



## 環境部環境管理署

112 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

# 氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗 輔以分子生物技術監測

成果報告(定稿)

主辦單位



環境部環境管理署

專案執行單位

國立雲林科技大學／環境與安全衛生工程系

專案主持人

楊茱芳 教授

專案執行期間

112 年 12 月 15 日起至

114 年 02 月 28 日止

中華民國 114 年 2 月 印製



# 環境部環境管理署「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   ☒成果報告   審查意見回覆對照表

計畫年度	112 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：楊茱芳   NO: C1	
計畫名稱	氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗輔以分子生物技術監測		
審查意見		執行單位回覆	
<b>委員一</b> 1. 建議檢附人事費用、耗材與主要費用及其他研究相關費用等編列細項明細表，以利確認經費運用之合理性。 2. 原成果績效預期投稿國內論文、研討會論文各一篇、投稿國外期刊論文一篇與人才培育 2 位，惟過程中因面臨碩士生健康因素影響而未能達成上述成果，故請於後續盡速完成本計畫之預期成果。 3. 本計畫成果報告內容完整，對氯乙烯類污染物的好氧整治提供有價值之研究成果，尤其係對於分子生物技術的應用具創新性，予以肯定。		1. 謝謝委員意見。根據規定，執行計畫期間之相關經費各細項支出與核銷皆需上傳至土基會指定系統進行審查，且須於期末由執行方提送相關經費明細等報表，發文進行結案，目前計畫經費核銷業已審查通過，並完成結案，相信經費運用應屬合理；另經費運用說明亦補充於成果報告中，敬請委員審閱。 2. 謝謝委員意見。國外期刊投稿近期業已被接受並刊登發表，後續將檢附佐證資料，發文至環境管理署；執行計畫之研究生因健康因素退出計畫(目前休學中)，計畫後期的管柱實驗，係由實驗室現有研究生合力完成，故現階段無法產出國內碩士論文，需視該名研究生是否復學，持續將計畫作進一步的延伸以作為論文；國內研討會論文之發表，預計投稿今年環境工程年會研討會。 3. 感謝委員對於計畫成果的肯定。	
<b>委員二</b> 1. 本計畫規劃採用好氧共代謝的整治手段，遴選具有潛在暴露風險的場址作為好氧共代謝之甲烷氧化菌群來源，馴養現地的甲烷氧化菌群，藉由管柱試驗模擬受氯乙烯類污染的地下水層，建立整治操作參數並調查場址菌相及管柱內部甲烷氧化菌群分布與結構，已具體說明執行之研究流程及方法。 2. 本計畫建議補充經費使用狀況說明。		1. 謝謝委員的肯定。 2. 經費說明已補充於成果報告定稿，敬請委員審閱。 3. 謝謝委員意見。實場整治案例呈現於 4.4 節，敬請委員審閱。 4. 謝謝委員意見，建議部分已整合入 6. 總結與建議章節中，敬請委員審閱。	



3. 本計畫提及好氧共代謝三氯乙烯於生物整治上具有可行性，建議提供國外實地應用案例文獻，補充實地應用狀況，並加以比較，俾利增加說服力。
4. 本計畫已有總結，建議補充建議。
5. 本計畫申請預估成果國內論文、國內研討會論文、國外期刊論文及國際研討會論文發表各為1篇，然成果達成數僅國際研討會論文發表1篇，建議仍須強化成果績效展現。
6. 綜上所述，整體研究成果尚符合預期成果，建議仍須盡快完成學術產出績效。
7. 建立氯乙烯類污染物好氧共代謝分子生物監測技術，對於氯乙烯類污染物生物整治工法上提供另一項選擇的技術，建議後續可以評估經濟性，作為日後實場應用參考。

5. 謝謝委員意見。國外期刊投稿近期業已被接受並刊登發表，後續將檢附佐證資料，發文至環境管理署；執行計畫之研究生因健康因素退出計畫(目前休學中)，計畫後期的管柱實驗，係由實驗室現有研究生合力執行，故現階段無法產出國內碩士論文，需視該名研究生是否復學，持續將計畫作進一步的延伸以作為論文產出；國內研討會論文之發表，預計投稿今年環境工程年會研討會。
6. 謝謝委員，將盡快完成學術相關產出。
7. 謝謝委員，後續會就經濟性作評估，並與配合顧問公司保持聯繫，瞭解三氯乙烯實場整治的經濟效益。

### 委員三

1. 三口監測井(MW02、B00422 與 B00583)的地下水水樣於酸性與中性條件下馴養，其中 B00422 與 B00583 兩者皆可有效降解三氯乙烯，因此可作為管柱實驗中性與酸性條件之植種菌群，然而為何僅有此兩水樣可馴養出有效菌群？為何 MW02 無法馴養出？宜從水質面或微生物面向作深入探討，才有應用的價值。
2. 成果績效方面，數據顯示國內外投稿及人才培育均無產出，之後也有文字說明顯示本研究計畫執行過程中有遇到研究人員不穩定，致出現計畫執行延遲狀況，因此未來宜引以為戒。
3. 在產業面績效方面，則著重在合作研發產業、申請專利、及技術移轉，然後此計畫在產業面的績效乃協助協助顧問公司分析整治期間的菌相與甲烷氧化等功能性基因，是屬於技術服務工作，嚴格來講並非技術研發合作範疇。

1. 謝謝委員意見。就 MW02 所獲得之水質項目結果(如 pH、導電度等)並未與其他兩口井(B00422 與 B00583)有顯著差異(表 5.1)，該井位於污染區上游，2023 年 11 月分析的三氯乙烯濃度為 0.0454 mg/L，馴養期間的三氯乙烯濃度(0.1-0.4 mg/L)遠高於此分析濃度，推測 MW02 井內的現地甲烷氧化菌群一開始甚微，加上現地菌群對於三氯乙烯的耐受度較低(此可以功能性基因量普遍低於另外兩口井加以支持)，以至於無法成功馴養。
2. 謝謝委員意見。目前國外期刊投稿近期業已被接受並刊登發表，其餘學術產出將盡快完成；對於研究人力不穩定，導致計畫執行延遲，將多加注意與控管，謝謝委員提醒。
3. 謝謝委員意見。執行計畫中後期，合作之顧問公司亦開始著手整治污染場址，除協助以建立之分子生物技術協助分析場址目標降解菌群的變化外，亦常與顧問公司交流討論現地整治面臨的問題，並給予建議與回覆，這部分較難以簽約



	量化方式呈現，懇請委員諒解。
<b>委員四</b> 1. 建議應提出針對實場應用時所需最佳化之操作參數。	1. 謝謝委員意見。相關說明已補充於成果報告 <u>總結與建議</u> 一節，敬請委員審閱
<b>委員五</b> 1. 本計畫完成不同濃度之甲烷氧化菌群馴養，並以管柱試驗模擬受污染場址含水層，針對相關實驗因子進行好氧共代謝三氯乙烯操作條件優化，其最高可降解三氯乙烯濃度為 0.4 mg/L，且進行甲烷氧化菌群功能性基因( <i>mmoX</i> 、 <i>pmoA</i> 、 <i>mxoF</i> )量分析比對，符合計畫進度查核點。	1. 謝謝委員。





# 環境部環境管理署「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 □成果報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	112 年度	計畫類型	□先導型 ■研究型 □模場型
計畫類別	□調查 ■整治 □其他	主持人：楊茱芳	NO：C1
計畫名稱	氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗輔以分子生物技術監測		
審查意見		執行單位回覆	
<b>委員一</b> 1. P.32 表示因初期手法不嫻熟，致使 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段初期的數據品質不佳，可否簡易說明後續如何進行改善馴養。 2. P.34 提及管柱試驗系統中，生物刺激組係添加甲烷或甲烷奈米氣泡水，請簡易說明該實驗設計原理？		1. 謝謝委員意見，初期手法不嫻熟主要係因執行計畫研究生在學習分析方法時，因認知有誤，以為無須等待三氯乙烯平衡即可上機分析；又馴養條件眾多，導致樣品於平衡不一情況下上機分析，致使數據間有波動(部分分析數據合理，部分不合理)，加上樣品數多，故一時間難以找到問題，耗費些許時間除錯，發現關鍵問題後，已建立分析操作 SOP，之後已無此問題。 2. 實驗最終依據文獻採用氣密性水袋製備含有甲烷的地下水，製備方式以流量約為 10 倍水體體積的純甲烷曝入含有地下水的水袋中數分鐘，使水中甲烷溶解濃度達最大值(飽和)，後續水袋頂空亦以 100%甲烷取代，使地下水水中甲烷濃度能以最高且穩定濃度進流至管柱中。	
<b>委員二</b> 1. 有關 112 年度專案成果績效自評表，二、主要研究人力應以人月為單位填寫；另本計畫提及富立業工程顧問股份有限公司總經理擔任場址提供、現地工程顧問，應依實際量化成果填寫於三、產業界資源投入表，以利瞭解產學合作中產業所投入之資源。 2. P.24，有關圖 4.2、現地污染場址暨三口井之配置圖，應於圖中標示相關圖例，如環保主管機關監測井、自設監測井、方位及地下水流向，以利瞭解		1. 謝謝委員意見，專案成果績效自評表二與三業已修正，敬請委員審視。 2. 謝謝委員意見，詳細場址配置圖已於成果報告修正。 3. 謝謝委員，三口井原始菌相有採樣分析，結果請參見成果報告-馴養期間菌相分析。 4. 謝謝委員提醒，實驗以專業套組萃取 total genomic DNA 後，會以微量分光光度計分析萃取的 DNA 品質 (A260/280、A260/230 ratio)，若未達標	



<p>現地污染場址之配置及污染物濃度擴散因子。</p> <p>3. 於管柱試驗前應事先分別分析 3 口井內之生物結構，以利微生物馴養條件設定。</p> <p>4. 土壤或地下水中有許多很多的干擾物質，例如腐植酸，可能會影響聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 或是即時定量 (real-timePCR) 等實驗，因此在萃取完 DNA 後必須經過純化的步驟。</p> <p>5. 本計畫建立氯乙烯類污染物好氧共代謝分子生物監測技術，對於氯乙烯類污染物生物整治工法上提供另一項選擇的技術。</p> <p>6. 然本計畫使用甲烷作為菌株之代謝基質，以達到好氧菌共代謝進而分解含氯污染物，惟甲烷為全球第二大溫室氣體，建議後續可評估甲烷使用量最小化、效益最大化。</p>	<p>準或濃度過低，後續會進行純化甚至濃縮作業。</p> <p>5. 謝謝委員，我們期望能提供另一項可供參考的生物整治策略。</p> <p>6. 謝謝委員，計畫採用氣密性水袋提供溶有飽和甲烷的地下水，故實驗期間無需以持續曝氣方式提供甲烷，但一開始製備時確實會將高流量甲烷曝入地下水 4-5 分鐘，後續會再搜尋更多文獻以瞭解是否可將甲烷使用量再行縮減。</p>
<p><b>委員三</b></p> <p>1. 建議在管柱試驗中進行多層次採樣，確定甲烷氧化菌群在不同深度和位置的分佈情況，以便更精確地調整整治操作參數。</p> <p>2. 建議期中報告可以提出初步結論。</p>	<p>1. 謝謝委員，每支管柱實驗設有 7 個採樣口，目的欲進行多層次採樣，然菌相世代定序礙於廠商分析時程，約需 2 個月方能出具分析報告，加上物力、人力與時間的有限性，未能達到高解析度分析，望請委員見諒。</p> <p>2. 謝謝委員建議，結論直接彙整於成果報告，敬請委員審閱。</p>
<p><b>委員四</b></p> <p>1. 整體進度尚屬合理，仍續注意後續進度完成情形。</p> <p>2. 建議應評估甲烷利用情形以及系統中未被微生物利用之定量分析，並說明未來實場應用時如何提升甲烷利用效率。</p>	<p>1. 謝謝委員，後續因執行研究生個人健康因素致使進度落後，計畫因而申請展延，後續投入更多研究生人力執行此計畫補助案，實驗項目皆已達成。</p> <p>2. 謝謝委員建議，實驗以 GC 分析水中甲烷，敬請委員審閱成果報告。</p>
<p><b>委員五</b></p> <p>1. 本計畫目前已完成好氧共代謝三氯乙烯之甲烷氧化菌群馴養/功能性基因分子生物技術分析方法/架設管柱試驗與清水試驗，符合期中報告查核點進度。</p>	<p>1. 謝謝委員。</p> <p>2. 謝謝委員建議，相關說明已補充於成果報告，敬請委員審閱。</p> <p>3. 謝謝委員，還原脫「率」係因繕打錯誤，成果報告已修正，敬請委員參閱成果報</p>



2. 基本水質項目對 TCE 的好氧共代謝是否有影響?亦請補充說明。
3. 勘誤部分，請於成果報告一併修正：報告書第 8 頁中 3.1 厭氧生物降解...菌株 *Dehalococcoides* sp. BAV1 能代謝二氯乙烯脫氯並持續還原成乙烯(He et al., 2003)；厭氧還原脫「率」之反應速率隨著氯數減少而遞減...，「率」文字是否為誤植？
4. 專案基本資料表請於定稿補上學校章。
5. 申請計畫書審查意見回覆表請於定稿補上。

告。

4. 謝謝委員，專案基本資料表已於定稿補上學校章，敬請委員審閱。
5. 謝謝委員，歷次審查意見回覆表已隨成果報告補上，敬請委員審閱。



# 環境部環境管理署「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	112 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：楊茱芳 NO：R14	
計畫名稱	氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗輔以分子生物技術監測		
審查意見		執行單位回覆	
<b>委員一</b> 1. 此計畫係使用現地生物整治工法整治含氯場址，若實驗進行順利，建議後續評估需耗費之整治時間，並評估其未來可行性。 2. 此計畫有助於未來含氯場址之污染整治，建議後續可評估實場相關可行性。		1. 感謝口委意見，目前計畫執行處於初期(實驗室馴養現地好氧甲烷氧化菌群暨建立分子生物分析技術，後續管柱實驗架設準備相關材料中)，於執行計畫期間會視研究進度評估可能需要的整治時間。 2. 後續管柱實驗期間會視面臨的問題持續修正，以期能達到實場應用。	
<b>委員二</b> 1. 欲馴養現地微生物以好氧共代謝氯乙烯類污染物，並測定降解後的生物毒性。 2. 建議輔以常見氯乙烯類污染物降解副產物的物種分析，以釐清與厭氧脫氯降解的機制差異與降解途徑，利於後續實場應用考量。		1. 感謝口委意見，計畫會盡可能安排管柱試驗出流地下水的生物毒性測試。 2. 計畫如若時間與物力允許，將針對可能的三氯乙烯好氧共代謝中間產物進行分析，中產物相關文獻(Baskaran & Rajamanickam, 2019)已補充於修正的計畫書(附件 8-18)，敬請查閱。	
<b>委員三</b> 1. 計畫中擬使用甲烷為刺激基質，促進降解菌之生長。但是甲烷為氣態、水溶解度低，現場施工上是否擬以奈米甲烷氣泡水取代？建議說明。 2. 敬請說明、並監測與探討主要影響處理效能之水質參數。		1. 感謝口委意見，甲烷於水相的低溶解度確實會引起主要基質是否充足的疑慮；文獻指出，甲烷氧化菌依據對於甲烷的親和力大致可分為高親和力和低親和力甲烷氧化菌兩類，高親和力甲烷氧化菌群基於對甲烷的高親和力，即使在 1.8 ppm 甲烷存在下，亦可存活(Silva-Gonzalez et al., 2018)(附件 8-20)；另有一篇文獻以頂空 0.1% 甲烷進行生物反應槽實驗，亦可觀察甲烷氧化菌的生長(Kambara et al., 2022)，因此溶解在水中的甲烷濃度雖然極低，應能使甲烷氧化菌群生長。另外，參考國外採用 air sparging 共代謝整治三氯乙烯技術(相關內容補充於修正計畫書	



	<p>附件 8-22)，加上與顧問公司交流討論，顧問公司表示灌注液體方式於實務上確實較常使用，但考量目前尚未有微奈米甲烷氣泡水整治實例，因此依循文獻發表策略或許較具公信力。</p> <p>綜合上述，研究執行時規劃先以氣體方式提供甲烷，並探討甲烷濃度實驗因子對於三氯乙烯共代謝的影響；若實驗期間確認氣態甲烷不足以支持管柱內的甲烷氧化菌共代謝三氯乙烯，將改採用微奈米甲烷水作為備用策略。</p> <p>2.感謝口委意見，相關水質分析已補充至修正計劃書(附件 8-36)，敬請委員審閱。</p>
<p><b>委員四</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 附件 8-48，有關十一、研究經費(1)人事費用請確認協同主持人經費是否需編列。</li> <li>2. 附件 8-55，本計畫之核心技術-管柱試驗於模擬現地污染物好氧降解，目前計畫團隊現有技術僅 TRL2，然國外已有發展且國內外相似技術為 TRL6，建議可強化說明國外技術發展之情形。</li> <li>3. 計畫申請人實驗室於五年前開始對氯乙烯類生物降解進行研究，從厭氧還原脫氯機制逐漸轉換甲烷氧化菌群好氧共代謝氯乙烯類污染物，故執行團隊於土壤地下水模場試驗有相關經驗，足以勝任本計畫。</li> <li>4. 本計畫預估之成果績效貢獻包括學術產出國際研討會論文及期刊論文各一篇、國內研討會及論文各一篇、人才培育碩士 2 人、產業面為促成合作研究 1 件。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.感謝口委意見，經確認為未將範例的文字移除，進而造成委員困擾，修正後的計劃書已移除，請委員審閱。</li> <li>2.感謝口委意見，於修正計畫書中補充 <u>4.4 甲烷氧化菌好氧共代謝氯乙烯類污染物國外現地整治技術</u>(附件 8-22)，小節中介紹兩實場整治條件暨結果。</li> <li>3.感謝口委肯定。</li> <li>4.將努力達到預期績效。</li> </ol>
<p><b>委員五</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.計畫書內容詳實。</li> <li>2.建議應考慮未來應用時所遇到的困難進行研究。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.感謝口委肯定。</li> <li>2.歸納委員們意見，在實場面臨的困難可能在於甲烷供給方式與甲烷於水中的低溶解度。經彙整文獻，國外案例確實以氣體方式供給，注</li> </ol>





<p>3. 如何克服甲烷溶解度低的問題。</p> <p>4. 本研究與相關文獻中研究之差異為何。</p>	<p>射井則進一步分為垂直井與水平井，採用連續或間歇方式提供甲烷。</p> <p>經與顧問公司討論，氣提工法在國內可以施行，但不常見，故相信技術面應可達成，特別是污染深度不深的條件下；在甲烷溶解度部分，甲烷於水中溶解度很低，但研究指出甲烷氧化菌分為甲烷高親和性與低親和性兩種，高親和性的甲烷氧化菌群仍可利用濃度相當低(1.8 ppm)的甲烷生長(附件 8-20)；因此申請計畫依循國外整治案例，先規劃採用氣體方式供給甲烷，並將甲烷供給濃度當作探討因子；另外，研究團隊實驗室曾嘗試以微奈米甲烷氣泡水(液態)取代甲烷氣體進行一系列批次實驗，研究成果顯示液態的微奈米甲烷氣泡水確實可作為甲烷氧化菌群碳源，執行計劃期間若面臨氣體甲烷供給難以達成，可能調整為以微奈米甲烷氣泡水方式供給，相關說明補充於<u>(三)預計可能遭遇之困難及解決途徑</u>(附件 8-37)，敬請委員審閱。</p> <p>3. 感謝口委意見，已於上述第 2 點合併回覆。</p> <p>4. 國外以好氧共代謝氣提方式整治三氯乙烯污染場址發表年代多在早期，原因推測為美國整治技術較國內起步早，由於發表年代較早，少有以分子生物面向仔細探究目標降解菌群乃至於相關功能性基因的數量與種類，基於分子生物技術蓬勃發展，已成為環境微生物菌相調查的利器，是以申請研究計畫欲將分子生物技術與氣提法整合，以分子生物技術確認生物整治的有效性，建立的分子生物分析技術亦可應用於其他污染場址甲烷氧化菌群的監測，以利場址整治決策的評估。</p>
<p>委員六</p> <p>1. 國外是否有灌注甲烷促進好氧共代謝之實場案例？因甲烷屬爆炸性氣體，現場兼顧安全及生物好氧共代謝是關鍵。建議設計管柱實驗時考量，以增加研究成果之現場運用潛力。</p>	<p>1. 感謝口委意見，國外灌注甲烷氣體促進好氧共代謝的案例已補充至修正計畫書(附件 8-22)，敬請委員審閱。</p> <p>國外施作的甲烷濃度介於 1-4%(低於甲烷燃燒爆炸下限 5%)，採用連續或間歇式供應，且多於戶外操作，是以安全性應可兼顧；在實驗室進行管柱試驗期間，將遵循實驗室安全操作規範，倘若遭逢甲烷氣體供給困難，</p>



	將嘗試改以微奈米甲烷氣泡水供給，使計畫順利執行。
<b>委員七</b> 1.場址取得水樣是否僅含三氯乙烯，應先與顧問公司確認。	1.感謝口委意見，經與顧問公司確認，回覆現階段僅測有三氯乙烯的污染，因此目前仍以三氯乙烯為主要研究污染物。
<b>委員八</b> 1.計畫主持人及本計畫執行團隊的學術研究能力佳，足以勝任本計畫。主持人及本計畫執行團隊近五年的研究績效佳。 2.本計畫對國內土壤及地下水污染整治的推動有貢獻。 3.本計畫書撰寫具體完整，計畫書中已經說明本計畫的執行方式。 4.計畫書所述的構想具可行性，且具有實務應用潛力(本計畫擬：“...建立氯乙烯類污染物好氧共代謝分子生物監測技術對於氯乙烯類污染物生物整治...”，國內對 VOC 的好氧共代謝分解較少研究，本類型整治工法可提供另一項的選擇)。 5.計畫執行期限合理，也已經說明預期的研究成果。	感謝口委肯定計畫團隊與撰寫的計劃書，將持續努力，以期達到預期的成果與績效。
<b>委員九</b> 1.人事費： · 主持人費編列 12 個月，請以計畫執行期程 11 個月進行編列。 · 兼任人員編列 12 個月，請以計畫執行期程 11 個月進行編列。 2.耗材費： · 分子生物相關等耗材，請細項說明耗材內容 · 玻璃實驗器材、玻璃器皿、化學藥劑、特殊氣體等高價格偏高，請補充說明。 · 其他：查從雲林到臺中(36 次)或臺北(4 次)來回高鐵次數(共 40 次)與雜費次數(18 次)不一致，請確認。	1.感謝口委意見，人事費用編列已修正。 2.感謝口委意見，耗材費用部分，分子生物耗材有增註細項說明；玻璃實驗器材、玻璃器皿、化學藥劑、特殊氣體等高價格偏高問題，已增註細項並下調經費。 3.感謝口委意見，其他關於車次與雜費已修正。



## 專案基本資料表

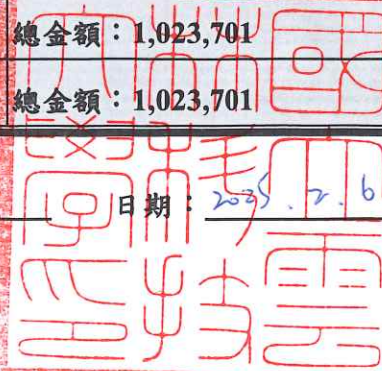
專案性質		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別(單選)		<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	
研究主題		<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他					
申請機構系所		國立雲林科技大學 環境與安全衛生工程系					
機構地址		64002 雲林縣斗六市大學路三段 123 號					
專案主持人		楊茱芳		職等／職稱		教授	
協同主持人		周奮興		職等／職稱		總經理	
專案名稱	中文	氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗輔以分子生物技術監測					
	英文	Study on aerobic co-metabolism of chlorinated ethylenes using column experiment and molecular-biological investigation					
	關鍵字	氯乙烯類污染物、好氧共代謝、管柱試驗、分子生物技術					
執行期程		自民國 112 年 12 月 15 日起至民國 114 年 2 月 28 日止					
專案主持人		姓名：楊茱芳		Email：cfyang@yuntech.edu.tw		專線：05-5342601 # 4415 手機：0939252715	
專兼任人員		姓名：徐玉清		Email：M11214010@yuntech.edu.tw		專線：05-5342601 # 4485 手機：0972198078	
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估經費		第一年金額	第二年金額	編列說明		
	1.	人事費用	344,483		(1~5 項相加之 50%為限)		
	2.	設備使用含維護費	-		(與計畫實驗相關)		
	3.	耗材與主要費用	679,218		(與計畫主體相關)		
	4.	其它研究相關費用	-		(含差旅與租賃費用)		
	5.	行政管理費	-		(1~5 項相加之 15%為限)		
	6.	自籌款	-		(自行籌備款項)		
	申請補助金額(1~5 項)		1,023,701		總金額：1,023,701		
	計畫總金額(1~6 項)		1,023,701		總金額：1,023,701		

專案主持人(簽名或蓋章)：

楊茱芳

日期：

2025.2.6







# 112 年度專案成果績效自評表

## 一、專案基本資料

填表日期：114 年 2 月 8 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input type="checkbox"/> 先導型 <input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input type="checkbox"/> 整治 <input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
執行機構	國立雲林科技大學	專案主持人	楊茱芳
專案名稱	氯乙烯類污染物之好氧共代謝管柱試驗輔以分子生物技術監測		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 成果		

## 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	成果 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	1	0	0		
		(2)研討會論文	1	0	0		
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1		
		(2)國際研討會論文發表	1	0	1		
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告					
	4.專著(本數)						
	5.辦理學術 會議(場 數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
6.研發改良 技術(項 數)	(1)已開發技術						
	(2)技術平台						
7.技術獎項(項數)							
B 人 才 培 育	8.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	0	0		
		(2)博士					
	9.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
(4)形成實驗室							
10.其他指標 (請自行命名)	(請自填)						



(二) 產業面

目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	成果 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)
項目								
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		1	1	1		
		金額(仟元)		0	-	395.945		
	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)						





(三) 政策面

目標達成程度			申請預估數	期中達成數	成果達成數	結案後半 年達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
項目							
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 政策 推動	3.協助政府推動 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
C 技術 效益	4.整治技術提升(%)						
	5.整治成本降低(%)						
	6.提升能源效率(%)						
7.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

一、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）

<b>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)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>· 投稿英文期刊 1 篇。相關研究已投稿至國際期刊”International Biodeterioration &amp; Biodegradation”，投稿已接受並刊登。</li><li>· 國際研討會論文發表 1 篇。相關研究已於 2024 年 8 月 11~15 日發表於假加拿大多倫多舉辦之 2024 世界水研討會暨展覽，發表形式為海報。</li><li>· 國內研討會論文發表 1 篇。碩士生因健康因素錯過投稿期限，而未能達成。</li><li>· 培育 2 名碩士生取得學位。一位碩士生於執行計劃期間因健康因素休學，另一位碩士生持續進行研究，預計今年暑假畢業。</li></ul>
<b>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)</b>
與工程顧問公司簽訂一產學合作計畫，協助顧問公司分析整治期間的菌相與甲烷氧化等功能性基因
<b>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、污染查核、場址管理等政策及法規研訂之參考)</b>



建立氯乙烯類污染物好氧共代謝分子生物監測技術，對於氯乙烯類污染物生物整治工法上提供另一項選擇的技術

二、 主要研究人力

請依照「專案主持人」、「協同主持人」、「專任人員」、「兼任人員」及「臨時工」等類別之順序分別填寫

姓名	服務機構/系所	職稱	在本研究專案內擔任之具體工作性質、項目及範圍	執行期間 (每月投入工作時數比率)
楊茱芳	國立雲林科技大學/ 環境與安全衛生工程	教授	研究專案指導	35%
周奮興	富立業工程顧問股份有限公司	總經理	場址提供、現地工程顧問	15%
徐玉清	國立雲林科技大學/ 環境與安全衛生工程	碩士生	執行專案實驗	40%
李明覬	國立雲林科技大學/ 環境與安全衛生工程	碩士生	協助專案進行	5%

三、 產業界資源投入表

專案執行若有與產業界合作，請執行單位依實際量化成果填寫於欄位中。

投入資源類別	數量	說明
1.自籌款	元	
2.人力	1 人月	
3.設備		
4.其他資源 (請自行增列)	1. 污染場址地下水 數批 2. 討論會議數次	1. 地下水供現地甲烷氧化菌群馴養以及管柱 實驗現地菌群植種使用 2. 場址現況與技術說明與交流暨經驗分享



## 中文摘要

整治國內受氯乙烯類污染物污染之土壤及地下水時，生物整治技術多採用厭氧還原脫氯機制，因其為序列式的脫氯作用，容易導致低氯數氯乙烯類污染物的累積與擴散，而好氧共代謝可克服厭氧脫氯不完全，並縮短整治時程，好氧共代謝機制仰賴菌株利用主要代謝基質(如甲烷、甲苯及酚等)所表現的低專一性酵素，同時造成氯乙烯類化合物結構上的改變而達到分解污染物之目的。

甲烷氧化菌群為適合好氧共代謝的菌群，因為作為主要基質的甲烷相較於其他好氧共代謝菌群的基質而言較不具毒性，且甲烷氧化菌群廣泛存在於自然環境中；甲烷氧化菌產生的甲烷單氧氧化酵素分成兩種形式，分別為位於細胞質中之溶解性甲烷單氧氧化酵素(soluble methane monooxygenase, sMMO)，以及分布於細胞膜的膜結合性甲烷單氧氧化酵素(particulate methane monooxygenase, pMMO)；可藉由好氧共代謝降解的氯乙烯類污染物包括三氯乙烯、1,1-二氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯、反-1,2 二氯乙烯及氯乙烯。含水層生物整治的成效取決於微生物的組成，分子生物技術相較於傳統微生物培養可提供更完整的菌相資訊，亦可定量特定污染物降解基因的數量，協助評估好氧共代謝的成效，乃至於整治策略的改善建議。

本計畫規劃採用好氧共代謝的整治手段，遴選具有潛在暴露風險的場址作為好氧共代謝之甲烷氧化菌群來源，馴養現地的甲烷氧化菌群，藉由管柱試驗模擬受氯乙烯類污染的地下水層，建立整治操作參數並調查場址菌相及管柱內部甲烷氧化菌群分布與結構。甲烷氧化菌群取自受三氯乙烯污染場址內的兩口監測井(MW02 與 B00583)，以及場址外下游一處監測井(B00422)地下水，由於污染場址地下水 pH 偏酸，故於馴養甲烷氧化菌群時，分成中性與酸性條件，並以三氯乙烯濃度逐步提升方式馴養，研究成果指出，源自監測井 MW02 的菌群至多能降解 0.3 mg/L 三氯乙烯，其餘兩菌群(B00422 與 B00583)，無論以酸性或中性條件馴養，皆能降解場址最高三氯乙烯污染濃度(0.4 mg/L)；從馴養菌群可檢測有甲烷氧化菌三種功能性基因 *mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF* 的存在，且基因量隨三氯乙烯馴養濃度而變化，菌相分析亦可分析有甲烷氧化菌屬 (*Methylobacterium*-*Methylorubrum*、*Methylocystis* 和 *Methylomonas*)與甲基氧化菌屬(*Methylobacillus*、*Methyloversatilis*、*Methyloparacoccus* 和 *Methylophilus*)，顯示馴養手段對於甲烷氧化菌的強化與增量是必要的；管柱實驗進流不同三氯乙烯濃度結果顯示，當管柱進流 0.05 和 0.2 mg/L 三氯乙烯時，管柱 B 相對於管柱 A 與管柱 C 穩定，進流 0.4 mg/L 三氯乙烯時，以管柱 C 有較佳的三氯乙烯降解；當進流流量由 0.06 mL/min 降低至 0.02 mL/min，三管柱的三氯乙烯降解皆變差；當頂空甲烷濃度分別為 100%與 40%時，管柱 C 在 100%甲烷濃度的三氯乙烯降解表現佳，而管柱 B 則在 40%甲烷時三氯乙烯降解表現較佳；將進流地下水 pH 調降至 pH 5 時，額外植種馴養菌群的管柱 B 較管柱 C 有更好的三氯乙烯降解表現。



## ABSTRACT

Anaerobic reductive dechlorination mechanism is extensively applied for bioremediating soil and groundwater contaminated with chloroethylenes (CEs). However, its dechlorination rate decreases as the increase of chlorine atoms is removed, leading to the accumulation and dispersion of low-chlorine CEs. To address this issue, the aerobic co-metabolism mechanism provides another optional strategy. Contrary to the anaerobic reductive dechlorination mechanism, the CE removal rate increases as the increase of chlorine atoms is removed. Aerobic co-metabolism involves the induction of specific enzymes by providing primary metabolic substrates (such as methane, toluene, and phenol) to primary substrates metabolic bacteria, and the induced enzyme with low-specificity can combine with target contaminants (such as CEs) to facilitate their biodegradation.

Methane-oxidizing bacteria are ideal for aerobic co-metabolism because of their extensive existence and nontoxic substrate. Methane-oxidizing bacteria express two types of methane monooxygenase (MMO) and are soluble methane monooxygenase (sMMO), found in the cytoplasm, and particulate methane monooxygenase (pMMO), distributed in the cell membrane. Both MMOs can cometabolize trichloroethylene (TCE), 1,1-dichloroethylene (1,1-DCE), cis-1,2-dichloro-ethylene (cis-1,2-DCE), trans-1,2-dichloroethylene (trans-1,2-DCE), and vinyl chloride (VC). The success of bioremediation in the aquifer depends on the microbial composition. Molecular biology techniques provide higher resolution toward microbial communities than traditional microbiological incubation. Moreover, the number of specific pollutant degradation genes can also be quantitatively analyzed. The gathered information can be applied to evaluate aerobic cometabolism performance and parameter suggestion.

This proposal aimed to apply aerobic co-metabolism as a bioremediation approach. At first, the suitable CEs contaminated sites were selected as the sources of target methanotrophic bacteria. After acclimation, the enriched methanotrophic bacteria were used for column experiments to simulate CEs aerobic cometabolic degradation in the aquifer. In addition, molecular biology techniques such as real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and next-generation sequencing (NGS) are used for MMO gene quantification and microbial community analysis, respectively. The methane-oxidizing bacteria were collected from two monitoring wells (MW02 and B00583) in the TCE-contaminated site and the groundwater from a monitoring well (B00422) downstream of the contaminated site. Since the pH of the groundwater in the



contaminated site was acidic. Therefore, the methane-oxidizing bacteria are enriched under neutral and acidic conditions, and TCE concentration increases step by step.

The research results indicated that the microbial community from monitoring well MW02 could degrade 0.3 mg/L TCE after enrichment. The other two microbial communities (B00422 and B00583), whether enriched under acidic or neutral conditions, could degrade 0.4 mg/L TCE. Three functional genes (*mmoX*, *pmoA*, and *mxoF*) involving methane utilization could be detected from the enriched microbial community, and the gene quantity varied with the TCE concentration. Besides, methanotrophic genera, such as *Methylobacterium*-*Methylobacterium*, *Methylocystis*, and *Methylobacterium*, and methylophilic genera, such as *Methylobacillus*, *Methylobacterium*, *Methylobacterium*, and *Methylobacterium*, could be detected from various enrichment phases, indicating that enrichment was necessary. The column experiment results demonstrated that when three columns were fed with 0.05 and 0.2 mg/L TCE, Column B was stable relative to Columns A and C. When the influent was 0.4 mg/L TCE, Column C had better TCE degradation performance. When the flow rate of the groundwater decreased from 0.06 mL/min to 0.02 mL/min, the TCE degradation of the three columns became unsatisfactory. When the headspace methane concentration was 100%, Column C had better performance in the TCE degradation. While Column B had the better performance in TCE degradation at 40% methane in the headspace. When the pH of the feeding groundwater was adjusted to pH 5, Column B, which was additionally inoculated with the enriched consortium, had better TCE degradation performance than Column C.





# 目 錄

目 錄 .....	I
表目錄 .....	III
圖目錄 .....	IV
一、前言.....	1
二、研究目的.....	1
三、文獻探討.....	2
1. 氯乙烯類污染物背景介紹 .....	2
2. 氯乙烯類污染物整治 .....	5
3. 氯乙烯類污染物生物降解機制 .....	6
4. 甲烷氧化菌好氧共代謝氯乙烯類污染物 .....	10
5. 管柱試驗模擬受污染之地下含水層 .....	14
6. 分子生物技術於環境微生物檢測 .....	16
7. 實驗室研究成果 .....	19
四、研究方法及過程 .....	21
1. 研究架構 .....	21
2. 現地菌群的場址現況 .....	21
3. 現地菌群採樣後馴養 .....	22
4. 管柱系統架設暨管柱試驗 .....	23
5. 菌相與功能性基因分析 .....	25
6. 基質與污染物濃度分析 .....	27
7. 相關水質參數分析 .....	28
8. 工作進度與甘特圖 .....	29
五、結果與討論.....	30
1. 甲烷氧化混合菌群馴養期間之甲烷利用與三氯乙烯去除 .....	30
2. 甲烷氧化菌三種功能性基因 QPCR 分析檢量線建立結果 .....	34



3. 甲烷氧化混合菌群馴養期間之功能性基因 Q-PCR 分析結果 .....	36
4. 甲烷氧化混合菌群馴養期間菌相 NGS 分析結果.....	39
5. 管柱試驗系統實驗結果.....	52
6. 總結與建議.....	62
六、參考文獻.....	64
七、經費使用說明.....	74



## 表目錄

表 3.1、不同氯乙烯類化合物的物化性質 .....	4
表 3.2、不同氯乙烯類化合物之毒性分級 .....	4
表 3.3、臺灣法規含氯碳氫化合物之地下水污染標準 .....	5
表 3.4、不同好氧共代謝菌株暨誘導酵素之彙整 .....	10
表 3.5、甲烷單氧氧化酵素對氯乙烯化合物共代謝之動力參數 .....	12
表 3.6、影響生物復育之環境因子 .....	13
表 3.7、可現地好氧共代謝含氯碳氫化合物的應用技術 .....	14
表 3.8、管柱試驗之管柱材料 .....	15
表 3.9、彙整污染物於管柱試驗模擬多孔介質之傳輸 .....	16
表 4.1、NMS 培養基組成 .....	23
表 4.2、模擬地下水組成 .....	24
表 4.3、聚合酶連鎖反應之引子對 .....	26
表 4.4、即時定量聚合酶連鎖反應操作試劑 .....	26
表 4.5、即時定量聚合酶連鎖反應操作條件 .....	26
表 4.6、次世代定序分析使用之引子對暨操作條件 .....	27
表 4.7、次世代定序分析統計軟體彙整 .....	27
表 4.8、甲烷與三氯乙烯氣相層析儀分析條件 .....	28
表 5.1、污染場址內監測井水質檢測結果 .....	30
表 5.2、甲烷氧化功能性基因之質體標準品資訊 .....	34
表 5.3、原地下水菌群與以不同三氯乙烯與 PH 條件馴養期間各菌群之次世代定序分析之 ALPHA INDICES 統計表 .....	41



## 圖目錄

圖 3.1、臺灣用水資源分布 .....	2
圖 3.2、DNAPL 之擴散行為示意圖 .....	3
圖 3.3、厭氧與好氧之氯乙烯類化合物降解途徑 .....	7
圖 3.4、厭氧序列式脫氯之不同厭氧菌株的代 .....	8
圖 3.5、好氧直接代謝氯乙烯類污染物之途徑 .....	8
圖 3.6、好氧共代謝氯乙烯類污染物之途徑 .....	9
圖 3.7、甲烷氧化菌之甲烷代謝途徑 .....	11
圖 3.9、PCR 步驟示意圖 .....	17
圖 3.10、QPCR 原理示意圖 .....	18
圖 3.11、ILLUMINA 公司所使用之合成定序原理 .....	19
圖 4.1、計畫研究架構圖 .....	21
圖 4.2、現地污染場址暨三口井之配置圖 .....	22
圖 4.3、管柱系統示意圖 .....	24
圖 4.4、管柱系統實體架設圖 .....	24
圖 5.1、監測井 MW02 甲烷氧化菌群於 PH 5(左)及 PH 7(右)條件下馴養期間之甲烷頂 空與三氯乙烯濃度變化 .....	31
圖 5.2、監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 PH5(左)及 PH7(右)條件下馴養期間之甲烷頂 空與三氯乙烯濃度變化 .....	32
圖 5.3、監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 PH5(左)及 PH7(右)條件下馴養期間之甲烷頂 空與三氯乙烯濃度變化 .....	33
圖 5.4、甲烷氧化功能性基因 <i>MXAF</i> 濃度標準曲線 .....	35
圖 5.5、甲烷氧化功能性基因 <i>PMOA</i> 濃度標準曲線 .....	35
圖 5.6、甲烷氧化功能性基因 <i>MMOX</i> 濃度標準曲線 .....	36
圖 5.7、監測井 MW02 甲烷氧化菌群於 PH 5 及 PH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能 性基因( <i>MMOX</i> 、 <i>PMOA</i> 與 <i>MXAF</i> )定量分析結果 .....	37
圖 5.8、監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 PH 5 及 PH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能 性基因( <i>MMOX</i> 、 <i>PMOA</i> 與 <i>MXAF</i> )定量分析結果 .....	38



圖 5.9、監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 PH 5 及 PH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因( <i>MMOX</i> 、 <i>PMOA</i> 與 <i>MXAF</i> )定量分析結果 .....	39
圖 5.10、各樣品序列數量與 OTUs 之關係圖 .....	40
圖 5.11、三口監測井整合繪製之 VENN 圖 .....	42
圖 5.12、監測井 MW02 組內繪製之 VENN 圖 .....	42
圖 5.13、監測井 B00583 組內繪製之 VENN 圖 .....	43
圖 5.14、監測井 B00422 組內繪製之 VENN 圖 .....	43
圖 5.15、監測井 MW02 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整 .....	44
圖 5.16、監測井 B00583 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整 .....	45
圖 5.17、監測井 B00422 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整 .....	46
圖 5.18、三口監測井所有樣品整合繪製之 PCoA 圖 .....	48
圖 5.19、監測井 MW02 組內樣品繪製之 PCoA 圖 .....	49
圖 5.20、監測井 B00583 組內樣品繪製之 PCoA 圖 .....	49
圖 5.21、監測井 B00422 組內樣品繪製之 PCoA 圖 .....	50
圖 5.22、三口監測井 TOP 35 菌屬的 HEATMAP 圖 .....	51
圖 5.23、三管柱於不同三氯乙烯進流濃度操作下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 PH 監測結果 .....	53
圖 5.24、三管柱於不同地下水進流量操作下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 PH 監測結果 .....	55
圖 5.25、管柱 B 與 C 於不同甲烷濃度(100 與 40%)下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 PH 監測結果 .....	57
圖 5.26、管柱 B 與 C 於 PH 7 與 5 條件下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 PH 監測結果 .....	59
圖 5.27、管柱 A 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形 .....	60
圖 5.28、管柱 B 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形 .....	61
圖 5.29、管柱 C 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形 .....	62







## 一、前言

氯乙烯類污染物具低可燃性及化學安定等特性，廣泛用於工業，因過去不當管控與處置，使其污染土壤與地下水體，危害環境生態與健康，生物整治是一種具環境友善性、低能耗且可避免二次污染的整治方式，高氯數氯乙烯類污染物的生物整治多仰賴厭氧還原脫氯機制，但並非所有場址皆適用厭氧還原脫氯；好氧共代謝提供另一種不同生物降解途徑，利用好氧微生物表現的低專一性的酵素，可將三個氯以下的氯乙烯類污染物轉變成不穩定的環氧化物，達到生物降解污染物之目的。

可好氧共代謝氯乙烯類化合物的菌群眾多，其中以隸屬於甲烷氧化菌群下的甲烷氧化菌最為常見，於環境中分布廣泛，其表現之甲烷單氧氧化酵素具有低專一性，在氧化甲烷的同時，亦能將烷烴類或芳香族等有機污染物轉換成不穩定的環氧化物，環氧化物可再快速分解為醇類或酸類等易被生物分解的化合物，降低該些污染物對於環境與健康之危害；此外，與厭氧還原脫氯機制相反，好氧共代謝速率反隨氯數減少而增快，可大幅縮短整治時間。

管柱試驗常用於模擬地下含水層的污染傳輸，近期氯乙烯類污染物好氧共代謝的發表亦多半採用管柱實驗進行探究，顯示管柱實驗對於模擬含水層的生物降解具有相當的代表性。近年分子生物技術快速發展，已成為解構微生物菌相不可或缺之工具，有助對微生物進行不同層面的探討；分子生物技術雖無法如傳統培養獲得單一純菌，卻能夠快速且大量定性及定量分析目標環境的微生物族群，以利後續對污染場址進行生物整治的條件掌控與策略擬定。

## 二、研究目的

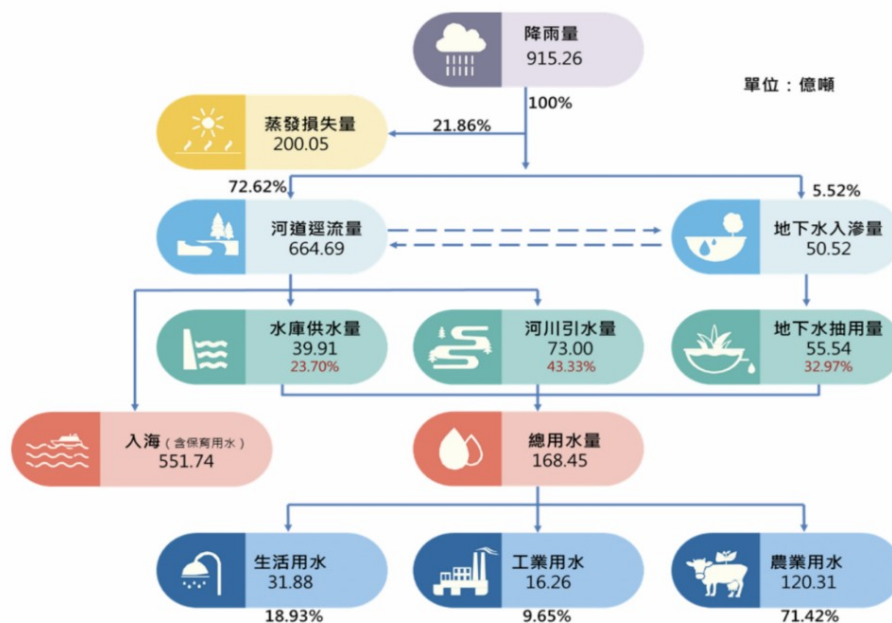
基於生物整治是一種具環境友善性、低能耗且可避免二次污染的整治方式，而好氧共代謝機制不但是氯乙烯污染物生物整治策略的另一項選擇，亦可解決傳統厭氧還原脫氯機制累積低氯數氯乙烯污染物的問題，並大幅縮短整治時間；甲烷氧化菌群為氯乙烯類污染物好氧共代謝之有效菌群，菌群廣泛分布於自然環境，表現之低專一性單氧氧化酵素可分為膜結合性以及溶解性兩種，兩者對於氯乙烯類污染物的親和力與反應速率不同，分析甲烷氧化菌群暨甲烷單氧氧化酵素基因，有助於協助判定好氧共代謝整治成效與目標菌群的類別。綜合上述，本計畫採用好氧共代謝機制進行三氯乙烯的降解，以管柱試驗模擬地下含水層，探討不同因子(主要基質濃度、污染物濃度、地下水流速與環境條件等)對於三氯乙烯好氧共代謝的影響，並輔以分子生物技術的檢測，探討目標菌群相關功能性基因與三氯乙烯好氧共代謝間的關聯性，希冀能產出可供未來實場生物添加的甲烷氧化菌群，以及監測該些菌群的分子生物技術，管柱試驗探討的相關因子亦可供實場整治參數擬定。



### 三、文獻探討

#### 1. 氯乙烯類污染物背景介紹

臺灣降雨量豐沛，卻因地理環境等因素成為國際缺水國家第 19 名，顯示水資源在臺灣彌足珍貴，圖 3.1 為臺灣水源供給分布。總用水量以河川水 43% 貢獻最高，地下水其次約佔 33%，而水庫佔約 24% 排名第三(今周文化，2023)，佔總用水量 1/3 的地下水存於地底下，不若地表水易察覺水質的變化與受污染情勢，因此，使地下水免於污染對於水資源的維護十分重要。



資料來源：經濟部水利署，108 年水利年報

圖 3.1、臺灣用水資源分布(今周文化，2023)

#### 1.1 氯乙烯類污染物污染

廢棄物儲存不當或意外洩漏導致土壤與地下水污染是臺灣工業發展後面臨的問題與挑戰，其中含氯碳氫化合物(chlorinated aliphatic hydrocarbons, CAHs)為一種低沸點、低可燃性、高蒸氣壓及化學穩定性之化學品，廣泛用於諸多產業製程，是以污染地下水事件時有所聞(Frascari et al., 2015)。碳氫化合物為不易溶於水之有機化合物，屬非水相液體(non aqueous phase liquid, NAPL)，非水相液體以比重可進一步區分為比水輕之非水相液體(light non aqueous phase liquid, LNAPL)，如石油碳氫化合物，以及比水重之非水相液體(dense non aqueous phase liquid, DNAPL)，如多氯聯苯、雜酚油、含氯碳氫化合物等。DNAPL 比重較大，進入地下水體後會向下移動至不透水層形成 DNAPL 池，下移期間亦跟隨地下水體移動及多孔介質而橫向擴散，圖 3.2 為 DNAPL 之擴散行為示意圖(Kamon et al., 2003)。DNAPL 於地下含水層

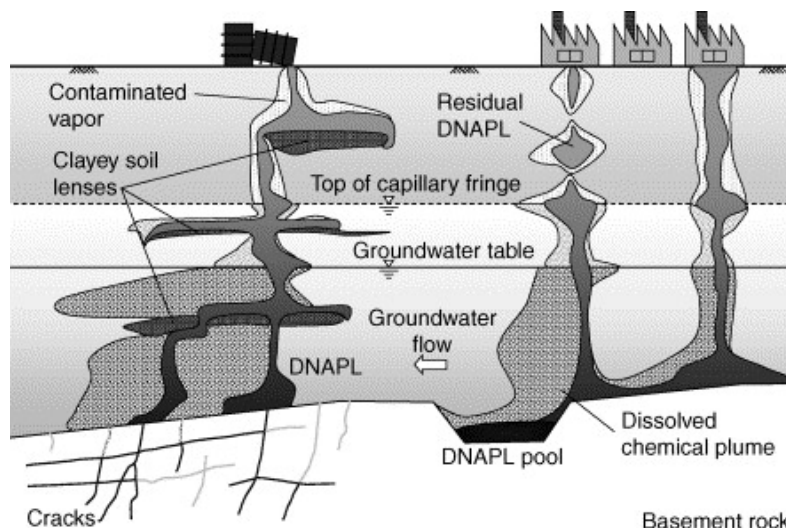


圖 3.2、DNAPL 之擴散行為示意圖(Kamon et al., 2003)

中會以自由相或是殘餘相之形態存在，當污染物藉由毛細作用於土壤介質間移動稱為自由相，而在污染物移動路徑中殘留於土壤孔隙間的稱作殘留相；殘留相 DNAPL 不具移動性，自由相又因持續下滲很難被直接發現，必須透過土壤或地下水之 DNAPL 濃度分析、土壤殘餘飽和度或水中的溶解度加以判斷，調查上相當困難。97 年經濟部工業局含氯碳氫化合物土壤及地下水污染預防與整治技術手冊(經濟部工業局，2008)指出，木材處理廠、一般工廠、有機化合物製造廠及事業廢棄物掩埋場等有較高機率發現 DNAPL 的污染，其中三氯乙烯、四氯乙烯、三氯甲烷及二氯乙烯為地下水污染中常見的含氯有機溶劑。氯乙烯類化合物之  $\log K_{ow}$  隨含氯數遞減而降低，表示越容易在地下水體中擴散，因此二氯乙烯與氯乙烯污染的場址控制最為棘手。氯乙烯類化合物除氯乙烯外，均屬比水重之 DNAPL，且具有疏水性，進入地下水體後容易因比重大而向下移動，且部分可溶於水相中，不僅會積累於不透水層上，亦隨地下水流動而擴散，造成污染團的擴張，又因氯乙烯類化合物不易分解而造成持續性的污染。

國內土壤及地下水污染場址數隨調查計畫逐日攀升，著名案例如臺灣美國無線電公司桃園廠之三氯乙烯及四氯乙烯暴露，該製程之污染物回收區及線路板清洗區洩漏，經沖洗排放而滲入土壤及地下水，已經歷十餘年的調查與整治；除土壤與地下水污染調查外，部分科學園區及加工出口區之地下水質異常，當污染物濃度超過管制標準時便需進行整治(經濟部工業局，2008；2010)。

## 1.2 氯乙烯類污染物特性與毒性

表 3.1 彙整氯乙烯類化合物(chlorinated ethenes, CEs)的物化性質。氯乙烯類化合物具低可燃性、低沸點、高氣壓密度及化學穩定等特性，廣為工業製程所用；四氯乙烯(perchloroethylene, PCE)廣泛用於乾洗、金屬除油及航太工業之化學製品；三氯





表 3.1、不同氯乙烯類化合物的物化性質(行政院環境部，2021)

化合物	四氯乙烯	三氯乙烯	1,1-二氯乙烯	1,2-二氯乙烯	氯乙烯
英文縮寫	PCE	TCE	1,1-DCE	<i>cis</i> -1,1-DCE	VC
分子量	165.38	131.39	96.94	96.95	62.5
比重 (at 20°C)	1.623	1.464	1.218	1.284	0.912
水中溶解度(mg/L at 25°C)	150	1280	2420	6410	2763
log K <sub>ow</sub>	2.6	2.61	1.32	1.86	1.36
亨利常數 ( $\times 10^{-3}$ atm·m <sup>3</sup> /mol)	0.18	9.85	26.1	4.08	56

乙烯(trichloroethylene, TCE)主要作為金屬脫脂、脫漆與化學萃取劑(Purdue et al., 2011)；二氯乙烯則分為 1,1-二氯乙烯(1,1-dichloroethylene, 1,1-DCE)及 1,2-二氯乙烯(1,2-dichloroethylene, DCE)，可作為含氯有機物之中間物，或工業製程使用的有機溶劑；氯乙烯(vinyl chloride, VC)可製造各式各樣塑料製品，包括輸送管、電線、電纜塗層及包裝材料。根據美國毒性物質與疾病登錄署(Agency for toxic substances and disease registry, ATSDR)資料指出，多數含氯碳氫化合物疑似對人體具致癌性，表 3.2 為不同氯乙烯類化合物之毒性分級。其中國際癌症研究中心(The International Agency for Research on Cancer, IARC)的第一級(Group 1)是指確定對人體具有致癌性的化合物，第二級 A 類(Group 2A)是對人類可能致癌，對實驗動物則確定致的化合物，第二級 B 類(Group 2B)則是對人類及動物皆可能致癌的化合物，第三級(Group 3)則屬實驗資料不足，尚無法判定是否為人類致癌物，第四級(Group 4)則非屬致癌物；三氯乙烯及氯乙烯於 IARC 分類上屬於 Group 1，若不慎經由民生或飲用水等途徑進入人體，會對人體皮膚、心臟、腎、呼吸及中樞神經系統造成危害，甚至造成嚴重肺出血、心臟衰竭及神經系統受損情形(ATSDR, 2023)。

表 3.2、不同氯乙烯類化合物之毒性分級(ATSDR, 2023)

化合物	U.S. EPA	DHHS	IARC
四氯乙烯	無	可預期致癌物	2A
三氯乙烯	人類致癌物	無	1
1,1-二氯乙烯	潛在致癌物	無	3
1,2-二氯乙烯	無	無	無
氯乙烯	無	已知致癌物質	1





### 1.3 氯乙烯類污染物管制

含氯碳氫化合物的長期使用，造成許多環境問題並危害人體健康，為解決上述問題，使用兩種方式，一為去除含氯碳氫化合物，二為訂定相關監測標準；前者發展出許多整治工法，於後續分節介紹，以生物整治為例，可透過氧化和還原過程降解含氯碳氫化合物，高氯數的含氯碳氫化合物適宜在還原條件下進行生物降解，而氯數較低的含氯碳氫化合物可在氧化條件下優先進行生物降解(Powell et al., 2014)；後者的目的在於預防地下水污染，臺灣現行法規含氯乙烯類污染物之地下水污染監測標準與管制標準彙整如表 3.3 所示。在地下水污染監測標準與管制標準中，將地下水分為二類，第一類係指飲用水水源水質保護區內之地下水，第二類為第一類以外之地下水(行政院環保署，2021)；若污染物濃度值高於管制標準值，需進行必要應變措施，將此地區列為控制場址，並進行後續的整治計畫。

表 3.3、臺灣法規含氯碳氫化合物之地下水污染標準(行政院環保署，2021)

含氯碳氫化合物	管制標準值(mg/L)	
	第一類	第二類
四氯乙烯	0.0050	0.050
三氯乙烯	0.0050	0.050
1,1-二氯乙烯	0.0070	0.070
順式-1,2-二氯乙烯	0.0070	0.070
反式-1,2-二氯乙烯	0.1	1.0
氯乙烯	0.0020	0.020

## 2. 氯乙烯類污染物整治

許多國家將土壤及地下水污染視為重要的環保議題，也因此發展諸多整治技術，有鑑於氯乙烯類化合物的大量使用，使其成為常見的地下水污染物，地下水污染整治技術依作用機制，可分為物理、化學及生物處理等方法，根據污染濃度與範圍則可分為污染源、污染團中心以及污染團邊緣之整治技術等，以下就物理、化學及生物處理分節敘述。

### 2.1 物化整治方法

物理化學處理是利用污染物或被污染介質之物化特性，達到破壞、分離或穩定污染物的目的，其優勢為操作時間短，去除污染量大，卻容易衍生改變現地環境之疑慮，同時耗能高、成本昂貴，並不適用於低濃度污染場址之整治。物化處理技術分為現地(In situ)及離地(Ex-situ)兩大類別，離地技術在歐洲國家為商業化的應用，如土壤洗淨法、安定/固化/去移動化法、溶劑萃取及電氧化法(陳和魏，2005)；土壤



氣體抽除法(soil vapor extraction, SVE)針對不飽和層即通氣層(vadose zone)土壤中高揮發性污染物進行整治，此技術利用真空抽氣，使存在於土壤中的污染物產生揮發作用，污染物由固相或液相轉移為氣相，並因抽氣井使污染區土壤產生負壓，使污染物隨土壤氣體往抽氣井方向移動而被抽出，被抽除的土壤氣體可進行回收或經處理後排放，土壤氣體抽除法不適用於低揮發性或低亨利定律常數的污染物，亦不適合處理水分含量高或黏土之土壤，更不適用於低透氣性的土壤環境中(中興工程，2023)；一般來說，土壤氣體抽除法已被成功地運用在處理位於中度透氣性及高透氣性土壤中揮發性污染物的處理，亦被大量運用在含氯溶劑污染的場址中。現地化學氧化法是指將氧化劑送入地下，以轉換目標污染物，並降低其質量、移動性及毒性的方法，該方法可以單獨使用，亦可與其他處理方法(如生物整治法)合併使用，化學氧化法的反應速率受許多因素影響，包括溫度、pH 值、污染物濃度、催化劑、副產物、背景水質及有機質等，而氧化劑與污染物的接觸則受到如注入方法與均質性，以及土壤中還原性物質多寡的影響。

## 2.2 生物整治方法

一般土壤地下水生物整治方法分為現地及離地兩種，主要差異在於離地整治需挖掘並抽取污染團之土壤與地下水進行處理，而現地僅需設置不同功能之井口，對污染區域曝氣、灌注營養鹽或生物製劑等操作，不僅節省大量成本，可於污染現場直接施作，是現今備受推崇的整治方式，一般現地的生物整治分為以下幾種：

1. 自然衰減：是自然環境中自發性的過程，是現地生物整治技術最簡單的方法，可細分成監測式以及強化式自然衰減法，其差別在於監測式僅需監測土壤污染物是否持續在降解，強化式則需進行質量平衡的評估，以最少的資源使土壤污染物減少並讓含水層有更佳的自然衰減能力(黃，2014)。
2. 生物刺激法(Biostimulation)：現地已具有可降解污染物之族群，但效益較低，若於地下水體補充微生物生長所需之營養鹽，如碳源、氮源、磷或微量元素，則可使現地微生物族群大量生長以克服環境條件的限制，強化污染物的降解(Nivetha et al., 2022; Nwankwegu et al., 2022)。
3. 生物添加法(Bioaugmentation)：即對現地額外添加對污染物有分解能力之純菌株或微生物族群等，藉由提高具降解污染物能力之微生物數量來增進污染物的降解；生物添加之菌種或混合菌群若取自非現地之場址，則污染場址之環境條件，如土壤性質、溶氧等可能會形成限制因子(Nwankwegu et al., 2022)。

## 3. 氯乙烯類污染物生物降解機制

微生物種類繁多，是以氯乙烯類污染物的生物降解各有不同的降解機制，氯乙



烯類化合物的生物降解主要可分為好氧與厭氧生物降解，圖 3.3 為氯乙烯類化合物在不同氧氣環境下的降解途徑，氯乙烯類污染物生物降解主要可區分為好氧下的氧化性脫氯作用 (oxidative dechlorination) 及厭氧下的還原性脫氯作用 (reductive dechlorination)。

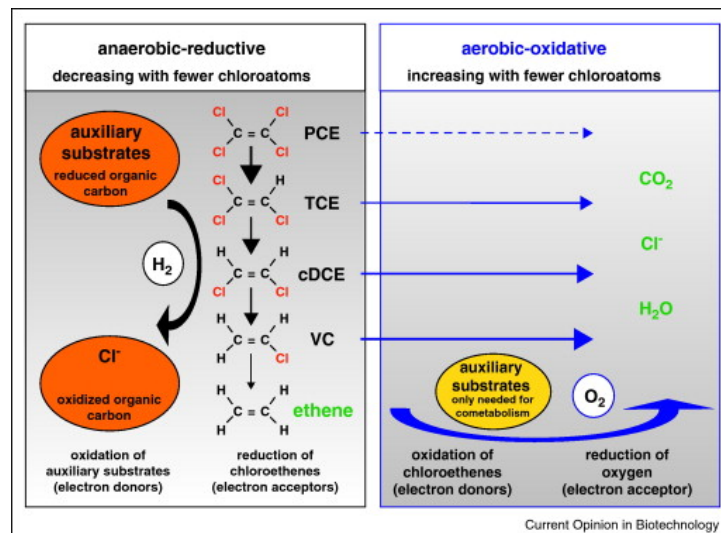


圖 3.3、厭氧與好氧之氯乙烯類化合物降解途徑(Tiehm & Schmidt, 2011)

### 3.1 厭氧生物降解

四氯乙烯和三氯乙烯之代謝常以厭氧還原脫氯為主，還原脫氯反應是利用氫原子逐步取代氯原子(Bennett et al., 2007)，現地電子提供者(如乳酸鹽、碳水化合物、醇類或氫)提供電子藉由一系列生化反應傳遞至電子接受者(氯乙烯類污染物)；還原脫氯反應去除化合物包括四氯乙烯、三氯乙烯、二氯乙烯和氯乙烯等，以四氯乙烯為例，脫氯還原過程中，會產生如三氯乙烯、二氯乙烯及氯乙烯等中間產物，氯乙烯類化合物代謝途徑暨行使途徑的菌株如圖 3.4 所示。圖中實線表示還原脫氯，虛線表示共代謝，脫鹵球菌屬 *Dehalococcoides* 為氯乙烯類污染厭氧生物整治的關鍵微生物，其具有一個或多個還原性脫鹵基因，分別對應不同氯數氯乙烯類污染物之降解，目前已知可將四氯乙烯代謝至無毒乙烯之菌株為 *Dehalococcoides mccartyi* 195，該菌株將四氯乙烯脫鹵還原降解至氯乙烯，再共代謝成乙烯(Maymo-Gatell et al., 1997)；菌株 *Dehalococcoides* sp. BAV1 能代謝二氯乙烯脫氯並持續還原成乙烯(He et al., 2003)；厭氧還原脫氯之反應速率隨著氯數減少而遞減，因此還原脫氯速率最低之步驟為氯乙烯轉化成乙烯，故常於四氯乙烯或三氯乙烯之污染場址發現二氯乙烯以及氯乙烯的累積(秦，2015)。

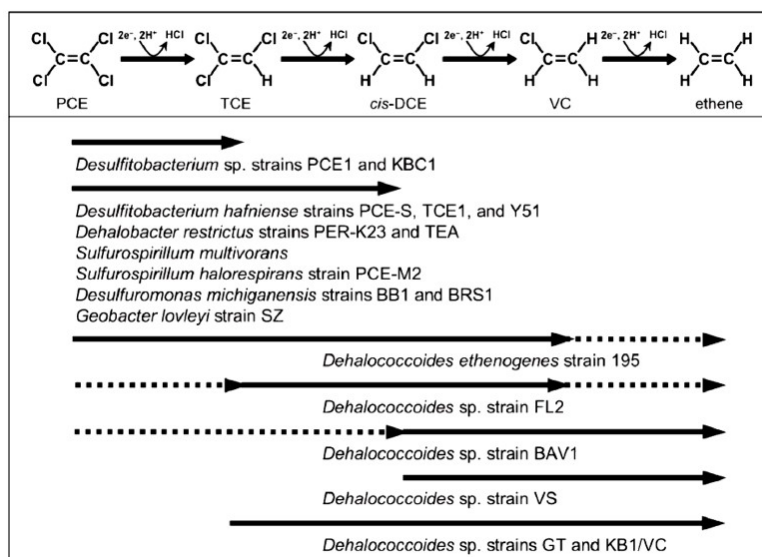


圖 3.4、厭氧序列式脫氯之不同厭氧菌株的代謝(Futagami et al., 2008)

厭氧共代謝為厭氧狀態下，菌株以較低專一性的酵素於偶發性反應下降解含氯有機物，如甲烷生成菌 *Methanosarcina mazei* 可利用甲醇作為電子提供者，將四氯乙烯降解為三氯乙烯；另有脫鹵呼吸微生物在氧化高氯數碳氫化合物時，共代謝低氯數有機物(Field & Sierra-Avarez, 2004)。

### 3.2 好氧生物降解

好氧脫氯亦可進一步分為直接降解(direct degradation)與共代謝降解(co-metabolic degradation)兩種，前者以氧氣作為電子接受者，將有機污染物(作為電子提供者)氧化為二氧化碳，並釋出氯離子，從中獲取能量，圖 3.5 為直接代謝氯乙烯類污染物示意圖。好氧氧化作用多存在污染團表面及氧化還原電位(oxidation-reduction potential, ORP)與 DO 較高的區域，若現地 DO 及 ORP 不適宜，微生物將無法進行好氧反應；研究指出 *Polaromonas* sp. JS666 可利用二氯乙烯當作唯一碳源，進行好氧氧化作用(Coleman et al., 2002)；另有學者表示菌株 *Pseudomonas aeruginosa* MF1 能以氯乙烯作為唯一碳源，但氧氣不足的情況下則該菌株無法代謝氯乙烯，而是轉化成不穩定含氯環氧化物(VC-epoxide)(Verge et al., 2000)。

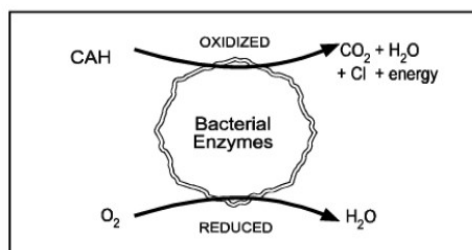


圖 3.5、好氧直接代謝氯乙烯類污染物之途徑(Fiedler, 2000)





共代謝則以其他基質(如甲烷、酚等)作為電子提供者，其對應的分解酵素專一性較弱，得以順帶降解含三個氯以下的氯乙烯類污染物(Bradley & Chapelle, 1998; Taylor et al., 2007)，若共代謝於好氧下進行，可稱為好氧共代謝，欲以此機制整治氯乙烯類污染物時，須有適合的好氧共代謝菌群，並為其提供充分的主要基質與溶氧，則氯乙烯類污染物即可順帶被降解，達到生物整治的目標。進行好氧共代謝作用時，微生物產生的酵素會催化電子供給者提供電子，使氯乙烯類污染物轉化為不穩定的環氧化物(epoxides)，環氧化物在水中會快速降解為醇類和脂肪酸(Anderson & Loveley, 1997)，進而被其他微生物礦化成二氧化碳及水，如圖 3.6 所示。Baskaran 和 Rajamanickam 利用火雞衍生垃圾堆肥中的混合菌群進行三氯乙烯的好氧共代謝，並分析酸性中間產物，結果指出三氯乙烯首先被水解為 dichloroacetyl chloride，接著再降解為 dichloroacetic acid 或 trichloroacetic acid，最終礦化為二氧化碳與水(Baskaran & Rajamanickam, 2019)。

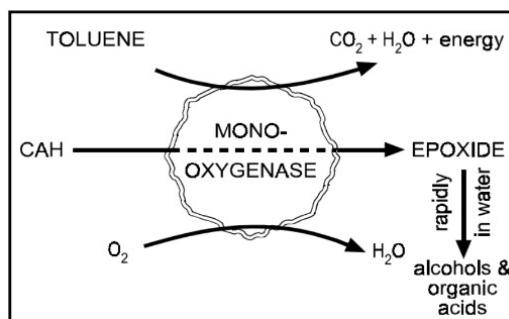


圖 3.6、好氧共代謝氯乙烯類污染物之途徑(Fiedler, 2000)

好氧共代謝菌群裡有甲烷、甲苯及酚等有機物作為主要基質，進而誘導菌株表現特定的酵素，該類型酵素多為單氧氧化酵素(monooxygenase)及雙氧氧化酵素(dioxygenase) (Luo et al., 2014)；因誘導表現的酵素不具專一性，同時造成氯乙烯類化合物結構上的改變進而達到分解目的，在此過程中，氯乙烯類化合物並不參與微生物的代謝。涉及好氧共代謝的酵素包括甲烷單氧氧化酵素(methane monooxygenase, MMO)、甲苯單氧(toluene 2-monooxygenase)及雙氧氧化酵素(toluene dioxygenase)、氨單氧氧化酵素(ammonia monooxygenase)及其他聯苯氧化酵素，表 3.4 彙整可行氯乙烯類化合物好氧共代謝菌株及其氧化酵素。甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 以甲烷誘導低專一性的甲烷單氧氧化酵素共代謝氯乙烯類化合物，最高氯數為三氯乙烯(Lee et al., 2006)；Lin 等學者的研究指出甲苯作為 *Pseudomonas putida* F1 的生長基質，其酵素甲苯雙氧氧化酵素可代謝含氯有機物(Liu et al., 2012)；另有以苯或二氯苯誘導 *Rhodococcus* sp. 形成苯雙氧氧化酵素進行好氧共代謝；氨亦可作為亞硝化菌 *Nitrosomonsa europaea* 的電子提供者，以氨單氧氧化酵素好氧共代謝氯乙烯類化合物(Kocamemi & Cecen, 2010)。上述所有氧化酵素中，應用甲烷單氧氧化酵素進行氯乙烯類污染物好氧共代謝最為適合，甲烷單氧





表 3.4、不同好氧共代謝菌株暨誘導酵素之彙整

Microorganism	Enzyme	Reference
<i>Methylosinus trichosporium</i>	Methane monooxygenase	Lee et al., 2006
<i>Pseudomonas putida</i>	Toluene dioxygenase	Morono et al., 2004; 2006
<i>Rhodococcus corallines</i>	Alkene monooxygenase	Saeki et al., 1999
<i>Mycobacterium vaccae</i>	Butane monooxygenase	Halsey et al., 2005
<i>Rhodococcus</i> sp.	Benzene dioxygenase	Suttinun et al., 2010
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Ammonia monooxygenase	Kocamemi & Cecen, 2010
<i>Mycobacterium chubuense</i>	Hydrocarbon monooxygenase	Le & Coleman, 2011

氧化酵素除可代謝多種有機碳氫化合物外(Lee et al., 2006)，使用的主要基質不若苯或甲苯屬於毒化物，其他烷烴氧化酵素雖同樣可將三氯乙烯好氧共代謝，但菌株易受到烷烴化合物抑制，且降解效率不及甲烷單氧氧化酵素；而氮在地下水中匱乏，硝化菌無法在地下水中正常代謝，氮單氧氧化酵素可去除 70%-90%二氯乙烯，但會造成酵素失活且需存有一定濃度的氮(Chu & Alvarez-Cohen, 1998；Kocamemi & Cecen, 2010)；甲烷氧化菌之甲烷單氧氧化酵素能共代謝三氯乙烯，在甲烷與氧氣充足下，可幾乎共代謝氯乙烯及二氯乙烯(Chang et al., 2017)，不會有低氯數化合物在地下水體中積累與擴散的問題。

好氧情況下，氧氣優先作為電子接受者，原因在於可使微生物獲得最多的能源，因此好氧生物復育的過程通常短於厭氧生物復育所需的時間，且有機物的降解更為完全，進行好氧生物降解時，液相殘存的氧氣含量須高於 1.0 mg/L，方能確保氧氣不是限制因子(盧，1997)；其他環境因子亦可能為共代謝的限制條件，如土壤特性、地下水流速、溫度、pH 值以及微量營養鹽等；生物因子則包含微生物族群之間的依存關係、添加菌及現地菌群的基質競爭；此外，基質競爭、酵素抑制皆被證明會影響氯乙烯共代謝作用，不同菌種產生的相同或不同之酵素都可能產生不同的代謝情況，於不適當的環境或族群下，即便環境具有分解能力的微生物，仍有機會抑制目標微生物降解污染物的效率(El Fantroussi & Agathos, 2005)。

#### 4. 甲烷氧化菌好氧共代謝氯乙烯類污染物

甲烷氧化菌(methanotrophs)隸屬於甲基氧化菌(methylotrophs)中的一員，甲基氧化菌可利用單碳化合物作為唯一碳源與能源生長，單碳化合物包括甲烷、甲醇、甲基胺及甲基硫等(Lidstrom et al., 2006)。甲烷氧化菌是將甲烷當作唯一碳源和能源之菌種，依據對甲烷的親和力，甲烷氧化菌大致可分為高親和力和低親和力兩類，高親和力甲烷氧化菌群基於對甲烷的高親和力，即使在低甲烷濃度(1.8 ppm)下亦可存活，低親和力甲烷氧化菌則需要較高的甲烷濃度(100 ppm) (Silva-Gonzalez et al.,



2018)，是以甲烷氧化菌廣泛分布於自然環境中，不論在酸鹼環境甚至於 55°C 的高溫環境，只要有甲烷及空氣同時存在，便能發現此菌種的存在(Moran & Hickey, 1997; Eshinimaev et al., 2004)。

#### 4.1 甲烷氧化菌特性與代謝途徑

甲烷氧化菌具有複雜的內膜系統(internal membrane system, ICMs)，根據甲烷氧化菌的細胞膜結構、碳路徑、固氮能力與其他生理特徵不同，分為 Type I、Type II 及 Type X。Type I 的甲烷氧化菌特徵在於細胞胞漿內膜的中央為束囊層狀(bundles of disks stacked)，碳同化的途徑為五碳醣磷酸途徑(ribulose monophosphate pathway, RuMP pathway)，細胞膜由 14 和 16 碳的磷脂脂肪酸組成；Type II 的特徵為胞漿內膜的排列呈現環狀分布在細胞膜邊緣，以絲胺酸(serine pathway)循環作為碳同化途徑，細胞膜為 18 個碳的磷脂脂肪酸；一些菌株同時有 Type I 及 Type II 特徵，則歸類為 Type X，細胞膜以 16 碳的磷脂脂肪酸組成，具有五碳醣磷酸代謝路徑及核酮醣-1,5-二磷酸，通常生長於更高溫的環境(秦，2015)。甲烷氧化菌細胞中的甲烷單氧氧化酵素(methane monooxygenase, MMO)以氧氣作為電子接受者將甲烷氧化成甲醇，甲醇再被甲醇脫氫酶(methanol dehydrogenase, MDH)氧化為甲醛，接著進入五碳醣磷酸途徑或進入絲胺酸循環進行細胞合成，甲醛亦會受甲醛脫氫酶(formaldehyde dehydrogenase, FADH)及甲酸脫氫酶(formate dehydrogenase, FDH)的作用氧化成二氧化碳及水，提供 NADH 作為細胞代謝，代謝途徑如圖 3.7 所示。

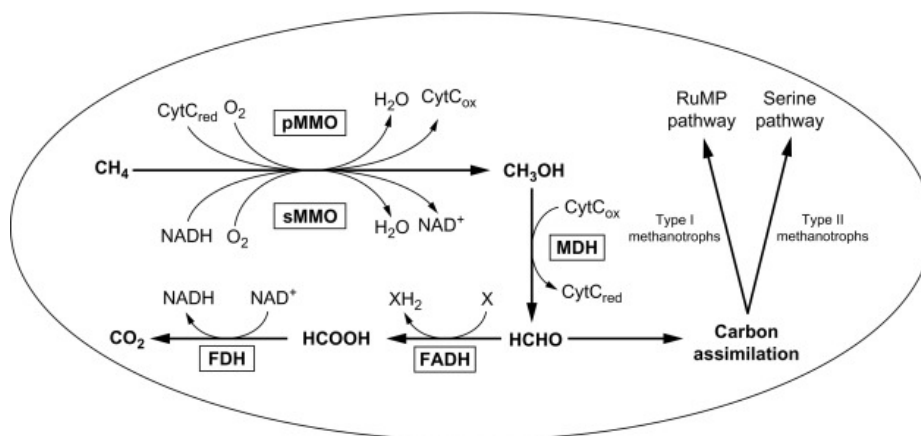


圖 3.7、甲烷氧化菌之甲烷代謝途徑(Tikhonova & Kravchenko, 2019)

#### 4.2 甲烷單氧氧化酵素

甲烷氧化菌利用甲烷單氧氧化酵素將甲烷催化為甲醇，這種甲烷氧化酵素為一種非專一性酵素，具有廣泛的基質親和力，可提供一個氧原子予甲烷以外的非生長基質之化合物，使非生長基質之化合物分解，即為共代謝反應。甲烷氧化菌存在兩種甲烷單氧氧化酵素，即溶解性單氧氧化酵素(soluble MMO)與膜結合性的單氧氧化酵素(particulate MMO)，研究指出溶解性甲烷氧化酵素對氯乙烯類化合物較有親



和力，因而有較高的三氯乙烯氧化速率，表 3.5 為甲烷單氧氧化酵素對氯乙烯化合物共代謝之動力參數(Semrau et al., 2010)。

表 3.5、甲烷單氧氧化酵素對氯乙烯化合物共代謝之動力參數  
(Semrau et al., 2010)

Compound	sMMO			pMMO		
	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/ mg protein)	$K_I$ (mL/min/ mg protein)	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nmol/min/ mg protein)	$K_I$ (mL/min/ mg protein)
Trichloroethylene	145	580	4	7.9	4.4	0.52
1,1-Dichloroethylene	5	12	2.4	2.5	0.23	0.092
<i>cis</i> -Dichloroethylene	30	364	12.1	0.8	0.12	0.15
<i>trans</i> -Dichloroethylene	148	662	4.5	42	61	1.5
Vinyl chloride	160	2100	13	26	42	1.6

#### 4.3 甲烷氧化菌好氧共代謝氯乙烯類污染物之影響因子

進行現地生物整治時，需考慮的因素眾多，包含土壤特性、溫度、pH 及營養鹽等，表 3.6 為影響生物復育之環境因子。甲烷氧化菌進行三氯乙烯好氧共代謝反應之主要影響因子包含溫度與 pH 等。甲烷氧化菌在酸鹼或溫度極端環境皆可發現，多數甲烷氧化菌適合的 pH 值在 5-8 之間，少數嗜鹼甲烷氧化菌可在 pH>9 的環境生長，嗜酸者則可於 pH<5 時生長，甲烷氧化菌最佳生長的 pH 值因生長環境而略有差異。甲烷氧化菌活性亦因溫度而變化，最適生長溫度介於 10-37°C，少數嗜冷菌種在 15°C 以下生長，嗜熱菌則高於 40°C(Eshinimaev et al., 2004)。

甲烷單氧氧化酵素的表現與甲烷氧化菌生長環境息息相關，環境中的氧氣以及氮源皆會影響甲烷氧化菌細胞中的單氧氧化酵素的種類，在氧氣不足、硝酸鹽過量時，甲烷氧化酵素會以膜結合性單氧氧化酵素為主，而在硝酸鹽缺乏則表現溶解性的單氧氧化酵素(秦，2015；Scott et al., 1981)。許多金屬離子亦作為酵素輔因子，銅離子則為甲烷氧化菌表現酵素的關鍵因子，膜結合性的氧化酵素容易在高濃度銅離子的環境下表現，並隨著銅離子濃度增加其表現活性更加明顯，因膜結合性甲烷氧化酵素是一種銅依賴性酶，溶解性甲烷單氧氧化酵素則是一種非血紅素鐵酶複合物(Kalyuzhnaya & Xing., 2018)，在低銅離子濃度較容易表現(Zhang et al., 2017)。文獻表示銅離子濃度低於 15  $\mu\text{M}$  時，溶解性甲烷單氧氧化酵素得維持活性，銅離子為 0.03  $\mu\text{M}$  時，三氯乙烯降解率可達 95%(Xing et al., 2018；Bodelier & Steenbergh, 2014)。



表 3.6、影響生物復育之環境因子(盧，1997)

影響因子	控制條件 / 產生效應
氧	盡可能以好氧方式進行，厭氧可能產生更氧化態的最終產物
溫度	在 5-30°C 的溫度範圍內，每增加 10°C 即加倍其分解效率
pH	5.5-8.5 範圍有利於生物分解
吸附	許多有機污染物會被土壤中的有機質吸附，影響生物分解
毒性	須維持在非毒性環境以利生物復育
營養鹽	氮、磷及其他營養鹽為生物生長所必須的
水溶性	有機污染物在受污染土壤中的水溶性會影響生物分解速率及程度
揮發性	有機污染物可能因揮發而消耗
土壤含水量	固相生物復育系統須維持其保水率 25-85%
電子接受者	好氧環境下氧是最終電子接收者， 厭氧環境下 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 及 $\text{SO}_4^{2-}$ 可作為電子接受者

甲烷氧化菌的生長標準培養基為硝酸鹽與礦物鹽組成，原因在於氮會與甲烷競爭甲烷單氧化酶，因此氮對於甲烷氧化有抑制效果(Hanson & Hanson, 1996)。許多文獻表明部分甲烷氧化菌有固氮作用，尤其與植物相關之甲烷氧化菌皆具有固氮基因，顯示甲烷氧化菌與其他固氮菌屬之間存在交互關係，而甲烷氧化菌將氮氧化成亞硝酸的能力會影響甲烷被氧化的效應，雖有文獻指出甲烷氧化菌不與氮氧化微生物相互競爭，但甲烷氧化酶會因共代謝失去能量(Fergala et al., 2018; Auman et al., 2001)。

#### 4.4 甲烷氧化菌好氧共代謝氯乙烯類污染物國外現地整治技術與案例

表 3.7 為可現地好氧共代謝含氯碳氫化合物之應用技術彙整(Frascari et al., 2015)。其中共代謝氣提法為申請計畫預計操作並參考之策略，共代謝氣提法適用於飽和含水層，設置深達含水層之注射井，將主要基質-甲烷以氣體型態注入，文獻指出操作之甲烷與空氣的體積比多落在 1-4% 範圍，可視情況與土壤抽氣裝置(soil vapor extraction)整合(Frascari et al., 2015)。好氧共代謝氣提法的第一個國外應用案例位於南卡羅來納州，場址受到 1 mg/L 三氯乙烯的污染，設置水平式的氣提井，結合水平式的土壤抽氣裝置，可移除 95% 三氯乙烯(Brockman et al., 1995)；另一個整治案例位於加州，場址受到 0.2-0.3 mg/L 三氯乙烯污染，該場址僅採用垂直氣提





表 3.7、可現地好氧共代謝含氯碳氫化合物的應用技術(Frascari et al., 2015)

技術	優點	缺點
地下水抽出、添加藥劑與回注 (適用飽和含水層)	• 可有效控制氧氣與生長基質添加濃度	• 需要耗能抽出地下水 • 生物反應有效區域有限
氣提同時注藥 (air sparging with in-well addition of growth substrate) (適用飽和含水層)	• 無須抽取地下水 • 不會有井堵塞問題	• 不適合深污染深度的場址 • 須結合土壤抽氣裝置以減少污染物逸散
灌注氧氣與生長基質 (In-well addition of oxygen and growth substrate) (適用飽和含水層)	• 無須抽取地下水 • 若污染濃度高，可與stripping技術結合	• 控制不佳易引起井堵塞
共代謝氣提法(cometabolic air sparging) (適用飽和含水層)	• 結合含水層水平曝氣，可形成廣闊的生物反應區域 • 不會造成井與含水層堵塞問題	• 須結合土壤抽氣裝置以減少污染物逸散
厭氧脫氯串接好氧共代謝 (aerobic cometabolism downstream a reductive dichlorination process) (適用飽和含水層)	• 以整治列車概念整合，全面去除含氯碳氫化合物	• 厭氧區的氧化作用可能造成鐵沉澱，進而引起堵塞現象
共代謝通氣法(cometabolic bioventing) (適用不飽和含水層)	• 可與共代謝氣提法結合	• 可能造成污染物逸散

井，未加設土壤抽氣裝置，場址連續供應空氣、一氧化二氮(0.8%)和磷酸三乙酯(0.08%)，但採用間歇式供應甲烷，甲烷濃度為 1.4%，一天供應 12 小時，結果顯示在距離注入井 44 英尺以內的五口監測井可觀察到溶氧濃度增加，在距離注入井最近的監測井之三氯乙烯濃度平均下降 92% (Eggers et al., 2008)。

## 5. 管柱試驗模擬受污染之地下含水層

地下水流動緩慢，雖受制於地形條件，地下水流速各有不同，但與地表水相比，地下水以每年移動百米左右為流動較快之地下含水層。地下岩層以粒徑大小分為不同土質顆粒，即分為黏土、淤泥、沙粒、碎石以及鵝卵石，又因土壤顆粒不同其土壤的儲水率有所差異，而導致不同的傳輸現象與傳輸係數。土壤與地下水污染物不計其數，污染物的物化特性不同亦會導致不一樣的傳輸現象，污染物隨著地下水流移動之行為稱為橫向擴散，污染物受比重及重力影響而下沉堆積於岩層則為垂直方向的擴散，另因土壤性質不同，污染物吸附在多孔介質上的程度不一即為分散。為

模擬地下水於含水層的流動與污染物的傳輸，實驗室多以管柱模擬特定污染物或是一系列物質的傳輸行為、降解以及吸附現象(Banzhaf & Hebig, 2016)，近期氯乙烯類污染物好氧共代謝的發表亦多半採用管柱實驗進行探究(Chen et al., 2020;





2021)，顯示管柱實驗對於模擬含水層的生物降解具有代表性。

### 5.1 管柱實驗影響因子

管柱試驗的原理是以特定介質填入管柱之中，以水泵加入特定污染物研究其於多孔介質中的傳輸行為，並添加示蹤劑以利觀察動態的過程。地下含水層因岩層與水位關係分為飽和及不飽和含水層，而管柱試驗皆可達成兩者的模擬研究，甚至可設置不同飽和度並模擬地下水位的波動。管柱試驗尚未標準化管柱之尺寸，管柱的尺寸不一歸因於廣泛的研究應用，短的管柱可實現快速又多次重複的研究，而較長的管柱則可觀察到較多傳輸行為；管柱長與內徑的比例也很重要，在小直徑的長柱中主要傳輸沿著管壁和堆積物之顆粒邊界來發生流動，若直徑過大，則可能會發生橫向擴散，導致成分遷移變得較為複雜；管柱試驗通常設計為主要流動的物質遷移，故需設計管柱尺寸以排除物質的橫向分散，文獻說明管柱長度相對的直徑過大可能妨礙添加物在管柱中的均勻擴散(Banzhaf & Hebig, 2016; Lewis & Sjöstrom, 2010)。管柱的製作材料通常以惰性板材製成，如鐵氟龍、不銹鋼、PVC 及玻璃等，在流體進入管柱時，為確保添加物與流體均勻流入管中，許多研究在管柱入口放置金屬網、多孔陶瓷板或玻璃材料等，透過類似過濾的行為均質進入的流體及物質，並可減少管柱入口及管內填料的水力差距，而管柱內填充物通常模擬土壤之多孔介質的呈現，如生物炭、玻璃填料、人造材料等，抑或直接填充現地土壤，表 3.8 中整理管柱試驗之管柱所用材料。

除管柱材料外，流體性質以及待測物的特性亦為管柱試驗之影響因子，飽和的管柱試驗所用模型以達西公式為主，流體黏度即為傳導係數的條件之一，以個別的代測物的密度、黏度所得之傳導係數，再代入達西公式可得其達西流量，即添加物質的傳輸速度。式 1 為中興大學盧至人教授研究團隊所修改之氯乙烯類污染物傳輸公式(張，2012)，以飽和管柱模擬氯乙烯類化學物降解與傳輸行為。

$$v_x = \frac{v}{n_e} = \frac{q}{n_e A} = \frac{Ki}{n_e} \quad (\text{式 1})$$

表 3.8、管柱試驗之管柱材料

管材	參考文獻	填料	參考文獻
玻璃	Chang et al., 2017	石英砂	Chang et al., 2017
不鏽鋼	Ke et al., 2012	沸石	Attia et al., 2013
聚乙烯	Bertelkamp et al., 2012	生物炭	Yao, 2012
聚丙烯	Srivastava et al., 2009	矽膠	Lorphensri et al., 2007



其中  $n_e$  為土壤之有效孔隙率； $q$  地下水流量( $L^3/T$ )； $A$  為地下水流垂直相之截面積或管柱之截面積； $K$  為水力傳導係數； $i$  為水力梯度。

## 5.2 可模擬之污染物

表 3.9 為以管柱試驗研究污染物或化學品之傳輸行為的相關發表彙整。欲將污染物移除，須確定污染範圍及擴散程度，DNAPL 主要沉積於含水層底部，又微溶解於水，污染範圍難以界定，其中四氯乙烯或三氯乙烯的污染常留存於現地，但二氯乙烯及氯乙烯較易擴散至更大的範圍，研究顯示厭氧串聯好氧等方式得以解決窘境，另有文獻表示好氧共代謝可將三氯乙烯以下之氯乙烯類污染物順利礦化為二氧化碳(張，2012；秦，2015)。

表 3.9、彙整污染物於管柱試驗模擬多孔介質之傳輸

污染物	管柱	模擬含水層	參考文獻
四氯乙烯	厭氧/好氧聯合	飽和含水層	Chang et al., 2017
1, 2-二氯乙烯	厭氧/好氧聯合	飽和含水層/反應牆	De Marines et al., 2023
硝酸鹽還原	控制氧氣	飽和含水層	Banzhaf & Hebig, 2016
鐵還原	控制氧氣	飽和含水層	Banzhaf & Hebig, 2016
六價鉻	厭氧	飽和含水層	林，2022
有機污染物	好氧	控制水位	Sinke et al., 1998

## 6. 分子生物技術於環境微生物檢測

近年分子生物技術快速發展，已成為分析微生物菌相不可或缺之工具，有助對微生物進行不同層面的探討。傳統微生物培養方法費時，且大部分菌種無法以傳統培養方式獲得，成為釐清微生物族群及其相互關係的重大阻礙；而分子生物技術雖無法如傳統培養獲得單一純菌，卻能夠快速且大量定性及定量分析目標環境的微生物族群，以利後續對污染場址進行生物整治的條件掌控與策略擬定，圖 3.8 為分子生物技術於微生物族群鑑定之相關分類(Dorigo et al., 2005)。以下分別闡述微生物菌相分析常用之分子生物技術。

(1) 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR): 1980 年代由 Kary Mullis 所開發之技術，用於擴增目標 DNA 片段，圖 3.9 為 PCR 增幅目標 DNA 片段之步驟。PCR 反應主要分為三個階段：

- i. 變性(Denaturation)：利用高溫(94-95°C)破壞雙股 DNA 間的氫鍵，而使兩股 DNA 解螺旋。

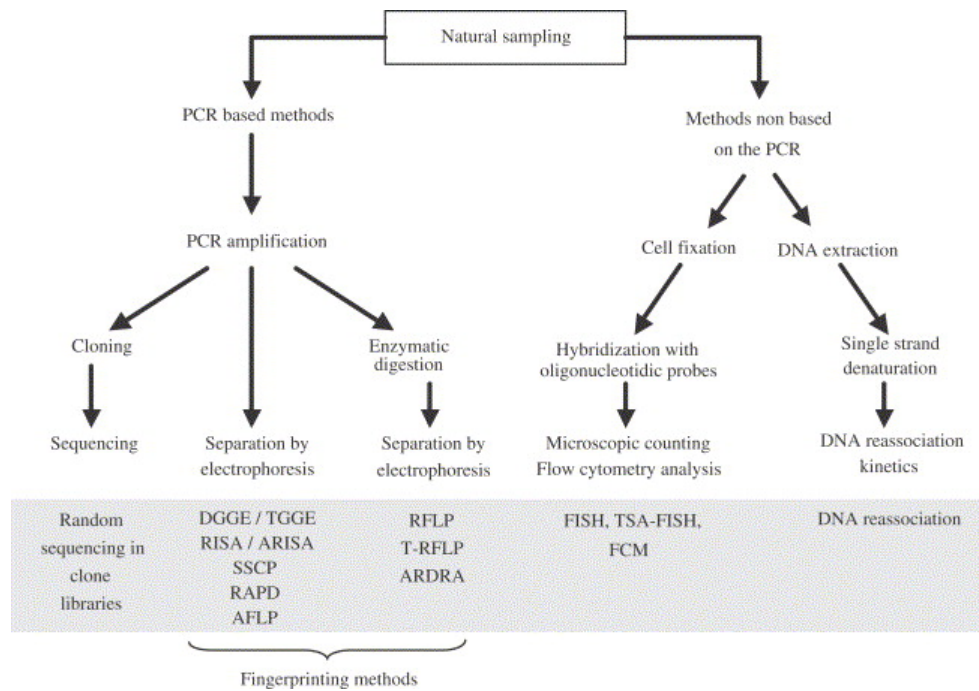


圖 3.8、分子生物技術用於自然微生物族群之鑑定分類(Dorigo et al., 2005)

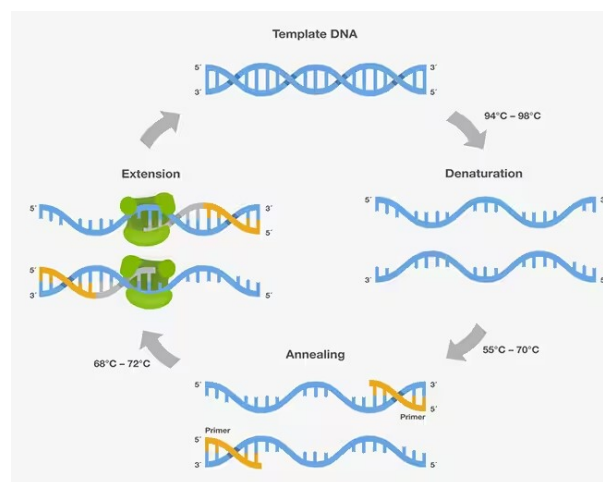


圖 3.9、PCR 步驟示意圖(Thermo Fisher, 2023)

- ii. 黏合(Annealing)：雙股 DNA 解螺旋後，溫度逐漸降低，使引子對得以與單股 DNA 目標片段互補黏合。
- iii. 延長(Extension)：提高溫度至  $72^{\circ}\text{C}$ ，使 DNA 聚合酶延長 DNA 片段。上述三步驟重複  $n$  個循環，藉以得到  $2n$  條數 DNA。

(2)即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time Quantitative PCR, qPCR)：於 1990 年代問世(Higuchi et al., 1993)，圖 3.10 為 qPCR 分析原理。可用於定量目標 DNA 片段濃度，挾帶可即時定量的優勢，qPCR 逐漸成為近年所倚重之微生物調查工具，廣

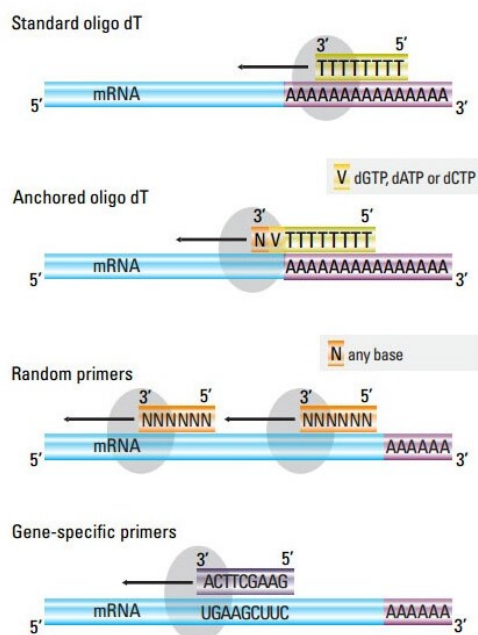


圖 3.10、qPCR 原理示意圖(Thermo Fisher, 2023)

泛應用於氯乙烯類污染物、石油總碳氫化合物、多環芳香烴、燃料含氧化合物以及放射性核種生物降解能力的調查(Biassoni & Raso, 2016)。qPCR 原理同 PCR，可將目標基因以指數方式擴增，反應藥劑與一般 PCR 大多相同，唯額外添加可附著於雙股 DNA 上之螢光染劑(如 SYBR Green)或螢光標記探針(如 Taqman probe)；以螢光染劑為例，當雙股 DNA 濃度越高，可結合至雙股 DNA 的螢光染劑越多，則螢光訊號越強，機器會記錄每一個循環之螢光訊號，當螢光訊號高於機器的偵測閾值，對應的 PCR 循環數稱作 Ct 值，Ct 值越小，意謂 DNA 濃度越高，表示僅需經過少量增幅循環數即可被機器測得，相反的，DNA 濃度越低，則 Ct 值越高；基於上述，只要以已知濃度之 DNA 配製一稀釋系列溶液，再將對應的 Ct 值與稀釋濃度製作一標準曲線，環境樣品 Ct 值以內插法代入檢量線之中，即可獲得環境樣品之目標基因濃度。雖 qPCR 被廣泛的應用，但此技術仍有其使用限制或疑慮之處，特別是環境樣品微量的腐植酸或金屬離子皆會影響 PCR 擴增反應，造成誤差；這些抑制物非常常見，故仍有許多學者致力研究標準作業流程(Lebrón et al., 2011)，以提升數據可信度。

- (3) 次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS): 1970 年代 Frederick Sanger 研究出鏈終止定序法(chain termination)，奠定後續 NGS 的基礎，2008 年次世代定序與質譜分析技術問世，逐漸取代傳統的鏈終止定序法，可一次大量且快速進行短序列片段(Short Reads)定序，原理為如圖 3.11 所示。將 DNA 片段變成大量短片段，接上轉接序列的待定序基因小片段，置入表面帶有互補轉接序列的晶片，透過橋式聚合酶連鎖反應進行擴增，接著置入依不同鹼基而標記特定且可移除螢光分子的 dNTP 與反應試劑，如此反覆進行螢光標記移除、試劑置換與偵測，



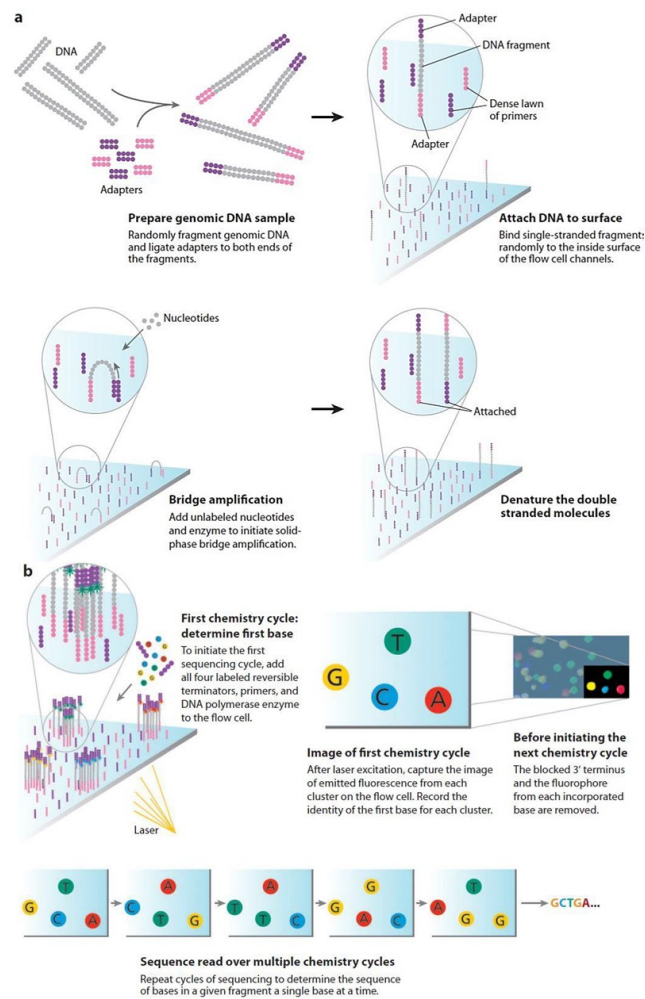


圖 3.11、Illumina 公司所使用之合成定序原理(Mardis, 2008)

以快速讀取大量之定序結果，最後輔以資訊軟體系統，即可分析配對出完整之 DNA 序列(李和莊，2010)。

## 7. 實驗室研究成果

計畫申請人實驗室於五年前開始對氯乙烯類生物降解進行研究，從厭氧還原脫氯機制逐漸轉換甲烷氧化菌群好氧共代謝氯乙烯類污染物。高氯數氯乙烯類化合物的降解主要以厭氧還原脫氯為主，著名菌屬 *Dehalococcoides* 不同菌種具有不同還原脫氯功能性基因(*vcrA*、*bvcA* 與 *tceA*)，計畫申請人研究團隊曾針對污染場址的菌屬 *Dehalococcoides* 還原脫氯功能性基因進行分析與定量；另使用次世代定序技術分析污染場址於枯、豐水期菌相的差異；並使用螢光染劑 Acridine orange (AO) 結合流式細胞儀分析污染場址微生物之死活菌數，最後彙整各項環境水質參數與生物性數據，分別以權重法與統計分析瞭解場址之生物還原脫氯潛勢以及環境因子與菌屬 *Dehalococcoides* 暨其還原脫氯功能性基因間的相關性，研究結果顯示場址雖存有脫氯菌群，但其濃度不足以有效降解氯乙烯類污染物(施，2020)。





基於部分污染場址為低氯數氯乙烯類污染物污染，且場址水文環境偏向好氧，是以開展計畫申請人好氧共代謝氯乙烯類污染物的研究，研究團隊從雲林科技大學雲夢湖底泥(代號 M)及牛糞(代號 S)收集菌群，以甲烷作為唯一碳源，並添加三氯乙烯進行長期馴養，馴養期間藉由次世代序列技術分析菌相及測定功能性基因，探討菌相組成變化及表現之甲烷單氧氧化酵素類型；菌群 M 及 S 在馴養過程中，甲烷利用率及三氯乙烯降解率逐漸提高，馴養期間添加銅離子與降低甲烷濃度能增強菌群對於三氯乙烯的降解；菌相結果指出，菌群 M 及 S 中皆以 Type II 甲烷氧化菌 *Methylocystis* sp. 為優勢菌種；此外，兩菌群皆可測得功能性基因 *pmoA*，顯示本實驗之氯乙烯類化合物皆由膜結合性甲烷單氧氧化酵素共代謝而降解。菌群 M 於三氯乙烯、cis-1,2-二氯乙烯及氯乙烯單獨存在下，耐受濃度皆可達 0.6 mg/L；上述三種氯乙烯類污染物同時存在下，菌群 M 對三種污染物皆展現好氧共代謝能力，特別可完全降解低氯數的 cis-1,2-二氯乙烯及氯乙烯(林，2021)。另外，研究團隊亦製備甲烷微奈米氣泡水，用以取代甲烷氣體的灌注，探討甲烷氧化菌群於不同甲烷微奈米氣泡比例下，對混合氯乙烯類污染物之共代謝情形(林，2021)。



## 四、研究方法及過程

### 1. 研究架構

基於現地生物整治氯乙烯類污染物多採用厭氧還原機制，然自然環境條件不一定皆適用於厭氧操作，故開發好氧共代謝之整治技術，以利氯乙烯類污染之好氧場址進行生物降解。圖 4.1 為申請計畫之基礎實驗架構。為使好氧整治場址以好氧共代謝降解氯乙烯類污染物，本計畫規劃馴養現地甲烷氧化菌群，取得受污染地下水環境樣品後，離心收集菌體作為馴養菌群來源，並灌入甲烷及添加三氯乙烯(整治場址唯一的污染物)馴養，馴養期間定期量測甲烷及三氯乙烯濃度變化，另進行微生物族群結構與甲烷氧化功能性基因分析；待目標菌群成功馴養後，以管柱試驗模擬受三氯乙烯污染含水層的生物整治，以三支管柱平行操作以相互驗證，管柱試驗以細長玻璃管柱進行單向擴散之模擬傳輸，藉由調整管柱添加的甲烷濃度、三氯乙烯濃度、管柱流速及環境因子，探討三氯乙烯去除與各影響因子間的相互關係，並即時分析水質參數及功能性基因定量，最後回收管柱內微生物進行菌相分析，獲得好氧共代謝生物整治三氯乙烯之建議操作參數。

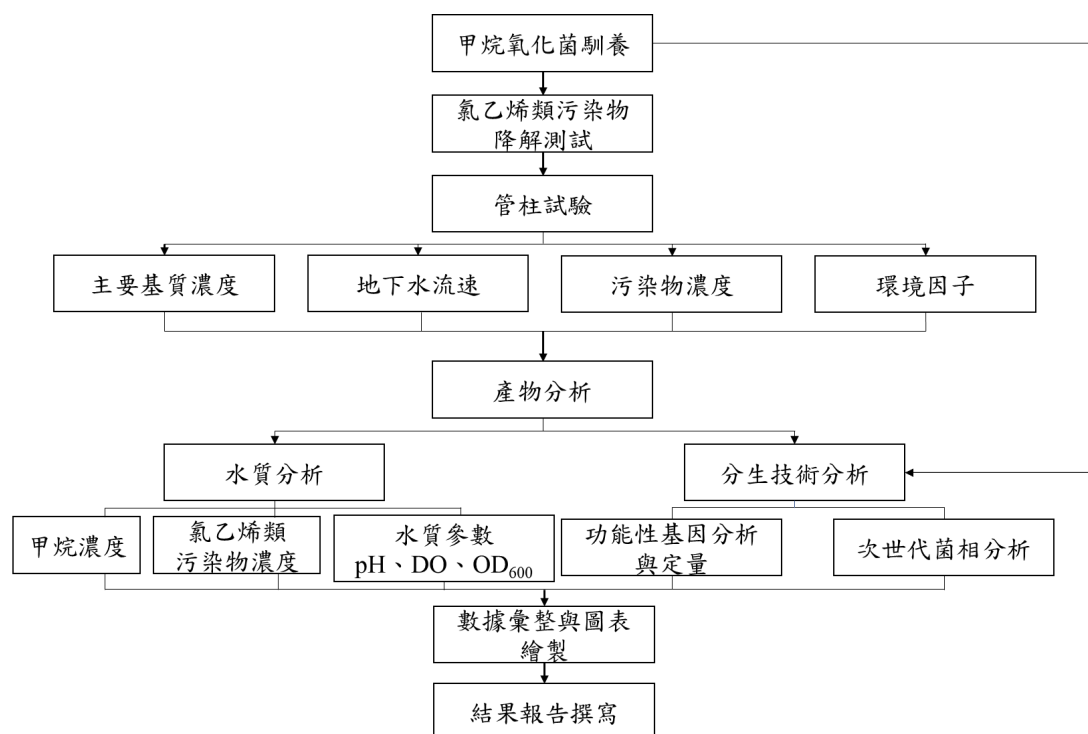


圖 4.1、計畫研究架構圖

### 2. 現地菌群的場址現況

研究使用的甲烷氧化菌群取自污染場址，污染場址位於台中市西屯工業區某公司，環保局監測井(B00583)過去多次測得三氯乙烯濃度高於地下水污染管制標準，



場址內監測井於 111 年年底測得之三氯乙烯濃度高於地下水污染管制標準，是以被公告為地下水污染控制場址；場址地表下約 4 公尺內以回填土、紅土為主，下方則均為礫石夾砂為主，地下水流向為西北向東南流動，水力傳導係數大致符合礫石層之水力傳導係數( $K > 10^{-3}$  cm/sec)。本計畫馴養的甲烷氧化菌群來自三口監測井，MW02 與 B00583 位於污染場址，監測井 B00422 位於場址外下游，三口監測井的溶氧與 ORP 量測結果顯示地下水為好氧環境，但地下水質偏酸，圖 4.2 為現地污染場址暨三口井之配置圖。



圖 4.2、現地污染場址暨三口井之配置圖

### 3. 現地菌群採樣後馴養

取得現地下水樣後，將水樣以抽氣過濾裝置留存於濾紙上，將含有菌群的濾紙移入於血清瓶中，初始血清瓶中含有 120 mL NSM 培養基(如表 4.1 所示)，由於地下水 pH 偏酸，因此配製中性(pH 7)與酸性(pH5)兩種 NSM 培養基；以鐵氟龍墊片與鋁蓋密封血清瓶後，將 0.1 mg/L 三氯乙烯注入血清瓶內，並注入甲烷，使瓶內頂空甲烷濃度為 10%；隨後將血清瓶倒置，於 25°C 與 120 rpm 震盪培養，定期分析甲烷與三氯乙烯濃度變化，視甲烷與三氯乙烯殘留濃度進行培養基置換；置換時，若瓶中菌數少，則將血清瓶內菌量全數離心收集，再將離心後菌體轉移入 120 mL 新鮮 NSM 培養基，若菌量多之馴養組別，則吸取 20 mL 菌液，加入裝有 100 mL 新鮮 NSM 培養基的血清瓶中；馴養期間視三氯乙烯降解與甲烷利用，階段式增加三氯乙烯濃度，每次以增加 0.1 mg/L 三氯乙烯為間隔，另就每馴養階段穩定期，收集部分菌體進行 total genomic DNA 的萃取，用於甲烷氧化兩種單氧氧化酵素功能性基因



表 4.1、NMS 培養基組成(Bowman &amp; Sayler, 1994)

成分	濃度	成分	濃度
Methane	1-10%	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0 μM
Trichloroethylene	0.1-0.4 mg/L	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.6 μM
NaNO <sub>3</sub>	1.0 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.0 μM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.4 μM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.15 mM	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.4 μM
CaCl <sub>2</sub>	47.6 μM	KI	1.0 μM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.9 mM	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40 μM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 mM		

(*mmoX* 與 *pmoA*)，以及甲醇脫氫酶基因(*mxoF*)分析，並以次世代定序技術分析菌相，作為後續好氧共代謝管柱試驗成效評估的依據。

#### 4. 管柱系統架設暨管柱試驗

管柱系統示意圖如圖 4.3 所示。系統以玻璃管柱與水樣採集管組成，玻璃管柱總長 80 公分，內徑為 3 公分，設有 7 個水樣採樣口。管柱內前端填入玻璃珠以均勻進流溶液，填入秤重後石英砂(0.03-0.1 mm 模擬現地土質)並壓實，孔隙率約 0.35，管柱後端再填入玻璃珠以完成密封。另依據文獻配製模擬地下水，地下水組成見表 4.2。將地下水裝填入 2 L 或 6 L 的氣密性水袋，地下水填充水袋 9/10 體積，隨後將甲烷曝入模擬地下水使地下水中溶解甲烷達飽和，並於袋中頂空充滿 100% 甲烷，三氯乙烯以注射幫浦注入水袋內，將水袋置於 28°C 震盪培養箱平衡過夜，平衡後分析確認三氯乙烯濃度無誤即開始進流；管柱實驗架設 A、B 與 C 三支管柱，管柱 A 為生物添加組，管柱 B 為生物添加與生物刺激組，管柱 C 為生物刺激組，三管柱系統實體架設圖見圖 4.4。三管柱皆流入現地地下水(井編號為 B00422)各 330 mL，管柱 A 與 B 額外添加實驗室馴養甲烷氧化菌群約 330 mL；現地水力坡降依據現地數值設為 0.15，進一步探討不同三氯乙烯濃度(0.05、0.2 與 0.4 mg/L)、地下水流量(0.06 與 0.02 mL/min)、頂空甲烷濃度(100%與 40%)與地下水 pH (pH7 和 5)等因子對於三氯乙烯好氧共代謝之影響；藉由定期測定採樣口 1 和 7 獲得水質參數，以及收集出流水進行功能性基因數量分析，彙整所有數據與圖表瞭解管柱中微生物族群變化及好氧共代謝最佳操作條件。



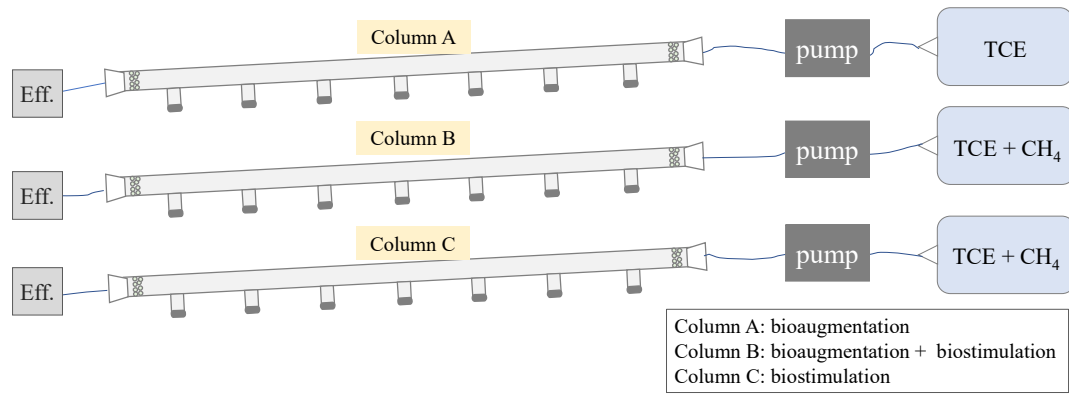


圖 4.3、管柱系統示意圖

表 4.2、模擬地下水組成(Chen et al., 2020)

成分	濃度	成分	濃度
Methane	依據實驗設計添加	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.06 mg/L
Trichloroethylene	依據實驗設計添加	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.25 mg/L
NaNO <sub>3</sub>	0.083 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.007 mg/L
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.008 g/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.048 mg/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.015 g/L	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.26 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.038 g/L	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.047 mg/L
FeSO <sub>4</sub>	1.085 mg/L	NaWO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.034 mg/L	SeO <sub>2</sub>	0.013 mg/L



圖 4.4、管柱系統實體架設圖





## 5. 菌相與功能性基因分析

### 5.1 微生物 DNA 萃取

地下水中菌數較少，因此將地下水樣先進行濃縮，接著再利用標準 DNA 商業套組 DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (QIAGEN, Germany) 萃取地下水中之 total genomic DNA，操作步驟依照套組建議步驟進行，萃取後之 DNA 產物則保存於-20°C下備用。

### 5.2 即時定量聚合酶連鎖反應

定量聚合酶連鎖反應可對樣品內目標 DNA 的片段數(copy number)進行定量，因此如同一般化合物濃度分析，須建立檢量線，並以內插法方式換算目標 DNA 的片段數；由於目標 DNA 片段長度各有不同，因此需先製備含有目標基因 DNA 片段的標準品，研究使用之標準品係從環境馴養菌群中以 PCR 擴增，再將三種目標基因片段(甲烷單氧化酵素功能性基因 *pmoA* 及 *mmoX*，以及甲醇脫氫酶 *mxoF* 基因)，委託明欣生物科技股份有限公司製備質體標準品。以 LightCycle® FasterStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Quick Reference Procedure (Roche, Germany)操作，使用之引子對彙整如表 4.3 所示。即時定量聚合酶連鎖反應試劑與反應操作條件見表 4.4 及表 4.5。

根據 DNA 稀釋系列之標準品的序列濃度與 Ct value 帶入下列公式，製備標準濃度曲線，以換算成 gene copies/mL

gene copies =

$$\frac{\text{標準品 DNA 濃度 } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 10^{-9} \frac{\text{g}}{\text{ng}} \times 10^3 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \times (6.02 \times 10^{23} \text{ copies/mol})}{(\text{質體鹼基長度 bp}) \times (660 \text{ g/mol/bp})}$$

質體鹼基長度(bp) = plasmid + 功能性基因

鹼基對分子亮 = 660 g

dsDNA 分子量 = 鹼基對長度 × (660 g/鹼基對)

1 mol =  $6.02 \times 10^{23}$  copies



表 4.3、聚合酶連鎖反應之引子對

Primer	Target	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Reference
189f Mb611r	<i>pmoA</i>	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTTACC	472	Shukla et al., 2009
<i>mmoX</i> f882 <i>mmoX</i> r1403	<i>mmoX</i>	GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTCG	521	Newby et al., 2004
F1003 R1561	<i>mxoF</i>	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT GGGCAGCATGAAGGGCTCCC	558	Paszczyński et al., 2011

表 4.4、即時定量聚合酶連鎖反應操作試劑

Materials	Volume (μL)
DNA template	2
Forward primer (10 μM)	0.5
Reverse primer (10 μM)	0.5
IQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green supermix (2×)	10
Nuclease-free water	7
Total	20

表 4.5、即時定量聚合酶連鎖反應操作條件

Primer set	Program	Cycles
189f Mb611r	94°C, 3 min	1
	94°C, 1 min; 55°C, 5 min; 72°C, 1 min	40
	95°C, 10sec; 65°C to 95°C increment 0.5°C, 5 sec	1
<i>mmoX</i> f882 <i>mmoX</i> r1403	94°C, 5 min	1
	94°C, 1 min; 57.3°C, 1 min; 72°C, 1 min	40
	95°C, 10sec; 65°C to 95°C increment 0.5°C, 5 sec	1
F1003 R1561	94°C, 5 min	1
	94°C, 1 min; 63°C, 30 sec; 72°C, 1 min	40
	95°C, 10sec; 65°C to 95°C increment 0.5°C, 5 sec	1

### 5.3 次世代序列菌相分析

次世代序列菌相分析作業委託生技公司基龍米克斯(Genomics)執行，上機前需先以確認抽取之 DNA 品質，引子對為針對 16S rDNA V3-V4 區域的引子對，如表



## 研究方法與過程

4.6 所示。次世代定序儀器為 illumina Miseq，以多種軟體進行 DNA 序列數據之彙整，統計軟體彙整見表 4.7。

表 4.6、次世代定序分析使用之引子對暨操作條件(Herlemann et al., 2011)

Primer	Specificity	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)
341F	16S rDNA	CCTACGGGNGGCWGCAG	464
805R	V3-V4 region	GACTACHVGGGTATCTAATCC	
Program			Cycles
98°C, 6 min			1
98°C, 20 s; 51°C, 20 s; 72°C, 12 s			25
72°C, 1 min			1

表 4.7、次世代定序分析統計軟體彙整

Software	Usage description
Trimmomatic	移除轉接子(adapter)序列
Cutadapt	用於去除引子(primer)序列
FastQC	儲存生物序列及其測序品質得分資訊的文字格式
MultiQC	用於品保品管
DADA2	進行雜訊、marginal、chimeric 與重複序列等的判定、校正與移除
QIIME2	用於序列分類與多樣性分析計算

## 6. 基質與污染物濃度分析

實驗使用氣相層析儀(Gas Chromatograph, GC)分析甲烷和氯乙烯類化合物，儀器製造公司及型號分別為 SHIMADZU 與 GC-2014，偵測器為火焰離子偵測器(flame ionization detector, FID)，以 GC-Alumina (30 m x 0.53 mm, Agilent)作為層析管柱，注射口與偵測器溫度分別為 100°C與 300°C，管柱升溫條件為先設定 35°C維持 1 min，接著以 20°C/min 升溫速率至 85°C維持 0.5 min，最後再以 10 °C/min 升溫速率至 140°C維持 8.5 min；載流氣體為氮氣，流量為 20 mL/min。氯乙烯類化合物檢量線製備需先將棕色樣品瓶及丁基橡膠墊片放置 105°C 烘箱去除揮發性有機物(Volatile organic compound, VOCs)；以氯乙烯類化合物標準品配製不同濃度後，各濃度取 5 mL 加入 10 mL 棕色樣品瓶中，以丁基橡膠墊片及鋁蓋壓蓋封瓶並以封口膜包覆瓶口；將棕色樣品瓶倒置於 35°C、120 rpm 震盪一小時達氣液平衡，以 1 mL 氣密針插入樣品瓶內抽取 1.0 mL 之頂空氣體注入 GC-FID 進行氯乙烯類化合物分析；甲烷之標準氣體則利用氣袋填裝，並以不同注入體積至氣相層析儀，同樣以火焰離子偵測器製作檢量線，供不同批次樣品濃度計算，表 4.8 為氣相層析儀之分析條件。



表 4.8、甲烷與三氯乙烯氣相層析儀分析條件

Item	Gas Chromatograph GC-2014
Column	GS-Alumina: 30 m x 0.53 mm, Agilent
Carrier gas, Gas flow	N <sub>2</sub> , 20 mL/min
Detector	FID
Total flow	11 mL/min
Column flow	8 mL/min, linear velocity
Inject temp.	100°C, splitless 35°C hold 1 min
Oven temp.	20°C/min to 85°C hold 0.5 min 10°C/min to 140°C hold 8.5 min
Detect temp.	180°C

## 7. 相關水質參數分析

預計水質分析項目包含溶氧量(dissolved oxygen, DO)、吸光度(optical density, O.D.600)、氧化還原電位(oxidation-reduction potential, ORP)、pH 值與溫度。溶氧量以溶氧計(HACH/HQ430d flexi)搭配螢光溶氧電極進行測定，以分光光度計(ChtomTech, CT-2200)於波長 600 nm 下測定吸光度值變化，氧化還原電位以 HQ411d Meter 量測，pH 值以 Mettler Toledo/EL-20 pH meter 測定，另以標準溶液(pH 4、pH 7)校正，溫度以經標準校正後的溫度計量測。



研究方法與過程

## 8. 工作進度與甘特圖

年月 工作項目	112 年 12 月	113 年 1 月	113 年 2 月	113 年 3 月	113 年 4 月	113 年 5 月	113 年 6 月	113 年 7 月	113 年 8 月	113 年 9 月	113 年 10 月	113 年 11 月	113 年 12 月	114 年 1 月	114 年 2 月	備 註
資料彙集與整理																
馴養現地微生物																
建立分子生物技 術																
微生物活性分析 (功能性基因)																
現地菌相分析																
實驗室管柱實驗																
查核點																
工作進度估計百 分比(累積數)	5 %	10 %	15 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %		80 %		90 %		100 %	
預定查核點	期中		1. 完成可好氧共代謝三氯乙烯之甲烷氧化菌群馴養 2. 建立甲烷氧化菌暨功能性基因分子生物技術分析方法 3. 架設管柱試驗，並完成清水測試													
	成果		1. 成功馴養有效降解低氯數含氯有機物之現地好氧共代謝甲烷氧化菌群 2. 建立甲烷氧化菌暨功能性基因分子生物技術分析方法 3. 以管柱試驗模擬受污染場址含水層，針對相關實驗因子進行好氧共代謝三氯乙烯操作條件優化													





## 五、結果與討論

### 1. 甲烷氧化混合菌群馴養期間之甲烷利用與三氯乙烯去除

本研究使用的混合甲烷氧化菌群取自台中某工業區一處受三氯乙烯污染場址之地下水，研究共取得三口監測井水樣，井號分別為 B00583、MW02 與 B00422，監測井 B00583 隸屬環保局監測井，位於污染場址停車場區域，監測井 MW02 位於污染場址製程區，B00422 為污染場址外監測井，由於污染場址監測井 B00583 及 MW02 測得之三氯乙烯濃度高於地下水污染管制標準，是以被公告為地下水污染控制場址，該場址地下水水質參數如表 5.1 中所示。場址地下水溶氧與氧化還原電位數值顯示為好氧環境，初步研判有利於好氧共代謝的進行，但地下水 pH 偏酸性，因此在馴養時，規劃兩種馴養條件，分別為酸性 pH5±0.02 及中性 pH7±0.02，三口監測井加上兩種 pH 條件暨兩重複的馴養，共計 6 組 12 瓶的混合甲烷氧化菌群，馴養過程之三氯乙烯濃度採取低至高階段式的增加(0.1 mg/L→0.4 mg/L)，以逐步提升馴養甲烷氧化菌群對於三氯乙烯的耐受性，頂空甲烷濃度為 10%，試驗另設有空白組(不添加菌群)作為對照，以確認馴養菌群期間的甲烷與三氯乙烯濃度降低係為生物作用所致，以下就三口監測井甲烷氧化菌群馴養期間的甲烷利用與三氯乙烯降解分項說明。

表 5.1、污染場址內監測井水質檢測結果

井號	採樣深度 (m)	三氯乙烯 (mg/L)	pH	EC	溶氧 (mg/L)	ORP (mV)
B00583	36	0.425	5.41	215	3.24	198.7
MW02	35.5	0.0454	5.71	267	3.90	159.5
B00422	-	-	5.93	245	4.04	287.2

\* B00583 與 MW02 水質取樣分析日期為民國 2023.11.17

\* B00422 水質取樣分析日期為民國 2023.12.22

#### (1) 監測井 MW02

監測井 MW02 位於場址中間(製程區)，民國 112 年 11 月 17 日採樣分析的三氯乙烯濃度為 0.0454 mg/L(見表 5.1)，除三氯乙烯外，其餘氯乙烯類污染物皆未檢出。

圖 5.1 為監測井 MW02 甲烷氧化混合菌群於 pH 5 及 pH 7 條件下馴養期間的甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化。在 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養初期，由於植入的污泥量較大(雜質亦較多)，使得甲烷消耗與三氯乙烯降解情況較不穩定，數據跳動幅度亦大，但後期趨於穩定。進入 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養階段後，在甲烷利用方面，無論是 pH 5 或 pH 7 馴養菌群，皆能在短時間內將 10%頂空甲烷利用完畢；但 pH 5 兩重複



## 結果與討論

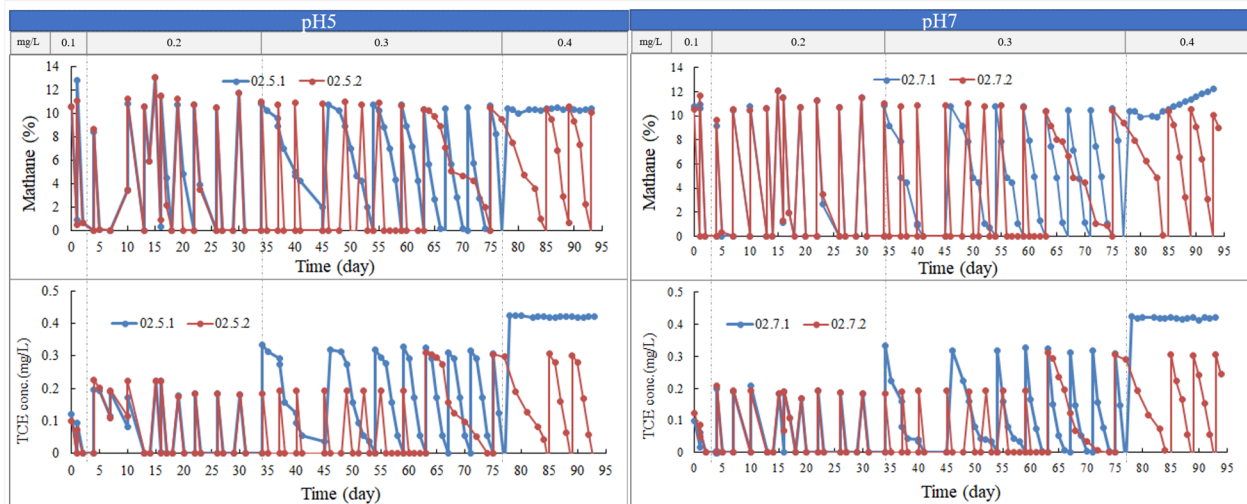


圖 5.1、監測井 MW02 甲烷氧化菌群於 pH 5(左)及 pH 7(右)條件下馴養期間之甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化。圖例代碼說明：監測井號碼.馴養 pH.二重複中的 1 或 2

組的初期三氯乙烯降解效果明顯不佳，多未能在 3 天內將三氯乙烯降解完全，藉由高頻率的置換培養基，方逐漸提升酸性條件下三氯乙烯的降解，在 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養階段末期，無論培養基 pH 為酸性或中性，甲烷的利用與三氯乙烯的降解，皆可穩定於三天內完成。基於 0.2 mg/L 三氯乙烯的降解趨於穩定，是以進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，因擔心 0.3 mg/L 三氯乙烯濃度會對甲烷氧化菌群帶來不可逆的衝擊(特別是污染場址近期的三氯乙烯污染濃度甚低)，因此先就二重複中的一重複進行三氯乙烯濃度的提升(圖中的 02.5.1 與 02.7.1 兩條藍線)，提升三氯乙烯濃度至 0.3 mg/L 後，甲烷氧化菌群無論在甲烷的利用速率與三氯乙烯的降解速率，皆明顯下滑，pH 5 與 pH 7 分別需要 11 天與 8 天方能將甲烷幾近利用完全，pH 5 的甲烷曲線有明顯的遲滯，pH 7 則無，兩條件下的三氯乙烯降解也與甲烷利用有相同的趨勢，推測不同馴養條件，菌群結構略有不同所致；但隨著培養基的定期置換，甲烷利用與三氯乙烯降解兩速率明顯增加，顯示馴養的必要性，後續亦將另一重複組(圖中紅色曲線的 02.5.2 與 02.7.2)的三氯乙烯濃度由 0.2 mg/L 增加至 0.3 mg/L，提高三氯乙烯濃度至 0.3 mg/L 後，同第一重複組別，甲烷利用與三氯乙烯降解皆明顯變差，因此須持續馴養；而第一重複組別於 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養期間的甲烷與三氯乙烯降解日趨穩定，故於第 77 天將其三氯乙烯添加濃度增加至 0.4 mg/L，而另一重複組別仍維持 0.3 mg/L 持續馴養，結果顯示 0.4 mg/L 對菌群造成嚴重抑制，甲烷不再利用，顯示監測井 MW02 馴養菌群最高三氯乙烯降解濃度僅為 0.3 mg/L。

## (2) 監測井 B000583

111 年環保局土水計畫於 10 月設置監測井 B000583，調查結果顯示地下水三氯乙烯超過管制標準(0.05 mg/L)，是三口井中濃度最高的，1,1-二氯乙烯與氯乙烯分



析濃度皆 $< 0.01 \text{ mg/L}$ ，112 年公告為污染控制場址及地下水管制區。過濾該口井的地下水樣時，污泥量最為厚重。

圖 5.2 為監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件下馴養期間之甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化。植種污泥到培養基後，可觀察到甲烷消耗迅速，進入  $0.2 \text{ mg/L}$  三氯乙烯馴養階段後，兩種 pH 條件之甲烷利用情況良好，但 pH 5 的三氯乙烯降解在此階段前期不甚理想，規律更換基質後，兩種 pH 下的三氯乙烯降解逐漸穩定，甲烷利用亦趨於穩定。為免三氯乙烯濃度衝擊，同樣先就一重複組別進行三氯乙烯濃度調整，結果兩種 pH 條件下的甲烷利用速率明顯趨緩，其中酸性條件(pH 5)初期利用速率較低，在此馴養階段的第一周期的兩 pH 條件甲烷皆未利用完畢，而三氯乙烯的降解一開始無明顯遲滯，特別的是，無論在甲烷利用或三氯乙烯降解上，在此週期中皆呈現階梯狀的曲線變化，甲烷消耗似乎分成二個階段，三氯乙烯的降解亦然，觀察有中間趨緩又繼續迅速降解完畢，此與另兩口井不同，顯示三口監測井的內生物結構應有所不同，基於第一重複組別於  $0.3 \text{ mg/L}$  三氯乙烯條件下的三氯乙烯與甲烷利用趨於穩定，故於第 78 天將第一重複組別之三氯乙烯馴養濃度上修至  $0.4 \text{ mg/L}$ ，而第二重複組別則於第 64 天方進入  $0.3 \text{ mg/L}$  三氯乙烯馴養階段，第二重複組別進入  $0.3 \text{ mg/L}$  三氯乙烯馴養階段的初期表現同第一重複組別，甲烷與三氯乙烯降解曲線有明顯的階梯狀；進入  $0.4 \text{ mg/L}$  三氯乙烯馴養階段的第一重複組別，其初期甲烷利用與三氯乙烯降解略為延長，但中性與酸性條件差異不大，整體較監測井 MW02 馴養菌群佳，且持續馴養後，三氯乙烯和甲烷利用趨於穩定，約略於 7-8 天內利用與降解完畢。

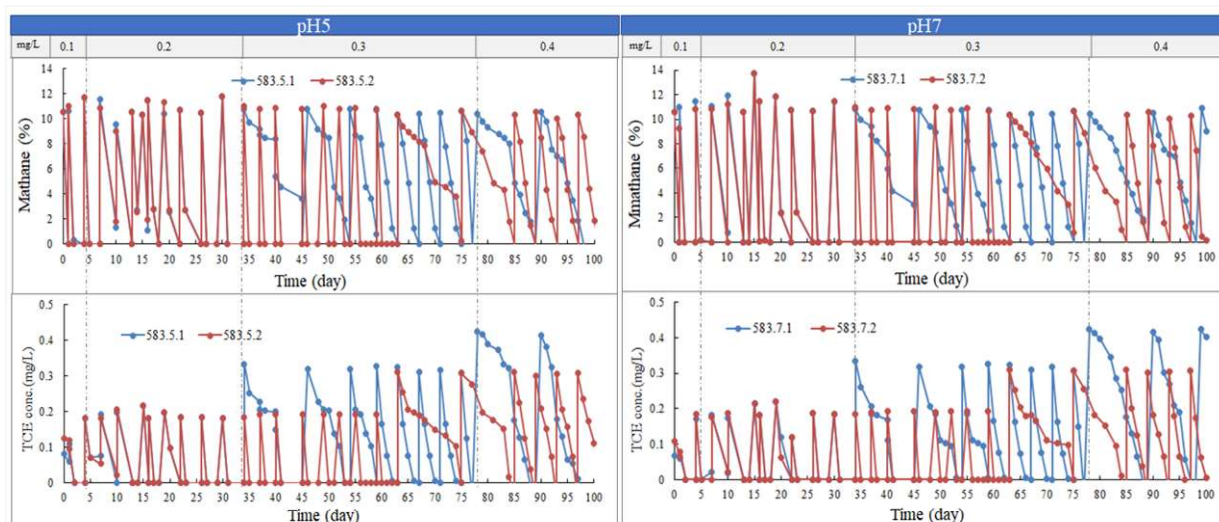


圖 5.2、監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 pH5(左)及 pH7(右)條件下馴養期間之甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化。圖例代碼說明：監測井號碼.馴養 pH.二重複中的 1 或 2，水平黑色虛線表示將菌群轉移至新培養基的濃度





## 結果與討論

## (3) 監測井 B00422

監測井 B00422 位為污染場址外下游區域，由於為砂質土壤，水利傳導係數  $K$  為  $7.11 \times 10^{-3}$  cm/sec，過濾此井地下水樣發現污泥量相較於場內之監測井少許多，近期雖未有該井三氯乙烯濃度分析數值，但因位處下游，仍委請顧問公司一併採樣。

監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件下馴養期間之甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化如圖 5.3 所示。從監測井 B00422 取得的污泥沉澱量雖不多，但以 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養期間，未有明顯的遲滯現象，甲烷利用亦相對迅速，pH 5 與 pH 7 的三氯乙烯降解未有顯著的差異，與監測井 MW02 不同，更換基質後一日內即可完全降解三氯乙烯。基於 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養趨於穩定，同樣將第一重複的三氯乙烯濃度於第 35 天提高至 0.3 mg/L，進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段後，同另兩口監測井結果，三氯乙烯降解時間明顯拉長，甲烷利用速率趨緩，pH 5 與 pH 7 組別同樣皆需要 11 天方可將甲烷利用完畢，三氯乙烯須要 8 天方幾近完全降解；但再次更換基質後，菌群活性逐漸提升，完全降解 0.3 mg/L 三氯乙烯時間縮短，甲烷利用情況同步於三氯乙烯降解，表示該菌群逐漸適應高濃度三氯乙烯環境，並在利用甲烷的同時好氧共代謝三氯乙烯，但中性條件的三氯乙烯降解略優於酸性條件；第二重複於第 64 天方開始進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，第二重複初期的三氯乙烯與甲烷降解與利用同第一重複不甚理想，但經過 2-3 週期後，開始呈現穩定；第一重複於第 78 天進入 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段，第一週期的甲烷利用與三氯乙烯降解所需時間因調高三氯乙烯馴養濃度而明顯延長，隨後隨著馴養週期增加，完全三氯乙烯降解與甲烷利用所需時間明顯縮短，且呈現穩定的週期變化。

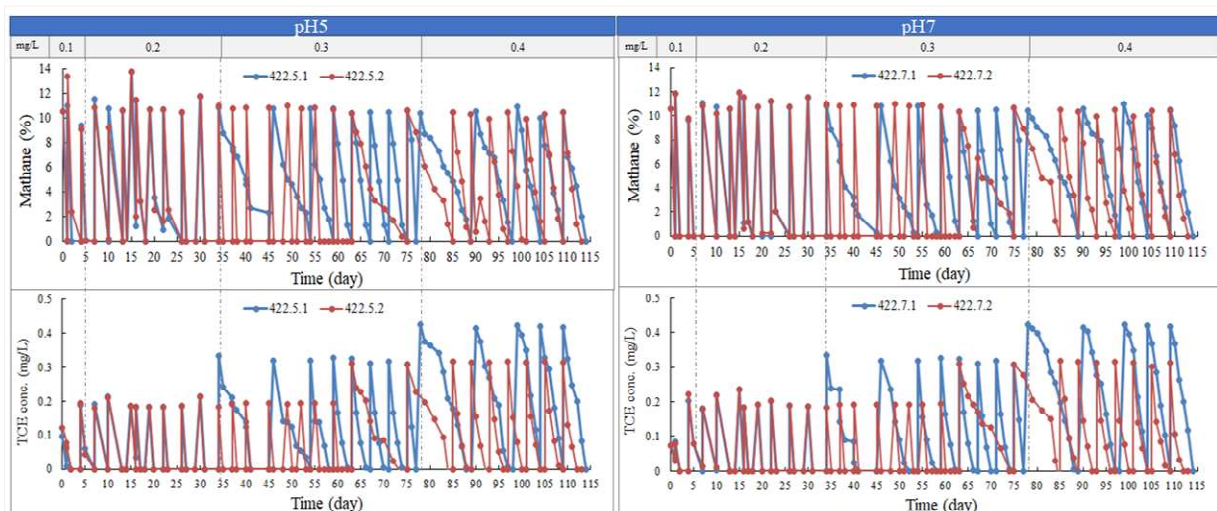


圖 5.3、監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 pH5(左)及 pH7(右)條件下馴養期間之甲烷頂空與三氯乙烯濃度變化。圖例代碼說明：監測井號碼.馴養 pH.二重複中的 1 或 2，水平黑色虛線表示將菌群轉移至新培養基的濃度



綜合上述，六組條件(三口監測井及兩種 pH)馴養的甲烷氧化菌群皆可降解 0.3 mg/L 三氯乙烯，但僅 B00583 與 B00422 可進一步承受 0.4 mg/L 三氯乙烯。於中性環境下，監測井 MW02 以及 B00422 對於三氯乙烯的降解表現相較於 B00583 更為迅速且穩定，其中又以監測井 B00422 馴養出的甲烷氧化菌群相對穩定，且更能適應 0.4 mg/L 三氯乙烯之環境，在三種菌群來源中最具潛力，可作為管柱試驗中性 pH 添加菌群之用；自然界中多數菌株最適生長條件多為中性環境，故以酸性條件馴養初期，三口監測井的甲烷氧化混合菌群，在甲烷利用或三氯乙烯降解皆較中性條件遜色，然而隨著 0.2 mg/L 三氯乙烯的馴養時程延長，監測井 B00422 及 B00583 的目標菌群逐漸穩定的利用基質與共代謝污染物，進入 0.3 與 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段後，兩菌群皆明顯需要更長的反應時間，但仍可持續降解三氯乙烯，並在更換培養基後逐漸縮短降解時間，顯示兩菌群皆能作為酸性條件管柱試驗之生物添加菌群。

## 2. 甲烷氧化菌三種功能性基因 qPCR 分析檢量線建立結果

計畫欲建立甲烷氧化菌三種功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)的 qPCR 定量分析技術，經確認三種功能性基因確實存於地下水樣之馴養菌群中，因此水樣中的三種功能性基因可用以製作標準品，委請明欣生物科技有限公司製作質體標準品，獲得的標準品資訊如表 5.2 所示。在基因 *mmoX* 部分，僅獲得一種序列，與 NCBI 資料庫比對後的相似度為 95%；基因 *pmoA* 與 *mxoF* 分別獲得種 3 與 2 種序列，前者

表 5.2、甲烷氧化功能性基因之質體標準品資訊

基因	編號	片段長(bp)	NCBI 比對結果 (第一筆比對結果)	Identity	相似度(%)
mmoX	mmoX-6	524	<i>Methylosinus trichosporium</i> strain IMV 3011 soluble methane monooxygenase gene cluster, complete sequence	497/524	95
	pmoA-1	508	Uncultured eubacterium pAMC514 particulate methane monooxygenase protein A ( <i>pmoA</i> ) gene, partial cds	499/508	98
	pmoA-2	508	Uncultured bacterium clone FM-53 particulate methane monooxygenase ( <i>pmoA</i> ) gene, partial cds	504/508	99
pmoA	pmoA-10	508	Uncultured bacterium clone 491CT10_pmoA_E9 particulate methane monooxygenase ( <i>pmoA</i> ) gene, partial cds	502/508	99
	mxoF-4	557	<i>Methylocystis parvus</i> strain BRCS2 chromosome, complete genome	512/558	92
	mxoF-7	554	Uncultured <i>Methylophilus</i> sp. <i>mxoF</i> gene for methanol dehydrogenase alpha subunit, partial cds, clone: K5-23	525/555	94
mxoF	mxoF-8	554	Uncultured <i>Methylophilus</i> sp. <i>mxoF</i> gene for methanol dehydrogenase alpha subunit, partial cds, clone: K5-23	526/555	95





### 結果與討論

與資料庫序列的相似度最高，皆> 98%，後者的相似度最高僅 95%，從序列種類可知，甲烷氧化菌種至少應有三種，後續選取 *mmoX*-6、*pmoA*-10 與 *mxoF*-7 進行 qPCR 檢量線製備。

圖 5.4、5.5 與 5.6 分別為甲烷氧化功能性基因 *mxoF*、*pmoA* 與 *mmoX* 濃度標準曲線。可用以評估樣品中甲烷氧化菌之豐度與具有 pMMO 及 sMMO 之甲烷氧化菌豐度，獲得之 *mxoF*、*pmoA* 與 *mmoX* 基因濃度標準曲線皆呈線性， $R^2$  大於 0.995 之要求，為可行之檢量線；在建立 *mmoX* 基因濃度標準曲線期間，依據文獻建議之操作條件無法獲得滿意的結果，且有非目標片段的干擾，幾經嘗試方得的此檢量線，但線性範圍較另外兩個基因小，未來或可嘗試選用其他文獻發表引子或自行設計引子，以增加分析範圍。

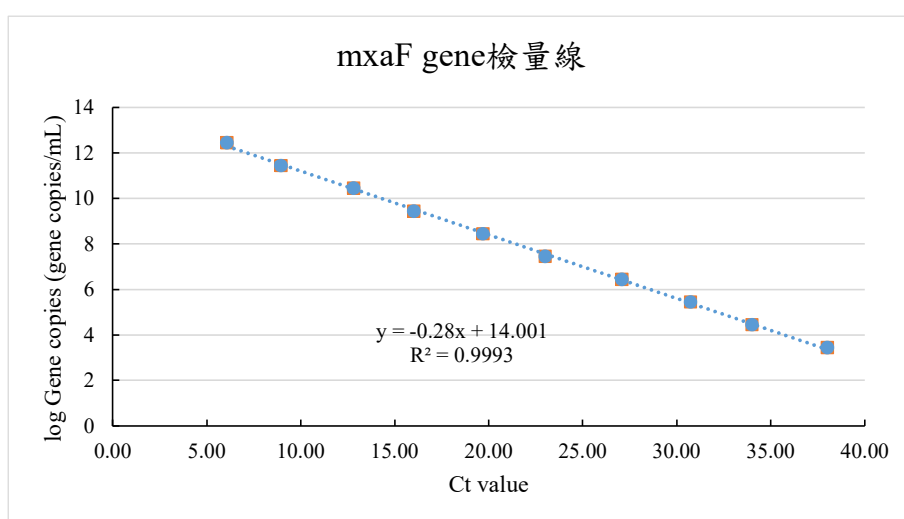


圖 5.4、甲烷氧化功能性基因 *mxoF* 濃度標準曲線

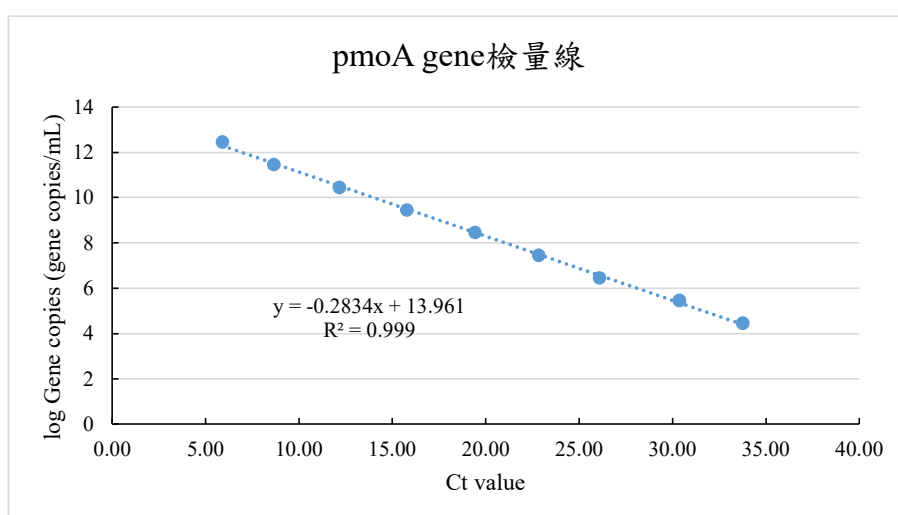


圖 5.5、甲烷氧化功能性基因 *pmoA* 濃度標準曲線

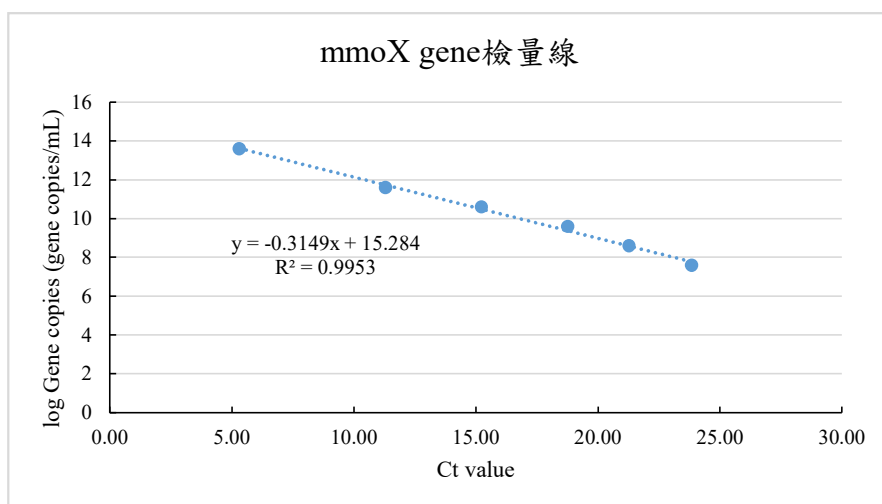


圖 5.6、甲烷氧化功能性基因 *mmoX* 濃度標準曲線

### 3. 甲烷氧化混合菌群馴養期間之功能性基因 q-PCR 分析結果

污染場址的微生物菌相與功能性基因分析已成為生物整治重要的佐證以及評估的依據，是以本研究亦嘗試建立甲烷氧化菌功能性基因分析技術。首先須有 DNA 模板，故利用商業套組萃取監測井地下水原始菌群以及馴養期間菌群的 Total genomic DNA，以 nanodrop 檢測 DNA 濃度與品質後，分別進行 qPCR 及 NGS 分析。

計畫鎖定甲烷氧化菌的功能性基因共有三種，分別為溶解性單氧氧化酵素與膜結合性單氧氧化酵素兩種甲烷單氧氧化酵素，以及甲醇脫氫酶，三種酵素對應的功能性基因分別為 *mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*，以下介紹就各監測井馴養菌群三種功能性基因 qPCR 檢測結果分項說明。

#### (1) 監測井 MW02

圖 5.7 為監測井 MW02 甲烷氧化混合菌群於 pH 5 及 pH 7 條件下馴養期間三種甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果。三種功能基因濃度大致隨著馴養期間增加而逐漸增加，在 pH 5 條件下，功能性基因 *mmoX* 在 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養下，達到最高值  $3.49 \times 10^8$  copies/mL，隨著三氯乙烯濃度進一步增加至 0.3 mg/L，功能性基因 *mmoX* 濃度略為下滑；功能性基因 *pmoA* 明顯隨著三氯乙烯馴養濃度增加，基因數量逐漸上升，由初始的  $6.31-8.78 \times 10^3$  copies/mL，依三氯乙烯馴養濃度由低至高分別上升至  $4.07 \times 10^5$ 、 $5.39 \times 10^6$  與  $2.69 \times 10^8$  copies/mL；功能性基因 *mxoF* 濃度則於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養期間已大幅增加至  $1.99 \times 10^9$  copies/mL，與後續兩三氯乙烯馴養濃度獲得的數據相差不大。在 pH 7 條件下，馴養期間的功能性基因 *mmoX* 濃度較原始水樣濃度約增加 10 倍，馴養期間數據落在  $3.72-4.99 \times 10^7$  copies/mL，整體差異不大；而功能性基因 *pmoA* 明顯與 pH 5 不同，於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養期間已大幅增加至  $2.44 \times 10^8$  copies/mL，與後續兩三氯乙烯馴養濃度獲得



### 結果與討論

的數據相差不大；功能性基因 *mxoF* 濃度亦於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養期間已大幅增加至  $9.61 \times 10^8$  copies/mL，於後續兩三氯乙烯馴養濃度，濃度微幅上升，分別為  $1.69 \times 10^9$  與  $1.08 \times 10^{10}$  copies/mL；另外功能性基因 *mxoF* 濃度多高於功能性基因 *mmoX* 與 *pmoA*，數據合理。

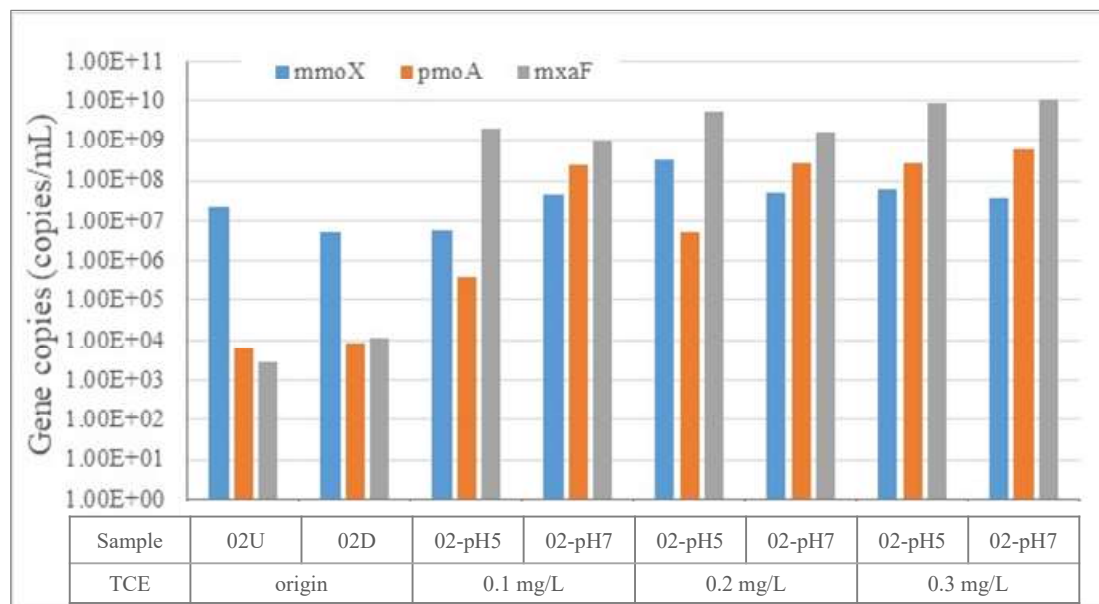


圖 5.7、監測井 MW02 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果。U 與 D 分別表示監測井上層與下層水樣

### (2) 監測井 B000583

圖 5.8 為監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果。功能基因 *pmoA* 與 *mxoF* 濃度大致隨著馴養期間增加而逐漸增加，而功能性基因 *mmoX* 原始水樣與馴養水樣差異不大，多落在  $10^7$  copies/mL，或許受限於檢量線本身的偵測範圍，故於後續僅就不同 pH 之功能基因 *pmoA* 與 *mxoF* 濃度進行說明。在 pH 5 條件下，水樣初始功能性基因 *pmoA* 濃度為  $5.72-7.57 \times 10^3$  copies/mL，馴養期間依三氯乙烯濃度由低至高分別為  $5.12 \times 10^9$ 、 $1.80 \times 10^7$ 、 $4.22 \times 10^9$  與  $7.12 \times 10^8$  copies/mL，馴養期間濃度明顯高於原始水樣  $10^3-10^5$  倍，排除 0.2 mg/L 三氯乙烯數據(推測係因菌群取樣時狀況不佳所致)，功能性基因 *pmoA* 於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段隨即大幅增加，並於 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段略微降低，或許為三氯乙烯開始具有抑制性所致；功能性基因 *mxoF* 濃度於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養期間即已從初始的  $3.63 \times 10^3-3.82 \times 10^4$  copies/mL 大幅增加至  $2.60 \times 10^8$  copies/mL，並於後續的 0.2 與 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段微幅增加，但在 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段略為下滑，馴養期間數據介於  $2.60 \times 10^8-1.70 \times 10^{10}$  copies/mL，其中於 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段可測得最高數值。在 pH7



方面，功能性基因 *pmoA* 濃度依三氯乙烯馴養濃度由低至高，分別為  $8.12 \times 10^8$ 、 $6.15 \times 10^7$ 、 $1.84 \times 10^9$  與  $8.75 \times 10^7$  copies/mL，排除 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養階段數據，亦呈現逐漸增加，但於 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段下滑趨勢；馴養期間的功能性基因 *mxoF* 濃度介於  $1.00 \times 10^9$ - $1.55 \times 10^{10}$  copies/mL，整體差異在 10 倍內，其中以 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段數據略高。

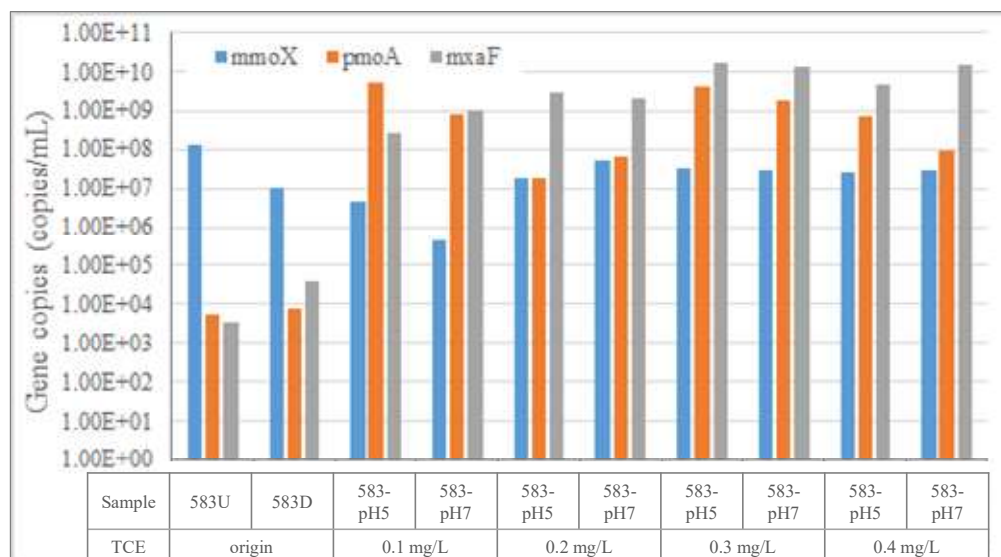


圖 5.8、監測井 B00583 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果。U 與 D 分別表示監測井上層與下層水樣

### (3) 監測井 B00422

監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果如圖 5.9 所示。功能基因 *pmoA* 與 *mxoF* 濃度大致隨著馴養期間增加而逐漸增加，而功能性基因 *mmoX* 原始水樣與馴養水樣差異不大，多落在  $10^7$  copies/mL，或許受限於檢量線本身的偵測範圍，故於後續僅就不同 pH 之功能基因 *pmoA* 與 *mxoF* 濃度進行說明。在 pH 5 條件下，水樣初始功能性基因 *pmoA* 濃度為  $5.55 \times 10^3$ - $3.86 \times 10^5$  copies/mL，以下層分析的濃度高於上層水樣，馴養期間依三氯乙烯濃度由低至高分別為  $1.97 \times 10^{10}$ 、 $8.17 \times 10^7$ 、 $1.66 \times 10^9$  與  $8.17 \times 10^7$  copies/mL，馴養期間濃度明顯高於原始水樣，同監測井 B00583，0.2 mg/L 三氯乙烯馴養獲得數據突然下降，推測原因相同歸咎於取樣時恰逢菌群狀態不佳，功能性基因 *pmoA* 濃度同樣於 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段呈現微幅下滑；功能性基因 *mxoF* 濃度於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養期間即大幅增加至  $3.86 \times 10^9$  copies/mL，於後續的 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養階段下降，再於後續兩個馴養階段持續微幅上升，馴養期間數據介於  $6.10 \times 10^8$ - $2.97 \times 10^{10}$  copies/mL，其中於 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段測得最高數值，於 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養階段測得最低數值。在 pH 7 方面，功能性





### 結果與討論

基因 *pmoA* 濃度依三氯乙烯馴養濃度由低至高，分別為  $3.51 \times 10^9$ 、 $1.81 \times 10^8$ 、 $8.54 \times 10^8$  與  $6.72 \times 10^6$  copies/mL，其中於最後一個階段數值最低；馴養期間的功能性基因 *mxoF* 濃度介於  $1.11 \times 10^9$ – $3.54 \times 10^{10}$  copies/mL，整體差異在 10 倍內，基因濃度隨著三氯乙烯馴養濃度持續微幅上升。

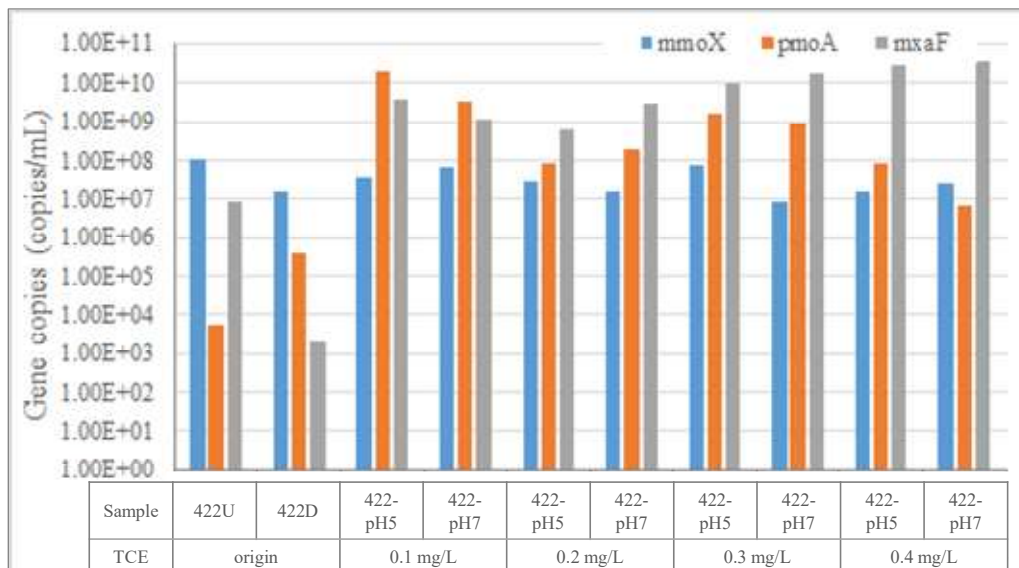


圖 5.9、監測井 B00422 甲烷氧化菌群於 pH 5 及 pH 7 條件馴養期間之甲烷氧化功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量分析結果。U 與 D 分別表示監測井上層與下層水樣

## 4. 甲烷氧化混合菌群馴養期間菌相 NGS 分析結果

於甲烷氧化菌群馴養期間，就三種菌群來源於不同 pH 以及三氯乙烯濃度馴養階段之菌相進行分析，瞭解馴養期間甲烷氧化菌群的消長變化，以下就次世代序列分析產出之 Rarefaction Curve 暨 Alpha Indices 統計表、Venn 圖、甲烷氧化菌菌屬名 top 10、PCoA 圖與 heatmap 分項說明。

### (1) Rarefaction Curve 暨 Alpha Indices 統計表

圖 5.10 為各樣品序列數量與物種(OTUs)之 Rarefaction Curve。X 軸為樣品的定序序列數(Sequences)，當分析序列數持續增加，Y 軸的 observed\_species 數量趨於平緩時，意謂即使增加序列分析數目，僅有少量的 observed\_species 增加，甚至不再增加，代表樣品定序序列數量的覆蓋率(Good coverage)趨近於 1，表示本次分析樣品中的生物多樣性已近完全涵蓋，顯示次世代定序深度沒有問題，而本次所有樣品的 Rarefaction Curve 皆已進入平原區，顯示樣品的分析數據深度足夠，具有相當的代表性。



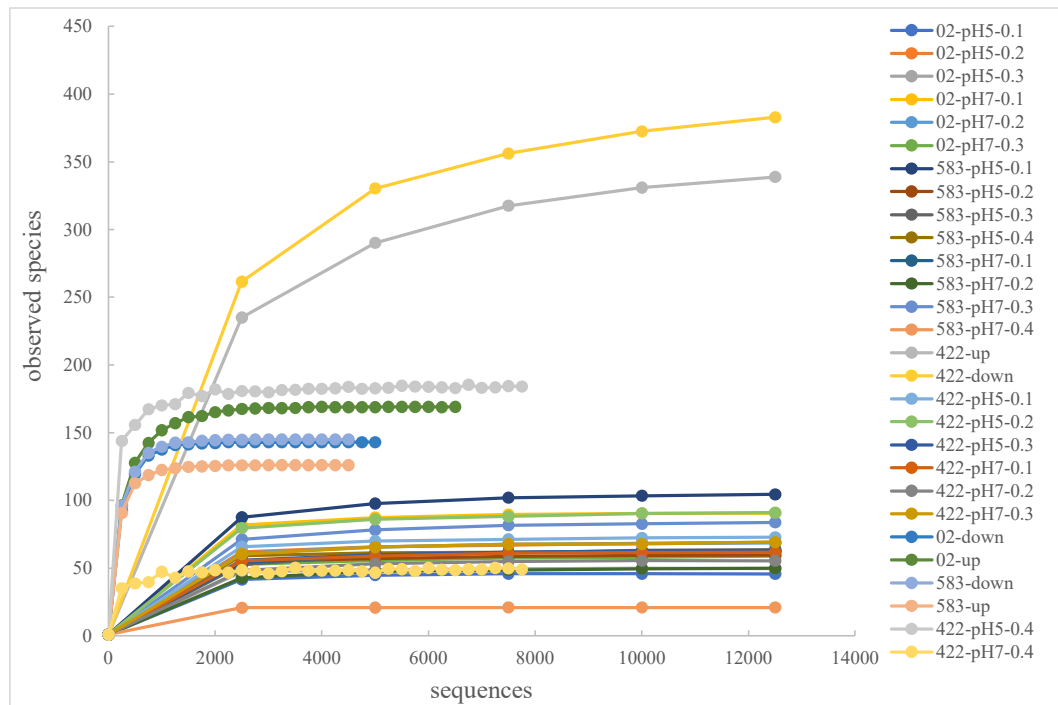


圖 5.10、各樣品序列數量與 OTUs 之關係圖。代號說明：監測井-馴養 pH-三氯乙烯濃度(mg/L)，up 與 down 表示採集上與下層地下水

Alpha 多樣性是指一個特定區域或者生態系統內的生物多樣性，常用指標包括 Observed OTUs、Shannon-Wiener diversity index、Simpson diversity index、Chao1 richness estimator 與 Goods coverage 等。其中 Observed OTUs 結果僅代表物種總數，無關豐度，數值範圍一般介於數十至幾百，乃至於數千不等；Shannon-Wiener diversity index 及 Simpson diversity index 則表示菌群多樣性，用以衡量定序量是否足夠的一個標準；Chao1 代表菌群豐度，表 5.3 為三口原地下水菌群與以不同三氯乙烯與 pH 條件馴養期間各菌群之次世代定序分析所得之 Alpha Indices 統計表。由表可知樣品，三口監測井之原始地下水菌群，其中監測井 B00422 的 OTU 最多，上、下層水樣 OTU 分別為 356 和 405，而監測井 MW02 和 B00583 差異不大，多介於一百與二百之間；隨著三氯乙烯馴養濃度逐漸增加，OTU 數量大致上隨之下降再持平，但某些樣品 OTU 於添加 0.1 mg/L 三氯乙烯後先顯著下降，隨著三氯乙烯濃度增加，OTU 微幅增加，三氯乙烯濃度持續上升，則 OTU 再下降趨勢，如監測井 MW02 菌群於 pH 5 條件和監測井 B00583 於 pH 7 條件；另外，再比較 pH 5 或 7 的 OTU，監測井 B00583 與監測井 MW02 兩者之間未有顯著區別，意謂無論是酸性或中性馴養條件，OTU 未有顯著不同；唯監測井 B00422 在 0.4 mg/L 三氯乙烯條件下，pH 5 的物種多樣性顯著大於 pH 7。

## (2)Venn 圖

Venn 圖可用於瞭解樣品間重複的物種多寡，重複物種數目越高，意謂樣品間的相似度越大，因此可就欲探討的樣品予以分組，初步瞭解樣品間的差異，研究採用



## 結果與討論

表 5.3、原地下水菌群與以不同三氯乙烯與 pH 條件馴養期間各菌群之次世代定序分析之 Alpha Indices 統計表

Consortium	Code (pH-TCE con.)	Observed_OTUs	Shannon	Simpson	Chao1	Goods_coverage
02	U	169	6.51	50.50	169	1.000
	D	143	6.44	51.36	143	1.000
	pH5-0.1	46	2.81	3.38	46	1.000
	pH5-0.2	70	4.53	13.92	70	1.000
	pH5-0.3	50	3.83	7.59	50	1.000
	pH7-0.1	91	4.72	13.60	91	1.000
	pH7-0.2	69	4.03	10.12	69	1.000
	pH7-0.3	60	3.57	5.59	60	1.000
583	U	126	6.52	70.48	126	1.000
	D	145	6.60	68.89	145	1.000
	pH5-0.1	108	4.21	8.91	108	1.000
	pH5-0.2	61	4.73	19.98	61	1.000
	pH5-0.3	65	3.65	7.60	65	1.000
	pH5-0.4	62	3.84	7.43	62	1.000
	pH7-0.1	63	2.94	4.12	63	1.000
	pH7-0.2	50	4.13	11.01	50	1.000
	pH7-0.3	86	3.87	6.26	86	1.000
	pH7-0.4	21	2.93	4.58	21	1.000
422	U	356	5.35	14.15	356	1.000
	D	405	5.65	16.65	405	1.000
	pH5-0.1	73	3.75	5.24	73	1.000
	pH5-0.2	92	4.81	13.41	92	1.000
	pH5-0.3	63	4.18	10.78	63	1.000
	pH5-0.4	184	6.13	28.33	184	1.000
	pH7-0.1	62	3.21	4.39	62	1.000
	pH7-0.2	56	2.98	3.85	56	1.000
	pH7-0.3	71	3.07	3.24	71	1.000
	pH7-0.4	50	3.62	7.72	50	1.000

兩種分組方式繪製 Venn 圖；首先以監測井種類作為分組依據，將各監測井原菌群與其後續的馴養各菌群物種數以聯集方式整合，再繪製三口監測井間的 Venn 圖，瞭解三口監測井的差異；第二種分組方式則以一口監測井為基準，同樣以聯集方式進一步繪製該口監測井原菌群(上、下層)以及馴養 pH 5 和 7 之 Venn 圖，瞭解相同菌群來源，但不同馴養 pH，物種的差異是否趨於顯著。

a. 三口監測井組間整合 Venn 圖

圖 5.11 為三口監測井整合繪製之 Venn 圖。整合監測井 B00422 相關 OTUs 總計 570，其中 164 個 OTUs 與監測井 B00583 重疊，另與監測井 MW02 共同持有 134 個 OTUs；監測井 B00583 共計有 380 個 OTUs，其中的 177 個 OTUs 與監測井 MW02 井共同持有，監測井 MW02 總計 402 個 OTUs，三口井共重複 99 個 OTUs，由圖可知監測井 B00422 的物種種類最多，而監測井 B00583 與 MW02 因重疊比例較高，重疊分別占監測井總 OTUs 的 46.6%與 44%，顯示兩口井的物種較相近。



圖 5.11、三口監測井整合繪製之 Venn 圖

b. 單口監測井組內 Venn 圖

圖 5.12 為監測井 MW02 組內繪製之 Venn 圖。將監測井 MW02 原始菌群(上、下層)、pH 5 馴養與 pH 7 馴養菌群作組內分組，監測井 MW02 原始菌群具有代表性的 OTUs 計有 257 個，pH 5 馴養菌群的 OTUs 有 100 個，pH 7 馴養菌群的 OTUs 有 122 個，其中原始菌群(上、下層)與 pH 5 和 7 馴養菌群的重複 OTUs 皆少於 10 個，顯示加入三氯乙烯後，對原始菌群有很大的衝擊，兩種 pH 馴養的重複 OTUs 計有 70 個，意謂兩種 pH 馴養的樣品的物種較相近，顯示 pH 對於菌群的影響小於三氯乙烯的添加，三組重疊的 OTUs 僅有 3 個。

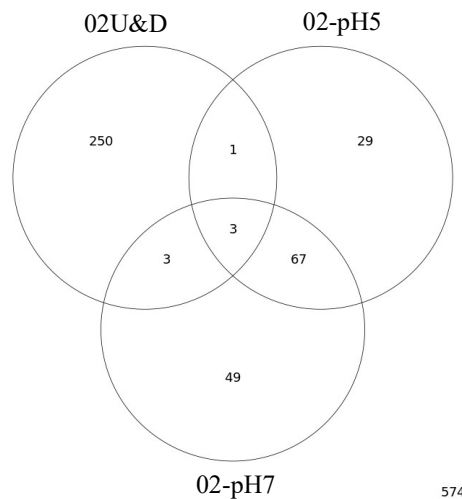


圖 5.12、監測井 MW02 組內繪製之 Venn 圖

圖 5.13 為監測井 B00583 組內繪製之 Venn 圖。監測井 B00583 原始菌群具有代表性的 OTUs 計有 216 個，pH 5 馴養菌群的 OTUs 有 147 個，pH 7 馴養菌群的 OTUs 有 131 個，其中原始菌群(上、下層)與 pH 5 和 7 馴養菌群的重複 OTUs 分別為 14 和 12 個，同樣顯示加入三氯乙烯後，對原始菌群有較大的衝擊，兩種 pH 馴養的重



### 結果與討論

複 OTUs 計有 99 個，分別占 583-pH5 與 583-pH7 的 OTUs 的 67%與 75.6%，意謂兩種 pH 馴養的樣品的物種較相近，顯示 pH 對於菌群的影響小於三氯乙烯的添加，三組重疊的 OTUs 計有 9 個。

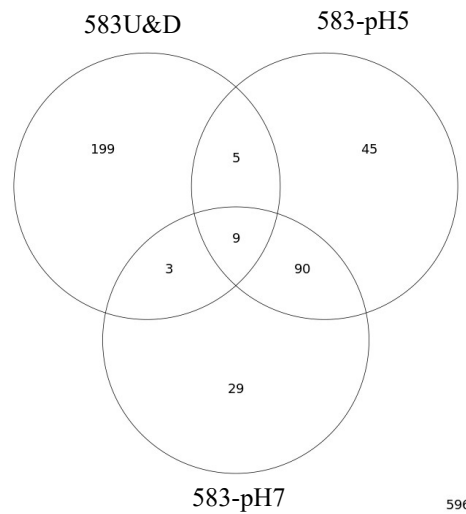


圖 5.13、監測井 B00583 組內繪製之 Venn 圖

圖 5.14 為監測井 B00422 組內繪製之 Venn 圖。監測井 B00422 原始菌群具有代表性的 OTUs 計有 334 個，pH 5 馴養菌群的 OTUs 有 269 個，pH 7 馴養菌群的 OTUs 有 151 個，以 pH 7 馴養的代表物種種類最低，原始水樣與 pH 5 馴養菌群物種種類較相近，或許係因地下水偏酸所致，其中原始菌群(上、下層)與 pH 5 和 7 馴養菌群的重複 OTUs 分別為 68 和 45 個，同樣顯示加入三氯乙烯後，對原始菌群有較大的衝擊，兩種 pH 馴養的重複 OTUs 計有 107 個，分別占 422-pH5 與 422-pH7 的 OTUs 的 40%與 70.9%，意謂兩種 pH 馴養的樣品的物種較相近，顯示 pH 對於菌群的影響小於三氯乙烯的添加，三組重疊的 OTUs 計有 36 個。

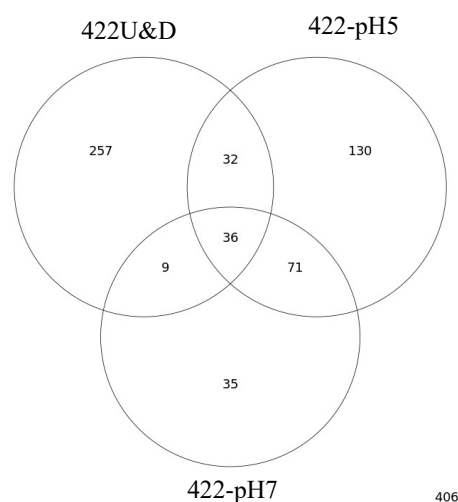


圖 5.14、監測井 B00422 組內繪製之 Venn 圖



### (3) 甲烷氧化菌菌屬

基於甲烷氧化菌為本實驗目標菌群，故以小組方式呈現，就三口監測井分開討論，進行甲烷氧化菌彙整，以瞭解甲烷氧化菌於馴養期間的種類與占比變化，結果分述如下。

#### a. 監測井 MW02 之甲烷氧化菌菌屬

圖 5.15 為監測井 MW02 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。在原始水樣上下層皆未有甲烷氧化菌的存在，抑或占比極低；在 pH 5 馴養期間，隨著甲烷馴養與逐步增加三氯乙烯濃度，甲烷氧化菌屬逐漸出現，於 0.1 與 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養期間，可測得菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium*，但兩階段的占比皆低於 1.0%，進一步提升三氯乙烯濃度至 0.3 mg/L，甲烷氧化菌屬 *Methylobacterium* 與 *Methylocystis* 出現，菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 占比也增加，但三種甲烷氧化菌總占比約 3.5%，其中菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 與 *Methylobacterium* 屬於 Type I 甲烷氧化菌，菌屬 *Methylocystis* 屬於 Type II 甲烷氧化菌(Jiang et al., 2010; Hanson & Hanson, 1996)。

在 pH 7 馴養期間，隨著以甲烷馴養與逐步增加三氯乙烯濃度，甲烷氧化菌屬同樣逐漸出現，於 0.1 與 0.2 mg/L 三氯乙烯馴養期間，可測得菌屬與 pH 5 馴養不同，主要以菌屬 *Methylobacterium* 為主，在 0.1 mg/L 三氯乙烯期間有少量菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 出現，但兩階段的占比皆低於 0.75%，進一步提升三氯乙烯濃度至 0.3 mg/L，前兩階段的甲烷氧化菌菌屬消失，反而以菌屬 *Methylocystis* 為主，占比約近 2%。從上述可知監測井 MW02 的總甲烷氧化菌菌屬

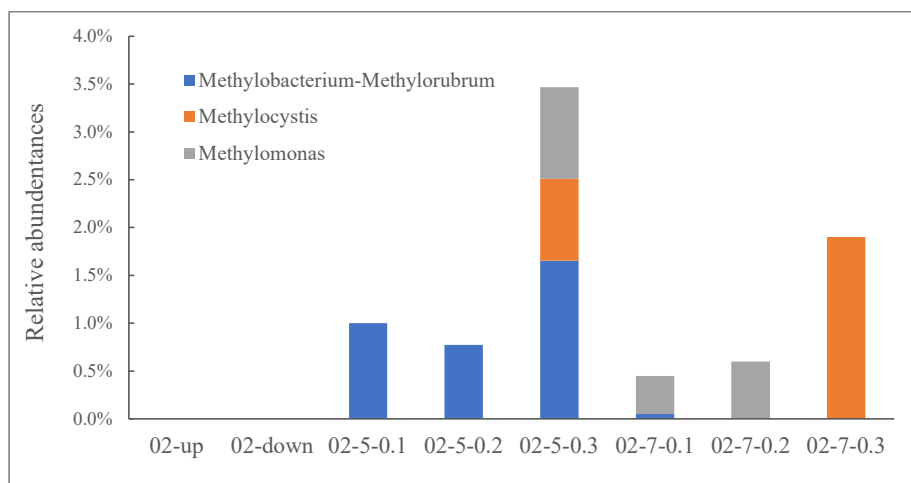


圖 5.15、監測井 MW02 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。樣品代號：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，三氯乙烯濃度單位為 mg/L，up 和 down 分別為上層與下層水樣





## 結果與討論

反以 pH 5 的占比略高於 pH 7 馴養條件，且因為甲烷氧化菌群占比不高，因此無法耐受更高濃度的三氯乙烯，呼應之前監測井 MW02 馴養菌群於進入 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段後，無法再利用甲烷與共代謝三氯乙烯的結果。

### b. 監測井 B00583 之甲烷氧化菌菌屬

圖 5.16 為監測井 B00583 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。監測井 B00583 原水樣的甲烷氧化菌群占比太低；在以 pH 5 馴養期間，隨著添加 10% 甲烷與逐步增加三氯乙烯濃度，於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段，Type II 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis* 占比高達 25%，另有甲烷氧化菌 MM1，其占比為 9.8%，文獻指出 MM1 屬於甲烷氧化菌，具有共代謝三氯乙烯的能力(Henry & Grbić-Galić, 1991)；隨著三氯乙烯濃度增加至 0.2 mg/L，興許濃度過高，致使菌屬 *Methylocystis* 幾近消失，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 變得相對優勢，亦有微量的菌屬 *Methylomonas*，總占比約為 6.62%；當進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 再度趨於弱勢，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylomonas* 取而代之，總占比約 12.79%；到最後三氯乙烯馴養階段，Type II 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis* 再度變為優勢，占比為 13.95%，菌屬 *Methylomonas* 占比降低至 3.01%，有少量的菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* (0.14%)，三菌屬總占比為 17.10%。

在 pH 7 馴養部分，於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylomonas* 占比高達 41.44%，甲基氧化菌屬 *Methyloversatilis* 占比有 34.12%；隨著三氯乙烯濃度增加至 0.2 mg/L，興許濃度過高，致使菌屬菌屬 *Methylomonas* 完全

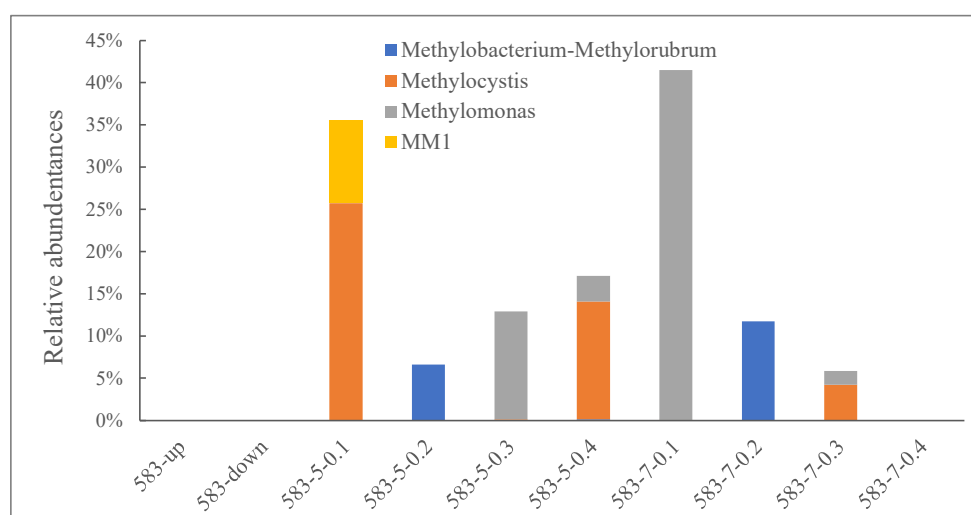


圖 5.16、監測井 B00583 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。樣品代號：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，三氯乙烯濃度為 mg/L，up 和 down 分別為上層與下層水樣



消失，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 變得相對優勢，占比約為 11.71%，但無甲基氧化菌屬的存在；當進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 再度趨於弱勢，占比僅剩 0.02%，Type II 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis* 變為優勢，占比為 4.24%，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylobacterium* 占比為 1.62%，甲烷氧化菌菌屬總占比約 5.88%，甲基氧化菌屬 *Methylobacterium* 占比為 38.81%(結果未顯示)；到最後三氯乙烯馴養階段，則未測得任何甲烷氧化菌屬，雖未測得甲烷氧化菌群，但具有占比為 40.29%的甲基氧化菌屬 *Methylobacterium*，文獻指出，該菌屬具有好氧共代謝三氯乙烯的能力(Ouyang et al., 2024)。

### c. 監測井 B00422 之甲烷氧化菌菌屬

圖 5.17 為監測井 B00422 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。監測井 B00422 原水樣的甲烷氧化菌群占比太低；在以 pH 5 馴養期間，隨著添加 10% 甲烷與逐步增加三氯乙烯濃度，於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段，Type I 甲烷氧化菌屬 *Methylobacterium* 占比高達 41.11%，另有 Type II 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis*，其占比為 1.20%；隨著三氯乙烯濃度增加至 0.2 mg/L，致使所有甲烷氧化菌幾近消失，但可測得甲基氧化菌屬 *Methylobacterium*，占比為 7.46%，文獻指出，該菌屬具有好氧共代謝三氯乙烯的能力(Ouyang et al., 2024)；當進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，同 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段，主要甲烷氧化菌屬為 4.59%的菌屬 *Methylocystis* 以及 0.67%的菌屬 *Methylobacterium*，另有 0.05%的菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium*，甲基氧化菌屬則有 1.29%的菌屬 *Methylobacterium* 和 20.10%的菌屬 *Methylobacterium*，文獻指出該菌屬多以甲醇及甲胺作為生長碳源，雖不具好氧共代謝

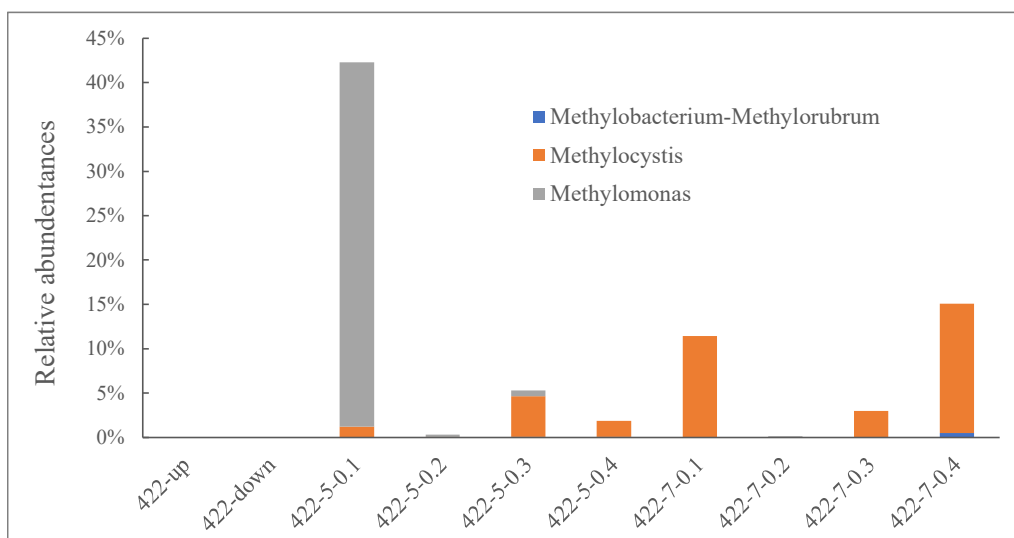


圖 5.17、監測井 B00422 於不同馴養階段之甲烷氧化菌菌屬彙整。樣品代號：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，三氯乙烯濃度為 mg/L，up 和 down 分別為上層與下層水樣



## 結果與討論

三氯乙烯的能力，但常發現與甲烷氧化菌同時存在(Yamazawa et al., 2014; Nam et al., 2013)；最後三氯乙烯馴養階段，菌屬 *Methylocystis* 占比下降至 1.81%，菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium* 占比維持不變，亦無分析有甲基氧化菌屬，可能係因當時取樣時，菌群狀況不佳。

在 pH 7 馴養部分，於 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養階段，僅分析有 Type II 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis*，其占比達 11.40%，另分析有高達 57.18% 的甲基氧化菌屬 *Methyloversatilis*，文獻指出該菌屬具有好氧共代謝三氯乙烯能力(Ouyang et al., 2024)；隨著三氯乙烯濃度增加至 0.2 mg/L，僅分析有 0.14% 的甲烷氧化菌屬 *Methylomonas*，在此階段同樣分析有 12.47% 的甲基氧化菌屬 *Methyloversatilis* (結果未顯示)；當進入 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養階段，菌屬 *Methylocystis* 占比回升，達 2.98%，甲基氧化菌屬 *Methyloversatilis* 占比同樣回升，占比為 54.02%；到最後馴養階段，甲烷氧化菌屬 *Methylocystis* 占比回升至 14.58%，亦分析有 0.49% 菌屬 *Methylobacterium-Methylobacterium*，並未測得甲基氧化菌群。

## (4)PCoA 圖

為瞭解不同樣品間物種組成的相似性及差異性，可利用主座標分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)進行分析，PCoA 是經由一系列的特徵值和特徵向量排序，從多維資料中找出最主要的元素和結構，PCoA 分析基於 Unweighted Unifrac 距離，並選取貢獻率最大的主座標作圖，如果樣品距離越接近，表示物種組成結構越相似，因此群落結構相似度高的樣品會聚集在一起，反之則分散。實驗結果採用兩種分組方式呈現，第一種為所有 28 個樣品皆納入分析，為免顏色過於複雜難以判讀，將同性質樣品以相同顏色標記，原始三種地下水樣各為一組，共計三種顏色，另外再就馴養 pH 分組，因為三種水樣各兩種 pH 馴養條件，因此將有 6 種顏色，總計以 9 種顏色呈現；第二種分組僅就同一監測井探討，分組分為原始水樣(上、下層兩菌群)以及 pH 5 和 7 兩種馴養條件，總計 3 種顏色。

### a. 三口監測井所有樣品整合之 PCoA 圖

圖 5.18 為三口監測井所有樣品整合繪製之 PCoA 圖。百分比表示兩個主要成分 PC1 與 PC2 的相對貢獻，兩者分別為 18% 與 11%，由圖中可知三口監測井原始菌群，以監測井 B00583 與 MW02 最為接近，而監測井 B00422 則明顯與其他兩口井不同，經過馴養後，馴養菌群與原水樣明顯有區別，監測井 MW02 原菌群以 0.1 mg/L 三氯乙烯於 pH 5 和 7 條件下馴養，一開始兩種 pH 菌群(02-5-1 與 02-7-1)顯著不同，但隨著三氯乙烯濃度增加，相同三氯乙烯馴養濃度但不同馴養 pH 兩菌群逐漸趨於相近；而監測井 B00583 於相同 pH 7 但不同三氯乙烯濃度馴養下，四種菌群(583-7-1、583-7-2、583-7-3、583-7-4)相對離散，顯示各有所差異，然於 pH 5 但不

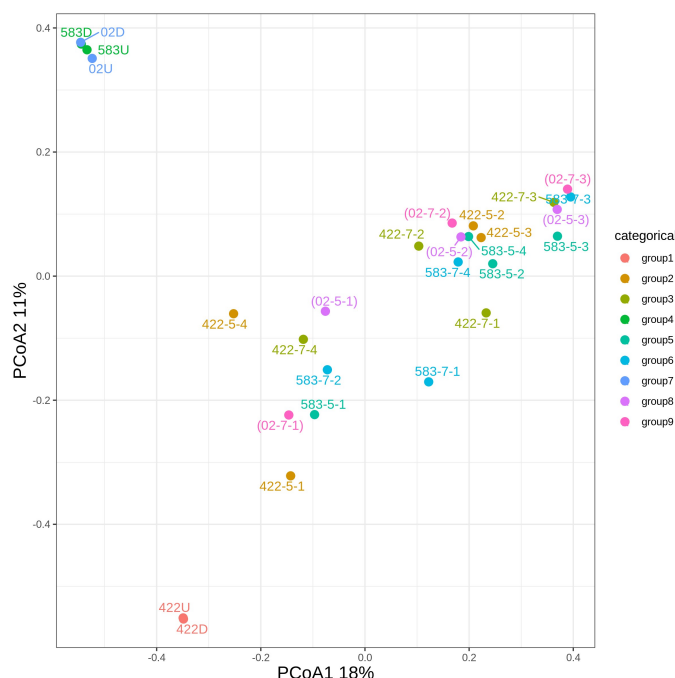


圖 5.18、三口監測井所有樣品整合繪製之 PCoA 圖。代號說明：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，1、2、3、4 分別表示 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 三氯乙烯，U 和 D 分別為上層與下層水樣

同三氯乙烯濃度馴養時，僅 0.1 mg/L 三氯乙烯馴養菌群較離散，其餘三菌群分布相近；在監測井 B00422 部分，在以 pH 7 但不同三氯乙烯濃度馴養時，同監測井 B00583 結果相近，四種菌群亦相對分散，以 pH 5 但不同三氯乙烯濃度馴養時，最低與最高三氯乙烯濃度菌群(422-5-1 與 422-5-4)明顯與其他兩者(422-5-2、422-5-3)離群，顯示較低與較高的三氯乙烯濃度對菌群組成造成明顯的影響；整體來看，以 0.2 或 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養，無論 pH 微酸性或中性，菌群分布較為集中，顯示組成較為相近，而三氯乙烯濃度為 0.1 與 0.4 mg/L 時，菌群間皆較為分散，前者係因初期馴養，三氯乙烯的添加造成原始菌群的壓力，加上馴養手法尚未穩定，導致菌群組成顯著變動，後者則因以最高馴養濃度，搭配馴養期間的三氯乙烯濃度變化與甲烷利用(見圖 5.1-5.3)，可知進入 0.4 mg/L 三氯乙烯馴養階段時，菌群無論在甲烷利用或三氯乙烯的降解皆受到顯著影響，致使菌群再次有大幅度的變動。

#### b. 單口監測井內樣品整合之 PCoA 圖

圖 5.19 為監測井 MW02 組內樣品繪製之 PCoA 圖。結果顯示大致可分成三群，第一群為原始菌群上、下水層(02-U 與 02-D)，第二群則為以 0.1 mg/L 三氯乙烯搭配兩種 pH 菌群，最後一群則是以 0.2 與 0.3 mg/L 三氯乙烯馴養之菌群，無論 pH 為酸性或中性，組成大致相近，顯示三氯乙烯濃度對於菌群組成上的影響較 pH 值顯著。





## 結果與討論

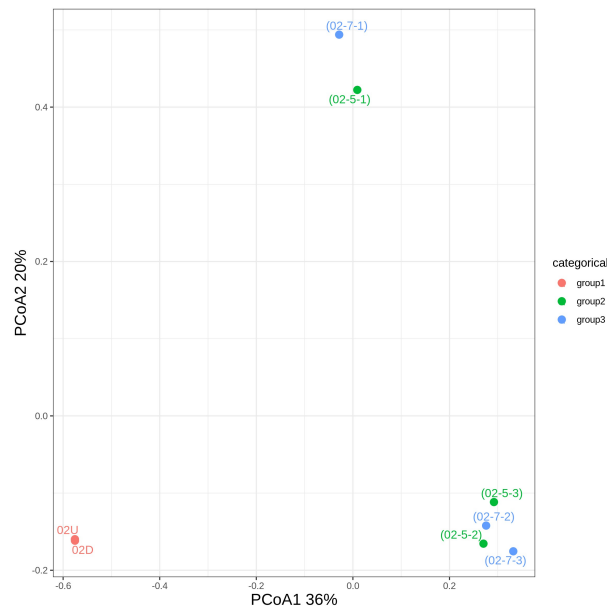


圖 5.19、監測井 MW02 組內樣品繪製之 PCoA 圖。代號說明：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，1、2、3 分別表示 0.1、0.2、0.3 mg/L 三氯乙烯，U 和 D 分別為上層與下層水樣

圖 5.20 為監測井 B00583 組內樣品繪製之 PCoA 圖。結果顯示馴養菌群與原始菌群組成明顯不同，導致分群；在酸性條件馴養時，添加 0.1 與 0.2 mg/L 三氯乙烯的兩菌群(583-5-1 與 583-5-2)組成相對較為相近，但進一步提升三氯乙烯濃度後，或許因高濃度三氯乙烯對菌群造成壓力，致使添加 0.3 與 0.4 mg/L 三氯乙烯的兩菌群(583-5-3 與 583-5-4)組成再次變動，並與前述菌群離散；中性條件下，添加 0.2 mg/L

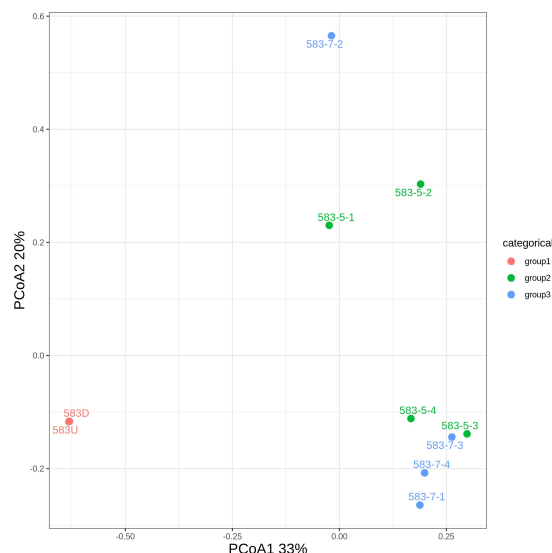


圖 5.20、監測井 B00583 組內樣品繪製之 PCoA 圖。代號說明：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，1、2、3、4 分別表示 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 三氯乙烯，U 和 D 分別為上層與下層水樣



三氯乙烯的菌群(583-7-2)，明顯與其他三者(583-7-1、583-7-3、583-7-4)離散，原因或許在於甲烷氧化菌屬與甲基氧化菌屬與其他三菌群明顯不同所致；整體而言，只要提升三氯乙烯濃度至 0.3 與 0.4 mg/L，無論馴養 pH 為何，菌群組成大致相近，意謂著能耐受高濃度三氯乙烯的菌屬相近。

圖 5.21 為監測井 B00422 組內樣品繪製之 PCoA 圖。結果大致與監測井 B00583 相近，馴養菌群與原始菌群明顯分群；在酸性條件馴養時，不同三氯乙烯濃度的菌群明顯分散，顯示每次增加 0.1 mg/L 三氯乙烯，對於菌群組成皆造成顯著影響；中性條件下，則以添加 0.4 mg/L 三氯乙烯的菌群(422-7-4)，明顯與其他三者(422-7-1、422-7-2、422-7-3)離散，顯示中性條件下，菌群對於三氯乙烯濃度的耐受性較佳，直到三氯乙烯濃度增加至最高的 0.4 mg/L，菌群方有顯著變動。

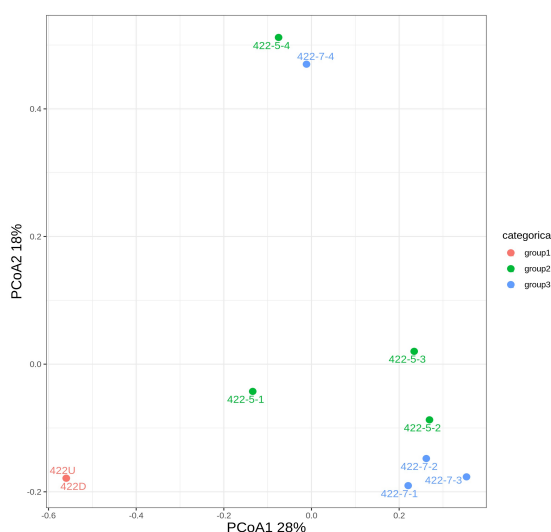


圖 5.21、監測井 B00422 組內樣品繪製之 PCoA 圖。代號說明：監測井編號-馴養 pH-三氯乙烯濃度，1、2、3、4 分別表示 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 三氯乙烯，U 和 D 分別為上層與下層水樣

#### (5)Heatmap 圖

Heatmap 圖係選出樣品內 TOP 35 菌屬，將菌屬豐富度以不同漸層藍、紅色塊表示，占比高者呈現不同深淺的紅色，占比低者呈現不同深淺的藍色，供直觀判斷樣品間的相似程度，若樣品間相似性高，則兩樣品間之菌屬色塊分布顏色深淺較為一致，實驗以聯集方式彙整菌屬，再繪製成 Heatmap 圖，分組方式以監測井作為分組依據，將同監測井所有樣品整合出 TOP 35 菌屬。

圖 5.22 為三口監測井 TOP 35 菌屬的 heatmap 圖。比較三口監測井原始水樣菌群，監測井 B00583 與 MW02 的色塊分布相似，監測井 B00422 色塊明顯與其他兩口井不同，其中監測井 B00422 明顯紅色色塊的菌屬計有 *Novosphingobium* 與 *Bosea*，菌屬 *Novosphingobium* 被指出是地下含水層中活躍的菌屬，能產生豐富的胞



## 結果與討論

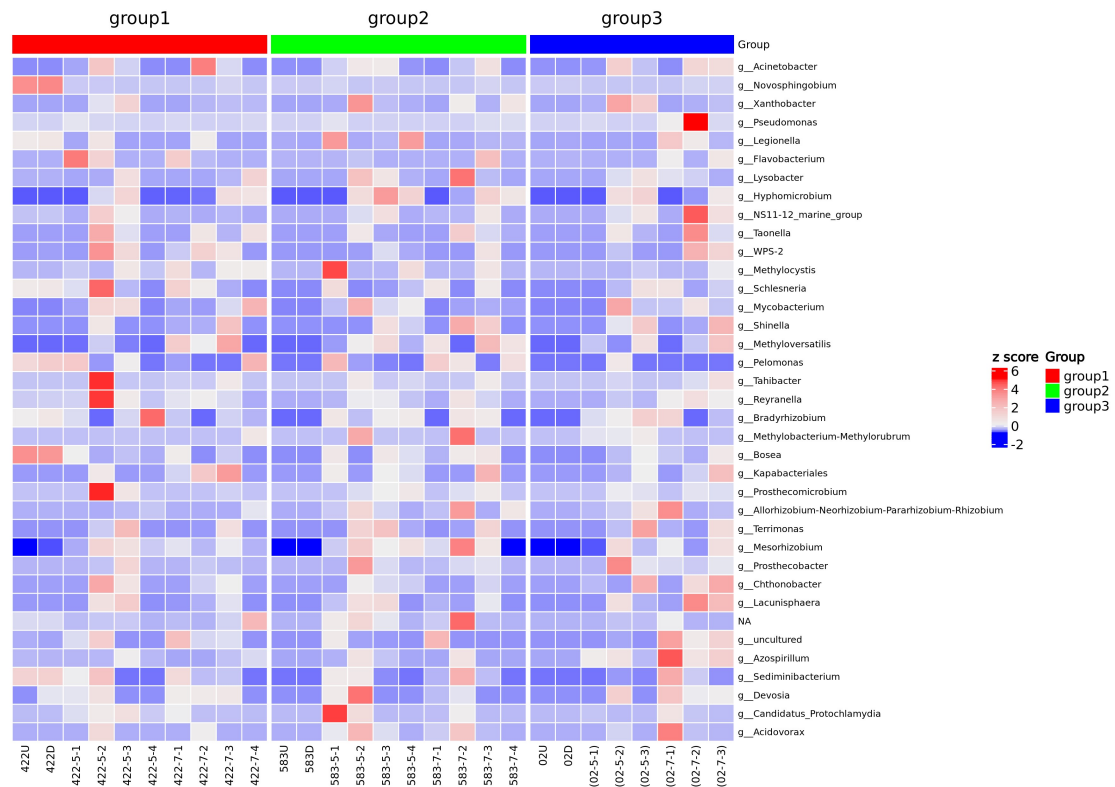


圖 5.22、三口監測井 TOP 35 菌屬的 heatmap 圖

外多醣，且無特殊的生長需求，使其在貧養環境，如底泥沉積物具有生態優勢(Héry et al., 2014)；菌屬 *Bosea* 屬於革蘭氏陰性好氧菌，可生存於含砷量高的地下水(Ghosh et al., 2014)，目前尚無該菌屬於含氯有機物的相關報導。在監測井 B00422 馴養菌群部分，菌屬 *Tahibacter*、*Reyranella*、*Kapabacteriales* 於 422-5-2 菌群分析有深紅色塊，但該些菌屬發表甚少；高佔比菌屬 *Acinetobacter* 出現在 422-7-2 菌群中，研究指出該菌屬常出現在受混合含氯揮發有機物污染場址中，但對於化學整治策略十分敏感，化學整治後，占比下降(Huang et al., 2024)。在監測井 B00583 馴養菌群部分，菌屬 *Candidatus Protochlamydia* 雖在 583-5-1 樣品有高佔比，但目前沒有相關文獻發表；菌屬 *Hyphomicrobium* 於 pH 5 條件下多有測得，該菌屬具有降解二氯甲烷能力(Hermon et al., 2018)。在監測井 MW02 馴養菌群部分，菌屬 *Azospirillum* 可於 02-7-1 菌群發現，該菌屬屬於固氮菌，在一以生物濾床去除三氯乙烯的研究結果顯示，該菌屬對於去除三氯乙烯扮演重要的角色(Shukla et al., 2010)；菌屬 *Pseudomonas* 可於 02-7-2 菌群測得，該菌屬於甲苯存在下，可利用好氧共代謝方式將三氯乙烯降解(Li et al., 2015)，然馴養期間僅添加甲烷，無法確認為何可於此菌群分析有高量菌屬 *Pseudomonas*；在一份研究氣體洩漏(甲烷、乙烷、丙烷等)至土壤、地下水時，何種菌群可作為洩漏指標的研究告報指出，菌屬 *Xanthobacter* 可降解甲醇和丙醇(Barnett et al., 2021)；菌屬 *Bradyrhizobium* 可在受三氯乙烯污染土壤發現，該菌屬可以乙炔作為碳源，同時具有固氮能力(Akob et al., 2022)。



## 5. 管柱試驗系統實驗結果

管柱實驗探討因子包括三氯乙烯濃度、地下水流量、甲烷濃度與地下水 pH 值，以下分項說明各實驗因子結果。

### (1) 三氯乙烯濃度

三氯乙烯濃度共計有三個濃度試程，分別為 0.05、0.2 與 0.4 mg/L，圖 5.23 為三管柱於不同三氯乙烯進流濃度操作下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果。在三氯乙烯濃度為 0.05 mg/L 的試程中，三個管柱皆於啟動 5-6 天後測到較高濃度的三氯乙烯，管柱 A 採樣口 1 與 7 於第 6 天分別測到 0.036 與 0.006 mg/L 三氯乙烯，管柱 B 採樣口 1 與 7 於第 6 天分別測到 0.019 與 0.013 mg/L 三氯乙烯，管柱 C 採樣口 1 與 7 於第 5 天分別測到 0.016 與 0.016 mg/L 三氯乙烯，管柱 A 於第 8 天亦測得相對較高的測值，其餘天數，三管柱的三氯乙烯皆低於 0.005 mg/L；在甲烷利用部分，管柱 B 的甲烷利用狀況明顯優於管柱 C，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 6.82 與 4.19 mg/L，而管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 11.28 與 9.29 mg/L，採樣口 7 的測值皆低於採樣口 1；管柱 B 的 DO 平均測值較管柱 A 與 C 略低，管柱 A 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.59 與 7.16 mg/L，管柱 B 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.21 與 6.85 mg/L，管柱 C 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.42 與 6.90 mg/L；三管柱的 pH 數值多維持在中性範圍，但管柱 B 的 pH 平均測值同樣略低於管柱 A 與 C，管柱 A 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.41 與 7.39，管柱 B 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.17 與 7.26，管柱 C 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.37 與 7.63。

進入 0.2 mg/L 三氯乙烯濃度試程後，管柱 A 與 C 在初期隨即可分析到高濃度的三氯乙烯，管柱 A 與 C 採樣口 1 在第 17 天分別測到 0.040 與 0.195 mg/L 三氯乙烯，管柱 A 的採樣口 7 則在第 19 天測得 0.029 mg/L 三氯乙烯，而管柱 B 採樣口 1 在第 18 天測得 0.040 mg/L；在 0.2 mg/L 三氯乙烯濃度試程期間，管柱 A 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.006 與 0.005 mg/L，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.01 與 0.002 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.031 與 0.005 mg/L；甲烷利用部分，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 7.68 與 4.90 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 8.59 與 6.97 mg/L，同樣以管柱 B 的甲烷利用情形較佳，此也反映在三氯乙烯的降解上，顯示生物添加有其效果；管柱 A 的 DO 平均測值在採樣口 1 與 7 分別為 6.93 與 7.13 mg/L，管柱 B 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.67 與 7.39 mg/L，管柱 C 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.92 與 7.17 mg/L，管柱 B 的採樣口 1 的 DO 明顯比管柱 A 與 C 低，但採樣口 7 則高於另外兩管柱；管柱 B 的 pH 平均測值略低於管柱 A 與 C，管柱 A 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.82 與 7.56，管柱 B 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.32 與 7.42，管柱 C 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.73 與 7.95。





# 結果與討論

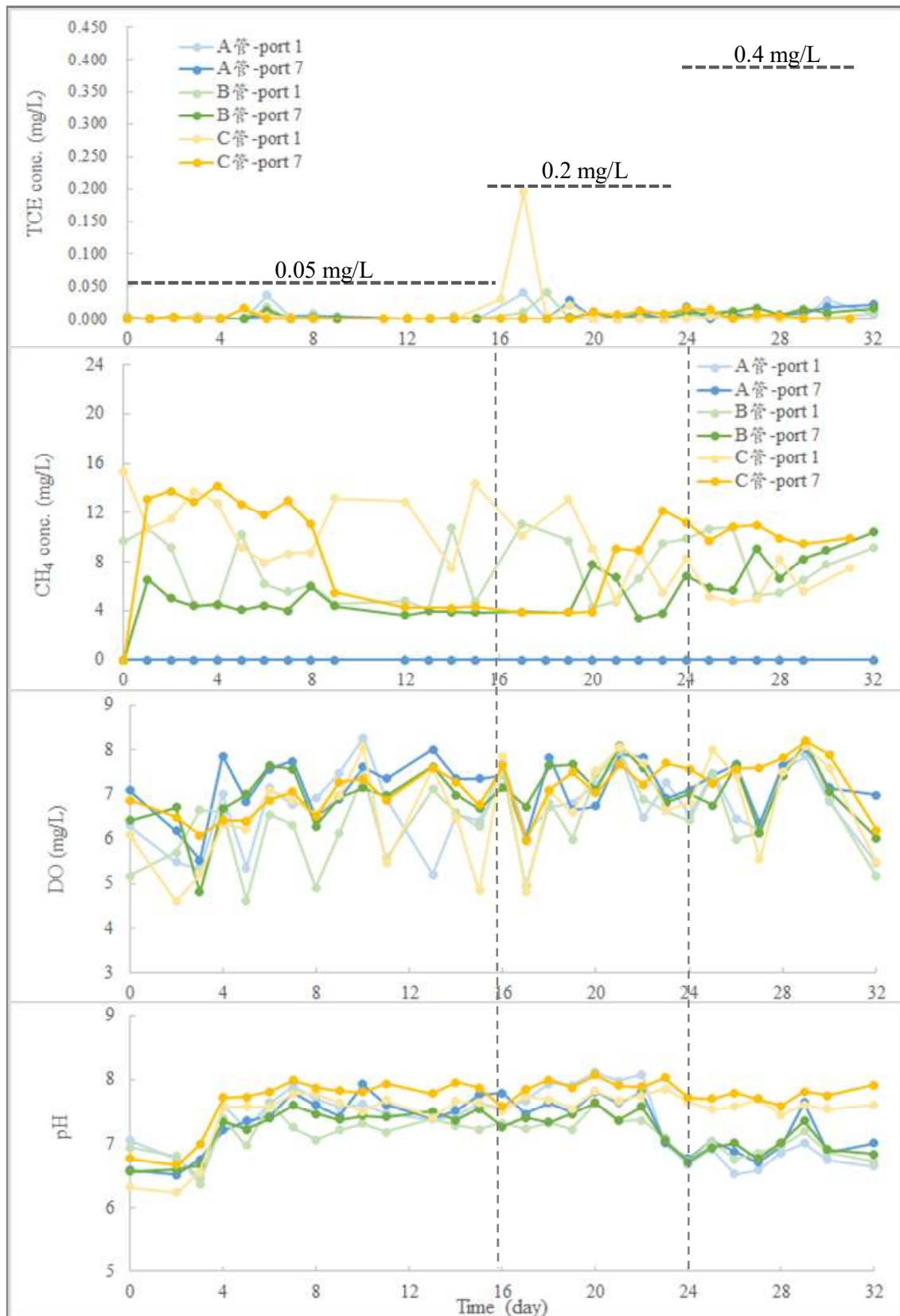


圖 5.23、三管柱於不同三氯乙烯進流濃度操作下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果



在 0.4 mg/L 三氯乙烯濃度試程期間，管柱 A 的三氯乙烯降解未若上個三氯乙烯濃度試程佳，管柱 A 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.008 與 0.012 mg/L，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.005 與 0.012 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.001 與 0.006 mg/L，其中以管柱 C 的三氯乙烯的平均濃度最低，推測為管柱 C 於前一個濃度試程的三氯乙烯壓力下，甲烷氧化菌群明顯增加，致使對於高濃度三氯乙烯有較佳的去除效果；甲烷利用部分，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 8.20 與 7.72 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 6.33 與 10.32 mg/L，管柱 C 採樣口 1 的甲烷濃度明顯低於管柱 B，可呼應管柱 C 較佳的三氯乙烯濃度降解，原水樣原就具有甲烷氧化菌群，在管柱實驗操作 1 個月後，興許其中的甲烷氧化菌群逐漸壯大；管柱 A 的平均 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.81 與 7.30 mg/L，管柱 B 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.72 與 7.03 mg/L，管柱 C 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 7.06 與 7.52 mg/L，管柱 B 的平均 DO 明顯比管柱 A 與 C 略低；在 pH 部分，管柱 A 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 6.75 與 6.99，管柱 B 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 6.90 與 6.95，管柱 C 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.60 與 7.76。

## (2) 地下水流量

實際污染場址的地下水流量介於 0.02-0.06 mL/min 間，計畫採用最高流量與最低流量進行實驗，圖 5.24 為三管柱於不同地下水流量操作之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果。在地下水流量為 0.06 mL/min 試程期間，管柱 A 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.008 與 0.012 mg/L，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.004 與 0.011 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.001 與 0.006 mg/L，三管柱於地下水流量為 0.06 mL/min 條件下，濃度皆未超過第二類地下水體管制濃度 0.05 mg/L，但其中以管柱 C 的三氯乙烯的平均濃度最低，推測為管柱 C 於管柱實驗以來，現地甲烷氧化菌群逐漸增加，致使對於高濃度三氯乙烯有較佳的去除效果；甲烷利用部分，管柱 B 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 8.20 與 7.72 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 6.14 與 10.21 mg/L，管柱 C 採樣口 1 的甲烷濃度明顯低於管柱 B，可呼應管柱 C 較佳的三氯乙烯濃度降解；管柱 A 的平均 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.81 與 7.30 mg/L，管柱 B 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 6.72 與 7.03 mg/L，管柱 C 的 DO 在採樣口 1 與 7 分別為 7.06 與 7.52 mg/L，管柱 B 的平均 DO 明顯比管柱 A 與 C 略低；在 pH 部分，管柱 A 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 6.75 與 6.99，管柱 B 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 6.90 與 6.95，管柱 C 採樣口 1 與 7 的 pH 分別為 7.60 與 7.76。

調降地下水流量至 0.02 mL/min 後，三氯乙烯降解與甲烷利用皆遜於 0.06 mL/min 操作條件，或許管柱菌群業已於相對高流量操作已久，適應該流量的碳源



## 結果與討論

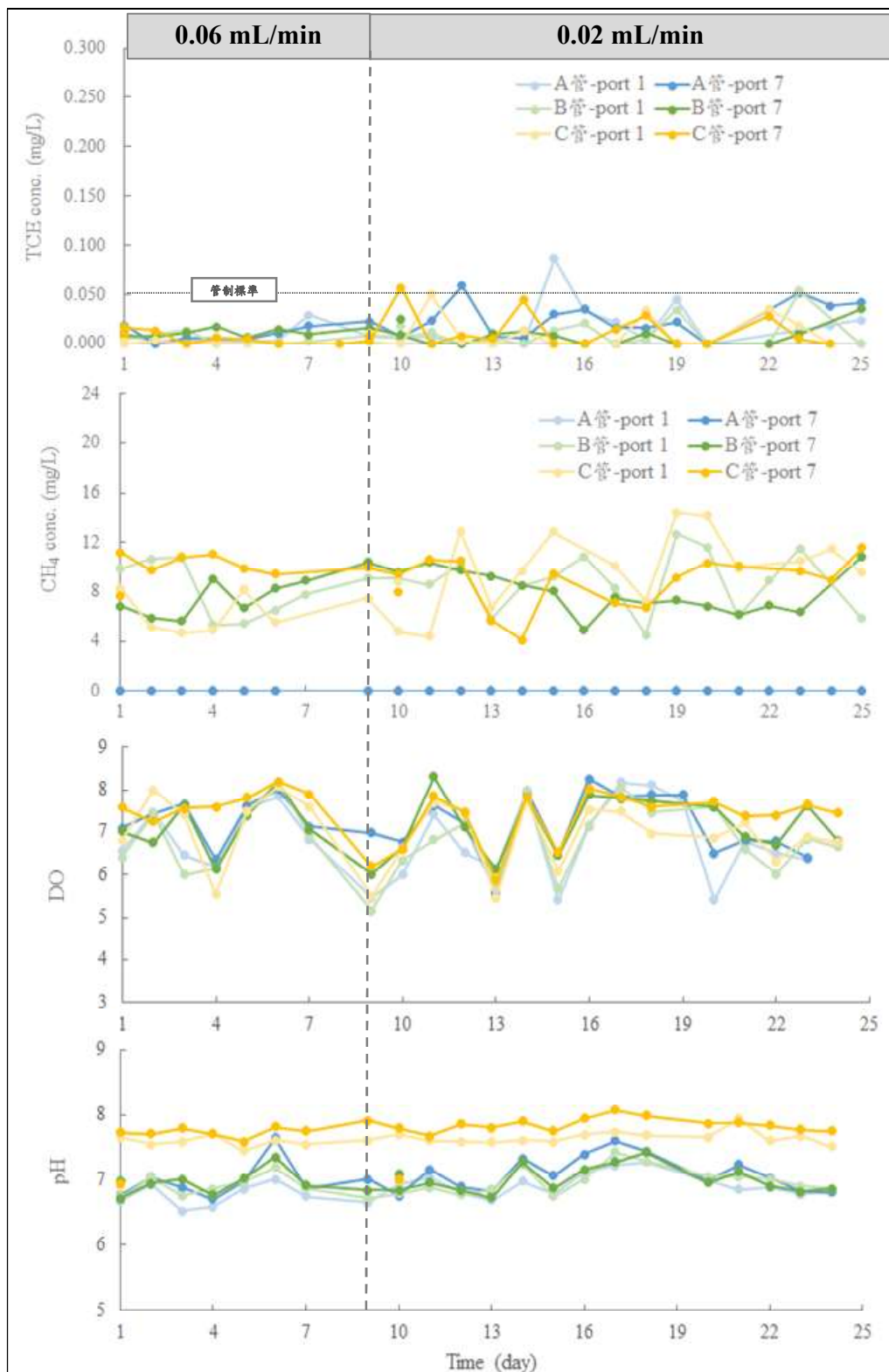


圖 5.24、三管柱於不同地下水進流量操作下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果



供給速率，流量調慢後，致使無論在甲烷利用與三氯乙烯降解上皆呈現下滑現象，管柱 B 在此流量期間採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 8.82 和 8.00 mg/L，較 0.06 mL/min 期間的平均甲烷濃度高出 0.62 與 1.1 mg/L，管柱 C 採樣口 1 與 7 的平均甲烷濃度分別為 10.32 和 8.79 mg/L，採樣口 1 較 0.06 mL/min 期間的平均甲烷濃度高出 4.18 mg/L，而採樣口 7 則低 1.42 mg/L，顯示降低流量對於管柱前段影響較大；在三氯乙烯部分，管柱 A 於採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.019 和 0.025 mg/L，管柱 B 分別為 0.011 和 0.008 mg/L，管柱 C 分別為 0.010 和 0.013 mg/L，管柱 A 與 C 採樣口 1 的三氯乙烯濃度大多低於採樣口 7，顯示三氯乙烯在管柱前端的降解效果不佳，以致流入管柱後端，此可以 C 管柱後端較低的甲烷濃度相呼應，另外，管柱 A 與 C 的三氯乙烯濃度波動也較管柱 B 顯著；三管柱於採樣口 1 的平均 DO 值介於 6.72-6.84，採樣口 7 平均數值介於 7.03-7.30，差異不大，顯示管柱維持好氧狀態；pH 值在低地下水流量條件下，管柱 A 於採樣口 1 與 7 的平均 pH 分別為 6.95 與 7.11，管柱 B 於採樣口 1 與 7 的平均 pH 分別為 7.00 與 7.01，管柱 C 於採樣口 1 與 7 的平均 pH 分別為 7.66 和 7.85，三管柱 pH 值與地下水流量 0.06 mL/min 相較差異不大。

### (3) 甲烷濃度

由於管柱 A 並無添加甲烷，因此在探討甲烷濃度對於三氯乙烯降解的影響時，僅針對管柱 B 與管柱 C 進行試驗，頂空甲烷濃度除前續的 100% 外，下修至 40%，比較管柱 B 與 C 於不同頂空甲烷濃度下的三氯乙烯共代謝，三氯乙烯添加濃度為 0.4 mg/L，地下水進流流量為 0.06 mL/min。圖 5.25 為管柱 B 與 C 於不同甲烷濃度 (100 和 40%) 之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果。當甲烷濃度為 100% 時，管柱 B 與 C 的三氯乙烯濃度皆不超過 0.02 mg/L，管柱 B 與 C 於採樣口 1 和 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.005 與 0.012 mg/L，以及 0.001 與 0.006 mg/L，在此試程，管柱 C 的表現較管柱 B 佳，推測原因同(1)不同三氯乙烯濃度，可能管柱 C 的甲烷氧化菌群經試驗一段時間已大幅增長；下調甲烷濃度至 40% 時，管柱 B 與 C 採樣口 7 三氯乙烯濃度明顯上升，係因此試程接續在地下水流速 0.02 mL/min 試程之後，流量在此試程再次調快，造成三氯乙烯快速流置管柱後端，採樣口 1 的濃度相對也較高，然而隨著操作時間拉長，濃度逐漸下降並維持穩定直至試程結束，管柱 B 與 C 於採樣口 1 和 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.001 與 0.007 mg/L，以及 0.002 與 0.034 mg/L，在此試程中，反以管柱 B 有較佳的表現。甲烷利用部分，管柱 B 於頂空甲烷濃度 100 和 40% 條件下，採樣口 1 和 7 的平均甲烷濃度分別為 8.20 與 7.72 mg/L 以及 0.30 與 0.16 mg/L，頂空甲烷 40% 情況下，兩採樣口初期尚可測得較高的甲烷濃度，隨著操作時間拉長，後期甲烷濃度皆幾近耗盡；管柱 C 與管柱 B 結果大致相同，於頂空甲烷濃度 100 和 40% 條件下，採樣口 1 和 7 的平均甲烷濃度分別為 6.33 與 10.32 mg/L 以及 0.10 與 0.65 mg/L。DO 值部分，管柱 B 與 C 差異不大，前者在





## 結果與討論

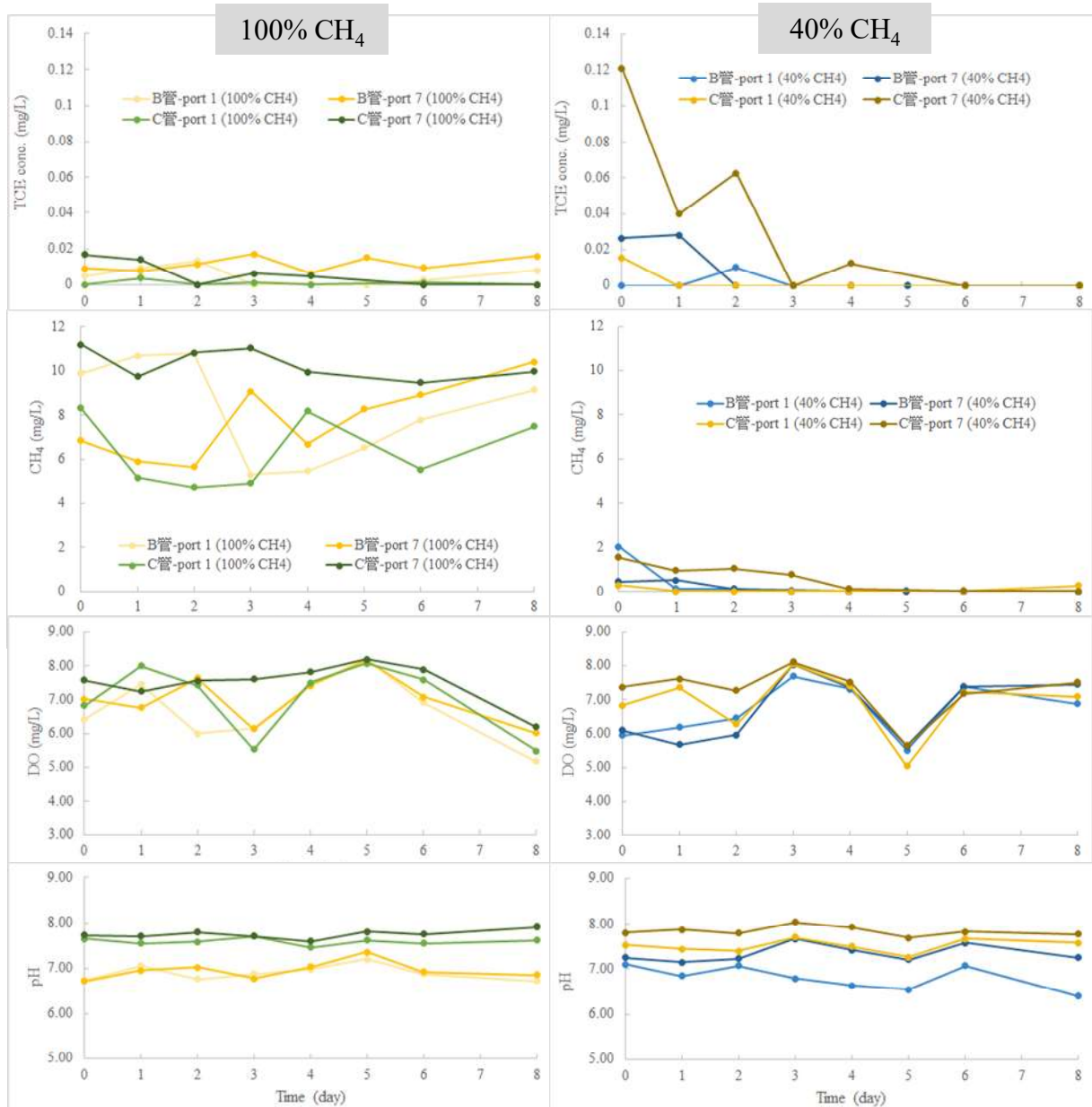


圖 5.25、管柱 B 與 C 於不同甲烷濃度(100 與 40%)下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果

頂空甲烷濃度 100 和 40% 時，採樣口 1 與 7 的平均 DO 分別為 6.72 與 7.03 mg/L 以及 6.67 與 6.70 mg/L，甲烷頂空濃度下降時，DO 濃度似乎略為下滑；後者管柱 C 於 100% 甲烷濃度時，採樣口 1 與 7 的平均 DO 分別為 7.06 與 7.52 mg/L，頂空甲烷濃度下降至 40%，採樣口 1 與 7 的平均 DO 分別為 6.91 與 7.28 mg/L。在 100% 甲烷頂空時，管柱 B 與 C 於採樣口 1 與 7 的平均 pH 介於 6.80-7.35，在 40% 甲烷頂空時，管柱 B 與 C 於採樣口 1 與 7 的平均 pH 介於 7.51-7.84，可發現甲烷濃度下調後，兩管柱 pH 皆略高，其中又以管柱 B 的變動幅度略高於管柱 C。





#### (4) 環境因子

由於污染場址的地下水偏酸，因此於馴養期間，特將菌群分別置於 pH 5 與 7 條件下馴養，故在環境因子的試驗，鎖定酸性 pH 下之三氯乙烯降解進行探討；實驗接續上述不同甲烷濃度試驗，僅就管柱 B 與 C 進行試驗，三氯乙烯濃度為 0.4 mg/L，地下水流速為 0.06 mL/min，頂空甲烷濃度為 100%，實驗先使用 pH 為 5 的模擬地下水緩慢流洗管柱 B 與 C 各約 1000 mL，隨後將監測井 B00583 於 pH 5 馴養之菌群作為管柱 B 的植種菌群，植種量為 330 mL，管柱 C 則未額外添加菌群，之後進行正式實驗。

圖 5.26 為管柱 B 與 C 於 pH 7 與 5 條件下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果。pH 7 條件下，管柱 B 採樣口 1 和 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.005 和 0.012 mg/L，當進流 pH 為 5 的模擬地下水時，採樣口 1 的三氯乙烯濃度於試程期間皆無法測得，推測試驗前先以 1 L 酸性模擬地下水流洗管柱，導致石英砂孔隙間的生物被部分洗去，致使試程正式開始後，地下水直接流至管柱後端，因此採樣口 7 於第 2 天開始，三氯乙烯濃度明顯上升，至第 3 天測到最高濃度，隨後再下降，並於第 8 天後無法測得，採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.000 與 0.012 mg/L，與 pH 7 相差不大；管柱 C 於 pH 7 條件下，採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.001 與 0.006 mg/L，當下調進流地下水 pH 至 5 時，採樣口 1 與 7 的平均三氯乙烯濃度分別為 0.002 與 0.014 mg/L，管柱 C 兩採樣口的三氯乙烯濃度變化同管柱 B，採樣口 1 濃度皆很低，採樣口 7 的三氯乙烯濃度變化較顯著，但不同於管柱 B 的地方在於，管柱 C 的三氯乙烯濃度呈現波動，不若管柱 B 有一個顯著的濃度波。在甲烷利用部分，可能因偏酸性條件，迫使管柱內菌群大量使用甲烷，以因應偏酸性的環境，管柱 B 與管柱 C 皆是如此。溶氧的部分，因大量使用甲烷的緣故，於偏酸性條件的 DO 數值明顯低於中性條件，管柱 B 採樣口 1 於 pH 7 與 5 測得的平均 DO 分別為 6.72 與 6.12，採樣口 7 分別為 7.03 與 6.63；管柱 C 採樣口 1 於 pH 7 與 5 測得的平均 DO 分別為 7.06 與 6.40，採樣口 7 分別為 7.52 與 6.78。在 pH 部分，在中性條件下，管柱 C 於兩採樣口的 pH 值皆明顯高於管柱 B，前者依次分別為 6.90 與 6.95，後者分別為 7.60 與 7.76；兩管柱雖於實驗前已進流 1 L pH 為 5 之模擬地下水以營造管柱內偏酸性環境，但正式實驗後，管柱 C 的 pH 值下調幅度不若管柱 B 佳，可能原因在於管柱 C 的 pH 值一直以來皆處於中性偏鹼，即使以 1 L 酸性模擬地下水置換，置換體積仍嫌不足；在進流酸性模擬地下水期間，兩管柱 pH 值的變化趨勢相反，管柱 B 兩採樣口的 pH 值隨著試程拉長，越來越高，而管柱 C 則是先越變越酸，於後期方又開始變高，但管柱 C 整體平均 pH 值仍高於管柱 B，管柱 B 於酸性條件下，採樣口 1 和 7 的平均 pH 值分別為 6.40 與 6.28，而管柱 C 採樣口 1 和 7 的平均 pH 值分別為 6.94 與 7.45，管柱 C 的 pH 值雖接近中性，但整體三氯乙烯降解卻明顯變差，顯示管柱 C 對於 pH 值的變化較不具抗性。



## 結果與討論

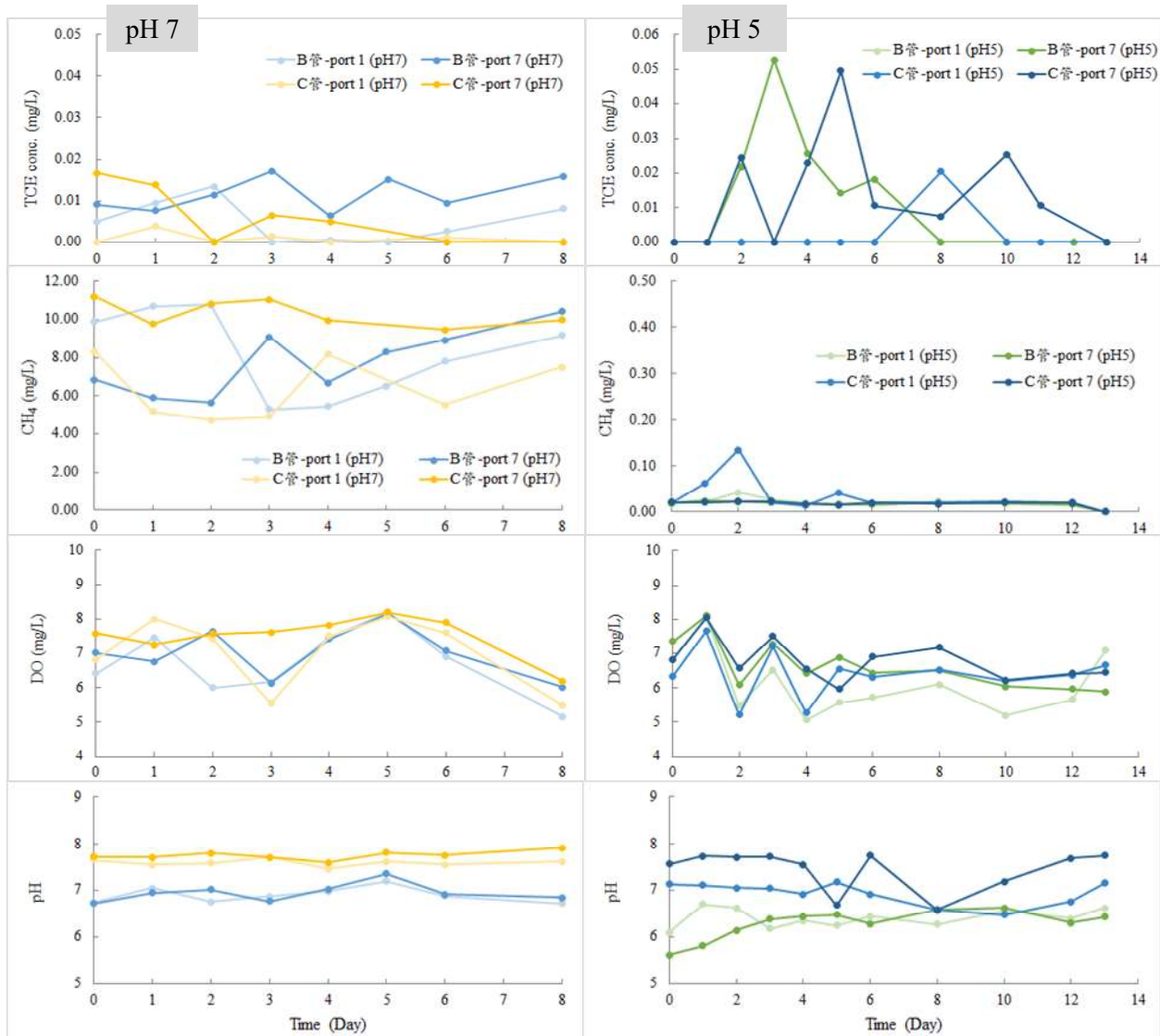


圖 5.26、管柱 B 與 C 於 pH 7 與 5 條件下之三氯乙烯、甲烷、DO 與 pH 監測結果

#### (5) 管柱實驗期間的功能性基因分析結果

管柱實驗共使用三大類菌群，一類為來自監測井 B00422 的原水，原水於啟動管柱實驗前進流至三管柱內，作為現地背景菌群代表，第二類則是生物添加實驗室馴養的降解菌群，分別為實驗啟動時植種源自 B00422 馴養之中性馴養菌群，以及管柱實驗最後探討 pH 環境因子試程，植種源自 B00583 馴養之酸性馴養菌群。菌相分析顯示，由於污染場址正進行生物整治，取自監測井 B00422 的原水具有高占比的甲烷氧化菌屬 *Methylovulum* (73.6%)，該菌屬屬於 Gammaproteobacteria 綱(Type I)；實驗室生物添加中性馴養菌群包括 14.6% 甲烷氧化菌屬 *Methylocystis*，另有微量(0.5%)的菌屬 *Methylobacterium*-*Methylorubrum*，此兩菌屬屬於 Alphaproteobacteria 綱(Type II)，管柱實驗最後植種之酸性馴養菌群因時效性故未能分析菌相。在功能



性基因部分，原水功能性基因 *pmoA*、*mmoX* 與 *mxoF* 的濃度分別為  $3.59 \times 10^4$ 、 $4.42 \times 10^5$  與  $3.41 \times 10^4$  copies/L，生物添加中性馴養菌群分別為  $7.45 \times 10^6$ 、 $3.99 \times 10^6$  與  $1.97 \times 10^7$  copies/L，生物添加酸性馴養菌群分別為  $4.89 \times 10^6$ 、 $4.80 \times 10^6$  與  $2.75 \times 10^6$  copies/L。

為瞭解管柱實驗各試程三種功能性基因(*pmoA*、*mmoX* 與 *mxoF*)的變化，於每個試程後期，收集出流水的 total genomic DNA 進行功能性基因定量分析。圖 5.27 為管柱 A 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形。管柱 A 為生物添加但未生物刺激的組別，雖未添加甲烷，但在實驗期間，除功能性基因 *mmoX* 外，其餘兩種功能性基因皆隨著試程操作時間拉長，較初始生物添加濃度高，唯在進流 0.4 mg/L 三氯乙烯時增加幅度較低，但在下修地下水流量後，基因數又略微回升，基於分析菌相於計畫後期因時效性而未分析，但初始生物添加中具有甲烷氧化菌菌屬 *Methylocystis*，文獻指出，該菌屬屬於兼性甲烷氧化菌(facultative methanotroph)，具有基因 *pmoA* (Hakobyan & Liesack, 2020)，研究指出兼性甲烷氧化菌可利用兩個碳以上的碳源，管柱 A 雖未添加甲烷，但推測填充的石英砂可能未充分洗淨，導致有其他碳源殘留，致使兼性甲烷氧化菌能夠於管柱生長；至於三氯乙烯降解部分，目前對於甲烷單氧氧化酵素的誘導文獻不算多，文獻指出銅離子(Miyaji, 2021)可以誘導膜結合性甲烷單氧氧化酵素，由於不確定系統內殘留何種有機物且是否能誘導膜結合性甲烷單氧氧化酵素，因此管柱 A 的三氯乙烯雖能被降解，相較於其他兩管柱較不穩定；另外，文獻也指出菌屬 *Methylocystis* 具有脫硝能力(Liu et al., 2023)，而模擬地下水含有硝酸根離子可作為電子接受者，或許也能有助於菌屬 *Methylocystis* 於管柱內的競爭性。

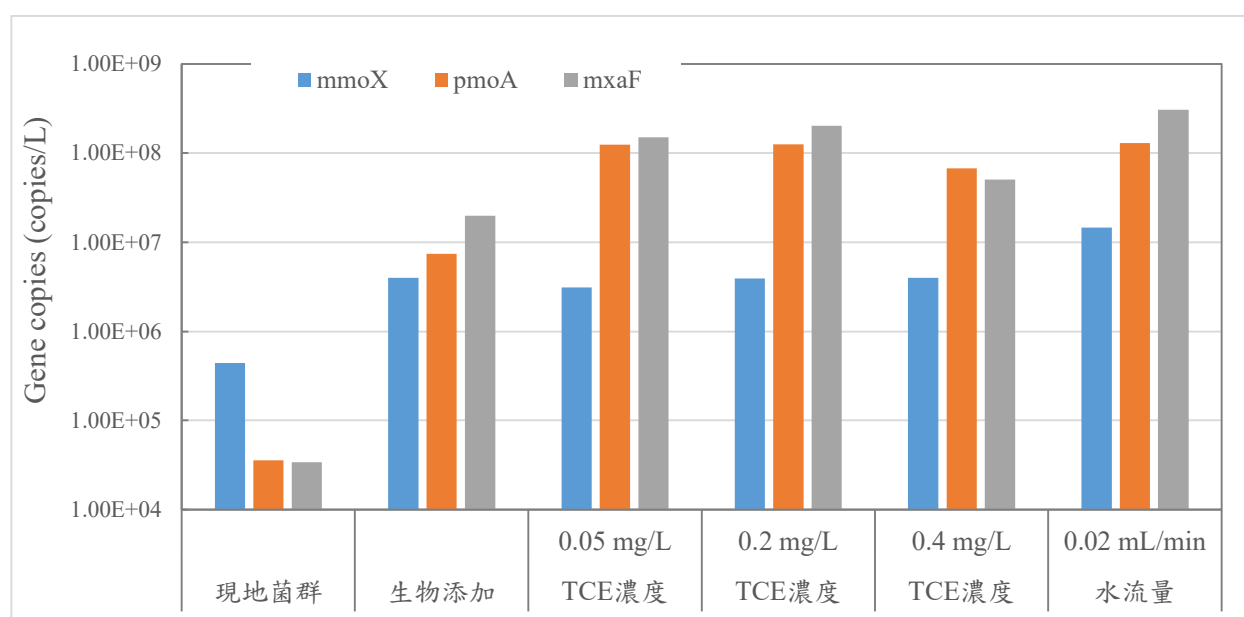


圖 5.27、管柱 A 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形



### 結果與討論

管柱 B 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形見圖 5.28。管柱 B 為生物添加又同時生物刺激的管柱，除 *mmoX* 基因無明顯濃度變化外，*pmoA* 與 *mxoF* 兩功能性基因於進流 0.05、0.2 與 0.4 mg/L 三氯乙烯時，皆較初始生物添加高出 2 個級數，且於進流 0.4 mg/L 三氯乙烯時，*pmoA* 與 *mxoF* 兩功能性基因也未若管柱 A 下滑；在下修地下水流量至 0.02 mL/min 時，*pmoA* 與 *mxoF* 兩功能性基因維持在  $10^8$  copies/L，但此階段的三氯乙烯降解表現略微下滑，推測低流量降低目標菌株與三氯乙烯與甲烷的接觸機會，又甲烷親和力高於三氯乙烯，致使三氯乙烯降解表現略微下滑；將頂空甲烷濃度下調至 40%，管柱 B 於此階段的三氯乙烯降解表現較佳，*pmoA* 與 *mxoF* 兩功能性基因量增加至  $10^9$  copies/L；最後的環境因子試程(pH 5)，雖然先以 1 L 酸性模擬地下水沖提管柱，且再植種酸性馴養菌群，但試程後期仍可分析高達  $1.60 \times 10^9$  與  $1.65 \times 10^9$  copies/L 的功能性基因 *pmoA* 與 *mxoF*，在此試程的三氯乙烯降解表現亦優於管柱 C。

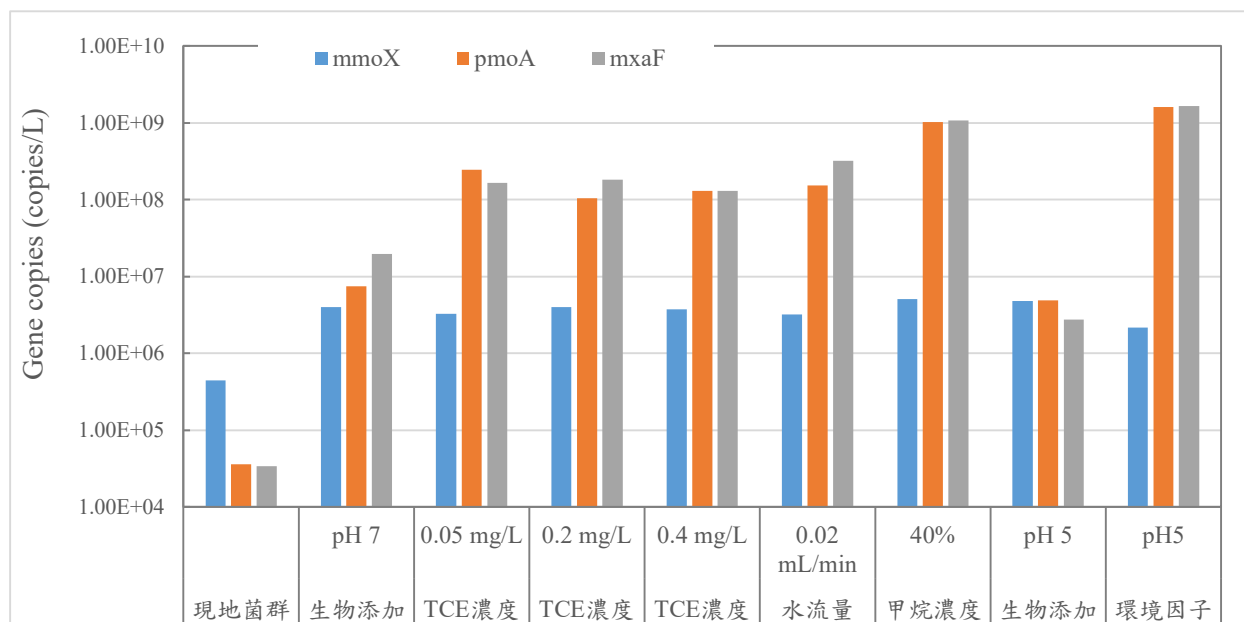


圖 5.28、管柱 B 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形

圖 5.29 為管柱 C 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形。管柱 C 為僅生物刺激的管柱，其中的三氯乙烯降解主要仰賴原水內夾帶的現地菌群，在進流 0.05、0.2 與 0.4 mg/L 三氯乙烯時，三個功能性基因皆較現地菌群基因數高，其中 *mmoX* 基因增加一個級數之後，便未再有特別的變化，而基因 *pmoA* 與 *mxoF* 則持續增加，在進流不同三氯乙烯期間的 *pmoA* 與 *mxoF* 基因數低於管柱 B 一個級數，但於 0.4 mg/L 三氯乙烯進流階段時，管柱 C 降解表現略優於管柱 B，由於抽取菌群 total genomic DNA，無法斷定菌體死活，因此推測管柱 B 雖在 0.4 mg/L 三氯乙烯進流期間分析的 *pmoA* 與 *mxoF* 基因數雖略高於管柱 C，但或許菌體活性不佳；在進





流流量下修至 0.02 mL/min 期間，基因 *pmoA* 與 *mxoF* 數量達到  $10^8$  copies/L，相較前一試程，增加 1 個級數，但三氯乙烯降解表現同管柱 B 略微下滑，推測為因地下水流速較慢，降低甲烷氧化菌與甲烷與三氯乙烯的接觸，另甲烷的親和力較三氯乙烯高，又甲烷濃度遠高於三氯乙烯，因此菌株將甲烷運用於菌體生長，而非三氯乙烯的共代謝；下修甲烷頂空濃度至 40% 時，流量又再調回 0.06 mL/min，此階段的三氯乙烯多在採樣口 7 測得較高的濃度，與採樣口 7 的平均三氯乙烯濃度明顯高於前一個地下水流速試程，加上地下水流量較快，導致菌群流失與抑制，因此此階段的 *pmoA* 與 *mxoF* 數量略微下降；在最後酸性環境因子試程，由於先以酸性模擬地下流洗管柱，再進行正式試驗，功能性基因 *mxoF* 數量，雖維持  $10^8$  copies/L，但基因 *pmoA* 量下降一個級數，而此也反映在三氯乙烯降解較不理想的結果上。

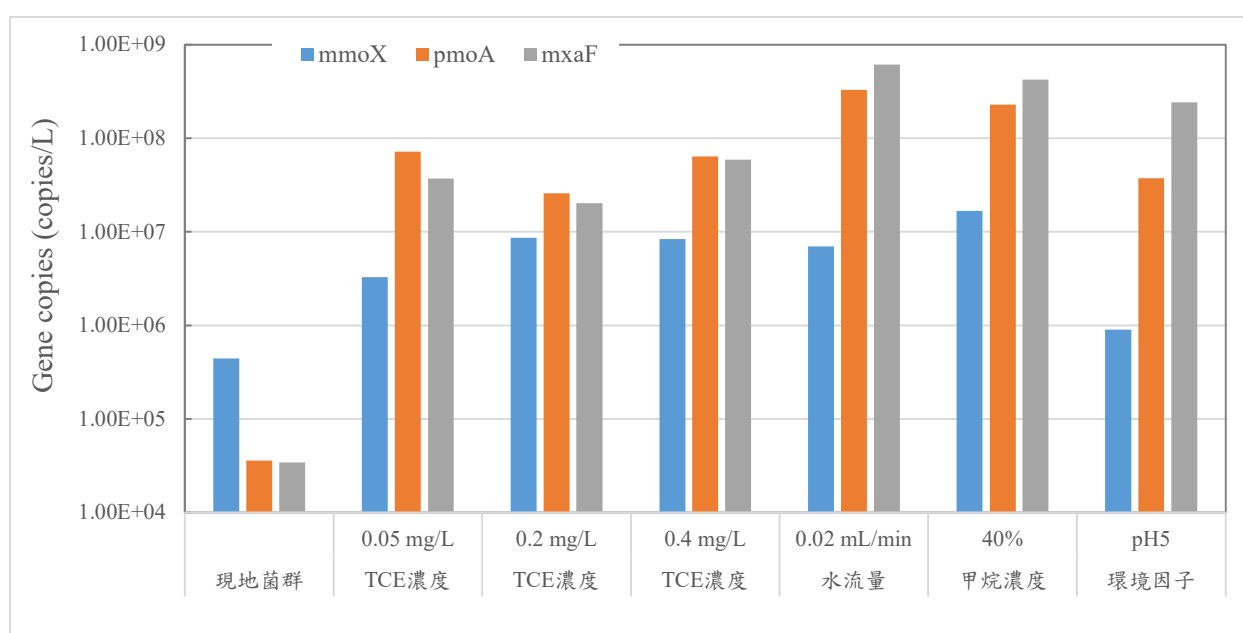


圖 5.29、管柱 C 於管柱實驗期間之三功能性基因量變化情形

## 6. 總結與建議

研究計畫將取自污染場址三口監測井(MW02、B00422 與 B00583)於酸性與中性條件下馴養，藉由逐步提高三氯乙烯馴養濃度，獲得可供後續管柱實驗植種的合適菌群，其中 B00422 與 B00583 兩者皆可降解最高三氯乙烯馴養濃度 0.4 mg/L，分別作為管柱實驗中性與酸性條件之植種菌群；相關分子生物技術成功建立，並用於馴養菌群期間的功能性基因(*mmoX*、*pmoA* 與 *mxoF*)定量；馴養期間菌相與功能性基因分析結果顯示，甲烷氧化菌屬占比相較於原始地下水樣明顯提高，亦可測得甲基氧化菌屬的存在；管柱實驗結果顯示，管柱 B(生物添加+生物刺激)相較於管柱 A(生物添加)與管柱 C(生物刺激)，整體而言具有較佳的三氯乙烯降解表現，功能性基因 *pmoA* 與 *mxoF* 數量整體也較其餘兩管柱高；綜上所述，好氧共代謝三氯乙烯於生



### 結果與討論

物整治上具有可行性，管柱實驗期間分析的平均三氯乙烯濃度皆未超過地下水第二類管制濃度，有些甚至符合第一類地下水管制濃度。

實場整治時，污染場址環境若好氧條件，則可考量使用好氧共代謝策略，建議先以生物刺激為主，主要基質-甲烷濃度無需過高，提供 40%頂空甲烷(相當 9 mg/L 甲烷)即足量進行 0.4 mg/L 三氯乙烯的好氧共代謝；現地地下水偏酸性或中性，流量介於 0.02-0.06 mL/min，皆可以進行三氯乙烯好氧共代謝，唯須注意整治期間的功能性基因數量是否持續增加，且微生物菌相能否分析有甲烷氧化或甲基氧化菌屬的存在，以利兩者交互比對與驗證；若上述生物添加操作仍無法有效提升目標降解菌群的量，則可採用生物添加策略，可添加實驗室馴養菌群，或考慮從注藥井取用增殖的降解菌群進行其他監測井的添加。



## 六、參考文獻

- Akob, D. M., Sutton, J. M., Bushman, T. J., Baesman, S. M., Klein, E., Shrestha, Y., ... & Freeman, J. L. (2022). Acetylenotrophic and diazotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain I71 from TCE-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(22), e01219-22.
- Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (1997). Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation. In *Advances in Microbial Ecology* (pp. 289-350). Boston, MA: Springer US.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2023/11/01.  
<https://wwwn.cdc.gov/tsp/substances/ToxChemicalClasses.aspx>
- Attia, T. M. S., & Hu, X. L. (2013). Synthesized magnetic nanoparticles coated zeolite for the adsorption of pharmaceutical compounds from aqueous solution using batch and column studies. *Chemosphere*, 93(9), 2076-2085.
- Auman, A. J., Speake, C. C., & Lidstrom, M. E. (2001). *nifH* sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4009-4016.
- Banzhaf, S., & Hebig, K. H. (2016). Use of column experiments to investigate the fate of organic micropollutants—a review. *Hydrology and Earth System Sciences*, 20(9), 3719-3737.
- Barnett, M. J., Gregory, S. P., Bott, T., Bech, T. B., Jacobsen, R., Souquet, P., ... & TOTAL SA, P. (2021) Report on the potential for exploiting methane oxidizer genes for monitoring stray methane intruding into and aquifers and assessment of the area that can be monitored.
- Baskaran, D., & Rajamanickam, R. (2019). Aerobic biodegradation of trichloroethylene by consortium microorganism from turkey litter compost. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(4), 103260.
- Bennett, P., He, F., Zhao, D., Aiken, B., & Feldman, L. (2010). In situ testing of metallic iron nanoparticle mobility and reactivity in a shallow granular aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 116(1-4), 35-46.
- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Botton, S., Cornelissen, E., Ghadiri, E., De Jonge, M., ... &



## 參考文獻

- Verliefde, A. R. D. (2012). Transformation of organic micropollutants during river bank filtration: laboratory versus field data. *Water Practice and Technology*, 7(4), wpt2012081.
- Bodelier, P. L., & Steenbergh, A. K. (2014). Interactions between methane and nitrogen cycling; current metagenomics studies and future trends. In *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle*. Caister Academic Press.
- Bradley, P. M., & Chapelle, F. H. (1998). Effect of contaminant concentration on aerobic microbial mineralization of DCE and VC in stream-bed sediments. *Environmental Science & Technology*, 32(5), 553-557.
- Brockman, F. J., Payne, W., Workman, D. J., Soong, A., Manley, S., & Hazen, T. C. (1995). Effect of gaseous nitrogen and phosphorus injection on in situ bioremediation of a trichloroethylene-contaminated site. *Journal of Hazardous Materials*, 41(2-3), 287-298.
- Chang, C. H., Yang, H. Y., Hung, J. M., Lu, C. J., & Liu, M. H. (2017). Simulation of combined anaerobic/aerobic bioremediation of tetrachloroethylene in groundwater by a column system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, 150-157.
- Chen, H., Liu, S., Liu, T., Yuan, Z., & Guo, J. (2020). Efficient nitrate removal from synthetic groundwater via in situ utilization of short-chain fatty acids from methane bioconversion. *Chemical Engineering Journal*, 393, 124594.
- Chen, S. K., Chin, Y. L., Yang, H. Y., Lu, C. J., & Liu, M. H. (2021). Cometabolic biodegradation of chlorinated ethenes with methanotrophs in anaerobic/aerobic simulated aquifer. *Journal of Environmental Biology*, 42(4), 1033-1045.
- Chen, S. K., Yang, H. Y., Huang, S. R., Hung, J. M., Lu, C. J., & Liu, M. H. (2020). Complete degradation of chlorinated ethenes and its intermediates through sequential anaerobic/aerobic biodegradation in simulated groundwater columns (complete degradation of chlorinated ethenes). *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, 4517-4530.
- Chu, K. H., & Alvarez-Cohen, L. (1998). Effect of nitrogen source on growth and trichloroethylene degradation by methane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3451-3457.





- Coleman, N. V., Mattes, T. E., Gossett, J. M., & Spain, J. C. (2002). Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a  $\beta$ -proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2726-2730.
- De Marines, F., Cruciata, I., Di Bella, G., Di Trapani, D., Giustra, M. G., Calabrisotto, L. S., ... & Viviani, G. (2023). Degradation of 1, 2-dichloroethane in real polluted groundwater by using enriched bacterial consortia in aerobic and anaerobic laboratory-scale conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 183, 105644.
- Dorigo, U., Volatier, L., & Humbert, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39(11), 2207-2218.
- Eggers, K. W., Rees, A. A., Siegal, J., & Hobbs, R. L. (2008). Pilot-scale evaluation of in situ cometabolic bioremediation of TCE in groundwater using PHOSter® technology. *Remediation Journal: The Journal of Environmental Cleanup Costs, Technologies & Techniques*, 18(2), 49-66.
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 268-275.
- Eshinimaev, B. T., Medvedkova, K. A., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Osipov, G. A., Lysenko, A. M., & Trotsenko, Y. A. (2004). New thermophilic methanotrophs of the genus *Methylocaldum*. *Microbiology*, 73, 448-456.
- Fergala, A., AlSayed, A., & Eldyasti, A. (2018). Behavior of type II methanotrophic bacteria enriched from activated sludge process while utilizing ammonium as a nitrogen source. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 130, 8-16.
- Fiedler, L. (2000). Engineered approaches to in situ bioremediation of chlorinated solvents: Fundamentals and field applications. Stroming media: report.
- Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2004). Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3, 185-254.
- Frascari, D., Zanaroli, G., & Danko, A. S. (2015). In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 382-399.



## 參考文獻

- Futagami, T., Goto, M., & Furukawa, K. (2008). Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *The Chemical Record*, 8(1), 1-12.
- Ghosh, D., Bhadury, P., & Routh, J. (2014). Diversity of arsenite oxidizing bacterial communities in arsenic-rich deltaic aquifers in West Bengal, India. *Frontiers in Microbiology*, 5, 602.
- Hakobyan, A., & Liesack, W. (2020). Unexpected metabolic versatility among type II methanotrophs in the Alphaproteobacteria. *Biological Chemistry*, 401(12), 1469-1477.
- Halsey, K. H., Sayavedra-Soto, L. A., Bottomley, P. J., & Arp, D. J. (2005). Trichloroethylene degradation by butane-oxidizing bacteria causes a spectrum of toxic effects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 794-801.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2), 439-471.
- He, J., Ritalahti, K. M., Aiello, M. R., & Löffler, F. E. (2003). Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 996-1003.
- Henry, S. M., & Grbić-Galić, D. (1991). Influence of endogenous and exogenous electron donors and trichloroethylene oxidation toxicity on trichloroethylene oxidation by methanotrophic cultures from a groundwater aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 236-244.
- Hermon, L., Denonfoux, J., Hellal, J., Joulain, C., Ferreira, S., Vuilleumier, S., & Imfeld, G. (2018). Dichloromethane biodegradation in multi-contaminated groundwater: Insights from biomolecular and compound-specific isotope analyses. *Water Research*, 142, 217-226.
- Héry, M., Casiot, C., Resongles, E., Gallice, Z., Bruneel, O., Desoeuvre, A., & Delpoux, S. (2014). Release of arsenite, arsenate and methyl-arsenic species from streambed sediment affected by acid mine drainage: a microcosm study. *Environmental Chemistry*, 11(5), 514-524.
- Huang, S. W., Hussain, B., Chen, J. S., Asif, A., & Hsu, B. M. (2024). Evaluating



groundwater ecosystem dynamics in response to post in-situ remediation of mixed chlorinated volatile organic compounds (CVOCs): An insight into microbial community resilience, adaptability, and metabolic functionality for sustainable remediation and ecosystem restoration. *Science of The Total Environment*, 920, 170874.

Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T. J., Murrell, J. C., & Xing, X. H. (2010). Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 277-288.

Kalyuzhnaya, M. G., & Xing, X. H. (Eds.). (2018). Methane biocatalysis: paving the way to sustainability. Springer International Publishing.

Kamon, M., Endo, K., & Katsumi, T. (2003). Measuring the k-S-p relations on DNAPLs migration. *Engineering Geology*, 70(3-4), 351-363.

Ke, J., Gin, K. Y. H., Tan, L. H., & Reinhard, M. (2012). Fate of endocrine-disrupting and pharmaceutically active substances in sand columns fed with secondary effluent. *Journal of Environmental Engineering*, 138(10), 1067-1076.

Kocamemi, B. A., & Çeçen, F. E. R. H. A. N. (2010). Biological removal of the xenobiotic trichloroethylene (TCE) through cometabolism in nitrifying systems. *Bioresource Technology*, 101(1), 430-433.

Le, N. B., & Coleman, N. V. (2011). Biodegradation of vinyl chloride, cis-dichloroethene and 1, 2-dichloroethane in the alkene/alkane-oxidising *Mycobacterium* strain NBB4. *Biodegradation*, 22, 1095-1108.

Lebron, C. A., Petrovskis, E., Loeffler, F., & Henn, K. (2011). Guidance protocol: application of nucleic acid-based tools for monitoring monitored natural attenuation (MNA), biostimulation, and bioaugmentation at chlorinated solvent sites. DTIC Document.

Lee, S. W., Keeney, D. R., Lim, D. H., Dispirito, A. A., & Semrau, J. D. (2006). Mixed pollutant degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing either soluble or particulate methane monooxygenase: can the tortoise beat the hare?. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7503-7509.

Lewis, J., & Sjöström, J. (2010). Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*,



## 參考文獻

- 115(1-4), 1-13.
- Li, J., Lu, Q., de Toledo, R. A., Lu, Y., & Shim, H. (2015). Effect of toluene concentration and hydrogen peroxide on *Pseudomonas plecoglossicida* cometabolizing mixture of cis-DCE and TCE in soil slurry. *Environmental Geochemistry and Health*, 37, 985-995.
- Lidstrom, M. E. (2006). Aerobic methylotrophic prokaryotes. *The Prokaryotes*, 2(20), 618.
- Lin, W. H., Chen, C. C., Ou, J. H., Sheu, Y. T., Hou, D., & Kao, C. M. (2022). Bioremediation of hexavalent-chromium contaminated groundwater: Microcosm, column, and microbial diversity studies. *Chemosphere*, 295, 133877.
- Liu, J., Amemiya, T., Chang, Q., Qian, Y., & Itoh, K. (2012). Toluene dioxygenase expression correlates with trichloroethylene degradation capacity in *Pseudomonas putida* F1 cultures. *Biodegradation*, 23, 683-691.
- Liu, S., Yu, X., Qin, H., Ye, J., & Long, Y. (2023). Newly isolated strain *Methylocystis* sp. L03 oxidizes methane with nitrite as terminal electron acceptor. *Journal of Environmental Engineering*, 149(12), 04023084.
- Lorphensri, O., Sabatini, D. A., Kibbey, T. C., Osathaphan, K., & Saiwan, C. (2007). Sorption and transport of acetaminophen, 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol, nalidixic acid with low organic content aquifer sand. *Water Research*, 41(10), 2180-2188.
- Luo, W., Zhu, X., Chen, W., Duan, Z., Wang, L., & Zhou, Y. (2014). Mechanisms and strategies of microbial cometabolism in the degradation of organic compounds—chlorinated ethylenes as the model. *Water Science and Technology*, 69(10), 1971-1983.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y. T., Gossett, J. M., & Zinder, S. H. (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, 276(5318), 1568-1571.
- Miyaji, A. (2021). Methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b grown in medium containing high copper concentration.





*Journal of the Japan Petroleum Institute*, 64(1), 29-35.

- Moran, B. N., & Hickey, W. J. (1997). Trichloroethylene biodegradation by mesophilic and psychrophilic ammonia oxidizers and methanotrophs in groundwater microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3866-3871.
- Morono, Y., Unno, H., & Hori, K. (2006). Correlation of TCE cometabolism with growth characteristics on aromatic substrates in toluene-degrading bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 31(3), 173-179.
- Nam, J. H., Shin, J. H., Kwon, K., Bae, W., & Lee, D. H. (2013). Microbial diversity of the trichloroethylene contaminated groundwater treatment system and characterization of *Pseudomonas* sp. DHC8. *Korean Journal of Microbiology*, 49(4), 336-342.
- Nivetha, N., Srivarshine, B., Sowmya, B., Rajendiran, M., Saravanan, P., Rajeshkannan, R., ... & Dragoi, E. N. (2023). A comprehensive review on bio-stimulation and bio-enhancement towards remediation of heavy metals degeneration. *Chemosphere*, 312, 137099.
- Nwankwegu, A. S., Zhang, L., Xie, D., Onwosi, C. O., Muhammad, W. I., Odoh, C. K., ... & Idenyi, J. N. (2022). Bioaugmentation as a green technology for hydrocarbon pollution remediation. Problems and prospects. *Journal of Environmental Management*, 304, 114313.
- Ouyang, W., Huang, Y., Li, C., Xue, C., Liu, M., Ma, J., ... & Liu, H. (2024). Response of TCE biodegradation to elevated H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>: Implication for electrokinetic-enhanced bioremediation. *Environmental Research*, 248, 118338.
- Powell, C. L., Goltz, M. N., & Agrawal, A. (2014). Degradation kinetics of chlorinated aliphatic hydrocarbons by methane oxidizers naturally-associated with wetland plant roots. *Journal of Contaminant Hydrology*, 170, 68-75.
- Saeki, H., Akira, M., Furuhashi, K., Averhoff, B., & Gottschalk, G. (1999). Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology*, 145(7), 1721-1730.
- Scott, D., Brannan, J., & Higgins, I. J. (1981). The effect of growth conditions on intracytoplasmic membranes and methane mono-oxygenase activities in



# 參考文獻

- Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology*, 125(1), 63-72.
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., & Yoon, S. (2010). Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 496-531.
- Shukla, A. K., Vishwakarma, P., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2010). Bio-filtration of trichloroethylene using diazotrophic bacterial community. *Bioresource Technology*, 101(7), 2126-2133.
- Silva-Gonzalez, J. A., Fraire-Garcia, D. A., Ochoa-Banuelos, C. V., Montanez-Hernandez, L. E., ESCAREÑO, M. P. L., & Balagurusamy, N. (2018). Methane monooxygenase and their potential role in methane mitigation. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 36(3), 44-47.
- Sinke, A. J. C., Dury, O., & Zobrist, J. (1998). Effects of a fluctuating water table: Column study on redox dynamics and fate of some organic pollutants. *Journal of Contaminant Hydrology*, 33(1-2), 231-246.
- Srivastava, P., Sanders, S. M., Dane, J. H., Feng, Y., Basile, J., & Barnett, M. O. (2009). Fate and transport of sulfadimethoxine and ormetoprim in two southeastern United States soils. *Vadose Zone Journal*, 8(1), 32-41.
- Suttinun, O., Müller, R., & Luepromchai, E. (2010). Cometabolic degradation of trichloroethene by *Rhodococcus* sp. strain L4 immobilized on plant materials rich in essential oils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4684-4690.
- Taylor, A. E., Dolan, M. E., Bottomley, P. J., & Semprini, L. (2007). Utilization of fluoroethene as a surrogate for aerobic vinyl chloride transformation. *Environmental Science & Technology*, 41(18), 6378-6383.
- ThermoFisher (2023), PCR 循環參數—成功的六個關鍵考量因素，瀏覽網址：  
<https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>；瀏覽日期：2023.11.14
- ThermoFisher (2023)，RT-qPCR 的基本原理，瀏覽網址：  
<https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>；瀏覽日期：2023.11.14



- Tiehm, A., & Schmidt, K. R. (2011). Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes—aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 415-421.
- Tikhonova, E. N., & Kravchenko, I. K. (2019). Activity and diversity of aerobic methanotrophs in thermal springs of the russian far east. *In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-30). Elsevier.
- Verce, M. F., Ulrich, R. L., & Freedman, D. L. (2000). Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3535-3542.
- Xing, Z., Zhao, T., Zhang, L., Gao, Y., Liu, S., & Yang, X. (2018). Effects of copper on expression of methane monooxygenases, trichloroethylene degradation, and community structure in methanotrophic consortia. *Engineering in Life Sciences*, 18(4), 236-243.
- Yamazawa, A., Date, Y., Ito, K., & Kikuchi, J. (2014). Visualizing microbial dechlorination processes in underground ecosystem by statistical correlation and network analysis approach. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(3), 305-309.
- Yao, Y., Gao, B., Chen, H., Jiang, L., Inyang, M., Zimmerman, A. R., ... & Li, H. (2012). Adsorption of sulfamethoxazole on biochar and its impact on reclaimed water irrigation. *Journal of Hazardous Materials*, 209, 408-413.
- Zhang, T., Zhou, J., Wang, X., & Zhang, Y. (2017). Coupled effects of methane monooxygenase and nitrogen source on growth and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Journal of Environmental Sciences*, 52, 49-57.
- 中興工程(2023)，土壤氣體抽除法(Soil Vapor Extraction)整治技術探討，瀏覽地址：  
<chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://proj.ftis.org.tw/eta/e-paper/PDF/ti039-2.pdf>，瀏覽日期：2023.11.01
- 今周文化(2023)，瀏覽網址：  
<https://esg.businesstoday.com.tw/article/category/180687/post/202303130012>；瀏覽日期：2023.10.28
- 行政院環境部(2021)，地下水污染管制標準，行政院環境部。



## 參考文獻

行政院環境部(2021)，行政院環保署毒化物質安全資料表，行政院環境部。

李思元、莊以光 (2010)。DNA 定序技術之演進與發展。 **Journal of Biomedical & Laboratory Sciences** , 22(2) , 49-58 。 <https://doi.org/10.30046/JBLS.201006.0001>

林庭亦(2021)，評估甲烷氧化菌群利用甲烷微奈米氣泡好氧共代謝混合氯乙烯污染物之研究，國立雲林科技大學環境與安全衛生工程系，碩士論文。

施玉賢(2020)，應用分子生物技術分析受氯乙烯類污染物污染場址菌相及脫氯功能性基因定量之研究，國立雲林科技大學環境與安全衛生工程系，碩士論文。

秦逸玲(2015)，地下水中氯化乙烯類好氧共代謝生物分解之研究，國立中興大學環境工程研究所，碩士論文。

張紋菁(2012)，地下水中二氯乙烯之厭氧與好氧整合生物復育研究：管柱試驗，國立中興大學環境工程研究所，碩士論文。

陳和魏(2005)，國內外污染場址整治技術應用現況與發展趨勢， **中興工程季刊**，P.11-18。

黃幸如(2014)，地下水中順-1,2—二氯乙烯好氧生物復育之研究，國立中興大學環境工程研究所，碩士論文。

經濟部工業局(2008)，含氯碳氫化合物土壤及地下水污染預防與整治技術手冊。經濟部工業局；中興工程顧問有限公司。

經濟部工業局(2010)，土壤及地下水污染調查技術手冊。經濟部工業局。

盧至人(1997)，地下水的污染整治，國立編譯館，台北市。



## 七、經費使用說明

計畫經費核定金額為 1,025,000 元，核定科目總計三項，分別為人事費用 344,487 元，耗材與主要費用 669,993 元，以及其他相關研究費用 10,520 元；實際支用總經費為 1,023,701 元，人事費用為 344,483 元，下修 4 元，耗材與主要費用 679,218 元，上調 9,225 元，而其他相關研究費用全數刪減。人事費用主要支應計畫主持人主持費暨補充保費，以及兩位研究生獎助津貼，總計 11 個月；耗材與主要費用主要用於購買執行計畫所需之耗材，如(1)分子生物實驗所需之總 DNA 萃取套組、Q-PCR 反應試劑、所需之各式 tip、各式微量離心管、手套、酒精等，亦包括委託生技公司進行次世代定序，以及菌相生物資訊分析衍生的費用；(2)購買實驗配製的藥品，如三氯乙烯、培養基相關無機鹽化學品、甲烷氣體鋼瓶等；(3)分析甲烷與三氯乙烯衍生氣相層析使用之耗材，如氣密針、氣袋、分析管柱、載流氣體鋼瓶，以及氣相層析需定期更換之墊片、玻璃管等耗材；(4)管柱實驗所需的石英砂、橡膠管、玻璃珠、玻璃管柱的燒製、橡膠塞、橡膠墊片、封口鋁蓋與採樣相關塑膠針筒、樣品瓶、燒杯等。