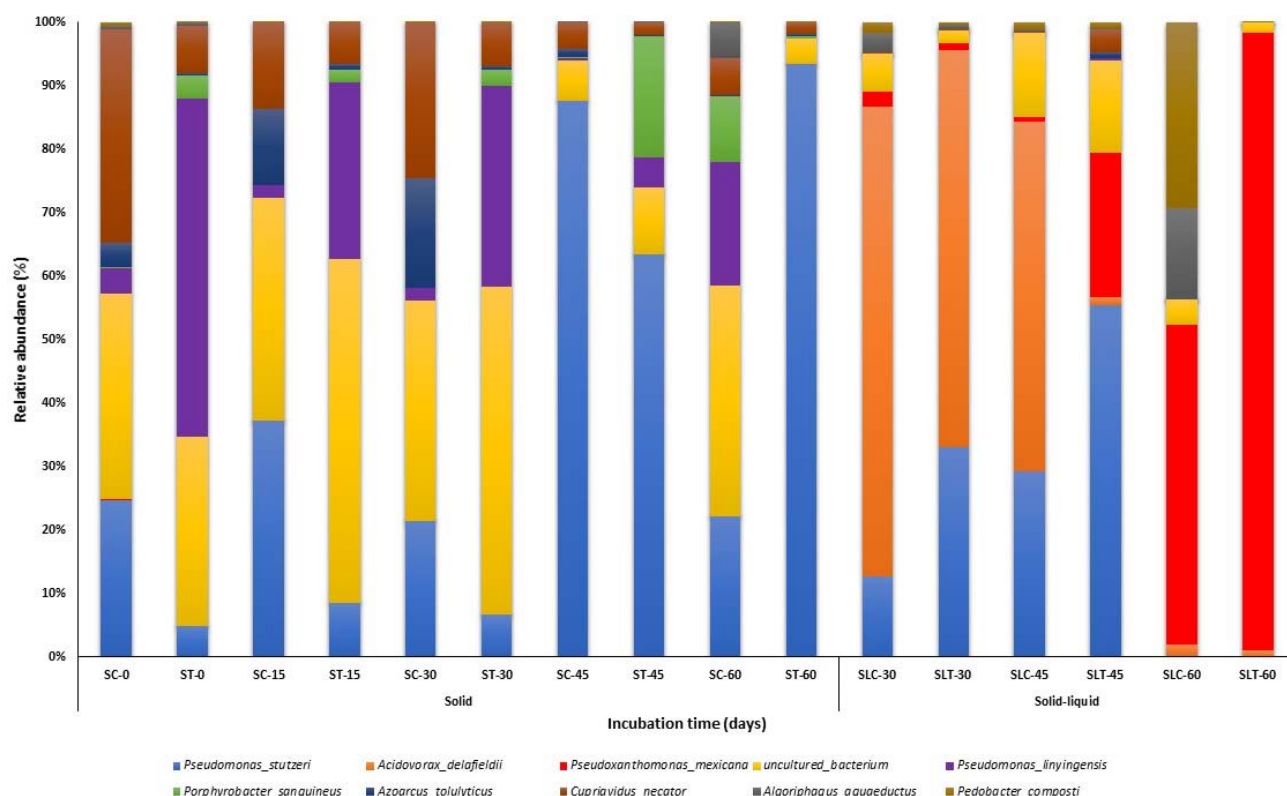


圖 22 固相和固液相 MFC 陰極的十大細菌物種的相對豐度

5. 固相和固液相的 MFC 陰極細菌物種的功能分析

本計畫應用 FAPROTAX 分析探索與 MFC 陰極相關的細菌物種的功能，結果如圖 23 所示。其中，各樣本最豐富的代謝途徑是化學異營，並且越在培養後期，固相 MFC 的化學異營菌豐度增加非常明顯。另外，我們發現添加泥火山樣本組的甲烷氧化和甲基營養代謝路徑確實比對照組增加，這兩種代謝途徑對 TCE 降解具有正面影響。

泥火山和陽極室中的現地微生物在氧化過程中會產生質子和電子，並以醋酸鹽作為這些微生物的碳源，可以增加質子和電子的產生。陽極的乙酸鹽也用作電子供體，電子從陽極中的溶液中集中在電極上，然後電子通過外部電路傳導並通過陰極電極進入陰極室。來自陽極溶液的質子穿過質子交換膜，與陰極的電子相遇。陰極中的原生脫氯微生物利用這些電子和質子進行降解。在厭氧條件下，許多微生物可以將 TCE 轉化為其氯化程度較低的副產物，其中一些物種（即 *Dehalococcoides mccartyi* 和 *Dehalobacter*）其在自然環境中僅限於使用氫氣作為電子供體。一旦在陰極定殖，就可以對 TCE 進行還



原脫氯。受氫氣生成和具有良好營養物質可用性的固體基質等因素的影響，微生物活性在 TCE 降解中起著重要作用，尤其添加泥火山作為生物刺激(Biostimulation)的改良劑對 MFC 陰極室中的 TCE 降解產生顯著正向影響。

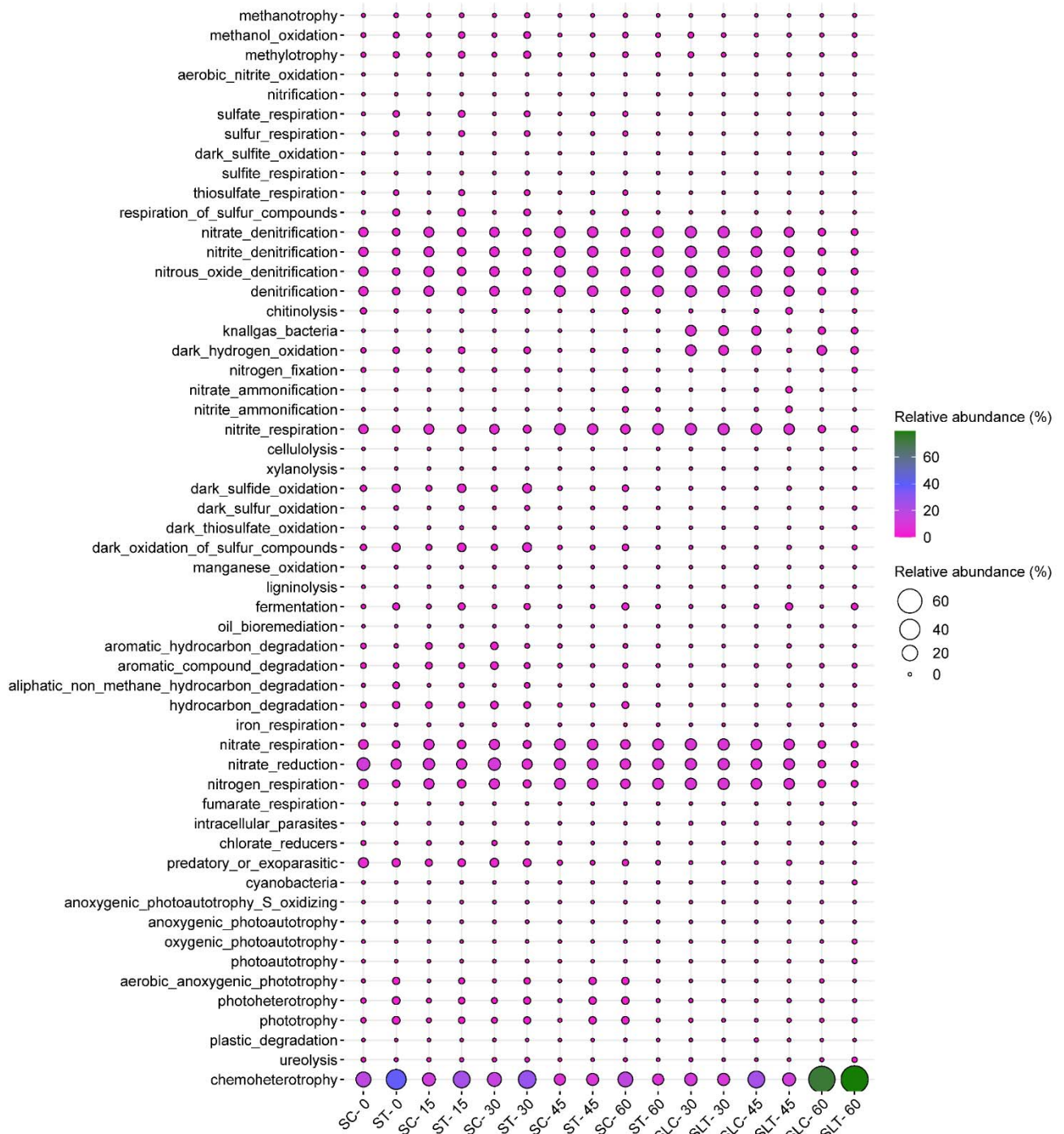


圖 23 固相和固液相 MFC 陰極細菌代謝功能的相對豐度氣泡圖



六、結論與建議

1. 泥火山樣本菌群在門的分類層面下，微生物群落變化小，其中以變形菌門 (Proteobacteria) 佔主導地位，而 Bdellovibrionota、Campilobacterota 以及 Desulfobacterota 則為第二至或第三佔比。泥火山樣本菌群在屬分類層面下有 20 個細菌屬別可歸類為氣代烷降解菌屬，而兩個屬別可歸類為甲烷氧化菌屬。
2. 泥火山樣本菌群代謝功能預測分析 FAPROTAX 顯示，最常見之代謝機制是化學異營及硫化物暗氧化反應。利用 KEGG 數據庫進行甲烷氧化和硫代謝相關的潛在酶的特定基因預測分析，乃為硫代謝基因和甲烷氧化基因提供了另一驗證途徑。
3. 綜合 Biolog EcoPlate™及 MicroResp™分析結果，葡萄糖類降解較少的泥火山樣本，其甲烷氧化相關代謝功能的菌群相對較高；而 Ecoplate 分析結果可作為樣本的碳源添加依據。
4. 泥火山樣本之斯皮爾曼(Spearman)相關性分析結果顯示，許多硫還原細菌與甲烷氧化相應基因(pmoA、pmoB 和 pmoC)呈顯著正相關。此一結果顯示在泥火山生態系統應存在硫化物還原和甲烷氧化共代謝的機制。
5. 以泥火山樣本進行典型對應分析(CCA)結果顯示，在 pH 和 ORP 較高的條件下，甲烷氧化菌能更好地進行甲烷氧化，而溫度、TDS 和 EC 對甲烷氧化菌的分佈具有顯著影響。
6. 本研究之 MFC 模組中，陰極利用陽極產生的自由電子和氫離子將可促進 TCE 降解。實驗設置中所添加的醋酸鹽以及泥火山樣品中的甲烷氧化菌，可增加氫氣的產生，提高 TCE 降解效率。
7. 在厭氧條件下，*Dehalococcoides mccartyi* 和 *Dehalobacter* 僅限於使用氫氣作為電子供體，一旦在 MFC 陰極定殖，可以加速 TCE 降解。
8. 在 MFC 模組中，陽極和陰極之間的氧化還原電位 (ORP) 及 pH 值存在顯著差異。而陰極發生的醋酸發酵生成氫氣，對 TCE 降解亦有助益。
9. 添加泥火山作為生物刺激改良劑對 MFC 陰極室中的 TCE 降解產生了顯著正向影響。
10. 固-液相 MFC 陰極之菌種變化，培養時間乃為重要因子，不同培養時間會出現不同



豐度之細菌種群。

11. *Cupriavidus necator*, Uncultured bacterium, *Pseudomonas linyingensis* 以及 *Parphyrobacter sanguineus* 為各類固-固相和固-液相 MFC 陰極之主要菌種。

12. 以 FAPROTAX 探索 MFC 陰極細菌物種功能，發現添加泥火山樣本組的甲烷氧化和甲基營養代謝路徑確實比對照組增加，這兩種代謝途徑對 TCE 降解具有正面影響。

13. 本團隊於計畫執行期間已將研究成果發表於國際期刊 *Environmental Research* (IF:8.431)。該研究之結論為：對於 TCE 汙染整治而言，相關菌屬(甲烷氧化菌)以花東縱谷及赤山斷層比例最高，常見的菌屬有 *Methylobacter*、*Methylomicrobium*、*Methylomonas* 以及 *Methylosoma*。該環境中富含的甲烷氧化菌所含之酵素 Methane Monooxygenase (MMO) 具有開解三氯乙烯雙鍵之功能。因此，是否能由富含甲烷氧化菌組成的泥火山基質作為受 TCE 汙染的土壤和地下水之生物刺激物，乃為本研究之主要假設。#

14. 本團隊於計畫執行期間已將研究成果發表於國際期刊 *Environmental Pollution* (IF:8.9)。該研究之結論為：在較高程度的 CVOCs 汙染場址，硫代螺旋菌屬(*Sulfurospirillum*)、*Azospira*、三氯硝基菌屬(*Trichlorobacter*)、酸性菌屬(*Acidiphilium*)和磁性螺旋菌屬(*Magnetospirillum*)，表現出較高之生存韌性，而 pH 值、氧化還原電位和溫度則對其豐度和分布則產生負面影響。#



七、參考文獻

- Atai, E., Jumbo, R.B., Cowley, T., Azuazu, I., Coulon, F. and Pawlett, M. 2023. Efficacy of bioadmixtures in reducing the influence of salinity on the bioremediation of oil-contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 164720.
- Atlas, R. and Philp, J. 2005. *Bioremediation: Applied microbial solutions for realworld environmental cleanup* [en línia]. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B.V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B.S. and Tripathi, M. 2022. Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics* 10(8), 484.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. and Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13(7), 581-583.
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P.E., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P. and Karp, P.D. 2020. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Res* 48(D1), D445-d453.
- Chambon, J.C., Bjerg, P.L., Scheutz, C., Bælum, J., Jakobsen, R. and Binning, P.J. 2013. Review of reactive kinetic models describing reductive dechlorination of chlorinated ethenes in soil and groundwater. *Biotechnology and Bioengineering* 110(1), 1-23.
- Chang, Y.-H., Cheng, T.-W., Lai, W.-J., Tsai, W.-Y., Sun, C.-H., Lin, L.-H. and Wang, P.-L. 2012. Microbial methane cycling in a terrestrial mud volcano in eastern Taiwan. *Environmental Microbiology* 14(4), 895-908.
- Davies, T.K., Lovelock, C.E., Pettit, N.E. and Grierson, P.F. 2017. Short-term microbial respiration in an arid zone mangrove soil is limited by availability of gallic acid, phosphorus and ammonium. *Soil Biology and Biochemistry* 115, 73-81.
- Doherty, R.E. 2000a. A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1, 1, 1-trichloroethane in the United States: part 1—historical background; carbon tetrachloride and tetrachloroethylene. *Environmental forensics* 1(2), 69-81.
- Doherty, R.E. 2000b. A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1, 1, 1-trichloroethane in the United States: Part 2--Trichloroethylene and 1, 1, 1-trichloroethane. *Environmental Forensics* 1(2), 83-93.
- Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháček, J. and Ševců, A. 2017a. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 13262-13283.
- Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháček, J. and Ševců, A. 2017b. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 24(15), 13262-13283.
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower,



- C. and Langille, M.G. 2020. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 672295.
- Ebrahimbabaie, P. and Pichtel, J. 2021. Biotechnology and nanotechnology for remediation of chlorinated volatile organic compounds: Current perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 7710-7741.
- Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E. and Molnár, M. 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment* 595, 903-911.
- Fraraccio, S., Strejcek, M., Dolinova, I., Macek, T. and Uhlik, O. 2017. Secondary compound hypothesis revisited: Selected plant secondary metabolites promote bacterial degradation of cis-1,2-dichloroethylene (cDCE). *Scientific reports* 7(1), 8406-8406.
- Geller, J., Holman, H.-Y., Su, G., Conrad, M., Pruess, K. and Hunter-Cevera, J. 2000. Flow dynamics and potential for biodegradation of organic contaminants in fractured rock vadose zones. *Journal of Contaminant Hydrology* 43(1), 63-90.
- He, R., Wooller, M.J., Pohlman, J.W., Quensen, J., Tiedje, J.M. and Leigh, M.B. 2012. Shifts in identity and activity of methanotrophs in arctic lake sediments in response to temperature changes. *Appl Environ Microbiol* 78(13), 4715-4723.
- Heimann, A.C., Batstone, D.J. and Jakobsen, R. 2006. *Methanosarcina* spp. Drive Vinyl Chloride Dechlorination via Interspecies Hydrogen Transfer. *Appl Environ Microbiol* 72(4), 2942-2949.
- Hermon, L., Hellal, J., Denonfoux, J., Vuilleumier, S., Imfeld, G., Urien, C., Ferreira, S. and Joulain, C. 2019. Functional genes and bacterial communities during organohalide respiration of chloroethenes in microcosms of multi-contaminated groundwater. *Frontiers in Microbiology* 10, 89.
- Hsu, H.-C., Chen, J.-S., Nagarajan, V., Hussain, B., Huang, S.-W., Rathod, J. and Hsu, B.-M. 2021. Assessment of Temporal Effects of a Mud Volcanic Eruption on the Bacterial Community and Their Predicted Metabolic Functions in the Mud Volcanic Sites of Niasong, Southern Taiwan. *Microorganisms* 9(11), 2315.
- Huang, B., Lei, C., Wei, C. and Zeng, G. 2014a. Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment—sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environment international* 71, 118-138.
- Huang, B., Lei, C., Wei, C. and Zeng, G. 2014b. Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment — sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environment International* 71, 118-138.
- Imfeld, G., Pieper, H., Shani, N., Rossi, P., Nikolausz, M., Nijenhuis, I., Paschke, H., Weiss, H. and Richnow, H.H. 2011. Characterization of Groundwater Microbial Communities, Dechlorinating Bacteria, and In Situ Biodegradation of Chloroethenes Along a Vertical Gradient. *Water, Air, & Soil Pollution* 221(1), 107-122.



- Jiang, Z., Li, P., Wang, Y., Li, B. and Wang, Y. 2013. Effects of roxarsone on the functional diversity of soil microbial community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 76, 32-35.
- Jones, D.L., Hill, P., Smith, A., Farrell, M., Ge, T., Banning, N. and Murphy, D. 2018. Role of substrate supply on microbial carbon use efficiency and its role in interpreting soil microbial community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology and Biochemistry* 123, 1-6.
- Kaown, D., Koh, E.-H., Mayer, B., Ju, Y., Kim, J., Lee, H.-L., Lee, S.-S., Park, D.K. and Lee, K.-K. 2021. Differentiation of natural and anthropogenic contaminant sources using isotopic and microbial signatures in a heavily cultivated coastal area. *Environmental Pollution* 273, 116493.
- Koner, S., Chen, J.-S., Hsu, B.-M., Rathod, J., Huang, S.-W., Chien, H.-Y., Hussain, B. and Chan, M.W. 2022a. Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-based biostimulation strategy. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127266.
- Koner, S., Chen, J.-S., Hsu, B.-M., Rathod, J., Huang, S.-W., Chien, H.-Y., Hussain, B. and Chan, M.W.Y. 2022b. Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-based biostimulation strategy. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127266.
- Koner, S., Chen, J.-S., Hsu, B.-M., Tan, C.-W., Fan, C.-W., Chen, T.-H., Hussain, B. and Nagarajan, V. 2021. Assessment of carbon substrate catabolism pattern and functional metabolic pathway for microbiota of limestone caves. *Microorganisms* 9(8), 1789.
- Kong, J.-Y., Bai, Y., Su, Y., Yao, Y. and He, R. 2014. Effects of trichloroethylene on community structure and activity of methanotrophs in landfill cover soils. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 118-127.
- Kopf, A. and Deyhle, A. 2002. Back to the roots: boron geochemistry of mud volcanoes and its implications for mobilization depth and global B cycling. *Chemical Geology* 192(3-4), 195-210.
- Kumar, V., Shahi, S.K. and Singh, S. (2018) Microbial Bioprospecting for Sustainable Development. Singh, J., Sharma, D., Kumar, G. and Sharma, N.R. (eds), pp. 115-136, Springer Singapore, Singapore.
- Kumar, V., Thakur, I.S., Singh, A.K. and Shah, M.P. (2020) Emerging Technologies in Environmental Bioremediation. Shah, M.P., Rodriguez-Couto, S. and Şengör, S.S. (eds), pp. 197-232, Elsevier.
- Kurisu, F. and Yagi, O. 2010. Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated by Volatile Organic Compounds. *Sustainability in Food and Water: An Asian Perspective*, 411-416.
- Lhotský, O., Krákorová, E., Linhartová, L., Křesinová, Z., Steinová, J., Dvořák, L., Rodsand, T., Filipová, A., Kroupová, K., Wimmerová, L., Kukačka, J. and Cajthaml, T. 2017.



- Assessment of biodegradation potential at a site contaminated by a mixture of BTEX, chlorinated pollutants and pharmaceuticals using passive sampling methods – Case study. *Science of The Total Environment* 607-608, 1451-1465.
- Lin, W.H., Chien, C.C., Lu, C.W., Hou, D., Sheu, Y.T., Chen, S.C. and Kao, C.M. 2021. Growth inhibition of methanogens for the enhancement of TCE dechlorination. *Science of The Total Environment* 787, 147648.
- Lovley, D.R. 2011. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environmental microbiology reports* 3(1), 27-35.
- Miao, L., Wang, C., Adyel, T.M., Wu, J., Liu, Z., You, G., Meng, M., Qu, H., Huang, L. and Yu, Y. 2020. Microbial carbon metabolic functions of biofilms on plastic debris influenced by the substrate types and environmental factors. *Environment International* 143, 106007.
- Miao, Y., Johnson, N.W., Gedalanga, P.B., Adamson, D., Newell, C. and Mahendra, S. 2019. Response and recovery of microbial communities subjected to oxidative and biological treatments of 1,4-dioxane and co-contaminants. *Water Research* 149, 74-85.
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, W., Bhatt, P. and Chen, S. 2021. Recent Advanced Technologies for the Characterization of Xenobiotic-Degrading Microorganisms and Microbial Communities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9.
- Moran, M.J., Zogorski, J.S. and Squillace, P.J. 2007. Chlorinated solvents in groundwater of the United States. *Environmental science & technology* 41(1), 74-81.
- Nagarajan, V., Tsai, H.-C., Chen, J.-S., Hussain, B., Koner, S., Hseu, Z.-Y. and Hsu, B.-M. 2022. Comparison of bacterial communities and their functional profiling using 16S rRNA gene sequencing between the inherent serpentine-associated sites, hyper-accumulator, downgradient agricultural farmlands, and distal non-serpentine soils. *Journal of Hazardous Materials* 431, 128557.
- Ottosen, C.B., Bjerg, P.L., Hunkeler, D., Zimmermann, J., Tuxen, N., Harrekilde, D., Bennedsen, L., Leonard, G., Brabæk, L., Kristensen, I.L. and Broholm, M.M. 2021. Assessment of chlorinated ethenes degradation after field scale injection of activated carbon and bioamendments: Application of isotopic and microbial analyses. *Journal of Contaminant Hydrology* 240, 103794.
- Pant, P. and Pant, S. 2010. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences* 22(1), 116-126.
- Paszczyński, A.J., Paidisetti, R., Johnson, A.K., Crawford, R.L., Colwell, F.S., Green, T., Delwiche, M., Lee, H., Newby, D. and Brodie, E.L. 2011. Proteomic and targeted qPCR analyses of subsurface microbial communities for presence of methane monooxygenase. *Biodegradation* 22, 1045-1059.
- Qu, T., Du, X., Peng, Y., Guo, W., Zhao, C. and Losapio, G. 2021. Invasive species allelopathy decreases plant growth and soil microbial activity. *PloS one* 16(2), e0246685.
- Renault, P., Ben-Sassi, M. and Berard, A. 2013. Improving the MicroResp™ substrate-induced respiration method by a more complete description of CO₂ behavior in closed



- incubation wells. *Geoderma* 207, 82-91.
- Rodrigues, R., Betelu, S., Colombano, S., Tzedakis, T., Masselot, G. and Ignatiadis, I. (2020) *Environmental Soil Remediation and Rehabilitation*, pp. 283-398, Springer.
- Salomo, S., Münch, C. and Röske, I. 2009. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog™ analysis. *Water research* 43(18), 4569-4578.
- Scheutz, C., Durant, N.D., Hansen, M.H. and Bjerg, P.L. 2011. Natural and enhanced anaerobic degradation of 1, 1, 1-trichloroethane and its degradation products in the subsurface—a critical review. *Water research* 45(9), 2701-2723.
- Sheu, Y.-T., Tsang, D.C., Dong, C.-D., Chen, C.-W., Luo, S.-G. and Kao, C.-M. 2018. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater using gamma poly-glutamic acid as the primary substrate. *Journal of cleaner production* 178, 108-118.
- Steinberger, Y., Stein, A., Dorman, M., Svoray, T., Doniger, T., Rinot, O. and Gil, E. 2022. A sensitive soil biological indicator to changes in land-use in regions with Mediterranean climate. *Scientific Reports* 12(1), 22216.
- Sun, C.-H., Chang, S.-C., Kuo, C.-L., Wu, J.-C., Shao, P.-H. and Oung, J.-N. 2010. Origins of Taiwan's mud volcanoes: Evidence from geochemistry. *Journal of Asian Earth Sciences* 37(2), 105-116.
- Teng, Y., Xu, Y., Wang, X. and Christie, P. 2019. Function of Biohydrogen Metabolism and Related Microbial Communities in Environmental Bioremediation. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Tkachenko, I., Tkachenko, S.N., Lokteva, E.S., Mamleeva, N.A. and Lunin, V.V. 2020. Two-stage ozonation–adsorption purification of ground water from trichloroethylene and tetrachloroethylene with application of commercial carbon adsorbents. *Ozone: Science & Engineering* 42(4), 357-370.
- Wakelin, S., Lombi, E., Donner, E., MacDonald, L., Black, A. and O'Callaghan, M. 2013. Application of MicroResp™ for soil ecotoxicology. *Environmental pollution* 179, 177-184.
- Wang, S., Chen, S., Wang, Y., Low, A., Lu, Q. and Qiu, R. 2016. Integration of organohalide-respiring bacteria and nanoscale zero-valent iron (Bio-nZVI-RD): a perfect marriage for the remediation of organohalide pollutants? *Biotechnology advances* 34(8), 1384-1395.
- Wang, S.Y., Kuo, Y.C., Huang, Y.Z., Huang, C.W. and Kao, C.M. 2015. Bioremediation of 1,2-dichloroethane contaminated groundwater: Microcosm and microbial diversity studies. *Environmental Pollution* 203, 97-106.
- Wen, L.-L., Li, Y., Zhu, L. and Zhao, H.-P. 2020. Influence of non-dechlorinating microbes on trichloroethene reduction based on vitamin B12 synthesis in anaerobic cultures. *Environmental Pollution* 259, 113947.
- Wright, J., Kirchner, V., Bernard, W., Ulrich, N., McLimans, C., Campa, M.F., Hazen, T.,



- Macbeth, T., Marabello, D., McDermott, J., Mackelprang, R., Roth, K. and Lamendella, R. 2017. Bacterial Community Dynamics in Dichloromethane-Contaminated Groundwater Undergoing Natural Attenuation. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Wu, N., Zhang, W., Wei, W., Yang, S., Wang, H., Sun, Z., Song, Y., Li, P. and Yang, Y. 2020. Field study of chlorinated aliphatic hydrocarbon degradation in contaminated groundwater via micron zero-valent iron coupled with biostimulation. *Chemical Engineering Journal* 384, 123349.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. and Glöckner, F.O. 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research* 42(D1), D643-D648.
- Yu, T., Cheng, L., Liu, Q., Wang, S., Zhou, Y., Zhong, H., Tang, M., Nian, H. and Lian, T. 2022. Effects of waterlogging on soybean Rhizosphere bacterial community using V4, LoopSeq, and PacBio 16S rRNA sequence. *Microbiology Spectrum* 10(1), e02011-02021.
- Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J. and Sun, Y. 2019. Using enzyme activities and soil microbial diversity to understand the effects of fluoxastrobin on microorganisms in fluvo-aquic soil. *Science of The Total Environment* 666, 89-93.



八、研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
工作項目													
實驗方法建置與生物燃料電池系統開發													
菌群之生物資訊分析 (第三代定序)													
不同整治方法整合評估													
泥火山之功能性微生物菌群檢測與篩選													
現地整治技術於實驗室測試及改良													
化學分析評估													
Biolog 微盤培養及代謝探討及整治評估													
固相/液相/混合相之三氯乙烯分解生物燃料電池模組設計與測試													
微生物燃料電池對 TCE 降解效力及其電極對降解 TCE 微生物菌群之影響評估													
期中報告撰寫													※報告交件



結案報告撰寫													※報告交件
工作進度估計百分比 (累 積 數)	5%	10%	15%	20%	40%	45%	55%	65%	75%	85%	95%	100%	
預定查核點	期中		含氯有機汙染物分析、第三代定序分析、泥火山採樣、Biolog 微盤應用分析、生物燃料電池開發評估										
	期末		整合性數據探討、實場整治技術開發建議、混合式整治成效分析										
<p>說明：</p> <p>1、工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。</p> <p>2、「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1)工作天數，(2)經費之分配，(3)工作量之比重，(4)擬達成目標之具體數字。</p> <p>3、「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。</p> <p>4、以12個月作規劃，其中期中報告書提送要件需達計畫執行進度50%以上，期末報告書需於計畫結束前1.5個月提送。</p>													

註：表格不敷使用時，請自行增列。