

行政院環境保護署

106 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含 氯有機物污染地下水之現地模場試驗 期末報告(定稿)

主 辦 單 位：  行政院環境保護署

專案執行單位： 國立中山大學／環境工程研究所

專案主持人： 高志明 教授

專案執行期間： 106 年 01 月 09 日起至

106 年 11 月 30 日止

中 華 民 國 106 年 12 月 印製

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告
☒修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫 ☒ 模場試驗
計畫類別	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
1. 本專案預估之成果績效已評估。 2. 計畫書撰寫具體。 3. 研究方法可行，對未來實場應用性已說明。 4. 文獻蒐集完整。 5. 對國內外本研究領域現況了解。 6. 專案執行期限合理。 7. 預期成果評估原則已說明。		1. 感謝委員指導。 2. 感謝委員指導。 3. 感謝委員指導，計畫成果會針對未來實場應用性進行完整評估及說明。 4. 感謝委員指導，後續計畫執行階段會持續更新文獻。 5. 感謝委員指導，計畫執行期間將會持續收集國內外相關領域研究現況。 6. 感謝委員指導。 7. 感謝委員指導，後續將以嚴謹原則進行計畫成果評估。	
委員 2 審查意見		計畫單位回覆	
1. 計畫主持人過去長期從事地下水整治相關技術研發，研究論文及專利非常多，在國內地下水整治領域屬領導人物，研究績效非常優異，研究專長與提出計畫非常符合。 2. 地下水中氯烯類污染物為國際及國內議題，其中生物整治更是重要整治方法之一，本研究議題具重要性。本計畫兼具學理創新與產業應用價值，預期成果除發表論文外，後續可能也會有產業應用可能性。 3. 本研究應用新型高分子聚合物注入地下水中，整治污染場址中含氯乙烯類污染物。該技術新穎，並擬於模場中測試，且包含最新的分析技術，創新性高，具有產業化可能性。		1. 感謝委員指導和肯定。 2. 感謝委員指導，若計畫成果達到預期成效，除將發表國內外文章外，亦將配合土基會進行技術宣導，以期達到技術外溢目的。 3. 感謝委員指導，由於地下水中氯烯類污染物之整治是屬於長期性的工作，因此生物整治技術是較為經濟可行的整治方式。惟氯烯類污染物之生物降解需長期注入主要基質，目前國內業者使用之基質多以國外進口之基質為主。未來若能發展經濟有效、生物可分解且對環境友善之基質，將可提供業者更多選項。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告
☒修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫 ☒ 模場試驗
計畫類別	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 3 審查意見		計畫單位回覆	
1. 本計畫目標、架構、內容、執行合理可行性。 2. 預期成果價值性與應用性。		1. 感謝委員指導，本計畫目標與內容主要發展 γ -PGA 為生物可分解之高分子材料，此材料不僅成份特殊與多功能性，亦可長效持續釋碳並刺激現地微生物生長，藉由研發之技術結合批次與管柱試驗成果應用於現地生物整治場址中獲得實場驗證之依據，可提升污染整治成效之可行性。本計畫研究架構已補件於計畫修定稿中(第 22 頁)，請委員參閱。此外，本計畫所發展 γ -PGA 具有帶正電及負電官能基之特性，使 γ -PGA 在整治過程中，可同時鍵結氫離子及硫離子，達到酸化控制及臭味抑制，且所開發之技術符合目前國內外推動的現地、被動及生物之綠色整治要項，可有效降低整治成本，為一種更具經濟效益且突破傳統設計思維之節能及環境友善工法。 2. 感謝委員指教，本計畫預期成果為提供被動式現地生物還原脫氯法整治受 TCE 污染地下水之相關知識與技術提升，並可依實驗室之結果應用於實場設計之準則。另外，本計畫所發展技術應用性對於處理受 TCE 污染之地下水具有經濟效益及環境友善之整治工法，此技術將可取代傳統之抽取處理法、吸附法或灌注國外進口藥劑等商業化產品，並提供業界對於受 TCE 污染地下水之整治工法選擇更具多樣性，此項技術亦將在市場上更具競爭力。	
委員 4 審查意見		計畫單位回覆	

1. 使用高分子聚合物 γ-PGA 處理受含氯有機物污染地下水，應可避免傳統化學藥劑注入法，可能遭遇阻塞、水質酸化及硫酸鹽還原作用造成臭味問題，應為十分具有潛力處理技術。	1. 感謝委員指導，γ-PGA 具有帶正電及負電官能基之特性，使 γ-PGA 在整治過程中，可同時鍵結氫離子及硫離子，達到酸化控制及臭味抑制。
2. 以 γ-PGA 加強地下水污中三氯乙烯之還原脫氯，建議整治過程中需注意，是否產生毒性更高中間產物「氯乙烯」之變化狀況。	2. 感謝委員指導。TCE 還原脫氯產生之副產物氯乙烯(vinyl chloride, VC)常因不斷累積，而使地下水之毒性增高。因此，若監測結果顯示 VC 累積，將釐清及排除 VC 累積因素，使 TCE 能完成還原脫氯反應，產生無害之最終產物乙烯。

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書■期中報告
☐修正計畫書☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫■模場試驗
計畫類別	■整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
1. 執行現況、流程及方法已具體說明。		1. 感謝委員指導。	
2. 計畫後續執行工作項目已於 P 歐 66 中說明。		2. 感謝委員指導，後續會依照撰寫工作項目進行完成。	
3. 本計畫的執行進度並無落後。		3. 感謝委員指導。	
4. 進度符合，依結案標準本計畫應可達成原計畫標的		4. 感謝委員指導，計畫成果會針對結案標準進行完整評估及說明。	
5. 研究內容與計畫目的相符。		5. 感謝委員指導和肯定。	
6. 本計畫為執行中的計畫，目前已有初步的成果，執行成果的討論與建議的合理性尚待期末報告中進一步說明。		6. 感謝委員指導，後續期末報告會針對實場應用性進行評估及說明。	
7. 整體研究成果符合預期。		7. 感謝委員指導。	
8. 學術產出及活動、人才培育等符合預期(依據以往的成果研析)。		8. 感謝委員指導，若計畫成果達到預期成效，除將發表國內外文章外，亦將配合各單位進行技術宣導，以期達到技術外溢目的。	
9. 本計畫仍在執行中，研究成果獲得專利、技術轉移等尚待期末報告中提出。		9. 感謝委員指導，現今生物整治技術是較為經濟可行的整治方式，惟氯烯類污染物之生物降解需長期注入基質。本計畫選用基質為高分子之綠色產品(γ -PGA)，若未來實驗室相關試驗與現地試驗均有效去除目標污染物。日後加強式自然生物技術，以 γ -PGA 作為基質參考選項之一。後續將申請發明專利以利於未來研究避免衍生爭議，並於期末報告進行說明。	
10. 本計畫的預期成果對社會經濟發展(土壤與地下水污染的產業)的效益尚待期末報告中提出。		10. 感謝委員指導，本計畫加強式自然生物技術，	
11. 結論(1) 中說明 437 nm ~ 5423 nm 的顆粒可在黏土到砂粒的顆粒間移動，是否可在黏土顆粒間移動建議評估。		整治受 TCE 污染地下水之相關知識與技術提升。另外，本計畫所發展技術應用性對於處理受 TCE 污染之地下水具有經濟	
12. ORP 為 - 142 mV，是否有利於完全脫氯？建議討論。			

	效益及環境友善之整治工法，並於期末報告進行說明。 11. 感謝委員指教，後續會依照委員建議進行相關試驗，應用於黏土性質之傳輸速率之可行性評估。 12. 感謝委員指導，ORP 偵測值為-150 到-250 在此環境下為適合硫酸鹽還原的環境，在硫酸鹽還原環境下亦是適合脫氯菌生長反應的環境，其中 Dehalococcoides 菌種普遍存在氯乙烯還原 A 基因 (Vinyl chloride reductase A gene, vcrA)，vcrA 基因可產生還原脫氯酵素將氯乙烯脫氯為乙烯，vcrA 基因需要嚴苛厭氧環境，因此主要觀察溶氧之變化。此外，DO 及 ORP 分析可能受到干擾而有升高情形。因此，實際數值應較測值為低。
委員 2 審查意見	計畫單位回覆
1. 實際進度符合預定進度。 2. 圖 4.28 模場實驗之注入井及監測井之相對距離請標示，並註明是否為新設井。 3. 未來模場注藥後，建議一併收集附近之監測井數據一併比對成果及中間產物。 4. 期末報告，建議將專利之申請情形進行說明。	1. 感謝委員指導和肯定 2. 感謝委員指導，依照委員建議進行修改本計畫修定稿中(圖 4.28)，圖 4.27 非本計畫執行期間所設置井位，已將此圖修正，請委員參閱。 3. 感謝委員指導，將依照委員建議進行評估，日後若可行會將附近監測井納入討論一併討論於期末報告呈現成果。 4. 感謝委員指導，將依照委員建議，日後提出期末報告會將專利申請情形進行說明。

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書■期中報告
☐修正計畫書☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫■模場試驗
計畫類別	■整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ-PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 3 審查意見		計畫單位回覆	
1. 批次試驗中採用 TCE 污染物初始濃度為 5.3 mg/L，考量未來應用於現地污染場址，污染濃度未必如此高，是否會有低濃度時，產生邊際效益過低狀況，建請謹慎考量。 2. 承上，使用高濃度污染染物批次試驗降解效率達到 99%，TCE 可能仍超過「地下水汙染管制標」0.05 mg/L 標準；反之在低濃度污染物時處理效率，可能才是本整治技術是否具有實場應用之關鍵 3. 報告中圖 4.15~4.17，顯示各組別試驗均會產生高濃度中間產物，因這些 TCE 降解過程中間產物為毒性更高的污染物質，將來本技術用於實場應用時，因地下水流佈、藥品注入影響、地層及水利傳導等因素，如何確保減少更高毒性污染物產生，降低高毒性中間產物污染擴散風險，建議於後續模場試驗中，審慎評估。		1. 感謝委員指導，批次試驗初始濃度為 5.3 mg/L，主要原因是嘗試以高濃度 TCE 情況下了解微生物生長趨勢與降解目標汙染物成效，藉此試驗求出基質添加最佳劑量，後續現地場址灌注基質作為參考。現地背景資料 TCE 最高濃度為 0.15 mg/L，藉由現地場址亦可證明低濃度降解效果，評估可達到預期效果，因此本團隊亦尚待現地成果會與批次試驗達到類似成效，後續期末報告會呈現與說明。 2. 感謝委員指導，在批次試驗中使第 84 天之降解效率為 γ-PGA 組(99%) TCE 殘餘濃度為 0.012 mg/L，符合管制標準 0.05 mg/L。藉由批次試驗得知高濃度 TCE 均良好降解成效，管柱試驗初始為 1.51 mg/L，亦達到預期成效。現地試驗部分亦是本團隊關注地方，藉由現地成果驗證實驗室試驗成效。本團隊尚待現地成果，若效果良好此工法成為處裡受 TCE 污染之地下水具有經濟效益及環境友善之整治工法。 3. 感謝委員指導，由於批次試驗主要求出最佳藥劑量與微生物降解情況，其中 Dehalococcoides 菌種普遍存在氯乙烯還原 A 基因 (Vinyl chloride reductase A gene,vcrA)，vcrA 基因可產生還原脫氯酵素將氯乙烯脫氯為乙烯，但欲營造此環境需要嚴苛的厭氧狀態，批次試驗中發現 50 天過	

	後溶氧才小於 0.05 mg/L，推估可能氧氣抑制 <i>vcrA</i> 基因成長。然而，DO 及 ORP 分析可能受到干擾而有升高情形。因此，實際數值應較測值為低。管柱試驗過程中未尚發生類似情況發生，後續實場應用時會謹慎注意此問題發生，未來嘗試將基質改質為還原態以利後續應於可快速消耗氧氣。
委員 4 審查意見	計畫單位回覆
1. 本計畫報告已初步完成包括γ-PGA 粒徑、黏滯度、表面電位、流通性等基本特性分析，及 5 組批次及 3 組管柱實驗，研究內容豐富，符合進度。 2. 管柱實驗中(圖 4.23)，自然衰減組 TCE 濃度降低有限，降解產物並不明顯，統計上是否具顯著意義？或是是否有其他證據證明有自然衰減？ 3. 圖 4.23(p.54 第二段)，誤植為圖 4.20；另圖 4.23 建議分成 a、b 及 c 說明。 4. 本計畫研究成果佳，應用性強，具可期待性。	1. 感謝委員指導，批次試驗及管柱實驗均達到預期結果，現地試驗初估將與實驗室規模試驗達到效果類似。日後期末報告會完成評估與說明。 2. 感謝委員指導，管柱式驗中管柱 1 自然衰減區主要模擬上游持續洩露目標污染物，評估基質被微生物利用情形與土壤吸附之效果，管柱 2 為 γ-PGA 基質注入區，藉由管柱試驗了解自然降解與添加基質之加強式生物整治效果之差異。 3. 感謝委員指導，依照委員建議進行修正。 4. 感謝委員指導與肯定，後續將以嚴謹原則進行計畫成果評估。

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告
☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫 ☒ 模場試驗
計畫類別	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 1 審查意見		計畫單位回覆	
1. 專案研究計畫執行現況、流程及方法已具體說明 2. 計畫後續執行工作項目及內容已於 p. 75 說明。 3. 計畫執行進度與預定進度符合。 4. 執行進度並未落後。 5. 結案標準與原計畫相符。 6. 研究內容與原計畫目的相符。 7. 根據研究內容所提出之討論與建議合理且可行，整體研究成果符合預期。 8. 學術產出及活動、人才培育等是符合預期。 9. 成果研發獲得專利、技術轉移：申請中。 10. 本計畫的研究成果具應用潛力，對國內污染整治的技術與應用發展具有效益。 11. 提供簡要成本經濟分析，具參考價值。 12. TCE 是否完全轉化至乙烯或乙烷仍待確認。 13. 適合本技術的污染場址的特性建議說明。		1. 感謝委員指導與肯定。 2. 感謝委員指導，後續將以此方向更深入探討。 3. 感謝委員指導。 4. 感謝委員指導。 5. 感謝委員指導。 6. 感謝委員指導，感謝委員指導，日後計畫將以嚴謹原則進行計畫成果評估。 7. 感謝委員指導，經過一系列試驗成果顯示，本計畫成果達到預期成效，後續將應用於不同含氯污染廠址，評估基質對不同場址之適用性。 8. 感謝委員指導，日後配合各單位進行技術宣導，以期達到技術外溢目的 9. 感謝委員指導，本計畫選用基質為高分子之綠色產品(γ -PGA)，經由實驗成效顯示，本計畫應用加強式自然生物技術為可行性，後續 γ -PGA 可作為基質參考選項之一。目前專利申請中，以利於未來研究避免衍生爭議問題。 10. 感謝委員指導，本計畫加強式自然生物技術，整治受 TCE 污染地下水之相關知識與技術提升。另外，發展技術應用性對於處理受 TCE 污染之地下水具有經濟效益及環境友善之整治工法， 11. 感謝委員指導，由表 4.4 提供各釋碳基質藥劑單價成本，經由試驗證實 γ -PGA 釋碳基質可排除如糖蜜型釋碳基質造成地下水 pH 值快速酸化問題。另外， γ -PGA 基質可直接灌注於地下水，其他需額外添加	

	鹼性緩衝物質，才能有效酸化問題但造成藥劑成本之提高。 12. 感謝委員指導，後續會持續監測乙烯生成量以確保完全將成完全脫氯成無毒之乙烯。 13. 感謝委員指導，本計畫選用污染場址土壤顆粒成份以砂土、坵土為主，配合基質傳輸性佳，於該場址成果顯示基質有效傳輸至下游，基質可維持厭氧環境和菌種豐富度，加速 TCE 之還原脫氯效率，並縮短整治期程，達到污染場址整治及防止污染物擴散目的。
委員 2 審查意見	計畫單位回覆
1. 計畫執行工作項目及內容說明具體詳盡。 2. 計畫進度達成原訂目標。 3. 計畫成果已發表於國內外文章。 4. 建議研究成果註明申請之專利。 5. P60 頁圖 4.25，建議適度放大，以利判讀。 6. 結論(4)若在不同的初始濃度之下反應，是否會有相同的生物利用率。	1. 感謝委員指導與肯定。 2. 感謝委員指導，日後計畫將以嚴謹原則進行計畫成果評估 3. 感謝委員指導，後續研究相關成果亦會持續發表，供各先進作為參考。 4. 感謝委員指導，依照委員建議於結論增加(13)目前彙整本計畫成果與味丹公司合作申請該基質專利，以利於未來研究避免衍生爭議。 5. 感謝委員指導，依照委員建議進行修正。 6. 感謝委員指導，於相同基質情形下不同總有機碳濃度之生物利用率並未太顯著差別，但不同基質於同樣總有機碳濃度情況下生物利用率皆為不同，其主要各基質特性不一樣，微生物分解利用速率均不同。

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告
☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106 年度	計畫類型	☐ 研究計畫 ☒ 模場試驗
計畫類別	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他		主持人：高志明 NO：
計畫名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
委員 3 審查意見		計畫單位回覆	
1. 本計畫報告完成工作項目包括 γ-PGA 基本特性分析，及 5 組批次及 3 組管柱、以及模場實驗，並分析基本水質、污染物、微生物等資訊，並初步進行成本討論。整體報告內容豐富，使用技術新穎，計畫符合進度。 2. 摘要中(第 ii 頁)部分文字有追蹤修訂，請移除。 3. 表 4.4 中成本，是指藥劑成本，抑或包括注入之操作成本？敬請釐清。 4. 本計畫含實驗室、管柱、及模型場實驗，研究成果質與量俱佳，後續應用性高。		1. 感謝委員指導，本計畫經過一系列試驗，目前成果顯示，實驗室與現地均有良好成效，後續將基質進行改質優化，以利於基質應於不同場址皆有成效。 2. 感謝委員指導，依照委員建議已修正。 3. 感謝委員指導，表 4.4 中成本主要是為估算藥劑單價成本，後續針對不同藥劑，整治期間藥劑注入次數以及藥劑量等，更精確得知藥劑成本。 4. 感謝委員指導，本計畫所發展技術應用性對於處理受 TCE 污染之地下水具有經濟效益及環境友善之整治工法，此技術將可取代傳統之抽取處理法、吸附法或灌注國外進口藥劑等商業化產品，並提供業界對於受 TCE 污染地下水之整治工法選擇更具多樣性，此項技術亦將在市場上更具競爭力。	
委員 4 審查意見		計畫單位回覆	
1. 本計畫達成目標，同意結案。 2. 本技術未來應用於現地污染場址時，建請注意 TCE 降解過程之中間產物，係為毒性更高的污染物質，需注意其流佈及分解狀況。		1. 感謝委員指導，日後計畫將以嚴謹原則進行計畫成果評估。 2. 感謝委員指導，後續基質應用於含氯污染場址將會評估副產物累積現象以及觀察 Dehalococcoides 菌種。由 Dehalococcoides 菌種普遍存在氯乙烯還原 A 基因(Vinyl chloride reductase A gene, vcrA)，vcrA 基因可產生還原脫氯酵素將氯乙烯脫氯為乙烯。	

106年土壤及地下水汙染整治基金補助研究與模場試驗專案申請書

專案基本資料表

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案類別 (單選)	☐ 研究專案 ☒ 模場試驗
研究主題	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他			
申請機構系所	國立中山大學環境工程研究所			
機構地址	804 高雄市鼓山區蓮海路70號			
專案主持人	高志明		職等／職稱	西灣講座教授
協同主持人			職等／職稱	
專案名稱	中文	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
	英文	Application of poly- γ -glutamic acid to enhance the in situ bioremediation of chlorinated-solvent contaminated groundwater: a pilot-scale study		
	關鍵字	三氯乙烯、現地生物復育、次世代定序、綠色整治		
執行期程	自民國 106 年 01 月 09 日起 至民國 106 年 11 月 30 日止			
專案主持人	姓名：高志明 E-mail：jkao@mail.nsysu.edu.tw		專線：07-5254413 手機：0935989780	
專任助理	姓名： E-mail：		專線： 手機：	
經費分析總表	專案預估總經費		金額	編列說明
	1.	人事費用	330,000	(1~5項相加之50%為限)
	2.	貴重儀器使用含維護費	0	(與計畫實驗相關)
	3.	消耗性器材與主要費用	747,940	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	39,080	(差旅與租賃費用)
	5.	雜項費用	65,000	(1~6項相加之5%為限)
	6.	行政管理費	117,980	(1~5項相加之10%為限)
	專案計畫申請總金額		1,300,000	

專案主持人(簽名及蓋章)：

高志明

日期：2017/12/14

校長 鄭英初

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

106 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：106 年 12 月 05 日

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質	專案類別	☐ 研究專案 ☒ 模場試驗
研究主題	☒ 整治 ☐ 預防 ☐ 其他		
申請機構系所	國立中山大學環境工程研究所	計畫主持人	高志明
專案名稱	以高分子聚合物 γ -PGA 處理受含氯有機物污染地下水之現地模場試驗		
專案執行期程	☐ 申請階段 ☐ 期中 ☒ 期末		

二、成果績效自評

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

(一) 學術面

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表日期、發表處、 發表名稱、影響指數等)
A 學術 產出 及 活動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	1	0	1	100	
		(2)研討會論文	1	0	1	100	第十八屆海峽兩岸環境 保護研討會
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1	100	Journal of Cleaner Production
		(2)研討會論文					
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告					
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
B 人才 培育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2	100	
		(2)博士	1	1	1	100	
	8.研究團隊 (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					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、 技術轉移相關詳細資料)
A 智慧財產權	1.專利 (件數)	已核准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申請中	發明	1	0	1	100	目前申請中
			新型/設計					
			合計					
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	4.技術移轉 (應用技術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
(2)品種/系(件數)								
C 產學研合作	6.促成合作研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額(仟元)						
	8.促成取得業 界科專	件數						
		業界投資金額(仟元)						
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						

(三) 政策面

項目 \ 目標達成程度			申請預 估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或 其他詳細資料)
-------------	--	--	-----------	-----------	-----------	-----------	----------------------------

A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

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

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

針對含氯有機溶劑污染場址，本團隊結合微生物、分子生物及環境工程之理論，將學術與應用結合，實際將研發之技術應於污染場址實場驗證。目前已研發一系列的污染場址整治系統及基質，可有效整治含氯有機溶劑污染場址。本計畫主要之目的為評估以聚麩胺酸為基質，以整治受含氯有機溶劑污染地下水之可行性。

此基質可維持厭氧環境和菌種豐富度，加速 TCE 之還原脫氯效率，並縮短整治期程，達到污染場址整治及防止污染物擴散目的。因 γ -PGA 具有同時帶正電及負電官能基之特性，使 γ -PGA 在整治過程中，可鍵結硫離子，從而可進行臭味抑制。而 γ -PGA 具有胺基，胺基釋放後為和水反應產生氨，由於氨為鹼性物質，因此可中和有機碳在厭氧反應後產生的酸，解決以往生物基質會造成水質酸化之問題，且試驗中亦未有造成基質傳輸效果不佳與阻塞等問題發生。故開發之技術符合目前國內外推動的現地、被動及生物之綠色整治要項，可有效降低整治成本，為一種更具經濟效益且突破傳統設計思維之節能及環境友善工法。

摘要

本計畫以三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)為目標污染物，研究發展處理重質非水相溶液(dense non-aqueous phase liquids, DNAPL)污染地下水之整治技術。由於DNAPL污染場址之整治是屬於長期性的工作，因此生物整治技術是較為經濟可行的整治方式。惟DNAPL之生物降解需長期注入主要基質，但基質之注入往往造成地下水阻塞及酸化問題。聚麩胺酸(gamma-polyglutamic acid, γ -PGA)是一種經由生化作用合成之高分子聚合物，由於具有保濕性、無毒性、金屬螯合性、生物可分解性及生體相容性等特性，已在各工業領域上有廣泛之運用性。因此 γ -PGA具有發展做為加強含氯有機物污染地下水之厭氧生物整治基質之優勢和潛力。本計畫主要之目的為評估以 γ -PGA為基質，以整治受TCE污染地下水之可行性。本計畫工作項目包括(1) γ -PGA基本特性分析，以評估 γ -PGA之物化和生物特性；(2)厭氧批次生物降解試驗，以評估 γ -PGA加強TCE還原脫氯之可行性；(3)管柱試驗以模擬現地應用之成效並以管柱試驗獲得現地應用之設計參數；及(4)現地模場試驗，以獲得實場應用之成果並驗證實驗室數據。本計畫完成 γ -PGA基本特性分析、厭氧批次生物降解試驗、管柱試驗以及模場試驗場址。 γ -PGA基本特性分析之結果顯示 γ -PGA之二個主要粒徑包含437 nm 及5,423 nm，因此在奈米到微米之間。此粒徑大小可使 γ -PGA有效分佈到粗細顆粒間(包括黏土到砂粒)，達到均勻分佈及增加生物可及性目標。此外， γ -PGA之介達電位為-36 mV，此負電位可使 γ -PGA向下游傳輸，不會被主要代負電的土壤顆粒吸附在注入點附近。厭氧微生物批次實驗結果顯示，實驗中以 γ -PGA為主要基質時，TCE具有最佳之降解效率。TCE濃度由初始濃度之4.23 mg/L在42天內可持續穩定降解至0.26 mg/L，反應至84天濃度剩餘0.01 mg/L，降解效率高達99%，已低於地下水污染管制標準0.05 mg/L。然而，實驗中以乳化油為主要基質時，pH在第28天後迅速下降至5.95，pH值並在84天後降為5.66，呈現酸化之情形。而 γ -PGA組之pH值在第84天仍在7.32，維持良好之中性環境。 γ -PGA之總有機碳(total organic carbon, TOC)初始濃度為1,977 mg/L，在第84天後降為量646 mg/L，生物利用率為67.3%。乳化油組之TOC初始濃度為841 mg/L，在第84天後為492 mg/L 生物利用率為41%。此外，由變性梯度膠體電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)菌相分析結果可知， γ -PGA可使環境中之菌相群集豐富度增加，且各組別以即時定量聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)分析初始脫氯菌(*Dehalococcoides* spp., DHC)菌量約為 10^4 gene copies/g soil， γ -PGA組於84天增加到 1.49×10^6 gene copies/g，生長效果較乳化油於84天之 9.4×10^4 gene copies/g soil為佳。由管柱試驗結果得知，添加 γ -PGA於管柱中做為碳源時，反應期間並未監測到出流水質酸化問題，pH值可維持在中性(6.5-7.5之間)，而氧化還原電位(oxidation-reduction

potential, ORP)亦因 γ -PGA之注入，使環境由氧化態轉變為還原態(ORP為-142 mV)，顯示 γ -PGA可有效做為微生物碳源。管柱試驗結果顯示管柱出流水TCE濃度於操作40天後，可由初始之1.51 mg/L降為0.05 mg/L以下，出流端3初期DHC菌量在約 10^3 gene copies/g，於120天增加到 1.02×10^6 gene copies/g，由批次及管柱實驗結果可知，添加 γ -PGA基質可促進現地脫氯菌生長，並能加強現地厭氧還原脫氯效果。現地模場評估結果顯示，本場址地下水TCE濃度介於0.04至0.15 mg/L之間，水力傳導係數為 7.269×10^{-4} cm/s，地下水流速為41.2 cm/day，地下水流向由西南向東北流動。W1上游井做為 γ -PGA灌注井，W3、W4、W5三口下游井做為監測井，現地試驗於注藥後W1井TCE濃度11周內為0.089 mg/L改善0.007 mg/L。監測井結果顯示，W3井TCE濃度5周內由0.149 mg/L改善至0.035 mg/L。另，初期各井脫氯菌量在約 10^3 gene copies/L，經灌注基質後各井位均有變化趨勢，後期第75天脫氯菌量維持在 $1.1 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^7$ gene copies/L；W2井無灌注基質，脫氯菌量介於 $1.67 \times 10^3 \sim 4.52 \times 10^3$ gene copies/L。實驗結果證實上游注藥井降解效果顯著，亦形成透水性生物整治牆，符合現地、被動及生物整治概念之綠色整治技術。由基質成本計算，相較其他須添加緩衝溶液基質，以每公斤NT 30至50元 γ -PGA釋碳基質較為優勢。本計畫執行成果顯示：(1)以 γ -PGA為基質，可加速TCE之還原脫氯效率，並縮短整治期程；(2) γ -PGA基質黏度低，可提升藥劑傳輸之能力；(3) γ -PGA具有緩衝pH之效果，解決以往生物基質會造成水質酸化之問題，維持良好之中性環境；(4) γ -PGA可有效促進厭氧分解反應，維持厭氧環境和菌種豐富度；(5) γ -PGA釋碳基質可避免其他釋碳基質造成地下水體pH值酸化問題，亦較其他基質具有較佳之傳輸性及可維持高濃度之生物可利用碳性質。實場數據顯示 γ -PGA可有效促進現場TCE之生物降解，使 γ -PGA之基質系統成為一種更具經濟效益及環境友善之綠色整治工法。

關鍵字：三氯乙烯、聚麩胺酸(γ -PGA)、批次試驗、管柱試驗、現地模場試驗

Abstract

Soil and groundwater at many existing and former industrial areas and disposal sites are contaminated by halogenated organic compounds that were released into the environment. When they are released into the subsurface, they tend to adsorb onto the soils and cause the appearance of DNAPL (dense-non-aqueous phase liquid) pool. In situ bioremediation of DNAPLs sites need to inject carbon substrates into the subsurface, which would cause the acidification and odor problems of the subsurface environment. This would deteriorate the groundwater quality and cause the increase in maintenance cost. The objective of this proposed study is to evaluate the feasibility of applying the poly-(γ -glutamic acid) (γ -PGA) as the primary substrate to enhance the TCE reductive dechlorination. The γ -PGA is a biopolymer synthesized by biochemical processes. Due to its characteristics of moisture resistance, no toxicity, and chelating ability with metals, it has been widely applied by the industry. The one-year project includes four major tasks: (1) analysis of basic physical, chemical, and biological characteristics of γ -PGA, (2) performance of anaerobic microcosm experiments, (3) conduction of anaerobic column experiments, and (4) in situ pilot-scale study. This project results from the particle size distribution of γ -PGA show that two major diameters of γ -PGA were observed, which were around 437 nm and 5,423 nm. Thus, the diameter of γ -PGA globule was in nano to micro-scale ranges. These two different size ranges of γ -PGA globule allowed it to distribute evenly in soil particles. The average zeta potentials of γ -PGA was -36 mV. This result implies that γ -PGA globule was in a reduced state, and the reduced zeta potential would result in the increase in the repulsion and friction force between γ -PGA globule and soil particles. This would promote γ -PGA to migrate to farther downgradient area, and thus, the influence zone can be enlarged. The microcosm study was conducted to evaluate the feasibility and effectiveness of using γ -PGA for the enhancement of TCE dechlorination. Results show that the addition of γ -PGA created anaerobic conditions and also caused a rapid increase in the total organic carbon concentration (about 1,977 mg/L). This led to a more thorough biodegradation of TCE through reductive dechlorinating mechanisms. Up to 99% of TCE (with initial concentration of 4.23 mg/L) was degraded after 84 days of operation. Acidification was prevented due to the release of amine functional groups could react

with water and form ammonia, which resulted in alkaline conditions due to its basic characteristic. Thus, pH was maintained in neutral conditions, which benefited the growth of *Dehalococcoides* spp. (*DHC*). Increase in *DHC* population indicates that the supplement of γ -PGA enhanced the growth of *DHC* (increased from 1×10^4 to 1.49×10^6 gene copies/g soil) after 84 days of operation, and thus, the TCE dechlorination rate was enhanced. Microbial analyses reveal that dechlorinating bacteria existed in soils, which contributed to TCE dechlorination. The increased ethene concentrations indicate the complete TCE dechlorination with γ -PGA addition. The column experiments was performed to evaluate the effectiveness of using the γ -PGA as the primary substrates for TCE control and biodegradation. Results from the column study show that the TCE concentration in the column effluent dropped from the initial concentration of 1.51 mg/L to below 0.05 mg/L after 40 days of operation. TCE biodegradation byproducts (dichloroethylene and vinyl chloride) were also observed. The results indicate that the addition of γ -PGA could effectively enhance the TCE dechlorination. The produced byproducts were further degraded and accumulation of byproducts was not observed. In this study, Increase in *DHC* population indicates that the supplement of effluent 3 enhanced the growth of *DHC* (increased from 1×10^3 to 1.02×10^6 gene copies/g) after 120 days of operation, and thus, a DNAPL-contaminated site (Yun-Kun TCE-contaminated site) is selected to apply γ -PGA as the primary substrate for field application. The TCE concentrations in groundwater at the selected site ranged from 0.04 to 0.15 mg/L. The site hydraulic conductivity and groundwater flow velocity are 7.269×10^{-4} cm/s and 62.8 cm/d, respectively. The groundwater flows to the northeastern direction. One upgradient well and three downgradient wells are selected as the substrate injection and monitoring wells, respectively. Moreover, an upgradient well with TCE contamination is used as a control well for comparison. Results from the contaminated site show that the TCE concentration in the degradation dropped from the initial concentration of 0.089 mg/L to below 0.007 mg/L after 11 weeks of operation in W1 wells Perfusion matrix, Results from the Monitoring wellsstudy show that the TCE concentration in the degradation dropped from the initial concentration of 0.149 mg/L to below 0.035 mg/L after 5 weeks of operation in W3 wells. In addition, the initial amount of each well is about 10^3 gene copies/L, Increase in *DHC* population indicates

that the supplement of γ -PGA enhanced the growth of DHC (increased from 1.1×10^5 to 4.6×10^7 gene copies/L)after 75 days of operation, and thus, W2 wells without perfusion matrix, DHC between 1.67×10^3 to 4.52×10^3 gene copies/L . The results show that the degradation effect of upstream injection is significant and the formation of permeable biological treatment wall is realized. The technology of conforming to the concept of local, passive and biological remediation includes the local biological rehabilitation combined with the permeable reaction wall. Calculated from the matrix cost, compared to other need to add buffer solution matrix, γ -PGA to NT 30 to 50 yuan per kilogram carbon matrix is more advantage. The major conclusions include the following: (1) γ -PGA can be applied as a primary substrate and create a reduced condition, which enhances the in situ reductive dechlorination of TCE, (2) γ -PGA has a low globule diameter, which allows it to migrate to the farther downgradient without causing a clogging problem, (3) γ -PGA has a pH buffering capacity, which prevents the groundwater acidification problem after supplement, (4) γ -PGA could be used as the carbon source and improve the microbial diversity, and (5) γ -PGA carbon-depleting matrix can avoid the problem of acidification of groundwater by other carbon-releasing matrix, and it has better transportability and high bio-usable carbon properties than other nature. Results of this study will aid in designing an in situ bioremediation system containing γ -PGA substrate for remedial application. The proposed treatment scheme would be expected to provide a more cost-effective alternative to remediate chlorinated-solvent contaminated aquifers.

Keywords: trichlorethylene; poly-(γ -glutamic acid) (γ -PGA); batch test; column experiment; in situ testing

目錄

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章：計畫前言與研究目的.....	1
1.1 計畫緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究重要性.....	3
第二章：文獻回顧.....	4
2.1 含氯脂肪族碳氫化合物之土壤及地下水污染.....	4
2.2 含氯脂肪族碳氫化合物之特性及危害.....	5
2.3 TCE 在地下環境之傳輸途徑.....	6
2.4 TCE 生物反應機制.....	7
2.5 現地場址背景簡介.....	9
2.6 不同基質於土壤地下水之應用性.....	12
2.7 高分子聚合物之應用性.....	14
2.8 地下水 pH 控制與緩衝溶液探討.....	19
2.9 硫酸鹽還原與異味控制之探討.....	20
2.10 分子生物技術於污染整治上的重要性與應用.....	21
第三章：研究方法與步驟.....	23
3.1 高分子聚合物 Γ -PGA 基本特性分析.....	24
3.1.1 黏度試驗.....	25
3.1.2 粒徑分析.....	25
3.1.3 元素分析.....	25
3.1.4 吸附試驗.....	25
3.1.5 均質試驗.....	25
3.1.6 流通性試驗.....	26
3.2 以微生物批次實驗探討 TCE 在厭氧條件下生物分解之可行性及速率.....	26
3.3 以微生物管柱實驗探討 TCE 在厭氧條件下生物分解速率及基質傳輸性.....	27
3.4 現地添加 Γ -PGA 基質之設計準則.....	28
3.5 進行現地之模場研究.....	29
3.6 現地微生物資訊分析.....	29
3.7 本研究使用儀器使用廠牌.....	30

第四章：結果與討論.....	33
4-1 Γ -PGA 基本特性分析	33
4.1.1 黏度試驗	33
4.1.2 粒徑分析與界達電位	34
4.1.3 元素分析	35
4.1.4 均質試驗	35
4.1.5 流通性試驗	36
4.2 微生物批次實驗	37
4.2.1 批次實驗水質參數變化趨勢	37
4.2.2 各組別降解三氯乙烯	40
4.2.3 各組別降解效率比較	42
4.2.4 批次試驗菌相分析	44
4.3 管柱試驗	48
4.3.1 管柱試驗水質參數	48
4.3.2 三氯乙烯與副產物降解趨勢	50
4.3.3 管柱試驗化學參數變化之影響	52
4.3.4 管柱試驗成果	54
4.3.5 管柱試驗菌相分析	56
4.5 模場試驗	59
4.5.1 現地場址基本水質與微生物分析	60
4.5.2 現地灌注試驗水質分析	61
4.5.3 地下水厭氧環境下化學參數變化	62
4.5.5 模場分子生物技術分析	67
4.6 基質成本效益評估	70
第五章 結論	72
參考文獻	1

圖目錄

圖 2.1 好氧共代謝示意圖(黃氏, 2012)	7
圖 2.2 以 NAD(P)H 為還原能之氧化作用(a)競爭型抑制；(b)還原能的消耗與再生；(c)毒性抑制(黃氏, 2012)	8
圖 2.3 PCE 厭氧還原脫氯反應途徑(Shukla et al., 2012)	9
圖 2.4 現地模場場址試驗示意圖	10
圖 2.5 103 年度計畫調查現地地下水流向	10
圖 2.6 聚麩胺酸(γ -PGA)之結構物(Liguori and Faraco, 2016)	15
圖 2.7 γ -PGA 之鹽類結構(a)與一價金屬鍵結；(b) γ -PGA 與二價金屬鍵結(Inbaraj and Chen, 2009)	18
圖 2.8 硫化氫在不同 pH 值水體中型態與分配比例(吳氏, 2015)	21
圖 3.1 實驗架構流程圖	24
圖 3.2 產品 γ -PGA 實際拍攝圖	25
圖 3.3 γ -PGA 基質流通性試驗裝置示意圖	26
圖 3.4 γ -PGA 基質管柱試驗示意圖	28
圖 4.1 γ -PGA 基質及緩衝液組黏度變化圖	33
圖 4.2 土壤顆粒粒徑分布百分比	34
圖 4.3 γ -PGA 粒徑分布百分比圖	34
圖 4.4 γ -PGA 界達電位分布圖	35
圖 4.5 基質組(左)與緩衝液組(右)示意圖	35
圖 4.6 γ -PGA 基質組(左)與 γ -PGA 緩衝液組(右)TOC 濃度變化	36
圖 4.7 流通性試驗於土壤孔隙間傳輸後之 TOC 出流濃度變化	37
圖 4.8 微生物厭氧批次實驗 pH 變化趨勢	38
圖 4.9 微生物厭氧批次實驗 ORP 變化趨勢	38
圖 4.10 微生物厭氧批次實驗 DO 變化趨勢	39
圖 4.11 微生物厭氧批次實驗 TOC 濃度變化趨勢	39
圖 4.12 微生物厭氧批次實驗甲烷濃度變化趨勢	40
圖 4.13 各組別降解 TCE 濃度變化趨勢	42
圖 4.14 各組別副產物趨勢圖	44
圖 4.16 批次實驗各組別 DHC 菌屬之變化	47
圖 4.17 批次實驗各組別 tceA(左)與 vcrA(右)還原脫氯酶之變化區試圖	47
圖 4.18 不同管柱出流端之水質參數變化之情形	49
圖 4.19 不同管柱出流端之污染物變化之情形	51
圖 4.20 不同管柱出流端之化學參數變化之情形	54
圖 4.21 不同管柱出流端之化學參數變化之情形	56
圖 4.22 管柱實驗各組菌相分析圖	57
圖 4.23 管柱實驗各出流端 DHC 菌屬之變化	58
圖 4.24 管柱實驗各出流端 tceA 與 vcrA 生長趨勢圖	58

圖 4.25 現地模場與井位示意圖	59
圖 4.26 現地試驗之基本水質監測趨勢圖	62
圖 4.27 模場試驗化學參數變化趨勢圖	64
圖 4.28 模場試驗化學參數變化趨勢圖	65
圖 4.29 現地試驗污染物降解趨勢	67
圖 4.30 模場試驗 DHC 菌屬變化趨勢圖	68
圖 4.31 注藥井 1-1 與下游井 3-1 之菌相豐富度變化圖	69
圖 4.32 注藥井 1-1 及下游井 3-1 之 Heatmap 圖	69

表目錄

表 2.1 我國土壤與地下水中氯化碳氫化合物污染管制標準	5
表 2.2 地下水主要污染之 VOCs 分析結果(104/1)	11
表 2.3 地下水主要污染之 VOCs 分析結果(105/1)	12
表 2.4 市售乳化基質種類及特性 (本團隊繪製)	13
表 2.5 γ -PGA 應用之工業類別	17
表 2.6 歷年學者在環境上應用 γ -PGA 之彙整	18
表 3.1 γ -PGA 之基本特性	25
表 3.2 彙整不同設備儀器之廠牌及型號	31
表 4.1 各組別之結果比較表	43
表 4.2 灌注 γ -PGA 前各井含氯有機物濃度	59
表 4.3 模場試驗地下水脫鹵球菌分析	60
表 4.4 目前常見基質藥劑操作成本(本團隊繪製)	71

第一章：計畫前言與研究目的

1.1 計畫緣起

含氯脂肪族碳氫化合物(chlorinated aliphatic hydrocarbons, CAHs)，如四氯乙烯(tetrachloroethylene, PCE)及三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)在工業上被大量使用於工業溶劑、脫脂業及化學工業原料中，其具有低可燃、低沸點、高蒸氣壓及對脂類有高溶解力等特性，又因其具有比重大於水，對水溶解度較低等特性，被稱之為重質非水相液體(dense non-aqueous phase liquids, DNAPLs)，其會緩慢釋出至地下水體中，導致地下水長期遭受嚴重污染，又因黏滯性大、密度高且溶解性低等特性，在地下水層內不容易隨水移動，也因此傳統的土壤與地下水整治技術難以有效處理(Sheu et al., 2015; Wang et al., 2016; Liu et al., 2017)。由於近年來國內受含氯溶劑污染之土壤及地下水事件日漸增多，國內目前受 TCE 污染有 33 處被列管為整治場址，如台灣美國無線電公司 RCA 桃園廠、漢翔航空公司台中廠及台灣塑膠股份有限公司仁武廠等(行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會，2016)。然而，隨著國內污染調查工作持續進行中，未來勢必有更多現地整治場址需進行整治及改善作業，因此，對於含氯有機物污染場址整治相關之研究、技術創新及掌握視為重要之環節。在推廣綠色整治(green remediation)技術原則下，污染場址之調查與整治規劃必須有著和傳統不同之思維。

現今國內外學者運用厭氧生物整治技術(bioremediation)處理受污染場址之案例已十分普遍(Hiortdahl and Borden, 2013; Liang et al., 2013; Palau et al., 2017; Chang et al., 2017)，以自然生物復育作為整治優先之選擇，亦是綠色整治概念及對環境友善之目標。此技術藉由微生物代謝污染物之能力，來轉換或礦化污染物，以達到降低或去除目標場址中污染物濃度與毒性、控制污染擴散及降低污染範圍之目的。對於物化整治程序而言，生物復育程序的整體反應速率較低，但長期而言，生物復育對場址破壞性較小，較符合復育的需求。因此，適當條件下為了加速生物分解速率，大部分係以添加營養源於地下水體中，此類營養源具有可溶性、低黏性、固態性及多樣試驗性等特性，使地下水產生足夠的氫氣與低分子脂肪酸，藉此提供碳源及提高厭氧生物分解之能力，以便處理受污染之土壤及地下水。目前常見加強生物分解的方式大致可分為：(1)添加生物可分解之營養鹽或電子接受者於污染場址，活化場址內既有的微生物族群；(2)在污染場址內直接添加對污染物具有分解能力的特殊菌種，或利用基因工程技術，發展具特定污染物分解能力之基因重組微生物；(3)利用生物處理將污染物經通氣或土壤洗滌後送至特殊生物反應器或是生物濾床、生物洗滌塔去除污染物，或採用地耕法、堆肥處理(土壤及地下水污染整治技術手冊，2004)。

由於整治工法主要可分為現地處理及離地處理兩大類，因離地處理需要花費更高費用及時間，目前都趨向於現地處理，而現地處理亦分為多項技術，生物整治為現今整治技術裡較為經濟實惠且對環境衝擊較小的技術(Kwon et al., 2016; Lien et al., 2016)。然而，當污染源存在於地下水體中一段時間，有機污染物之厭氧降解反應將自然發生，其所需整治時間較長，相對環境暴露風險值較高，因此，縮短厭氧還原之整治時程即為本研究考量之一。近幾年研究聚麩胺酸(γ -Polyglutamic acid, γ -PGA)被廣泛應用於食品品質改良、化妝品、醫藥及農業等各領域中且成果相當豐碩，係利用微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)將麩胺酸經由生化過程聚合而成的一種生物可分解高分子材料，具有保濕性、高黏性、無毒性、金屬螯合性、生物可分解性及生體相容性等特性。其結構上功能性其極具經濟價值，極適合跨領域之工業應用上，在環境領域應用上由於 γ -PGA 屬多價陰離子聚合物，為一種良好的生物絮凝劑，能有效吸附去除水中重金屬。此外，因用途廣泛，對於目前化學合成高分子具有較優異的取代性，且在安全及環保上有其絕對的必要性。本計畫目的即是發展一套具有生物可分解之高分子聚合物基質，此基質添加可作為電子提供及營養鹽可有效降解 TCE 之成效，且因 γ -PGA 具有帶正電及負電官能基之特性，使 γ -PGA 同時鍵結氫離子及硫離子，從而達到酸化控制及臭味抑制之目的。因此，本計畫主要藉由 γ -PGA 批次試驗成效應用於現地含氯整治場址之可行性評估，以達到綠色整治效益之目的。

1.2 研究目的

由於 DNAPL 污染場址整治具有相當高之困難度，因此，發展經濟且有效之整治技術，已成為 DNAPL 場址之一項重要且迫切之議題。現今厭氧生物整治技術中大部分以添加有機基質(如醇類、脂肪酸及乳化食用油等)(Scheutz et al., 2011; Hosoda et al., 2012; Kuo et al., 2014)之方式於飽和層地下環境中，此類基質皆具有可溶性、低黏性、固態性與多樣試驗性等特性，使得地下水中產生足夠的氫氣與低分子量的脂肪酸，藉此提供碳源及提高厭氧生物分解之能力，便於處理飽和地下環境之污染物。然而，因多數基質主要作為緩釋碳源及生物生長刺激之元素，易造成厭氧發酵後地下水體快速酸化與傳輸受限之影響。因此，本研究發展 γ -聚麩胺酸為全天然生物可分解性高分子，不僅構成成份特殊與多功能特性，且基質可長效持續釋碳並刺激現地微生物生長，具有營造適合降解 DNAPL 菌群，提升污染整治成效之潛勢。本研究之主要工作目標如下：

- (1) 利用高分子聚合物 γ -PGA 作為緩釋碳源材料，並進行基質基本特性分析及穩定性試驗，基本特性包括液滴顆粒形狀、粒徑及界達電位分析，以瞭解基質應用上可能發生之情形，亦可提供未來應用於現地含氯整治場址與永續環境

之可行性。

- (2) 依 γ -PGA 之最佳比例進行管柱流通性試驗，評估此營養基質添加於土壤地下水中，並觀察基質於土壤孔隙間之吸附與傳輸之情形。
- (3) 以厭氧微生物批次試驗，評估高分子聚合物 γ -PGA 應用於受含氯污染之地下水，並找出最佳添加比例應用於地下水整治，並探討控制 pH 酸化與副產物臭味生成之控制情形。
- (4) 針對批次微生物試驗中，利用 NGS 技術分析菌相豐富度或 realtime-PCR(脫氯桿菌)及特徵基因(還原脫氯基因 *vcrA*、*bvcA* 及 *tceA*)之表現量，綜合評估受 DNAPL 污染地下水中環境之菌群變化。
- (5) 將模場現地試驗佐證批次試驗之可行性與應用性，做為整治含氯有機污染物場址之整治參考及設計規劃依據。

1.3 研究重要性

近幾年來，對於生物處理法之研究，國內外學者有許多豐碩的成果發表，美國環保署及許多州之環保單位，均以自然生物處理法作為整治的優先選擇。生物處理法和目前所使用的物化處理(包括氣提法、化學氧化法、熱脫附法、萃取法及電動法等)相比，自然生物處理法可以省下大筆的整治費用，且對於現地地下水環境衝擊較小又可有效降解污染物，為一綠色整治技術，然而應用於現地整治上，為了加速生物分解的速率，亦可使用現地加強式整治法，以提供生物分解之有利條件來加速處理之速率。由於含氯碳氫化合物被微生物降解時，主要可分為好氧共代謝及厭氧還原脫氯。其中，在好氧環境下，微生物可利用氫氧化作用或甲基化作用以去除氯離子；在厭氧環境下，則以還原性脫氯作用將氯離子去除，接著再進行礦化作用，將化合物轉變為二氧化碳或甲烷等物質。由於受污染之地下水不僅體積龐大且大多處於無氧狀態，且地表下厭氧性之微生物可轉化不同種類之有機及無機污染物，因此厭氧之微生物降解對現地生物整治十分重要。同樣地，厭氧反應也可以有效的整治政府所表列優先處理之污染物，如氯化乙烯類化合物等嚴重污染之含水層，也可經由厭氧處理將高毒性氧化價位型態轉化為低毒性還原價位型態，因此，現地厭氧生物處理已成為地下水污染整治之主要替代方案。

第二章：文獻回顧

2.1 含氯脂肪族碳氫化合物之土壤及地下水污染

台灣因地狹人稠、河川湍急而導致地表淡水資源分佈不均，部分地方水資源豐富，部分地方貧乏。往往為了滿足日益增加的農業、工業、民生用水的需求量以及氣候變遷影響，除了利用水庫調節之外，另外用水的重要來源之一即為地下水。在有限的淡水資源中，以地下水的貯存總量最多。在許多較為乾旱甚至沙漠化區域，地下水更是主要或是唯一的水資源。過去知名的案例如美國 RCA 桃園廠的含氯碳氫化合物污染、中石化台南安順廠之五氯酚、汞及戴奧辛污染、彰化裕台化工之有機氯農藥污染、桃園中油煉油廠之燃料油外洩及觀音鄉高銀化工之鉛及鎘污染等。這些事件的發生不但對環境與自然資源造成直接的傷害，相對的也使人體的健康受到威脅。民眾的大規模抗爭不僅浪費社會成本，間接的也容易造成社會的動盪與不安。

我國行政院環保署所公布的土壤及地下水污染場址中可發現，受含 CAHs 之污染場址有逐漸增多之趨勢，因此含氯碳氫化合物污染土地之整治有相當之急迫性。常見的地下水污染物依其是否能溶於地下水而分為可溶性與非混合性兩大類。此兩類污染物的物理化學性質不同，對環境傷害及人體健康有不同程度的影響。地下水中發現有機化合物多為非混合性污染物，以液態存在一般稱為非水相液體 (non-aqueous phase liquid, NAPL)。NAPL 與水接觸後，呈現非溶解的情況。依特性又可分為密度小於水，稱之為輕質非水相液體 (light non-aqueous phase liquid, LNAPL)，密度大於水則稱 DNAPL。主要之 DNAPL 污染物包含 PCE、TCE、二氯甲烷 (methylene chloride) 及氯仿 (chloroform) 等含氯碳氫化合物污染，我國土壤與地下水中氯化碳氫化合物污染管制標準如表 2.1 (郭氏，2013；環保署，2015)。

表 2.1 我國土壤與地下水中氯化碳氫化合物污染管制標準

氯化碳氫化合物	土壤管制標準值 (mg/kg)	地下水管制標準值 (mg/L)	
		第一類	第二類
四氯化碳	4	0.0050	0.050
氯苯	-	0.10	1.0
氯仿	100	0.10	1.0
氯甲烷	-	0.030	0.30
1,4-二氯苯	-	0.075	0.75
1,1-二氯乙烷	-	0.85	8.5
1,2-二氯乙烷	8	0.0050	0.050
1,1-二氯乙烯	-	0.0070	0.070
順-1,2-二氯乙烯	7	0.070	0.70
反-1,2-二氯乙烯	50	0.10	1.0
總酚	-	0.014	0.14
四氯乙烯	10	0.005	0.05
三氯乙烯	60	0.005	0.05
氯乙烯	10	0.002	0.02
二氯甲烷	-	0.005	0.05
1,1,2-三氯乙烷	-	0.005	0.05

2.2 含氯脂肪族碳氫化合物之特性及危害

CAHs 是一種在工業上大量被使用的有機溶劑，常用在金屬電子零件之清洗、去油等製造過程，當地下水中發現之有機化合物多為非水相液體，非水相液體因為與水不相溶解或僅微溶於水，進入地下水層，而形成獨立之液相。由於 CAHs 具有密度大、難溶於水、低黏滯性與高移動性等特性，因此當 CAHs 進入地表下時會迅速向下移動，而在沈移過程中將形成蒸氣相(vapor phase)、自由相(mobile phase)、殘留相(residues phase)及溶解相(dissolved phase)之不連續分布層。NAPLs 和水交界處會形成一界面，於此二種液體交界面上有「界面張力」，促使 NAPLs 和水相互不混合互溶。當 NAPLs 污染量大時，未溶於水且未揮發的部分，即以液相存在，被稱為自由相物質。

自由相物質存在的 NAPLs 會因為重力及毛細作用而在土壤顆粒孔隙中移動(正確的說法是緩慢的滲透移動)當 NAPLs 以液態在土壤顆粒的孔隙中移動時，一

部分的 NAPLs 會在極小的孔隙中被侷限住，而未能隨著主要的 NAPLs 物質持續移動，而形成土壤中的 NAPLs 的非移動性物質，此殘留物質會因土壤含水量的改變而再度溶於水中、再度揮發或再進入更細緻的孔隙內。不論是以何種型態存在，只要有 NAPLs 的自由相存在，該區域即存在著氣、液、固相的污染與 NAPLs 自由相的污染源(Chin, 2012)。NAPL 殘留量將緩慢地溶於水，形成溶解相的 DNAPL，完全溶解可能需要數十年至數百年之久，造成土壤與地下水環境嚴重之危害。

此外，DNAPL 可以穿透黏土層或岩盤極細的裂隙，經由這些裂隙而向下滲透污染很深的含水層，此將增加整治上的困難度(Miyata et al., 2010; De Biase et al., 2012; Meyer, 2017)。DNAPLs 的物質具有特殊的物化特性，例如高密度、低黏滯性、高揮發性、低溶解度及低吸附性等，因此，以工程技術而言，DNAPLs 污染的整治就更具挑戰性。美國環保署在毒性化學物質的分類中將含氯有機化合物列為第 1 類「確定為人體致癌物」及第 2 類「疑似致癌物」物質(環保署，2015)。由於 TCE 具滲透、揮發、脂溶等特性，且具致基因突變性、致癌性等毒性特徵，故經由人體直接接觸或呼吸道吸入，會對呼吸、消化、造血系統及中樞神經、皮膚、肺、肝、腎、心臟等器官造成危害(行政院勞委會，2015)。

2.3 TCE 在地下環境之傳輸途徑

當 TCE 自污染源釋出而侵入地下環境後，首先到達通氣層土壤，此層土壤之孔隙中，同時含有空氣及吸附水，TCE 在通氣層時可能揮發成蒸氣相、溶解於水中形成溶解相、殘留於所通過之路徑而形成殘留量、或受重力影響而形成向下沉降的移動相。當 TCE 穿過毛細作用帶及地下水位面，進入飽和含水層後，由於飽和含水層的土壤孔隙完全為水所充滿，因此 TCE 無法揮發成氣相，而以溶解相，殘留量及移動相存在於此飽和含水層中，且在飽和含水層會繼續向下沈陷。此外，雖然 TCE 密度比水大，但當 TCE 與其他 NAPL 污染混合，使得整體比重小於水時，TCE 仍會浮在地下水面，而不會有往下沈陷的現象。地質的異質性會使 TCE 之移動過程產生不穩定流，亦能夠造成 TCE 在飽和層以指狀般地向下移動。另一方面，當 TCE 在移動過程中碰到顆粒較細的土壤，可能因無法貫穿這些細質土壤，而堆積並形成停滯的 TCE 池(王氏，2002)。TCE 於地表下之分佈極其複雜，使得部分污染場址，並無法以現有技術整治達到特定之水質標準，因而美國環保署已於 1993 年建立技術欠缺(technical impracticability, TI)的判定程序及相關工作，以因應 TCE 於部分污染場址中無法有效整治的事實，然而，針對尚能進行整治的 TCE 污染場址，其整治困難度亦較一般地下水污染為高，因此其相關技術之研究，持續有相當高的需求。

2.4 TCE 生物反應機制

(1) 好氧共代謝降解

含氯碳氫化合物經由微生物降解時，主要可分為好氧及厭氧兩種處理機制。在好氧的情形下，因三氯乙烯在環境中結構特殊，微生物通常無法直接利用作為生長之碳源或能源，故需依靠共代謝作用(cometabolism)進行降解。當添加生物基質經由微生物分解利用時，基質可做為微生物分解時產生特定酵素或輔酵素物質，而這些酵素會對含氯脂肪族在結構上進行改變或破壞分解，達到污染物降解之目的(如圖 2.1)。

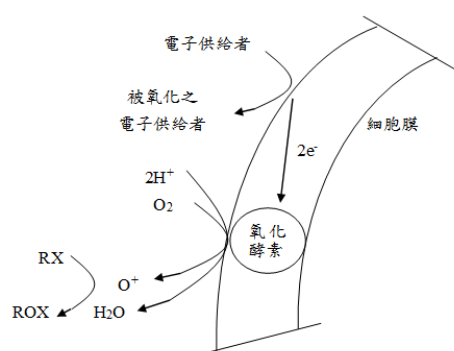
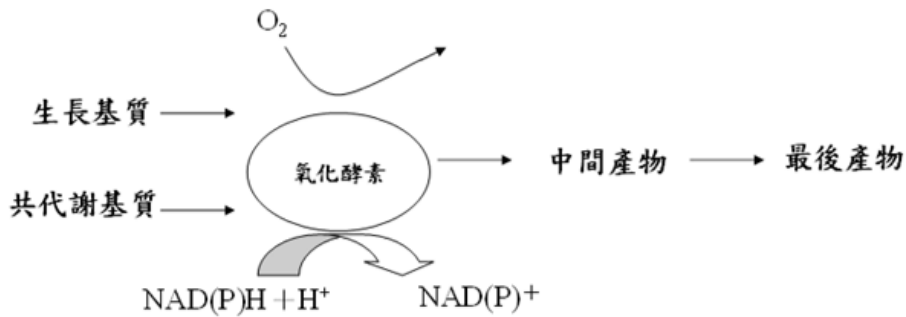


圖 2.1 好氧共代謝示意圖(黃氏，2012)

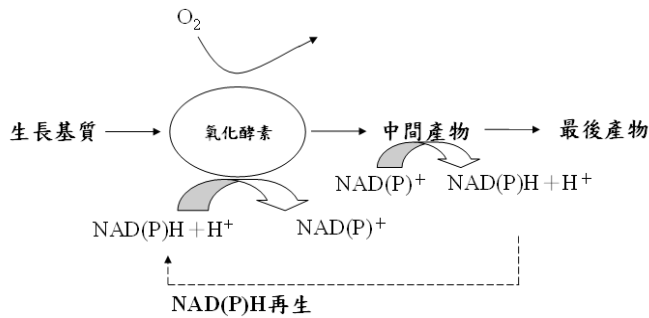
氧化酵素與生長基質共代謝含氯碳氫化合物時，具有競爭型抑制、消耗、再生及毒性抑制等機制，其反應如圖 2.2 所示，競爭型抑制效應(黃氏，2012)為在共代謝機制中，以氧氣為電子接受者，NAD(P)H 為電子(還原能)提供者，微生物需要生長基質維持酵素活性來共代謝 TCE，但氧化酵素由於專一性較低，除分解主要生長基質外，亦具有分解 TCE 之能力，故生長基質會與 TCE 共同競爭，進而影響微生物分解基質與共代謝 TCE 的效率；當微生物獲得主要生長基質做為能量及碳源來源時，會被誘導產生氧化酵素來分解主要生長基質，除了可促使微生物增長外，同時具有再生還原能的能力。由於氧化酵素的專一性較低，不僅能分解生長基質，同時具有分解 TCE 的能力，將 TCE 分解成無毒害性的二氧化碳和水等。此種在好氧狀態下藉由好氧共代謝使主要生長基質所誘導產生的氧化酵素，藉以分解 TCE 的處理方式。雖然 TCE 能夠藉由氧化酵素加以分解，但其無法做為微生物的能量及碳源；且在 TCE 的分解過程中，不僅無法如分解主要生長基質時具有再生還原能的能力，其分解過程所產生的有毒中間產物亦可能會對微生物產生毒性抑制的作用，一旦微生物無法持續獲得主要生長基質，微生物活性會逐漸衰減，同時，氧化酵素還原能無法再生，以及中間產物毒性抑制的作用下，微生物共代謝分解 TCE 的能力將會逐漸消失。因此，適當添加營養基質可持續提供微生物利用行共代謝，不但可提升微生物活性，還可以降低中間產物毒性抑制的

作用，使污染物有效被微生物共代謝降解。

(a) 生長基質與共代謝基質間的競爭型抑制



(b) 代謝生長基質時，還原能的消耗與再生



(c) 代謝產物毒性抑制

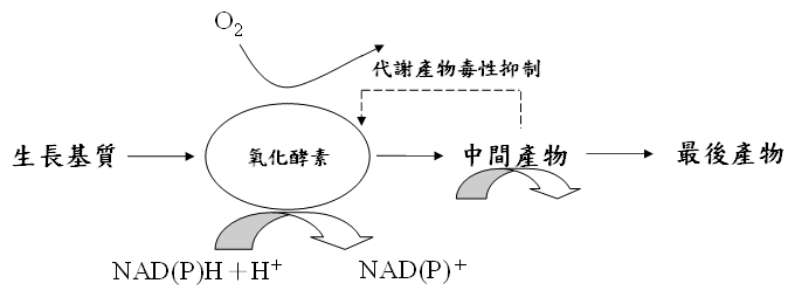


圖 2.2 以 $NAD(P)H$ 為還原能之氧化作用(a)競爭型抑制；(b)還原能的消耗與再生；(c)毒性抑制(黃氏，2012)

(2) 厭氧還原脫氯降解

如圖 2.3 所示，在厭氧環境下，若有適當之物質可做為電子提供者(如乳酸鹽、糖蜜、醇類、氫氣或砂糖等)的情況下，此時 PCE 為最終電子接受者及生長所需之碳源，氯原子會被氫原子所取代，慢慢由 PCE 降解成 TCE、順式-1，2-二氯乙

烯 (cis-1,2-Dichloroethene, cis-1,2-DCE)、反式-1,2-二氯乙烯 (trans-1,2-Dichloroethene, trans-1,2-DCE)、氯乙烯 (Vinyl chloride, VC) 及 乙烷 (ethane)，而最後礦化成 CO_2 、 H_2O 、 Cl^- 等無機物，此過程稱為直接代謝還原脫氯又稱為鹵化呼吸作用 (Shukla et al., 2012)。每一階段之還原脫氯產生時，其反應所生成之能量則可被微生物所利用生長，當添加營養基質促進微生物生長而降解污染物效率最佳 (Harkness and Fisher., 2013; McLean et al., 2015; Varjani, 2017)，目前已得知 Dehalorespiring 菌屬之微生物可進行還原脫氯反應，另外被發現亦可進行還原脫氯之菌群如 *Anaeromyxobacter*, *Desulfitobacterium*, *Trichlorobacter* 和 *Dehalobacter* (Carmona et al., 2009)。除此之外，已被發現相關菌株可針對 PCE 和 TCE 進行還原脫氯產生 cis-1,2-DCE 如 *Sulfurospirillum multivorans*, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfuromonas michiganensis*, *Desulfitobacterium* spp. PCE-1 (Xiu et al., 2010)，*Geobacter* strain SZ (Crane and Scott, 2012)，若脫氯不完全會產生二氯乙烯、氯乙烯的累積，其中氯乙烯屬於致癌物且毒性較 TCE 更高 (O'Carroll et al., 2013)，近年來多數研究發現脫氯菌屬 (*Dehalococcoides* spp., DHC)，該菌屬可完全使氯化乙烯完全脫氯形成乙烷 (Xiu et al., 2010; Hunkeler et al., 2011; Schaefer et al., 2017)。

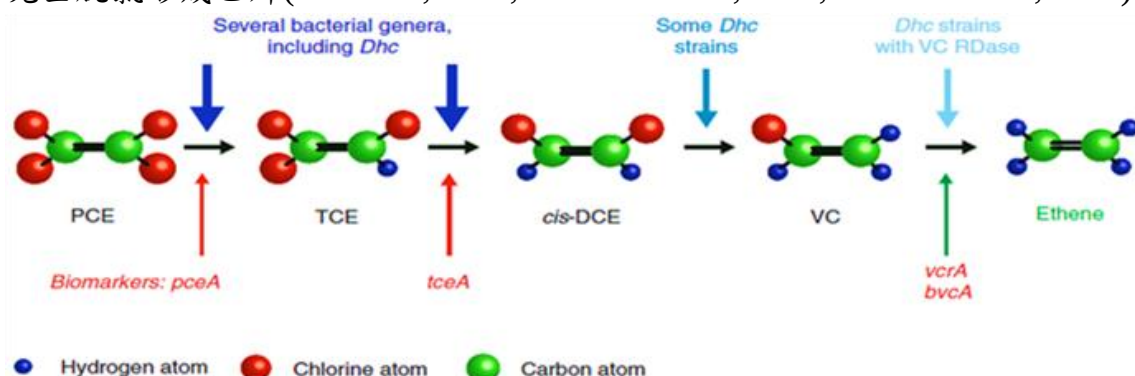


圖 2.3 PCE 厭氧還原脫氯反應途徑 (Shukla et al., 2012)

2.5 現地場址背景簡介

(1) 場址簡介

本計畫場址位於台南永康工業區以鹽行段 1426-0005 地號為主 (如圖 2.4)，由 104 年度調查該場區永安路與永安路 12 巷之路口為該區段屬於相對厭氧之環境，且該場址路口處監測井 EPB-MW14 於 104 年度監測地下水污染物 PCE、TCE、VC 及 1,1,2-TCA，其濃度分別為 0.159、0.185、0.413 及 0.350 mg/L，皆超過法規管制標準之限值。因此，本計畫將藉由批次試驗成效應用於該場址區域添加高分子聚合物 γ -PGA 進行現地生物復育成效，當注入不飽和層土壤及飽和層地下水中，該基質可長期並持續釋放可刺激現地微生物生長之基質並營造適合降解 DNAPL 菌群，提升污染整治成效。

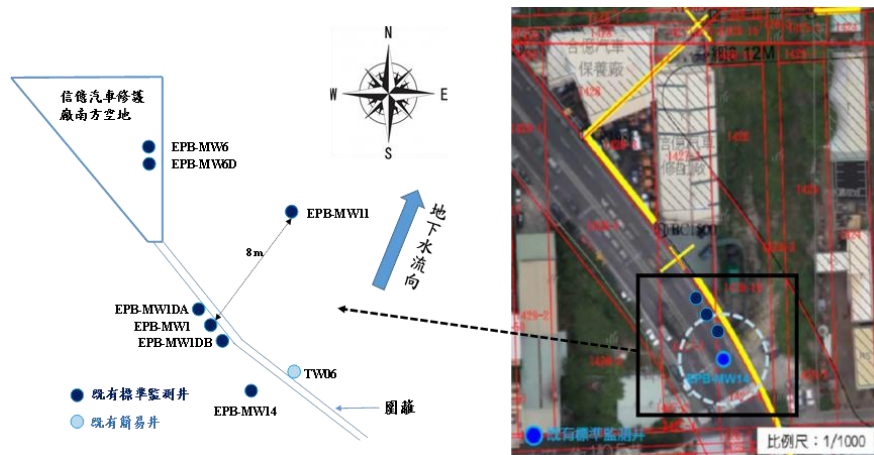


圖 2.4 現地模場場址試驗示意圖

(2) 場址地下水流向

本計畫由 99 年度調查評估顯示，地下水於南測時呈現向北、北北東方向流動，至場址 C 區中間(永安路東側)，轉而向北北東或東北方向流動。103 年度計畫取開篩位置相近之監測井水位(井深約為 7 公尺)繪製地下水流向(如圖 2.5)，其結果顯示，地下水流向與以往之調查資料相似，以由南向北為主要流向，其中 104 年 2 月之量測，EPB-MW11 之水位於地表下 2.81-3.05 公尺，明顯低於附近位於 1.5-2.1 公尺之測值，因此形成 C 區永安路東側地下水流向趨向東北向，而此現象在 104 年 10 月之量測則較不明顯，整體而言大致呈現由南向北之趨勢。

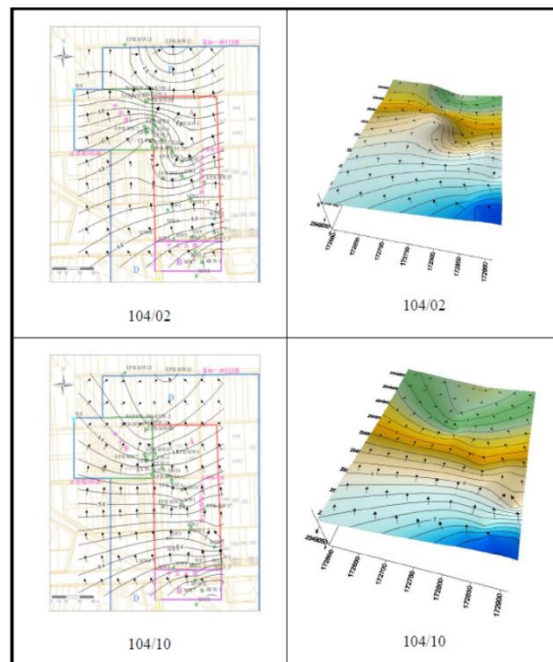


圖 2.5 103 年度計畫調查現地地下水流向

(3) 場址污染現況

本計畫於 104 年 1 月及 105 年 1 月進行 VOCs 採樣分析，主要之污染物為 1,1,2-TCA、1,2-DCA、cis-1,2-DCE、PCE、TCE 及 VC 等六種，僅將監測井(EPB-MW14、EPB-MW1DA 及 EPB-MW1DB)此六種污染物之分析數據彙整(如表 2.2 及表 2.3 所示)。由表 2.2 監測結果顯示，PCE 及 1,1,2-TCA 污染源位於 EPB-MW14 至 EPB-MW6 之間，下游之 EPB-MW5 污染物種類以 1,2-DCA、cis-1,2-DCE 及 VC 等降解產物為主，與其上游之原始污染物種類相符。

TCE 濃度超過管制標準者以 EBP-MW14 及 EPB-MW6 最高，分別為 0.1852 及 0.1926 mg/L(104 年 1 月)，105 年 1 月 TCE 最高濃度還是在永安路東側路旁之附近之 EPB-MW6(EPB-MW14 之下游)，濃度為 0.296 mg/L。104 年 1 月 VC 超出管制標準，以 EPB-MW5、EPB-MW14、EPB-MW1DA 為相對高濃度中心，EPB-MW5 位於污染熱區之 EPB-MW14 下游約 90 公尺處，污染熱區之 PCE 及 1,1,2-TCA 皆可降解產生 VC，故 EPB-MW5 之 VC 濃度達 0.67 mg/L，為計畫區監測井最高者。經 103 年度計畫 C 區模場生物復育試驗（位於 EPB-MW5 附近）後，105 年 1 月 EPB-MW5 之 VC 濃度已降為 0.00771 mg/L，低於管制標準，VC 最高濃度之測井變為 EPB-MW6D（位於 EPB-MW5 之上游約 80 公尺）之 0.251 mg/L。

表 2.2 地下水主要污染之 VOCs 分析結果(104/1)

監測井編號	1,1,2-TCA	1,2-DCA	PCE	TCE	cis-1,2-DCE	VC
單位	mg/L					
EPB-MW14	0.35	0.019	0.1591	0.1852	0.2094	0.413
EPB-MW1DA	0.0402	0.0783	ND	0.0715	0.189	0.577
EPB-MW1DB	ND	0.00094	ND	0.00079	0.00553	0.00465
地下水 第二類管制 標準	0.05	0.05	0.05	0.05	0.7	0.02

表 2.3 地下水主要污染之 VOCs 分析結果(105/1)

監測井編號	1,1,2-TCA	1,2-DCA	PCE	TCE	cis-1,2-DCE	VC
單位	mg/L					
EPB-MW14	0.0488	ND	0.0177	0.0502	0.0428	0.0696
地下水 第二類管制 標準	0.05	0.05	0.05	0.05	0.7	0.02

2.6 不同基質於土壤地下水之應用性

近年針對含氯有機物污染整治所使用之基質多選擇具緩慢釋放有機基質特性之產品，因可長期促進厭氧生物降解目標污染物。緩慢釋放基質包括纖維素、幾丁質、釋氫物質(Hydrogen Release Compound, HRC®)及乳化油。釋氫物質為聚合酯合成物，可在水中長期釋放乳酸物質維持厭氧生物降解含氯溶劑或其他污染物(Scheutz et al., 2010; Harkness and Fisher, 2013)。Borden (2007)評估注入食用油基質(Edible Oil Substrate, EOS®)進行現地生物整治技術處理受過氯酸鹽及1,1,1-三氯乙烷(1,1,1-trichloroethane, 1,1,1-TCA)污染之地下水。研究中，於2天內將EOS®連續注入10口注入井中，建立一個15 m長的生物透水性整治牆(bio-barrier)。經由2.5年監測發現，在EOS®注入處發現強還原反應區，區域間之溶氧、硝酸鹽及硫酸鹽皆被消耗殆盡，同時發現溶解性鐵錳及甲烷濃度增加，而注入井之過氯酸鹽在注入EOS®約5天後由原本濃度約3,100-20,000降解至<4 $\mu\text{g/L}$ ，2年後注入井下游之過氯酸鹽濃度約6 $\mu\text{g/L}$ ，遠低於注入井上游濃度13,100 $\mu\text{g/L}$ 。因此得知注入EOS®後可大量轉移氯化溶劑及生物菌落轉移適應情形發生。其所加入之乳化油可以經由發酵後產生之氫氣及低分子量之脂肪酸(醋酸鹽、乳酸鹽、丙酸及丁酸)，用以提供厭氧生物降解污染物時所需之碳源及能量。目前常見之市售乳化基質：RST™ Emulsified Vegetable Oil Substrate(C)、LactOil® Soy microemulsion、EOS®、EHC®、Newman Zone®及CAP-18™...等皆具有生物可降解性，並可以完全促使污染物還原脫氯，可緩慢釋放有機基質，長期促進厭氧生物降解目標污染物(Peale et al., 2010; Mueller et al., 2013; Watson et al., 2013)。

若食用油以乳化型態注入時，其液滴細小且均勻，因此更容易擴散至不同種類之土壤孔隙間(Scheutz et al., 2011)。當食用油注入至地下含水層時，三酸甘油脂會經由厭氧發酵水解出甘油(醇類)和多鏈脂肪酸(Long-Chain Fatty Acids, LCFAs)(Carrere et al., 2010)，由於甘油具有生物分解性且易溶於水，因此當甘油存在於系

統中時，則會被快速分解或刺激微生物。因 LCFAs 水溶性較差(Palatsi et al., 2010) 則吸附於土壤孔隙間，並緩慢氧化成短鏈脂肪酸、醋酸鹽(CH_3COO^-)及氫氣(H_2)，其持續生成氫氣及醋酸鹽有助於污染物削減(Viessman and Hammer, 2009)。另外這些脂肪酸通常以亞麻油酸(linoleic acid)型態存在於蔬菜油中(Chaganti et al., 2011; Salman et al., 2015)，亞麻油酸可用於生物整治之化學平衡計量表示之，1 mole 亞麻油酸經生物分解可產生 9 mole 醋酸及 14 mole 氫氣，當醋酸完全氧化分解產生 CO_2 時，則產生 28 mole 氫氣；但醋酸鹽並無法作為還原脫氯之電子供應者(Lyon and Vogel, 2013)。不過醋酸可進行硫酸鹽還原及乙酸甲烷化(Christ et al., 2010)，由完全反應式得知這些化合物之最大氫氣生成量(Scheut et al., 2011; Fam et al., 2012; Hamonts et al., 2012)，市售乳化基質種類及特性如表 2.4 所示。

綜觀上述市售乳化基質，其特點多為緩釋碳源、可食用油與部分生物生長刺激元素，其中多數藥劑皆會釋放脂肪酸、乳酸鹽、醋酸鹽等有機酸，易使得水體酸化，而乳化油品亦因油滴吸附與黏滯度較高之特性而不易於地下水中之土壤層移動；另一方面，氣候變遷與糧食危機的全球化議題，持續發展食品級蔬菜油、大豆油等乳化基質產品勢必暫緩腳步，轉換為更多元化之生物基質發展空間， γ -聚麩胺酸(γ - Polyglutamic acid, γ - PGA) 為全天然生物可分解性高分子，由於其構成成份相當奇特，因而具有許多一般意想不到的結構特性和多功能特性，極適合於跨領域的工業應用，具高度經濟價值。 γ -PGA 的工業化生產技術平台已在台灣成形，但其特殊的化學、生化、營養、生醫、農業和工業上應用則有待積極開發和進一步加以商業化推廣應用。

表 2.4 市售乳化基質種類及特性 (本團隊繪製)

名稱	成分	特點
RST TM Emulsified Vegetable Oil Substrate (C)	food oil: 45-60% lactic acid: 4% food Additive/Emulsifiers/ preservatives: 10%	緩釋基質(Slow Release Substrates, SRS [®])亦稱乳化植物油基質(Emulsified Vegetable Oil Substrate, EVO)，於還原脫氯或厭氧降解過程中可當作電子供給者，以緩慢釋放營養物質長達3-5年供給微生物利用

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

2.7 高分子聚合物之應用性

(1) 聚麩胺酸簡介

聚麩胺酸(γ -Polyglutamic acid，以下簡稱 γ -PGA)是以麩胺酸(glutamic

acid, GA)為基礎原料，經由微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)並結合有機碳源、氮源及礦物質以液態發酵行生物聚合而成的一種生物可分解性的高分子材料(Bajaj and Singhal, 2011; Chang et al., 2013; 吳等, 2017)，本研究使用味丹公司開發之 PGA 發酵液產品，係以麩胺酸(L-glutamic acid)為原料加入納豆菌(*Bacillus subtilis* var. natto)進行液態發酵而成(Tang et al., 2015; Liguori and Faraco, 2016)，內含豐富的 γ -PGA，以及麩胺酸、葡萄糖、蛋白質、礦物質、維生素及多種生化活性物質，是取之天然、有機、用之環保的植物營養促進劑。其結構(如圖 2.6)，內含豐富的聚麩胺酸是一種高分子之綠色產品。

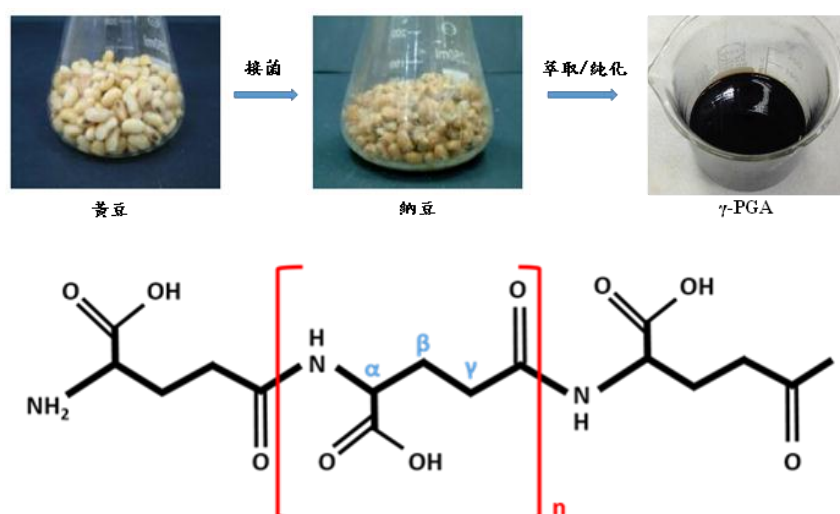


圖 2.6 聚麩胺酸(γ -PGA)之結構物(Liguori and Faraco, 2016)

最早 γ -PGA 被發現於 *Bacillus anthracis* 的莢膜，在日本傳統發酵食品納豆的黏性物質中亦發現含有大量的 γ -PGA。聚麩胺酸為生物性高分子聚合物，其化學結構特殊，因此已廣泛的應用於食品工業、健康食品、化妝品、醫藥工業、農業應用及環境保護等領域(吳等, 2008；陳氏, 2014)。 γ -PGA 主要是經由二種不同的生物化學轉化機制聚合而成。一種為 de novo Bioconversion Pathway，此為固態發酵生產所進行者，不需要 L-GA (L-Glutamic acid)作誘導物質。

液態發酵方法適用於大量生產 γ -PGA，所以也是工業上大量生產唯一之選擇製法。 γ -PGA 的分子式為 $(-[-NH-CH(COOH)-(CH_2)_2-CO-])_n-$ ，其結構組成為 α -螺旋和 β -折疊，其分子鏈上具有活性較高的側鏈羧基(-COOH)、胺基(-NH)及羰基(-CO)等多種官能基團。三個官能基的 H^+ 解離常數各為 $pK_\alpha = pK_1 = 2.13 \sim 2.2$ 、 $pK_\gamma = pK_2 = 4.25 \sim 4.32$ 、 $pK_3 = 9.7 \sim 9.95$ ，其各官能基活性依序為 $\alpha-NH_2 > \alpha-COOH > \gamma-COOH$ ，這些官能基團提供聚麩胺酸進行化學或生物反應的活性。在 γ -PGA 分子結構中， $\alpha-COOH$ 與 $\alpha-NH_2$ 縮水結合成為 α -peptide bond(α -蛋白鍵)； $\gamma-COOH$ 與

α -NH₂ 縮水結合成為 γ -peptide bond (γ 蛋白鍵)。由於強力 α -COOH 與 γ -peptide 鍵之-NH₂-所形成的氫鍵(hydrogen bonding)，再加上分子結構上之外在形態改變(conformational change)，使得 α -COOH 基變成不解離狀態以至 $pK_{\alpha}=pK_1=0$ ，使整個 γ -PGA 分子成為極緊密而收縮的 α -helix conformation，因而呈現強烈的疏水性(hydrophobic)。

由於 γ -PGA 為全天然生物可分解之分子材料，可以工業化大量生產。天然的 γ -PGA 之分子量約為 10000~1000000 Da，其分子大小取決於醱酵時間及水解酶等因素(Zeng et al., 2016)，聚合度(degree of polymerization)約為 1,000 至 15,000 個麩胺酸。在醫藥、農業和化妝品工業及環境等應用效果非常顯著。由此可知 γ -PGA 所具有的結構上功能性其極具經濟價值，可以在跨工業領域地方的應用。表 2.5 列述 γ -PGA 在各種工業上的潛在應用，由於用途廣泛，對於目前化學合成高分子具有較優異的取代性，且在安全及環保上有其絕對的必要性，展望未來 γ -PGA 將成為全球最重要的高分子素材之一。

表 2.5 γ -PGA 應用之工業類別

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

(2) γ -PGA 在環境上之應用

在水處理之應用上，因 γ -PGA 為多價陰離子聚合物，其 COOH 官能基所帶的靜電會與金屬離子相互影響，故具有可螯合重金屬之特性，對於二價、三價金屬離子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cr^{2+})具有相當良好之處理效果(Inbaraj and Chen, 2009)，其結合後所形成之鹽類結構如圖 2.7 所示。所以 γ -PGA 除了應用於吸附土壤、海洋、垃圾以及廢水重金屬等。表 2.6 為過去學者將 γ -PGA 應用在環境上處理重金屬之整理，均有不錯之成效。

另有學者研究發 γ -PGA 具有 pH-responsivity 之特性，當環境中之 pH 值產生變化時， γ -PGA 能與溶液中之氫離子(H^+)結合或分離達到平衡之狀態，在這種結合和分離中，其微觀分子結構的變化會導致其體積、形態或結構的變化(Luo et al., 2016; Khalil et al., 2016)。因此 γ -PGA 在農業肥料使用上具有緩衝之作用，能夠有效平衡土壤之酸鹼性，避免長期使用化學肥料所引起之土壤酸化問題(張等, 2014)。綜觀上述， γ -PGA 應具有提供電子之功能促進氯乙烯還原脫氯成乙烯之功能，且因 γ -PGA 為高分子聚合物，本身可做為一豐富碳源供給微生物利用，因此其應用於現地地下水厭氧生物處理技術應有其適用性與優勢。 γ -PGA 與其他基質比較，

在處理 TCE 污染物時具備以下之優勢：(1)整治時程短，不須大量之灌注量即可達到法規標準；(2) γ -PGA 本身具備有緩衝地下水酸鹼值之能力，可以解決以往釋碳基質經微生物利用後會有逐漸酸化之情形。

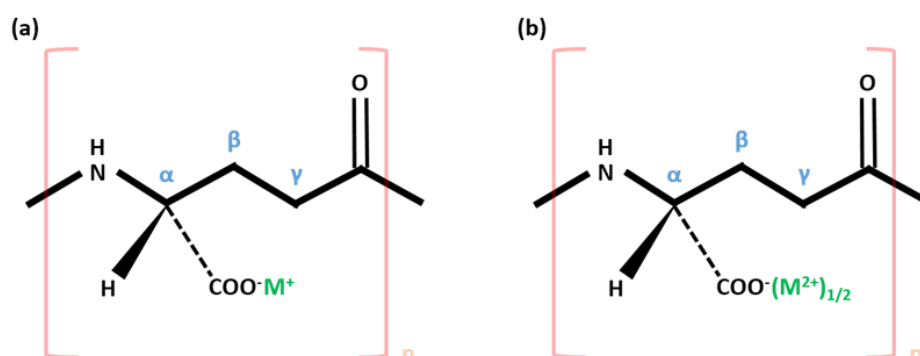


圖 2.7 γ -PGA 之鹽類結構(a)與一價金屬鍵結；(b) γ -PGA 與二價金屬鍵結(Inbaraj and Chen, 2009)

表 2.6 歷年學者在環境上應用 γ -PGA 之彙整

作者	γ -PGA 研究內容	處理對象	結果摘要
王等，2011	γ -PGA 溶液與明膠交聯製成明膠膜處理重金屬。	銅、鈷離子	γ -PGA 與明膠交聯製成的明膠膜具有吸附重金屬 (Cu^{2+} 、 Co^{2+}) 的能力。
陳氏，2011	γ -PGA 與天然棉絮進行聚合物的交聯，在不同之條件下處理重金屬。	鐵離子	當樣品水溶液 pH=6 時經過抽濾，其去除水中鐵離子效果最佳。
王等，2005	γ -PGA 與明膠膜交聯製成重金屬吸附劑。	銅離子	採用初始濃度為 100×10^{-6} g/mL 的 Cu^{2+} 溶液在 $30^\circ C$ 吸附 4 小時之條件下能夠達到最大吸附量，證實 γ -PGA 確實對於重金屬離子具有很強的吸附作用。
Inbaraj et al., 2009	γ -PGA 不同參數下對重金屬汞之吸附效應。	汞離子	使用鹽酸調節 γ -PGA 之 pH 值至 2，可回收 98% 汞。
林等，2008	探討不同類型之 1 ppm γ -PGA(鈉離子型、鈣離子型)對重金屬吸附量變化。	銅、鉛及鎘離子	在 6 種不同類型之 γ -PGA 中，以 γ -PGA(鈉離子型)HM 對 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Cd^{2+} 具有最佳之吸附效果。
Yang et al., 2017	以三種形式的 γ -PGA 作為清洗劑	鉻、鎳、銅及鋅離子	三種聚麩胺酸(RB、NHP 以及 NLP)清洗土壤中 Cr、Ni、Cu、

	探討土壤中重金屬去除效率。		Zn 等金屬之結果顯示，RB 對目標金屬有最佳之去除效果。
--	---------------	--	-------------------------------

2.8 地下水 pH 控制與緩衝溶液探討

當我們進行 TCE 厭氧還原脫氯時，維持地下水中的 pH 對還原脫氯是一個重要之影響因素，每一種微生物都有專屬最適生長之 pH 值環境，雖然在低(高)pH 值環境中之嗜酸(鹼)菌已被篩出，但大多數之微生物皆適於中性環境(pH 值 6-8)，有利於微生物生長反應(Mundle et al., 2012)。然而，許多可進行還原脫氯之重要菌群皆適於中性生長環境，如 Dehalococcoides 菌群，唯一已知能夠完整還原乙烯，四氯乙烯脫氯菌群之生長 pH 值為 6.8-7.5 之間。同樣，數個可進行還原脫氯氯化乙烯和乙烷之 Desulfitobacterium 菌群之最適 pH 值範圍亦是接近中性的，維持一個穩定的 pH 環境是促進脫氯反應一個重要的一環。Volkerling 與 Pijls (2004)研究發現 pH 值小於 6 時利於硫酸鹽、甲烷及脫氯菌還原反應。在現地復育中，添加混合性基質(糖蜜、乳清、植物油)和短鏈的脂肪酸到含水層中作為一個電子供給者，基質會經由發酵釋出氫氣和乙酸，來降解地下水中之污染物。在還原脫氯過程中，氫氣和乙酸被消耗後會釋出碳酸(H_2CO_3)和鹽酸(HCl)，亦可能會導致 pH 值下降，相關研究證實 pH 值酸化會導致脫氯之效率變差或抑制之可能性(Eaddy, 2008; Philips et al., 2013)。

除了提供現地額外的鹼度，我們也可以使用緩衝溶液(Buffered Solution)，緩衝溶液是指當溶液中有酸或鹼加入時，會抗拒 pH 值的改變，使整體溶液的 pH 值變化不大，可以維持一個相對穩定的值。這對一些化學反應的進行是相當重要的，因為許多化學反應是受到 pH 值的影響，在不同 pH 值環境下進行反應會得到不同的產物或是影響微生物的存活，所以控制 pH 值在一定範圍內是非常重要的。通常我們使用的 pH 緩衝溶液是「弱酸搭配弱酸鹽」或「弱鹼搭配弱鹼鹽」，其可維持具有緩衝的效果是弱酸鹼與其弱酸鹼的共軛酸鹼對(conjugate acid/base pair)之間存在的酸鹼平衡。如果現地中含有天然的碳酸鈣(CaCO_3)可以中和一些酸，過程中可釋出碳酸氫根(HCO_3^-)和碳酸(H_2CO_3)。假如 CaCO_3 沒有溶解在含水層中，則不會成為一個有效的 pH 緩衝物質(McCarty et al., 2007)。鹼度也可由硝酸鹽還原、硫酸鹽還原和氫氧化鐵($\text{Fe}(\text{OH})_3$)來產生，黏土中的離子交換和氫氧化鐵可提供強烈的緩衝 pH 能力。在 pH 值接近中性時， H^+ 會往黏土和鐵的氧化物有吸附的作用，可以限制 pH 值的下降。如果含水層中的 pH 值很低時，便要加入大量的鹼來提供它的鹼度，使地下含水層維持在中性的條件下，以利微生物生長。McCarty 等人(2007)曾計算出，需要鹼度 800 mg CaCO_3/L ，相當於使用 0.9 mM 的

葡萄糖作為電子供給者來中和還原脫氯 1.2 mM 的 TCE 所產生的酸。所以在地下水含水層中提供大量的鹼，來增加現地的緩衝能力，使微生物存在一個有利生長的环境之中。

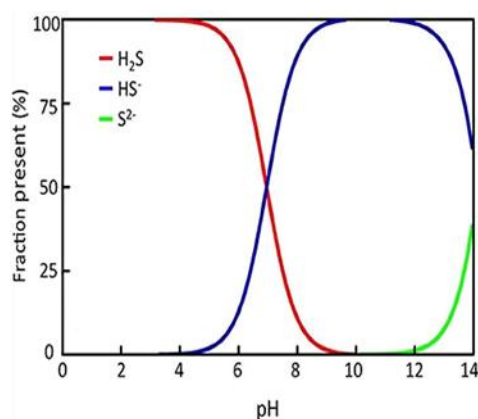
在整個厭氧還原脫氯的過程中，從 TCE 降解至乙烯的過程中皆有 HCl 的生成，導致 pH 下降的問題，所以有很多種鹼性物質可以使用，其中較為常見的鹼性物質包括氫氧化物，如：氫氧化鈉(NaOH)、氫氧化鉀(KOH)、氫氧化鈣($\text{Ca}(\text{OH})_2$)和氫氧化鎂($\text{Mg}(\text{OH})_2$)；碳酸鹽類，如：碳酸鈉(Na_2CO_3)、碳酸氫鈉(NaHCO_3)和碳酸鈣(CaCO_3)。其中 NaOH 和 KOH 溶解性高，所以有大量的鹼度能進入到含水層中。但是 NaOH 和 KOH 屬於較強鹼性和具有腐蝕性，現場操作的人員如操作不當，可能會傷害現場人員造成永久性的職業傷害。然而 NaOH 和 KOH 的 pH 值大於 13，也有可能抑制微生物的生長。而 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 的 pH 值分別為 12.5 和 10.5 但溶解性較差，更何況加入地底下的溫度較低，溶解性也可能相對的下降，尤其是 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，可能就無法控制含水層的 pH 值。 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 混合可以製備 8.3-10 之間的 pH 值，但在水體中提供相對較小的鹼度，所以需要的加入量可能比較龐大。長期和大量的加入，使鉀離子或鈉離子濃度變高，造成地下水含水層有鹽化的可能性，也間接的對使用下游地下水的居民的健康有所傷害。

2.9 硫酸鹽還原與異味控制之探討

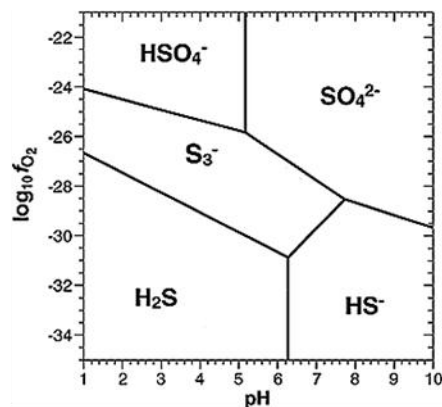
厭氧生物反應過程主要伴隨著不同機制轉化，包括利用硝酸鹽、三價鐵、硫酸鹽及二氧化碳當作最終電子接受者(Lee et al., 2015; Dolinová et al., 2017)。根據現地微生物之競爭及環境狀況，將決定何種厭氧性生物降解作用是最主要的機制。在一般典型的地下水缺乏溶氧情況下，脫硝反應會先發生，接著進行鐵還原作用、硫酸鹽還原作用及最終的甲烷化作用。當地下水中存在硫酸根離子經厭氧發酵，硫酸還原菌於缺氧環境中會生成硫化氫，硫化氫自然界存在於原油、天然氣、火山氣體和溫泉之中，也因此細菌分解有機物的過程中產生是一自然現象。但硫化氫是一種急性劇毒物質，微量的硫化氫具腐蛋味，但高濃度反而無味，吸入少量高濃度硫化氫可於短時間內致命，因此在污水下水道或生物整治過程中，大量有機物質及營養鹽環境下，易使微生物大量生長過程中，藉由厭氧還原作用產生大量硫化氫，其中硫酸鹽還原菌(Sulfate-Reducing Bacteria, SRB)是地球上最古老細菌之一，普遍存在於水及陸地的環境中，在有硫化氫臭味及發黑的水體環境中，其代謝活動尤其旺盛。因此，硫酸鹽還原作用為厭氧代謝呼吸作用之指標參數。

當水中硫酸鹽濃度低於 2.9 mg/L 就不易發生硫酸鹽還原作用，相關研究指出，發生硫酸鹽還原作用的氧化還原電位大約低於 -150 mV(Griebler and Lueders, 2008)。SRB 的不同菌屬生長所利用的碳源不同，最普遍的是利用 C3、C4 脂肪

酸，如乳酸鹽、丙酮酸、蘋果酸；此外還可以利用一些揮發性脂肪酸，如乙酸鹽、丙酸鹽、丁酸鹽；醇類，如乙醇、丙醇等；而銨鹽是大多 SRB 生長所需的氮源。硫酸鹽經 SRB 反應後生成之 H_2S ，可與金屬結合產生沉澱物，此類金屬硫化物的溶解度不高，若其存在環境中並不易造成再釋出的現象且可有效控制環境臭味之生成，因此，硫化氫值得我們重視它的存在與評估危害風險。其硫化氫在水中會解離成 HS^- 及 S^{2-} ，其毒性依序為 $H_2S > HS^- > S^{2-}$ ，當水中的 pH 值增加時，硫化氫的毒性會降低，因為未解離的強毒性的 H_2S 變成毒性較低的 HS^- 離子，圖 2.8(左)所示，在 pH9 時幾乎 99% 之硫化物以 HS^- 的形式存在，pH7 時 HS^- 與 H_2S 以 1:1 等比例存在，但在 pH5 則幾乎 99% 為 H_2S ，圖 8(右)顯示，在 pH6.2 以下，氧化還原電位越低，硫酸鹽越容易以還原型態硫化氫呈現(Tristram and Philip, 2013；Holmer and Hasler-Sheetal, 2014；吳氏，2015)。



Sours: Holmer and Hasler-Sheetal, 2014



Sours: Tristram and Philip, 2013

圖 2.8 硫化氫在不同 pH 值水體中型態與分配比例(吳氏，2015)

2.10 分子生物技術於污染整治上的重要性與應用

近年來分子生物定序技術蓬勃地發展，相關生物研究在新世代定序技術(Next generation sequencing, NGS)輔助下可獲得高輸出量及精確之基因序列，其在短時間內以相對低廉的價格產生大量的 DNA 定序資料，提供了分子生物學家探究基因體、轉錄因子和分子間交互作用等領域的有效工具(林等，2013)。本研究將利用 NGS 分析技術結合即時定量聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)於分解實驗中進行菌相分析，以瞭解特徵基因和優勢菌之變化，做為應用 γ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。NGS 有別於傳統定序，包含 3 大特性：1. 屬於高通量定序(High-Throughput Sequencing, HTS)，定序數據量增加與時間減少來自於 NGS 定序資料的高輸出量；2. 合成定序法(Sequencing by Synthesis, SBS)，NGS 是利用合成的方式來定序，這種方式與傳統 Sanger Sequencing 的 ddNTP 中斷法有所不同(Sanger Sequencing 還需要 ddATP, ddGTP, ddTTP，而就是利用這「四種」切斷的組合，才能拼湊出 DNA 序列上 ATCG)，

因此 NGS 所採用之鏈終止定序法(chain terminatin)來進行 DNA 定序，不需要經由細菌進行質體複製，能有效減少錯誤發生率；3.大量同步定序法(Massive Parallel Sequencing, MPS)，說明 NGS 可以同時分析成千上萬條序列，有別於傳統的定序法(Sanger sequencing)一次只能定序一種序列。因為 NGS 是由電腦操作，所以相較於傳統方法，次世代定序法(Next Generation Sequencing, NGS)具有便宜又快速的優點(Shokralla et al., 2012；Pabinger et al., 2014)。

Metagenomics(總體基因體)是近年來才發展出來的興新學門，主要是透過研究分析環境基因體，進而描繪環境生物的代謝特性。一個完整的環境系統，是由許多種生物所組成，除了看的見的生物之外，當然也包括看不見的微生物族群，這些族群的數量遠比動植物多，然而，如要描繪一個真實的環境生化代謝圖譜，最有效的方式就是直接萃取環境中的總 DNA 或 RNA 加以分析，藉由基因體的資訊，對環境做全面性的了解。環境基因體具有高多樣性及複雜度，最著名的例子是 Craig Venter 在一桶海水中萃取細菌 DNA，經 NGS 分析後，發現含有高達 150,000,000 bp 非重複性的鹼基對，1,800 個 genotype 以及 1,200,000 個過去沒有被記錄過的基因，因此，要描繪出真實完整的環境基因體特性，需要大量的資料(Tatusova et al., 2013)。一般來說，一群微生物可能是相互合作降解環境污染物。然而，不是所有菌種可降解各種各樣的污染物，可藉 NGS 測定在污染廠址內具有分解污染物潛力菌種種類和其在所有菌種種類分佈比率，然而透過分析工業污染場地的微生物群落基因序列，並經由生物分類資訊軟體分析，可提供污染物及其化合物存在的污染場址，其微生物群落組成。這種做法將有利於鑑定是否具有特定微生物，參與降解途徑的關鍵生化反應步驟。這項研究的目的是評估內生性土壤及水體微生物群落，並預測受污染的場址之微生物復育前和後的菌相分析，當我們對於環境中菌相的分佈以及優勢菌種可以有非常完整瞭解後，便可有利於特定菌種的分離、純化與培養，並進而利用這些菌種來進行各類環境污染的生物復育。利用 PCR 的方式放大 16S rDNA 之後，搭配 NGS 來獲得微生物的組成群落，是目前最有效率且精準的方式(Krachunov et al., 2015; Dudhagara et al., 2015)。

第三章：研究方法及步驟

本研究工作包含蒐集國內外近 5 年 γ -PGA 相關研究文獻、利用 γ -PGA 作為生物生長基質及現地酸鹼緩衝材材料，本計畫之工作內容主要包含 γ -PGA 基本特性分析、批次試驗、管柱試驗及現地生物復育試驗成效，共四階段分別進行探討，實驗架構流程圖如圖 3.1 所示。第一階針對高分子聚合物 γ -PGA 特性分析，以黏度試驗、粒徑分析、元素分析、成分分析、吸附試驗、流通試驗及分配係數等評估 γ -PGA 之物化特性。第二階段進行厭氧還原脫氯之生物批次降解試驗 (microcosm study)，評估以 γ -PGA 做為加強 TCE 還原脫氯基質之可行性。生物降解試驗將探討在不同環境及控制條件下(包括 γ -PGA 濃度、硫酸鹽濃度、亞鐵離子濃度、污染物濃度及 pH 值)， γ -PGA 對污染物之分解效率，以做為後續現地生物復育技術之設計參考準則。批次實驗為針對 γ -PGA 基質處理受 TCE 污染之地下水作探討，以微生態系統試驗模擬現地自然環境，進行 5 組批次試驗，分別為控制組、自然降解組、 γ -PGA 組、緩衝液 γ -PGA 組及緩衝液乳化油組等，藉由添加不同基質，作為評估加強式自然生物技術對 TCE 污染物降解之情形以及對自然環境的影響。第三階段將進行厭氧管柱試驗，管柱實驗是針對 γ -PGA 作為透水性反應牆，以評估 γ -PGA 對 TCE 之吸附效應，在管柱試驗中，將以現地 TCE 污染土壤及地下水進行試驗，以模擬基質注入後之整治成效。第四階段將整合前述試驗成效，並挑選台南永康工業區受含氯有機污染物之場址進行生物復育技術評估試驗，藉此證實 γ -PGA 基質可有效加強 TCE 之還原脫氯，達到生物降解之目的。其整體工作計畫內容包括下列各點：

- (1) 針對高分子聚合物 γ -PGA 基質進行基本特性分析，包含黏度試驗、粒徑分析、元素分析、吸附試驗及流通試驗等，藉此瞭解基質應用上可能發生之情形，亦可提供未來應用於現地含氯整治場址與永續環境之可行性。
- (2) 利用厭氧微生物批次試驗，評估高分子聚合物 γ -PGA 應用於受含氯污染之地下水，並找出最佳添加比例應用於地下水整治，並探討控制 pH 酸化與副產物臭味生成之控制情形。
- (3) 針對現地基本場址調查，以了解場址基本特性、地質、水文條件及污染情形等。
- (4) 依據先前研究成果發展出對污染場址進行現地整治之設計準則，進行現地受含氯有機污染物之生物復育技術。
- (5) 利用 NGS 分析技術結合即時 real-time PCR 進行菌相分析，以瞭解脫氯菌群

(*Dehalococcoides* spp.)和特徵還原基因酶(*tceA*、*vcrA* 及 *bvcA*)之菌量變化，作為現地應用 γ -PGA 整治 TCE 之成效驗證參考依據。

- (6) 進行經濟效益分析，評估應用 γ -PGA 作為厭氧脫氯基質之操作成本效益，並和其他常用之基質比較，進行成本分析，評估 γ -PGA 之市場競爭力。

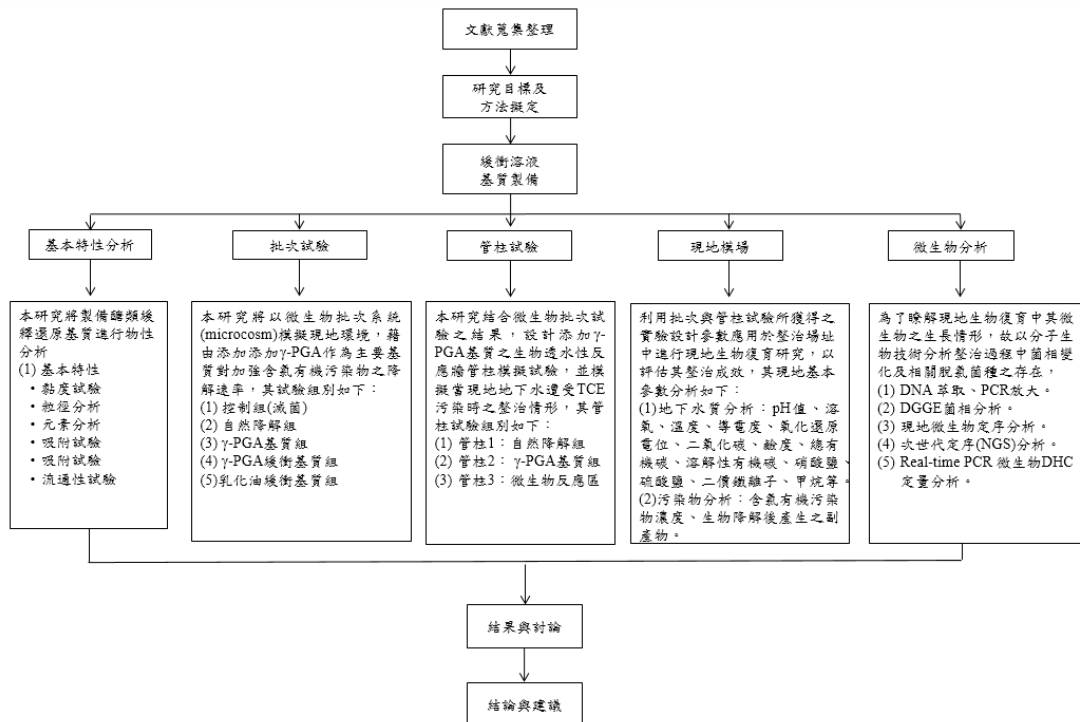


圖 3.1 實驗架構流程圖

3.1 高分子聚合物 γ -PGA 基本特性分析

聚麩胺酸(γ -PGA)是以麩胺酸(GA)為基礎原料，經由微生物(*Bacillus* sp.)或酵素(glutamyl transpeptidase)並結合有機碳源、氮源及礦物質以液態醱酵行生物聚合而成的一種生物可分解性的高分子材料，其產品外觀及基本特性(如圖 3.2 及表 3.1 所示)。

表 3.1 γ -PGA 之基本特性

外觀	黑褐色液體	
分子量 (GPC/HPLC)	約 20 萬	
純度(HPLC)	95%	
濃度	3.5%	
pH	6.0	
總金屬含量	Pb =5 mg/L, Cd = 2 mg/L, As ₂ O ₃ = 2 mg/L	
元素分析儀	C, 44.86% ; H, 5.91% ; N, 10.49%	

圖 3.2 產品 γ -PGA 實際拍攝圖

3.1.1 黏度試驗

添加 γ -PGA 基質及緩衝液組，利用粘度分析儀於轉速 20 rpm 下，分析溫度 20℃、25℃及 30℃之 γ -PGA 基質及緩衝液組粘度變化。

3.1.2 粒徑分析

土壤樣品經充份攪拌混合後經風乾、破碎後，先以 10 mesh，孔徑 2 mm 的篩網篩除石礫及雜質。陽離子交換容量、比表面積及土壤有機質含量等此部份之研究主要先建立不同粒徑土壤特性的資料，提供做為後續研究之基本參考。

3.1.3 元素分析

利用元素分析儀將 γ -PGA 在氧化銅等氧化催化劑存在下利用氧氣將其完全燃燒，再經過銅還原處理後，生成之 N₂、CO₂、H₂O 混合物經過特殊之分離管分離後，可利用熱傳導偵檢器(TCD)分別測定其含量，再經資料處理機運算，即可自動列計碳、氫、氮及硫之重量百分比。

3.1.4 吸附試驗

利用管柱分析 γ -PGA 基質穿透管柱後，計算單位土壤所吸附之 γ -PGA 總量，並分析單位土壤吸附飽和後之總有機碳(total organic carbon, TOC)增加量。

3.1.5 均質試驗

實驗配製添加 γ -PGA 基質及緩衝液組別之地下水溶液，利用 30 公分量筒分別分析初始(0hr)、1hr、3hr、6hr、12hr、18hr、24hr、36hr 及 48hr 之量筒 0、15 及 30 公分處之 TOC 濃度，藉此評估 γ -PGA 基質及 γ -PGA 緩衝液基質之均質穩定度。

3.1.6 流通性試驗

針對流通性試驗主要評估添加 γ -PGA 基質於土壤孔隙間之吸附能力。因此，本計畫所採集之土壤為南部某工業場區內之現地土壤含水層，採集後之土壤樣品於現場經破碎及充分混篩，並去除大型萃石及雜質後，填裝於玻璃罐中以 4°C 冷藏保存。並添加 γ -PGA 基質進行管柱傳輸流通性之試驗評估，以一管柱長 (cm) $\times$ 寬 (cm) = 8 (cm) $\times$ 3.5 (cm) 填充現地土壤並模擬基質灌注於地下含水層土壤中之傳輸情形如圖 3.3。首先，實驗進行時先將管柱內注入超純水測定其流量，之後注入 γ -PGA，並於出水端測定該物質之 TOC 出流濃度及出流量，觀察基質於土壤孔隙間之傳輸情形，並於進出流濃度達平衡時，再以超純水注入，觀察基質釋出情形。

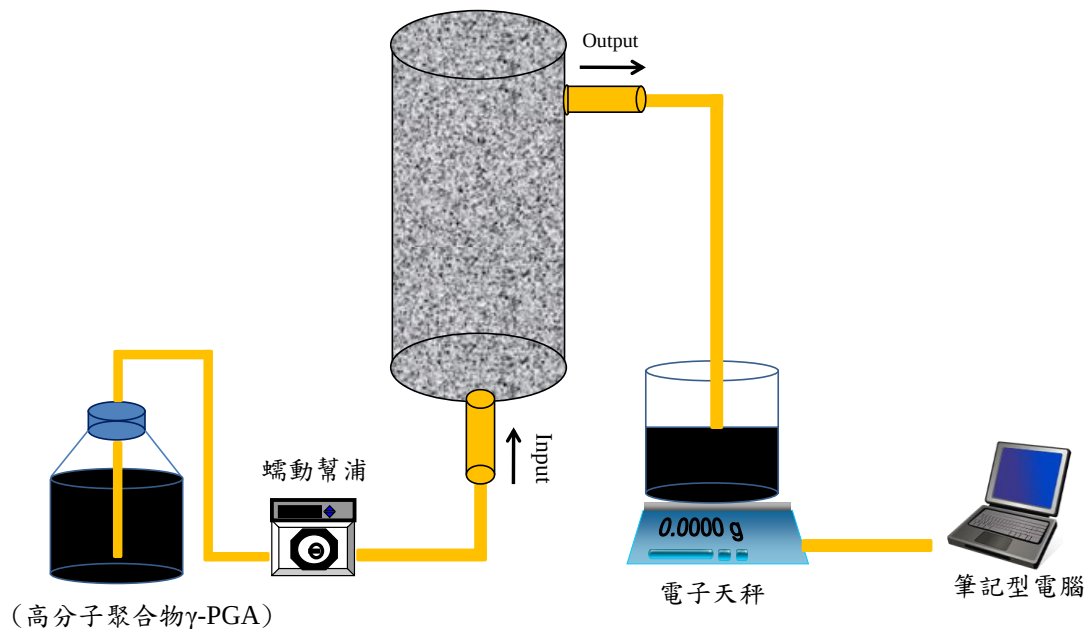


圖 3.3 γ -PGA 基質流通性試驗裝置示意圖

3.2 以微生物批次實驗探討 TCE 在厭氧條件下生物分解之可行性及速率

厭氧批次實驗主要目的探討現地微生物菌群在提供 γ -PGA 基質之生長條件下，加強對 TCE 的降解成效。本計畫批次實驗以 160 mL 之培養瓶做為此分解實驗中之 microcosm。污染場址所採集之乾淨含水層土壤為微生物之來源。實驗目的在研究厭氧條件下，添加 γ -PGA 作為主要基質對加強含氯有機污染物之降解速率。

第一組：控制組，將土壤之污泥及地下水經由 121°C ，15 lb/in 高壓滅菌釜滅菌

約 30 分鐘後，取滅菌之土壤於血清瓶中並以分注器加入 40 mL 已滅菌之地下水，再加入氯化汞及疊氮化鈉確保血清瓶內部呈現無菌狀態。

第二組：自然降解組，取現地含水層土壤 5 g 及污泥 0.4 mL 於血清瓶中並以分注器加入 40 mL 地下水，此組中將包含現地含水層土壤、含氯有機污染物，可瞭解現地微生物利用現地自然環境條件下降解污染物之效率並以培養瓶 10 mL 之頂空(headspace)中填充 5% 氫氣及 95% 氮氣之混合氣體。

第三組： γ -PGA 基質組，取現地含水層土壤 5 g 及污泥 0.4 mL 於血清瓶中並以分注器加入 40 mL 地下水及 1 mL 之 γ -PGA 作為微生物生長之碳源。此外，本研究在 microcosm 中加入 γ -PGA 基質來源，並以培養瓶 10 mL 之頂空(headspace)中填充 5% 氫氣及 95% 氮氣之混合氣體。

第四組： γ -PGA 基質及緩衝液組，取現地含水層土壤 5 g 及污泥 0.4 mL 於血清瓶中並以分注器加入 40 mL 含緩衝液之地下水及 1 mL 之 γ -PGA 作為微生物生長之碳源。此外，本研究在 microcosm 中加入加入 γ -PGA 基質來源，並以培養瓶 10 mL 之頂空(headspace)中填充 5% 氫氣及 95% 氮氣之混合氣體。

第五組：添加乳化油及緩衝液組。在此組中，取現地含水層土壤 5 g 及污泥 0.4 mL 於血清瓶中並以分注器加入 40 mL 含緩衝液之地下水及 0.4 mL 乳化油作為微生物之生長碳源。此外，本研究在 microcosm 中加入乳化油作為基質來源，並以培養瓶 10 mL 之頂空(headspace)中填充 5% 氫氣及 95% 氮氣之混合氣體。

以上試驗皆以 GC-ECD/purge and trap 進行含氯揮發性有機污染物及其降解副產物分析並量測 pH、氧化還原電位(oxidation-reduction potential, ORP)變化及進行總生菌數分析，並將明顯降解效果之組別進行菌相分析，了解不同條件下之微生物菌相變化及脫氯球菌量之變化。

3.3 以微生物管柱實驗探討 TCE 在厭氧條件下生物分解速率及基質傳輸性

本計畫以 γ -PGA 做為疏水性生物基質釋碳材料，並針對地下水整治技術之透水性反應牆應用之可行性進行評估，提供未來作為經濟且環境友善之生物整治牆技術。其目的主要探討現地微生物菌群在提供 γ -PGA 基質之生長條件下，對含氯有機污染物的分解情形。本計畫依據流通試驗及微生物批次試驗選定最佳操作參數，以連續式反應裝置(pilot-scale study)評估整治技術之成效。其連續式反應裝置如圖 3.4 所示，各管柱(直徑：5 cm、長：25 cm)填充現地含水層土壤以模擬現地

3.5 進行現地之模場研究

本計畫在場址選定後，將場址隔一塊污染區域進行現地模場研究，選擇現有之 2-3 口監測井作為整治井(靠近含氯有機污染源區域)，並於不同地下水井中添加 γ -PGA 基質至監測井中，研究將每月進行後續之採樣及監測工作，以評估其成效。若場址中監測井不足或位置不適當，我們將視場址狀況，增設數口臨時監測井作為整治井。此外，本計畫將依現場之微生物反應速率，做必要之整治技術之調整，以提高微生物活性及數量。地下水之分析監測項目包括含氯有機污染物濃度、生物降解後產生之副產物、溶氧、pH 值、溫度、導電度、氧化還原電位、二氧化碳、鹼度、總有機碳、溶解性有機碳、硝酸鹽、硫酸鹽、二價鐵離子、甲烷等。

3.6 現地微生物資訊分析

為了瞭解批次實驗過程中其微生物之生長情形，故以分子生物技術分析其各組實驗之菌相變化，本研究利用-次世代定序(NGS)分析技術結合即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 及變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 等分子生物分析技術，分子生物分析實驗包含 DNA 萃取、PCR 放大、Real-time PCR 微生物定量分析、DGGE 菌相圖及現地微生物定序分析。

- (1) DNA 萃取及聚合酶連鎖反應：將樣品加入酚及氯仿(phenol/chloroform)除去蛋白質及其他成分，使蛋白質變性來進行 DNA 萃取之步驟。將萃取 DNA 進行聚合酶連鎖反應(PCR)，利用溫泉菌(Taq polymerase)耐高溫特性，以升降溫度的循環方式來控制 DNA 聚合酶的酶活性，針對細菌的 16SrDNA 中變異的區段序列所設計的 V6-V8 region 的 primer：968fgc、1401r，大量複製目標 DNA 序列的方法。
- (2) DGGE：其原理是將 PCR 放大後的 DNA 片段進行電泳分離，其在膠體間形成一個 DNA 變性劑梯度，使其影響膠體中 DNA 雙股間氫鍵。當凝膠變性劑(如甲醯胺或尿素)濃度增加，DNA 分子形成端部的叉狀或中間環形，便不能繼續向前移動而形成條帶，如此便能將具有相似長度而序列有差異之 DNA 分離。
- (3) 定量即時聚合酶連鎖反應(Quantitative realtime polymerase chain reaction, Q-PCR)：偵測 *Dehalococcoides* spp. 以 TaqMan probe 法分析，使用的 primer 與 probe 參考 Ritalahti 等人(2006)發表研究中選用引子 1200 f 與 1271 r 進行 PCR 放大 *Dehalococcoides* spp. 16S rDNA 基因片段。將此 PCR 產物接合到 pGEM-

T Easy Vector (50ng/ μ L)上，進行定序確認物種，當確定為 *Dehalococcoides* spp. 的質體做為標準品進行後續的標準曲線建立。依下方公式(1)，將序列稀釋的各種濃度換算成 gene copies，做出一條標準曲線 (gene copies 對 Ct 值做圖)。此實驗進行二重複的反應以做出較為準確的標準曲線，配製好後以 StepOnePlus™ Real-time PCR system (Applied Biosystem)進行實驗反應，反應中 annealing 溫度為 58°C，時間為 1 分鐘，進行 40 個 cycles 的反應。

- (4) 次世代定序(next generation sequencing, NGS)分析：次世代基因定序技術已然發展 10 年，NGS 次世代定序 (Next Generation Sequencing) 是新的核酸定序技術，本研究將利用 illumina HiScan 平台，每日最多可以得到 15 Gb 的數據，每批次實驗可獲得的資料總量為 150 Gb。在完成實驗取得資料後能藉由專業生物資訊團隊依照實驗目的需求進行分析與探討。

3.7 本研究使用儀器使用廠牌

本計畫主要以氣相層析/電子捕捉偵測器進行 TCE 與副產物之分析(如表 3.2 所示)，並將以貴儀中心之掃描式電子顯微鏡及 X 光繞射分析觀察分析批次瓶沉澱物及填充土壤於實驗過程之型態及種類變化，並以 NGS/real-time PCR 分析技術與設備進行相關分子生物技術之研究。

表 3.2 彙整不同設備儀器之廠牌及型號

編號	設備名稱	用途說明	廠牌/型號/備註
1	冷凍乾燥機	樣本預備	台灣泛群科技有限公司，型號 FD-5030
2	GC-ECD 氣相層析/電子捕捉偵測器	氣態產物分析	Agilent，型號 6890 (層析管柱：Agilent MXT-5，0.53 mm，30 m)。
3	吹氣捕捉裝置 (Purge and Trap concentrator)	樣本預備	Tekmar，型號 3000。
4	GC-TCD 氣相層析儀	氣態產物分析	Agilent，6890N
5	GC-FID 火焰離子偵測儀	液態產物分析	Agilent，6850
6	掃描式電子顯微鏡 (SEM)	觀測材料型態	中山大學貴儀中心
7	高速離心機	樣本預備	-
8	恆溫培養箱	批次實驗用	-
9	黏度分析儀	材料型態特性分析	Brookfield，型號 DV3T
10	粒徑分析儀	材料型態特性分析	-

預定進度及查核點

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	備註
文獻蒐集												
γ -PGA 特性分析												
流通試驗/分配係數												
厭氧批次反應試驗												
厭氧管柱降解試驗												
期中報告撰寫												
場址背景調查												
整治井及監測井設置												
灌注 γ -PGA 基質												
含氯污染物/分子生物 (realtime PCR 及 NGS)定 序分析												
生物復育技術整體分析 評估												
期末報告撰寫												
工作進度估計百分比 (累積數)	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
預定查核點	期中		第 3 個月完成實驗室基質特性分析及管柱流通性試驗； 第 6 個月完成實驗室批次及管柱降解試驗，提出期中報告。									
			第 8 個月完成整治井及觀測設置，進行現地添加 γ -PGA 基質； 第 11 個月完成現地生物降解整治效益評析，並提出期末報告。									

第四章：結果與討論

4-1 γ -PGA 基本特性分析

4.1.1 黏度試驗

本試驗組別可分添加 γ -PGA 基質及緩衝液組，利用粘度分析儀於轉速 20 rpm 下，分析溫度 20、25 及 30°C 之 γ -PGA 基質及緩衝液組粘度變化。由圖 4.1 結果顯示於 20°C 環境下 γ -PGA 緩衝液組與 γ -PGA 基質組分別為 1.24 cP 及 1.26 cP，隨著溫度條件上升黏度並未顯著改變；上升至 25°C 時， γ -PGA 緩衝液組為 1.24 cP 而 γ -PGA 基質為 1.24 cP；上升溫度至 30°C 時， γ -PGA 緩衝液組僅下降至 1.2 cP，反之 γ -PGA 基質下降至 0.97 cP。黏性越大的流體，其流動性較為緩慢而流動阻力亦較大，有效的提高黏度能減緩基質於土壤中移動之速度。實驗結果作為後續現地基質灌注參考之依據。

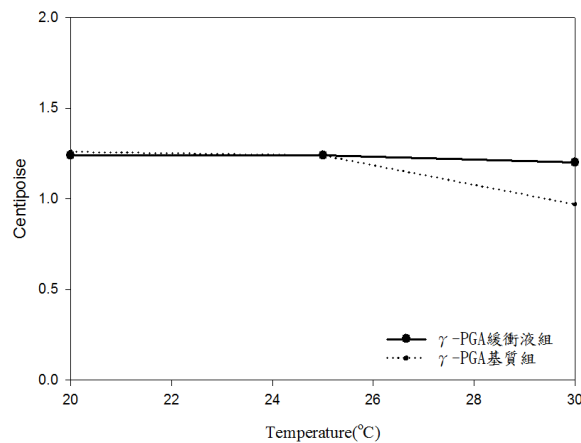


圖 4.1 γ -PGA 基質及緩衝液組黏度變化圖

4.1.2 粒徑分析與界達電位

顆粒組成以黏粒($<2\ \mu\text{m}$)、粉粒($2\sim 63\ \mu\text{m}$)及砂粒($>63\ \mu\text{m}$)所佔的百分比如圖 4.2 所示。土壤黏粒、粉粒及砂粒所佔的百分比分別介於 0.8%、10.2%及 89%之間。其中，以砂粒主要組成(89%)為主。由圖 4.3 及 4.4 數據顯示 γ -PGA 之二個主要粒徑包含 437 nm 及 5,423 nm，因此在奈米到微米之間。此粒徑大小可使 γ -PGA 有效分佈到粗細顆粒間(包括黏土到砂粒)，達到均勻分佈及增加生物可及性目標。此外， γ -PGA 之介達電位為 -36 mV，此負電位可使 γ -PGA 向下游傳輸，不會被主要代負電的土壤顆粒吸附在注入點附近。

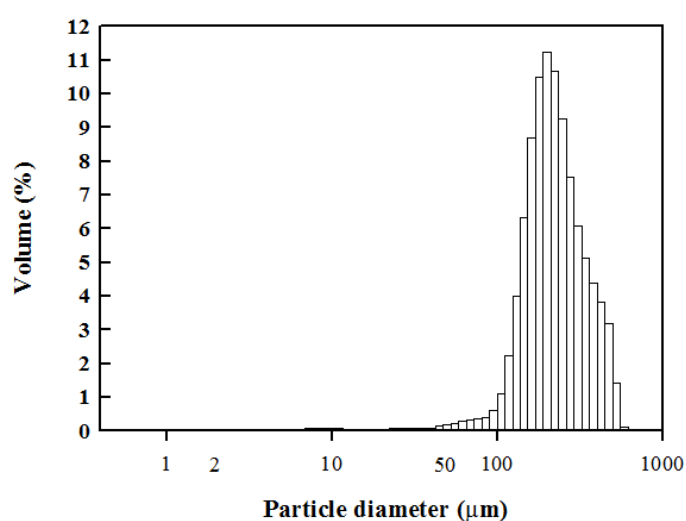


圖 4.2 土壤顆粒粒徑分布百分比

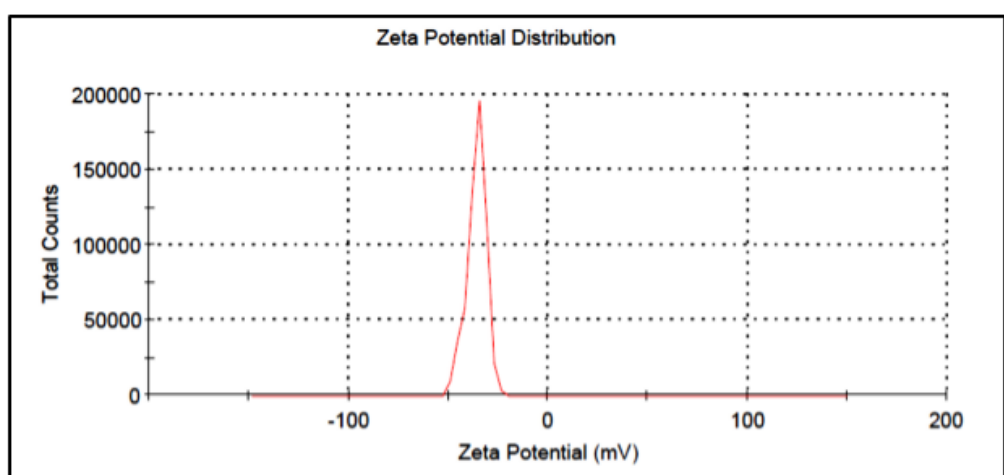
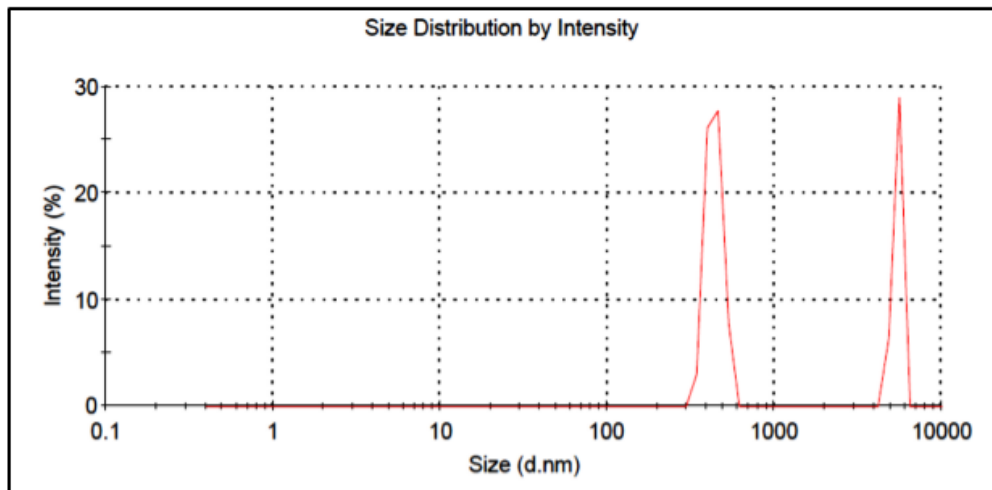


圖 4.3 γ -PGA 粒徑分布百分比圖

圖 4.4 γ -PGA 界達電位分布圖

4.1.3 元素分析

將計畫選用基質進行原素分析，係確定基質含碳、氫、氮之重量百分比。數據顯示主要為碳含量為最高 45%，其餘氫、氮及硫分別為 5.9、10.5，其基質有豐富碳源供於微生物利用。

4.1.4 均質試驗

目前適用於土層之生物基質皆為水溶性反應物質，此試利用 30 公分量筒主要以不同高度(0、15 及 30 公分)，分析不同小時之 TOC 濃度，藉此評估 γ -PGA 基質及 γ -PGA 緩衝液組基質之均質穩定度。由圖 4.5 顯示 γ -PGA 基質及 γ -PGA 緩衝液組經過 48 小時試驗未有分層之產生，後續針對 TOC 濃度進行檢測。由圖 4.6 結果顯示試驗 γ -PGA 基質及緩衝液組經過 48 小時試驗，TOC 濃度均維持於 1555~1655 mg/L 之間，TOC 濃度未有分布不均之情況發生，由試驗結果可得知兩種組別基質均質穩定為一致性。



圖 4.5 基質組(左)與緩衝液組(右)示意圖

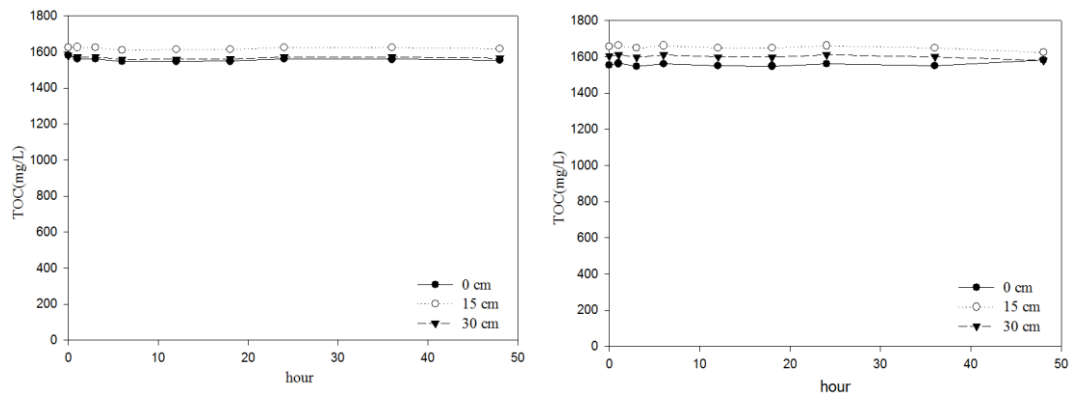


圖 4.6 γ -PGA 基質組(左)與 γ -PGA 緩衝液組(右)TOC 濃度變化

4.1.5 流通性試驗

本試驗用以評估基質於地下水之傳輸性，本研究選用可完全溶於水之氯化鈉作為示蹤劑與 γ -PGA 基質進行管柱試驗來模擬基質注入地下水中傳輸性。由於示蹤劑較無阻塞情形發生，可有效作為判別管柱中與基質傳輸差異上之依據，同時示蹤劑與 γ -PGA 基質進行管柱試驗來模擬基質注入地下水中傳輸性。 γ -PGA 基質進行管柱傳輸試驗，以一填充管柱模擬地下含水層土壤，實驗進行時先將管柱內注入超純水測定其流量，之後分別注入氯化鈉及 γ -PGA 基質，並於出水端測定該物質之出流濃度及出流量，觀察以上不同物質於土壤孔隙間之傳輸情形，並於進出流濃度達平衡時，再以超純水注入，觀察基質釋出情形。

各物質出流濃度如圖 4.7 所示，由於氯化鈉可完全溶於水，較無孔隙阻塞情形發生，可視為示蹤劑，其出流濃度與入流濃度達平衡時之注入體積約 6~7 PV，而 γ -PGA 基質其出流濃度與入流濃度達平衡時之注入體積約 6~7 PV，顯示 γ -PGA 基質與氯化鈉一樣易於土壤孔隙間傳輸，其原因由於 γ -PGA 基質進流濃度過高造成傳輸狀況屬於成熟(ripening)階段， γ -PGA 基質會造成土壤孔隙的吸附阻塞而發生短流現象。而當基質注入體積達 12 PV 時，以超純水注入，此時 γ -PGA 基質出流濃度下降較氯化鈉快，其原因由注入之基質為水溶性基質，其易流失而累積於土壤顆粒。出流體積至 14 PV 時 γ -PGA 基質實驗組 TOC 已流出 85%，反而氯化鈉實驗組約 16PV TOC 才流出 85%。現地土壤顆粒為砂粒亦造成流通性較佳主要之一。

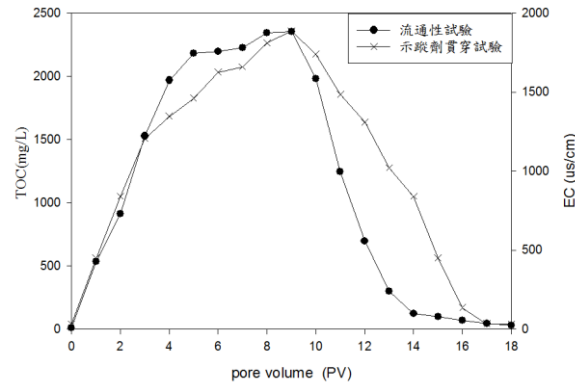


圖 4.7 流通性試驗於土壤孔隙間傳輸後之 TOC 出流濃度變化

4.2 微生物批次實驗

4.2.1 批次實驗水質參數變化趨勢

批次試驗為瞭解現地地下水添加基質與未添加基質情況下，微生物利用自然環境代謝 TCE 之可行性。因此，以微生態批次系統模擬現地環境，分別 5 組批次試驗分別為：控制組(滅菌代號 A)、自然降解組(代號 B)、 γ -PGA 組(代號 C)、 γ -PGA 緩衝液組(代號 D)及乳化油組(代號 E)，作為評估現地自然環境對污染物降解效率。

各組別 pH 值實驗結果如圖 4.8 所示，控制組(A)初期測得 pH 值 7.5 反應 14 天 pH 下降至 7.27，此組別無額外添加基質，推測初期 pH 下降主因為土壤中微量營養鹽供微生物利用後將污染物代謝過程產生 HCl 所致，反應後期地下水中 pH 並無明顯變化。自然降解組(B)初期測得 pH 值 6.11，反應 14 天 pH 下降至 6.10，此組別無額外添加基質，反應後期地下水中 pH 並無明顯變化。 γ -PGA 組(C)及 γ -PGA 緩衝液組(D)初始 pH 值維持在 6~8 之間至第 84 天 pH 值分別為 7.32 及 7.30，均維持在 6.5 以上，顯示出 γ -PGA 與乳化油作為碳源比較，本身具有緩衝 pH 之效果。另有學者研究發 γ -PGA 具有 pH-responsivity 之特性，當環境中之 pH 值產生變化時， γ -PGA 能與溶液中之氫離子(H^+)結合或分離達到平衡之狀態，在這種結合和分離中，其微觀分子結構的變化會導致其體積、形態或結構的變化(Luo et al., 2016; Khalil et al., 2016)。因此 γ -PGA 當作基質有緩衝 pH 值之作用，能夠有效解決基質導制 pH 酸化問題。乳化油組(E)初期測得 pH 值 7.42，在第 28 天之後 pH 迅速下降至 5.95，至 84 天 pH 值為 5.66，由數據顯示 pH 值呈現酸化情形，環境中 pH 的變化決定微生物行還原脫氯的效率，一般脫氯是最佳 pH 值為 7.1~7.5，但 pH 值低於 6.2 會受到抑制之情形(Philips et al., 2013)因此，控制酸化現象即為相當重要之因子。於生物基質反應期間因微生物生長過程中可快速分解水中有機物質及營養鹽所產生有機酸、脂肪酸等機制作用下而造成 pH 值降低，

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

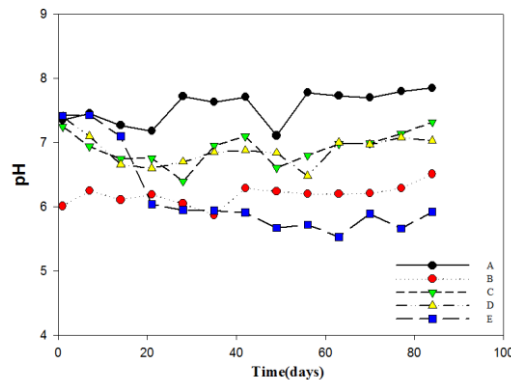


圖 4.8 微生物厭氧批次實驗 pH 變化趨勢

由 ORP 監測結果如圖 4.9 所示，控制組(A)與自然降解組(B)初始測得 ORP 為 294、237 mV，並於反應 84 天測得 ORP 為 312、198 mV，兩種總別主要於微氧型態。 γ -PGA 組(C)、 γ -PGA 緩衝液組(D)及乳化油組別(E)ORP 初始濃度為 -220 mV，於第 21 天 ORP 有上升趨勢介於-125 到 -175 mV 之間。ORP 在第 84 天皆維持在負值(介於-75mV 到-251 mV 之間)，證實添加基質將有助於快速營造地下水中環境由微氧型態轉換為厭氧還原態。

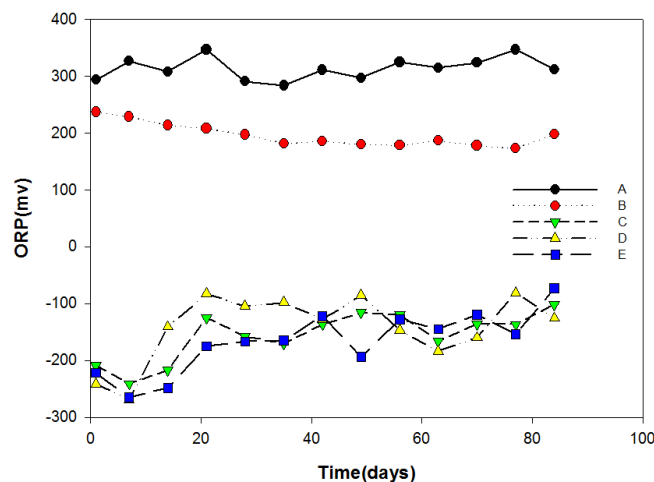


圖 4.9 微生物厭氧批次實驗 ORP 變化趨勢

各組別 DO 監測結果如圖 4.10 所示，控制組(A)初期測得 DO 為 1.7 mg/L，反應過程中監測 DO 皆維持在 1.7 ~ 1.9 mg/L 之間並無明顯改變。自然降解組(B)初期測得 DO 為 3.2 mg/L，反應過程中因微生物反應消耗地下水中 DO 值，反應過程中監測 DO 皆維持在 2.2 mg/L 之間並未達到厭氧環境。 γ -PGA 組(C)及 γ -PGA 緩衝液組(D)初期測得 DO 為 1.1、0.9 mg/L，反應過程中監測 DO 皆維持在 0.7、

0.7 mg/L，均維持在厭氧環境之狀態。故從 DO 及 ORP 結果顯示此厭氧環境的形成，有利於微生物在厭氧的環境進行還原脫氯降解 TCE 污染物。乳化油組別(E)實驗結果顯示初始 DO 為 2.0 mg/L，當添加基質後於第 21 天監測 DO 值為 1.13 mg/L，並於 84 天反應期間 DO 皆維持在 1.05 mg/L，顯示添加乳化油提供營養基質與產氫作用下可刺激微生物生長，消耗水中 DO，而形成一穩定且還原態環境。

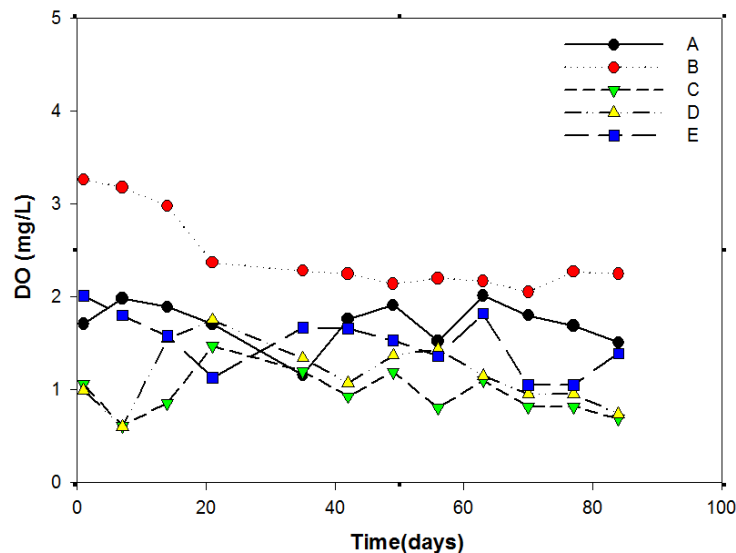


圖 4.10 微生物厭氧批次實驗 DO 變化趨勢

TOC 結果如圖 4.11 所示， γ -PGA 組(C)與緩衝液 γ -PGA 組(D)之初始 TOC 濃度分別為 1978、1793 mg/L，在第 84 天後之 TOC 濃度分別為 646、945 mg/L，生物利用率為 67.3 %及 47.2 %，顯示出 γ -PGA 除了可提較多碳源，微生物利用 γ -PGA 之效果亦相當顯著。而緩衝液乳化油組之初始 TOC 之初始濃度為 84 mg/L，在第 84 天後之 TOC 濃度為 492 mg/L 生物利用率為 41 %。表示為生物能夠有效利用基質且反應期間可持續提供碳源。

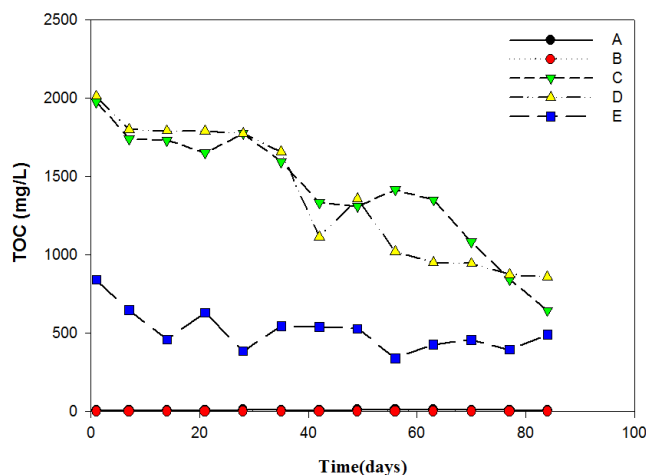


圖 4.11 微生物厭氧批次實驗 TOC 濃度變化趨勢

厭氧性生物降解機制過程中，二氧化碳當作最終電子接受者而形成甲烷，因此甲烷的生成也可作為評估微生物利用碳源之情形，其結果圖如圖 4.12 所示，第 0 天至 21 天未偵測到 CH_4 生成，數據顯示於第 35 天開始添加基質組別(C、D、E)均有微量甲烷之生成，表示厭氧微生物降解機制已進入甲烷化作用。其中以 γ -PGA 與緩衝液 γ -PGA 之甲烷生成量在第 84 天分別為 0.121 mg/L 及 0.124 mg/L，顯示 γ -PGA 經微生物分解之效果顯著。TOC 與甲烷濃度於反應期間產生變化趨勢性不大。綜合各組別基本水質參數顯示，含微生物分解後所產生有機酸產物及污染物降解過程產生 HCl 等機制作用會導致地下水中 pH 值微幅下降，但反應期間添加 γ -PGA 基質組別 pH 維持在中性。控制組與自然降解組之水中碳源濃度不足亦是受限微生物生長主因，添加基質組別將明顯提高生物降解可行性。

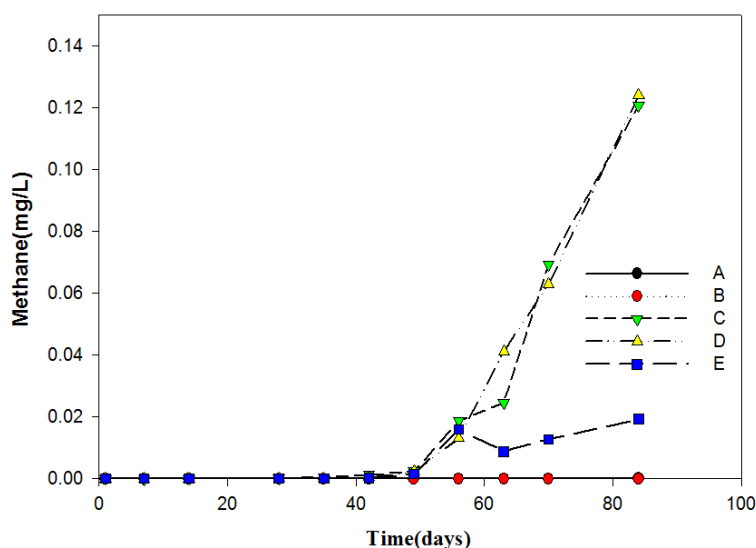


圖 4.12 微生物厭氧批次實驗甲烷濃度變化趨勢

4.2.2 各組別降解三氯乙烯

各組別監測結果顯示如圖 4.13 所示，控制組 TCE 初始濃度 5.3 mg/L，反應第 35 天測得 TCE 濃度為 4.21 mg/L，於反應期間 TCE 趨於平衡曲線，亦表示 TCE 吸附平衡曲線中達氣相與液相間平衡狀態。自然降解組別於實驗反應期間 TCE 濃度呈現下降之趨勢，惟 35 天後降解效率趨於平緩曲線，其 TCE 殘留濃度維持在 3.0 mg/L 左右，TCE 降解效率約 45%。至於後期降解效率趨於平緩，推估原因為現地土壤中之營養源被微生物耗盡，造成微生物代謝速率降低之主因。過去研究指出，現地生物整治場址中，提供於地下水之基質 TOC 應大於 100 mg/L，方能確保微生物進行發酵產氫作用，並刺激微生物生長達到還原脫氯之效果，若是低於 20 mg/L，需再適度灌入營養基質，才能確保有足夠之電子提供(Dahan et al., 2017)。因此，本研究利用自然降解組別試驗結果可知，現地地下水中 TOC 略顯

不足，惟有添加足夠基質可有利於生物反應進行。

γ -PGA 組別(C)、 γ -PGA 緩衝液組別(D)，兩組實驗為瞭解以 γ -PGA 基質刺激微生物進行 TCE 厭氧還原脫氯可行性，因此實驗以微生態系統模擬添加 γ -PGA 基質對 TCE 的降解效率，作為評估加強式自然生物技術對污染物降解之情形以及對自然環境的影響。 γ -PGA 組別初始 TCE 濃度 5.243 mg/L，第 42 天內呈現一平穩下降至濃度為 0.26 mg/L，第 49 天 TCE 濃度為 0.04 mg/L，符合土污法管制標準 0.05 mg/L，未來應用於現地模場評估第 49 天達到類似成效。於第 84 天測得 TCE 濃度為 0.01 mg/L，其降解效率達到 99 %。 γ -PGA 組反應期間水質參數 ORP(-241~-83 mV)、DO(0.61~1.06 mg/L)、TOC 濃度的變化及甲烷的生成，顯示其出 γ -PGA 適合作為微生物生長之碳源並加強三氯乙烯之厭氧還原脫氯。故從 γ -PGA 之 pH 結果來看本身具有平衡地下水體之酸鹼值，能解決以往釋碳基質經微生物分解後會有酸化之問題，能使微生物不受到抑制。因此能讓 γ -PGA 在處理 TCE 污染地下水時達到最佳之降解效果。

緩衝液 γ -PGA 組(D)另外添加酸鹼緩衝溶液探討地下水體之酸鹼值，因此本組實驗以微生態系統模擬添加 γ -PGA 基質及緩衝物質對 TCE 的降解效率，作為評估加強式自然生物技術對污染物降解之情形以及對自然環境的影響。緩衝液 γ -PGA 初始 TCE 濃度 6.49 mg/L，之後呈現一緩慢下降之趨勢，在第 84 天後之 TCE 濃度為 0.06 mg/L，降解效率為 98%。 γ -PGA 組反應期間水質參數 ORP(-242~-81mV)、DO(0.6~1.75mg/L)、TOC 濃度的變化及甲烷的生成，顯示 γ -PGA 組與緩衝液 γ -PGA 組適合作為微生物生長之碳源並加強三氯乙烯之厭氧還原脫氯。實驗數據顯示緩衝液 γ -PGA 組降解效率較 γ -PGA 組稍低，推測 γ -PGA 具有與金屬結合之能力，本實驗所添加之緩衝液有 H_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，當這些物質與 γ -PGA 反應後， γ -PGA 會與緩衝液內之金屬物質結合，進而影響微生物利用以及 TCE 之降解效率。因由 pH 之結果亦顯示 γ -PGA 本身就具備有緩衝之能力，故 γ -PGA 處理 TCE 之地下水時不需添加緩衝物質平衡水體之 pH 值，即可達到最佳之降解效果。

緩衝液乳化油組(E)本組實驗為瞭解以乳化油基質是否可刺激微生物進行 TCE 厭氧還原脫氯，另外添加酸鹼緩衝溶液探討地下水體之酸鹼值。本組實驗以微生態系統模擬添加乳化油基質及緩衝物質，探討對 TCE 的降解效率，作為評估加強式自然生物技術對污染物降解效率之情形以及對自然環境的影響。E 組之 TCE 及其中間產物結果初始 TCE 濃度 4.13 mg/L，於反應第 7 天後濃度快速下降至 1.11 mg/L，推測降低可能原因為 TCE 具有與油脂較高親和性，當乳化型基質注入地下水中可有效快速攔阻 TCE 包附於油滴顆粒中，形成水相與油相間之相

轉移作用，此時微生物可利用碳源後迅速增長，而提高污染物降解效率，造成前期濃度快速下降。反應第 14 天時濃度有回升之現象，推測原因為基質被微生物分解過程中造成油相間 TCE 釋出，而微生物無法快速降解 TCE 而有累積之現象。然而，反應第 28 天後 TCE 濃度呈現平穩下降之趨勢，顯示微生物開始進行還原脫氯降解 TCE，反應第 84 天之 TCE 濃度為 0.69 mg/L，降解效率為 83 %。緩衝液乳化油組水質參數 ORP(-265 ~ -73 mV)、DO(1.05~2.01 mg/L)、TOC 濃度的變化及甲烷的生成，數據顯示乳化油可作為微生物生長之碳源並加強三氯乙烯之厭氧還原脫氯。但乳化油經微生物分解後會釋出有機酸，造成 pH 值下降，進而影響微生物生長及降解物染物之效率，故過去研究中以添加物質緩衝地下水體避免酸化，但是當緩衝物質消耗殆盡時將造成水質酸化之問題。

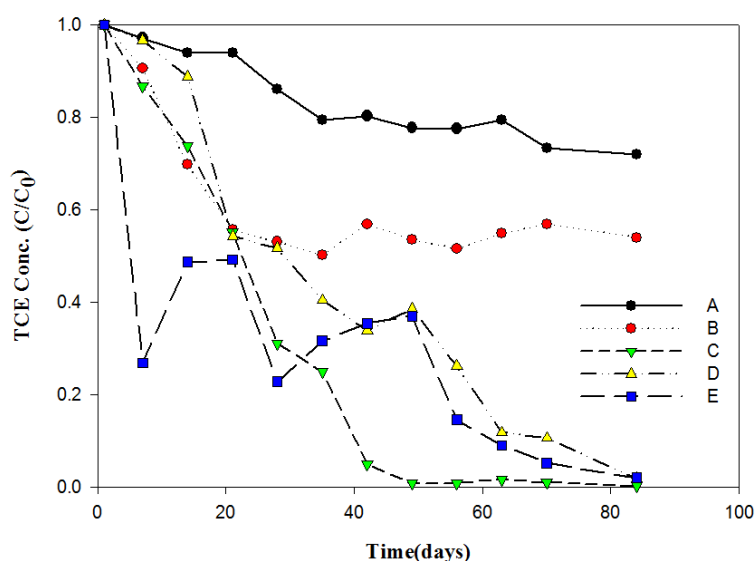


圖 4.13 各組別降解 TCE 濃度變化趨勢

4.2.3 各組別降解效率比較

本批次試驗藉由添加不同的基質對 TCE 的還原脫氯之情形，比較整體降解效率之情形，其結果如表 4.1 所列。各組別在第 84 天之降解效率為 γ -PGA 組 (99%) > γ -PGA 緩衝液組 (98%) > 乳化油緩衝液組 (83%)。以 γ -PGA 組有最佳降解效果，可維持一穩定且快速之降解效率，在 84 天的試驗中 γ -PGA 組 TCE 殘餘濃度為 0.012 mg/L，符合管制標準 0.05 mg/L。乳化油緩衝液組之成分中，大豆油對 TCE 有較強富集性，具有物理吸附特性使 TCE 被乳化油包覆住，造成反應第 7 天濃度有顯著下降之情形，後續乳化油滴經微生物利用部分 TCE 慢慢釋出，造成 TCE 濃度有回升之現象。然而，微生物利用使 TCE 濃度呈現平穩下降之趨勢，但後期因乳化油持續釋出有機酸，造成環境酸化而使微生物受到抑制，導致影響對 TCE 還原脫氯之效益。

γ -PGA 組不具備像乳化油一樣能包覆住污染物之能力，但相較於乳化油可以提供較高之 TOC，可長期下來提供大量之碳源供微生物利用，故反應第 84 天之 TCE 濃度為 0.01 mg/L，已符合法規標準。 γ -PGA 在反應第 84 天之 pH 值為 7.32，並沒有造成水質酸化之問題產生，且 TOC 殘餘量還有 646 mg/L。顯示 γ -PGA 與其他基質比較，於處理 TCE 污染物時具備以下優勢：(1) 整治時程短，不須大量之灌注量即可達到法規標準；(2) γ -PGA 本身具備有緩衝地下水酸鹼值之能力，可以解決以往釋碳基質經微生物利用後產生逐漸酸化之情形發生。另， γ -PGA 緩衝液組之降解效率較 γ -PGA 組差，推測原因為 γ -PGA 具有與金屬離子結合之特性， γ -PGA 與緩衝液的物質反應後，會造成 γ -PGA 在處理 TCE 上產生干擾亦間接影響 γ -PGA 對 TCE 之還原脫氯效率，由於 γ -PGA 本身就具備緩衝地下水體之能力，故 γ -PGA 在現地應用時不需添加任何之緩衝物質，即可達到最佳之降解效率。

從各組別之中間產物結果如圖 4.14 所示，三氯乙烯經微生物行脫氯之作用會有副產物如 c-DCE、t-DCE、1,1-DCE 和 VC 等之生成及累積，其中各組別之 cDCE 及 tDCE 在中期有明顯之生成，但均在第 84 後低於法規標準，顯示微生物在厭氧情形下還原脫氯 TCE，未有副產物之累積而造成毒性問題。

表 4.1 各組別之結果比較表

天數	項目	控制組	自然界解	γ -PGA	緩衝液 γ -PGA	緩衝液 乳化油
第 1 天	TCE (mg/L)	4.55	5.39	5.24	6.49	4.12
	TOC (mg/L)	8.35	2.62	1978	1793	841
	pH	7.35	6.01	7.25	7.40	7.42
第 8 天	TCE (mg/L)	2.63	3.01	0.01	0.12	0.69
	TOC (mg/L)	8.32	0.94	646	945	492
	pH	7.85	6.51	7.32	7.03	5.95
TCE 降解效率		42%	46%	99%	98%	83%
TOC 消耗率		0.3%	64%	67%	47%	42%

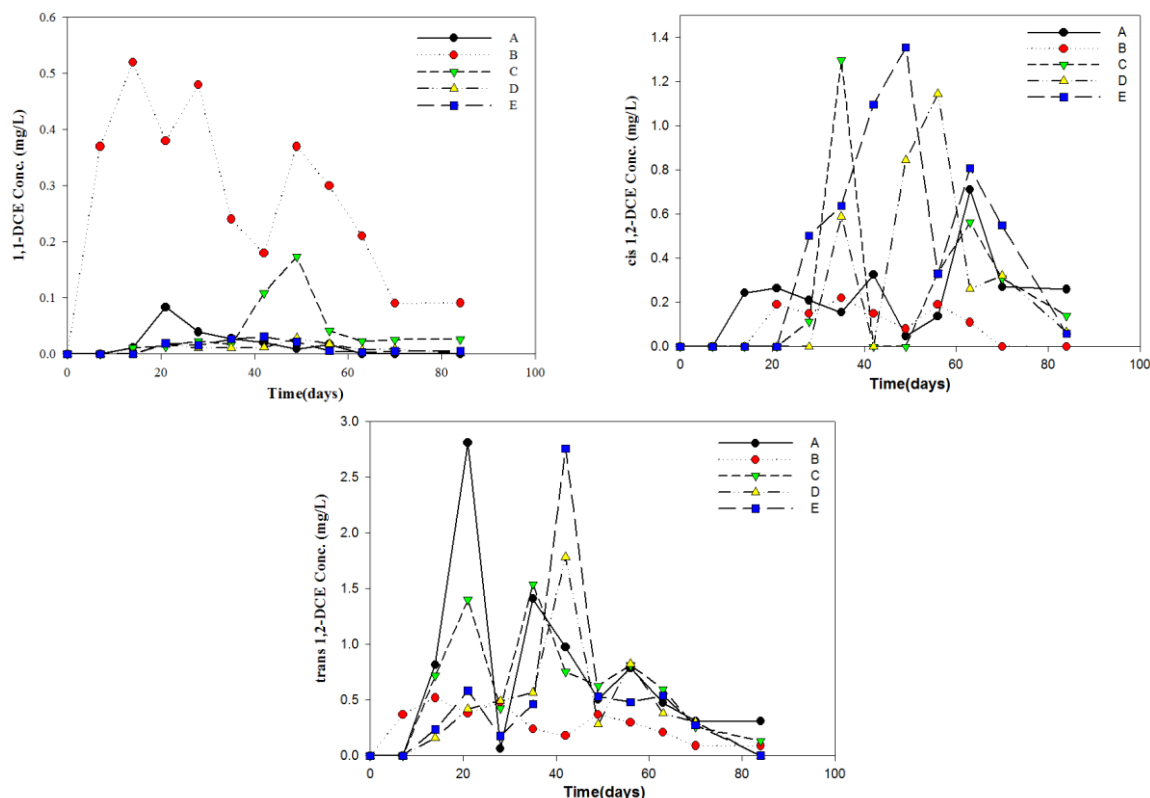


圖 4.14 各組別副產物趨勢圖

4.2.4 批次試驗菌相分析

自然生物處理係指利用土壤中的微生物將污染物分解去除，同時亦達到降低污染物對環境及人類健康危害之目的。在現地土壤中含有眾多的微生物族群，其大多數菌數約 $10^3 \sim 10^7$ cells/g。因此，本實驗為了瞭解微生態系統(microcosm)模擬現地環境微生物種類、特性及批次試驗整體菌相之變化趨勢，批次試驗中各組分別以前、中、後三個時期進行微生物菌相分析，利用 PCR 技術放大 16S rDNA 的 V6-V8 片段，將 PCR 之產物搭配 q-PCR 技術觀察各批次瓶中微生物之菌量變化，及搭配 DGGE 技術菌相變化。可進一步瞭解添加基質來刺激與馴化現地微生物生長情形，且伴隨著時間與污染物降解過程中，觀察菌群物種間稍長變化之情形，利於微生物還原脫氯降解污染物之成效之依據。

(1) DGGE 菌相分析

批次組別之菌相變化如圖 4.15 所示，Lane 1 為現地土壤(控制組)及地下水之菌相，Lane 2、5 分別為 γ -PGA 組之第 1 天及第 84 天之菌相，Lane 3、5 分別為 γ -PGA 緩衝液組之第 1 天及第 84 天之菌相，Lane 4、7 分別為乳化油緩衝液組之第 1 天及第 84 天之菌相，Lane 8、9 分別為自然降解組之第 1 天及第 84 天之菌相。綠色 bar 為背景初始菌種，紅色 bar 為與背景相同之菌種，黃色 bar 為與背景不同之菌種，由此標記可瞭解不同亮帶區間位置之菌相表現與菌群活躍性。由於

環境微生物的存在並不表示生物分解能有效地完全將污染物降解之特性，在受污染之地下水環境中已被發現涉及到生物還原脫氯作用有幾個重要之因素：(1)產氫菌種的存在與活動條件；(2)在場址內脫氯菌種存在條件；(3)觀察提供足夠的電子接受者使脫氯、硫酸鹽還原和甲烷菌所需的營養來維持活性(4)其他因素如土壤的酸鹼度及溫度、營養鹽濃度、污染物特性、土壤結構、特性、土壤有機質含量(soil organic content)、電子接受者的多寡及利用性(bioavailability)均影響污染物自然生物分解之反應速率及可行性。

由 DGGE 圖譜結果得知結果可發現 Lane 1 之菌相豐富度不高，推測現地 TCE 毒性高，且無添加任何碳源供微生物生長，影響微生物之生存。Lane 8、9 自然降解組部分，第 0 天至第 84 天的菌相豐富度皆無太大變化差異，可能原因為現地地下水初始為氧化態環境，此環境存在部分的好氧菌與兼氧菌共生，在反應期間微生物可利用土壤與地下水碳源並將環境轉為還原型態，使得厭氧脫氯菌群無法生存，顯示現地唯有利用土壤及地下水中少量之碳源供微生物生長為主要限制因子，因此 TCE 之降解效率較差。Lane 3、5 經添加 γ -PGA 為微生物生長之基質，其菌相前後有增加之趨勢，顯示 γ -PGA 可促進微生物生長；Lane 4、6 添加 γ -PGA 及緩衝物質雖影響 TCE 降解效率，但是菌相前後也是有增加之趨勢；Lane 5、7 為添加乳化油緩衝液組，經比較後其菌相前後有增加之趨勢。

基質 γ -PGA 組菌相在初始第 0 天和 30 天變化情形與緩衝液乳化油組大致相同，但是當添加緩衝溶液能有效控制 pH 值在中性條件適合微生物之生長環境，使得此組別之菌相在反應第 84 天之整體菌群豐富程度有增加趨勢，因此，後續可藉由定序比對結果來佐證具有降解 TCE 之菌群相關性。緩衝液乳化油組別中，因額外提供碳源刺激微生物生長，初始第 0 天之菌相和第 30 天菌相相比，菌群有明顯增加之趨勢但反應後期觀察菌相有減少趨勢，可能原因為乳化油滴分解過程中會造成部分尚未被降解之 TCE 有釋出之現象。經由實驗結果顯示，於第 84 天各基質組方面進行探討，發現乳化油緩衝液組之菌相最為豐富，推測乳化油之成分為大豆油、界面活性劑(Simple Green)、卵磷脂、去離子水、綜合維他命及維生素 B 群經由乳化成基質，其分子結構較有利於微生物利用，因此其菌相最為豐富。 γ -PGA 為合成之高分子聚合物，其分子結構複雜，故菌相沒有較乳化油豐富。但是經由還原脫氯之相關菌屬之分析結果表示 *Dehalococcoides* 菌屬前後增加效果最為顯著，表示 γ -PGA 適合還原脫氯之相關菌群生長，進一步降解 TCE 污染物。

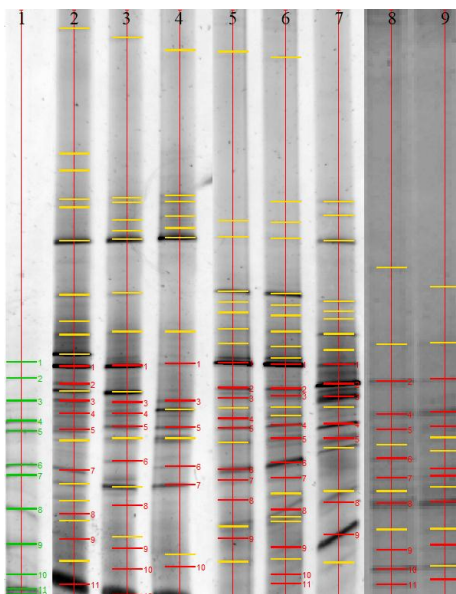


圖 4.15 批次實驗各組別之 DGGE 菌相圖。

(2) q-PCR 定量分析

本研究利用 q-PCR 定量技術不僅可瞭解指標性菌株稍長，且若能於污染物降解途徑場址中鑑定出具有降解之脫氯菌之種類及數量等，有助於提升生物整治成效，提供未來應用於受含氯有機污染之場址進行生物復育之參考依據。本研究於批次生物整治期間偵測不同反應天數之降解組別，分別為 γ -PGA 組、緩溶液 γ -PGA 組及緩溶液乳化油組，採樣天數為第 0、40 及 84 天進行 *DHC* 之 16S rDNA 定量分析，可進一步瞭解厭氧還原脫氯過程中針對 *DHC* 菌屬稍長變化之情形。此外，相關研究亦證實 *DHC* 在含氯有機污染場址中為最常見之代表性菌株，目前僅有 *DHC* 菌屬能夠完全將污染物降解至乙烯(Xiu et al., 2010; Hunkeler et al., 2011; Schaefer et al., 2017)，

批次實驗組別以 q-PCR 了瞭解實驗各組別之還原脫氯菌群之生長情形。*DHC* 之菌量結果如圖 4.16 所示，各組別之初期之菌量在約 10^4 gene copies/g，於第 84 天菌量 γ -PGA 與 γ -PGA 緩衝液組均大於 10^5 ，其中以 γ -PGA 的菌量為最多為 1.5×10^6 gene copies/g，且結果亦顯示出具有最佳之 TCE 降解效果，表示 γ -PGA 適合 *DHC* 之菌群利用及生長，進而降解污染物，而乳化油在的 84 天後之菌量為 9.4×10^4 gene copies/g，與前期比較生長效果並無不顯著。而這些菌群環境酸鹼較為敏感，當環境中 pH 值產生明顯的變化會降低還原脫氯效率(Findlay et al., 2011)，因此維持環境中 pH 值中性可以達到最大之還原脫氯效果(Kouznetsova et al., 2010)。由批次實驗之結果顯示，乳化油緩衝液組之在反應過程中 pH 持續下降，可能影響其生長及還原脫氯之效率，而 γ -PGA 與 γ -PGA 緩衝液組在第 84 天後之 pH 值

為 7.32 及 7.03，整個過程呈現良好之中性環境，故適合還原脫氯之菌群生長，對污染物之降解亦具有最佳之降解效果。

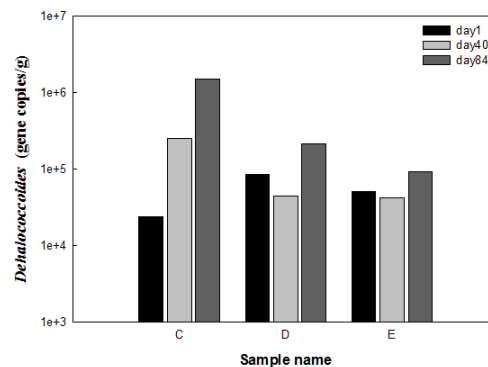


圖 4.16 批次實驗各組別 *DHC* 菌屬之變化

由三種還原脫氯酶基因 *tceA*、*vcrA* 之分析結果如圖 4.17，初期各組別之基因量均維持在 10³ gene copies/g，在後期各組別之基因數量並未有增加之趨勢，因具有 *tceA* 基因能將三氯乙烯代謝成氯乙烯的能力(Xiu et al., 2010; Dolinová et al., 2017)。從污染物分析結果中也推測現地環境中因 *tceA* 之存在量較少，而影響副產物氯乙烯之生成。*vcrA* 還原脫氯酶基因結果顯示初期各組別之基因量為 10³ gene copies/g 左右，且在後期各組別之基因數量也並未有明顯增加之趨勢。因具有 *vcrA* 基因能將三氯乙烯代謝成乙烯的能力(Lee et al., 2013)，故從污染物分析結果中也並未有乙烯之生成之結果顯示可能之原因為各組別之 *vcrA* 存在量較少之緣故。*bvcA* 結果顯示各組別 *bvcA* 基因含量極少甚至是未檢出，至第 84 天後各組別之 *bvcA* 基因含量也未有明顯之增加，由於 *bvcA* 能將氯乙烯轉換成乙烯的能力。故從污染物分析結果顯示未有乙烯之生成之結果顯示可能之原因為各組別之 *bvcA* 存在量較少之緣故。

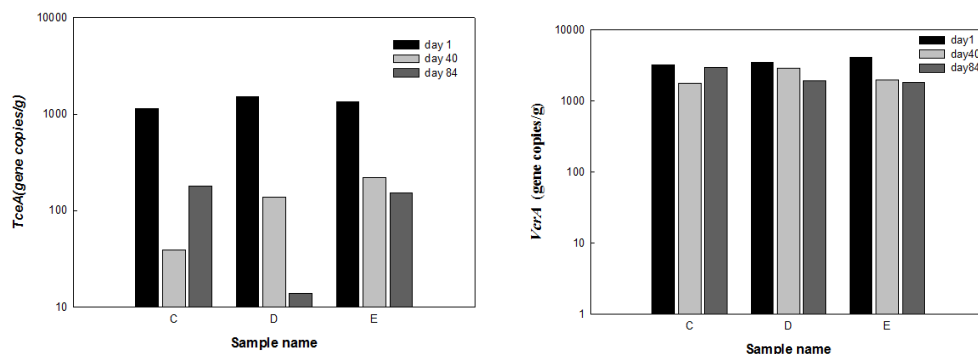


圖 4.17 批次實驗各組別 *tceA*(左)與 *vcrA*(右)還原脫氯酶之變化區試圖

4.3 管柱試驗

本研究結合微生物批次試驗之結果，設計 γ -PGA 藥劑之生物透水性反應牆管柱模擬試驗，模擬當現地地下水受 TCE 污染時之整治情形，其管柱試驗供試土壤取某 TCE 污染場址中未受污染之背景現地含水層土壤及地下水。每一管柱尺寸為直徑 5 cm、長度 30 cm，體積為 590 mL。設定每根管柱平均流量為 0.90 mL/min，平均之孔隙體積為 178 mL，平均停留時間為 3.29 小時，管柱之總停留時間為 9.87 小時。管柱 1 為模擬上游之背景地下水，管柱 2 則模擬生物透水性整治牆，管柱 3 為模擬整治牆下游，將 TCE 溶液並填充於水袋內，TCE 濃度約為 1.5 mg/L，管柱 1~3 內填充現地土壤模擬現地情況，再將人工配製水樣經蠕動幫浦送至管柱中。當人工配製水樣流經管柱 1 時先將管柱 1 出流水 TCE 濃度約 1 mg/L，在於管柱 2 注入基質同時管柱 1 出流水流入管柱 2，其管柱 2 出流水流向管柱 3 進行微生物反應區。實驗進行前先取取 200 g 厭氧污泥及 3 L 現地地下水(以 80/20(v/v)氮氣及二氧化碳混合氣吹提使 $DO < 0.05$ mg/L)於血清瓶中，並加入 5 g 乳酸鈉增進微生物生長，以 2 mL/min 流速於管柱 2 中循環 10 天，之後加入以 γ -PGA 基質注入，管柱 2 注入 1000 mL γ -PGA 基質，並連接出口端及入口端，以密閉循環方式進行生物整治牆建立。循環 5 天後關閉蠕動幫浦，使管柱內之基質於充分吸附於土壤顆粒，待管柱 1 之 TCE 濃度於達到預估貫穿時間時開始試驗，管柱實驗試驗期間定時採樣分析，其分析項目於研究方法已詳細說明。

4.3.1 管柱試驗水質參數

effluent 1 為管柱 1 出流端；effluent 2 為管柱 2 出流端及 effluent 3 為管柱 3 出流端，各出流端水質變化如圖 4.18 所示。effluent 1 管柱初始 pH 值為 8.9，反應第 5 至 140 天 pH 值介於 7~8.5，地下水 pH 值皆維持弱鹼性環境(pH 值 >7)，並無明顯變化。effluent 2 管柱為加強式生物復育法，添加 γ -PGA 基質與控制下，初始 pH 值為 7.8，反應第 5 天 pH 值為 7.5，pH 值降低原因 γ -PGA 基質 pH 值為 6.0~6.5 導致 pH 值下降。然而，第 14 至 140 天 pH 值於反應期間皆可維持中性環境(pH 值=6.8~7.3)，其導致 pH 值上升再下降可能原因 γ -PGA 能使 pH 增加後並控制 pH 應是其結構上有 NH_2 胺基之官能基，解離後和水反應形成氨 NH_3 是鹼性物質，後續會監測氨氮濃度確定是否有增加之趨勢，以佐證上述之推測原因。當基質通過 effluent 3 管柱出流端初始 pH 值為 6.9 環境而有利於脫氯菌群生長與降解污染物之功能。此外，於反應至 140 天 pH 值維持中性環境(pH 值=6.5~7.5)，此結果顯示污染物降解過程中不因基質快速被微生物分解產生有機酸(organic acid)之影響，而導致水質 pH 酸化程度之影響，數據顯示抑制微生物生長的情況並未發生。

由 DO 監測結果，effluent 1 管柱初始 DO 值為 3.4 mg/L 為有氧狀態，反應第 5 至 140 天 DO 介於 3.4~3.7 mg/L，由現地微生物生長及消耗溶氧平衡天數約 15 天，反應至 30 天測得 DO 無明顯變化情形，推測原因為提供現地原有之營養鹽含量不足而限制微生物生長之因子。因此，effluent 2 管柱為添加基質來刺激現地微生物生長，當微生物分解基質過程中會大量消耗地下水中溶氧情況下，於 effluent 2 與 3 管柱出流端監測第 140 天 DO 皆值低於 0.5 mg/L，且 ORP 值介於-163 至-196 mV 為厭氧還原態反應，此結果亦表示當高氯數含氯有機物降解至低氯數或完全脫氯過程中，維持低氧化還原電位是非常重要之因素，若採用加強式生物降解法，藉由添加促進微生物生長之基質亦可幫助營造合適之還原環境，有利於加速微生物之共代謝降解 TCE。此結果於研究中可證實添加基質皆能夠加速現地加強式生物整治，迅速消耗水中氧氣，亦能夠有效持續提供微生物代謝及生長所需之營養鹽。此外，本試驗使用 γ -PGA 基質含有緩衝溶液效果無需添加緩衝溶液即可有效控制 pH 值酸化程度之影響。

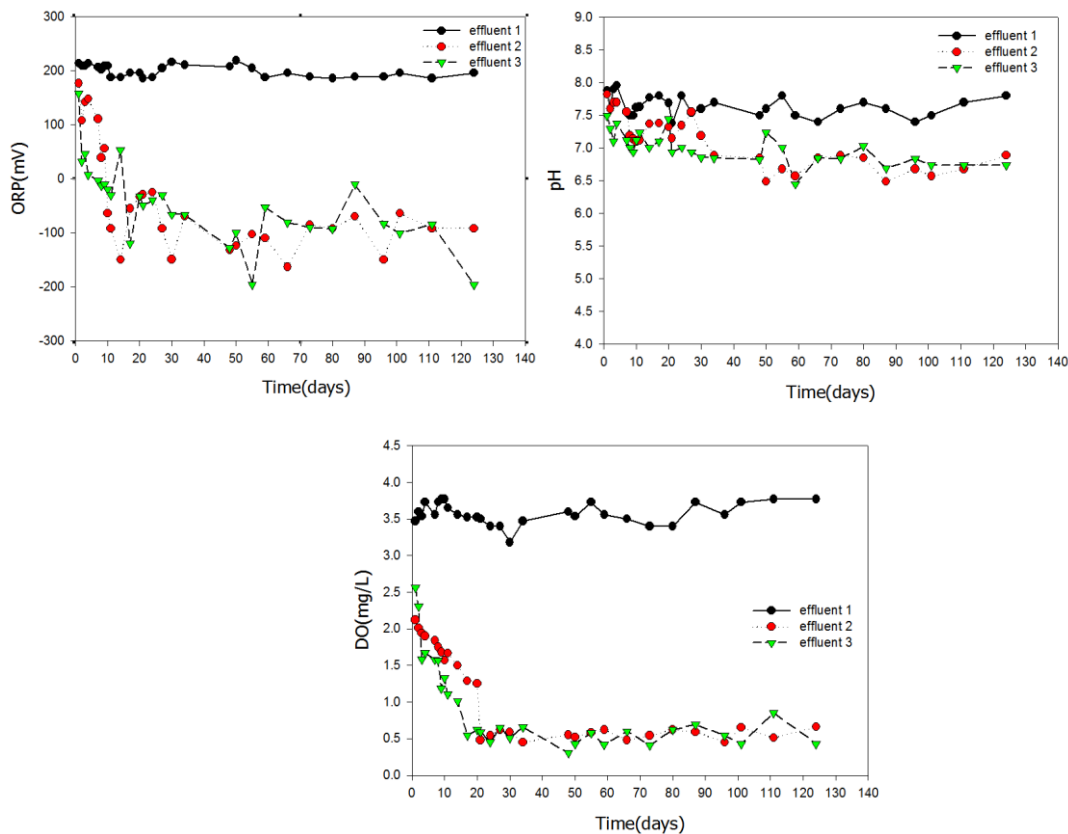


圖 4.18 不同管柱出流端之水質參數變化之情形

4.3.2 三氯乙烯與副產物降解趨勢

由於批次試驗數據顯示， γ -PGA 基質未添加緩衝溶液反應期間亦未造成酸化現象，因此，本研究於 effluent 2 管柱中注入 γ -PGA 基質未添加緩衝溶液，管柱試驗評估達到批次試驗類似成效。本研究設置 effluent 1 是 TCE 達貫穿後才開始進行生物透水性整治強建立，由圖 4.19(a)結果可知，TCE 初始濃度為 1.55 mg/L，反應第 14 天測得 TCE 濃度為 1.301 mg/L，反應期間 TCE 趨於平衡曲線，亦表示 TCE 吸附平衡曲線中達平衡狀態，因此，反應後期 TCE 濃度呈現下降之趨勢 (1.31~1.67 mg/L)，其 TCE 殘留濃度維持在 1.45 mg/L 左右，TCE 降解效率約 13%，後期降解效率趨於平緩，推估可能原因為現地土壤中之營養源被微生物耗盡，造成微生物代謝速率降低之主因。另一方面，由 TCE 濃度降低及副產物結果顯示，TCE 在降解過程中於反應第 24 天監測到副產物 DCE 累積，其降解產物以 *cis*-1,2-DCE 為主要產物 (0.002 mg/L)，反應期間皆未超過地下水 (第二類) 管制標準 (<0.7 mg/L)，於反應期間並未偵測到 VC 副產物累積。由上述結果顯示，自然降解組於初期可有效共代謝降解 TCE，微生物進行好氧共代謝反應時須提供額外的碳源，當微生物分解碳源時，其產生的還原酶亦可以分解 TCE，達到生物處理之目的，由實驗結果可推測，土壤中有機質可提供一緩慢釋放之碳源並提供微生物產生能量刺激現地微生物生長，其實驗結果與文獻相符 (Maier et al., 2009)。由 effluent 1 自然降解組中顯示，TCE 降解及 *c*-DCE、*t*-DCE 生成與降解發生，證實 TCE 於環境中生物自然衰減作用之發生與生物復育法之可行。然而，自然生物降解需較長整治時程，且當現地發現高濃度之受 TCE 污染水體時，如要達到法規所訂定之標準，更增加其整治時程及困難度，若現地欲採用自然處理法，建議可採用加強式生物降解法，以添加共代謝物質與促進微生物生長之基質，增加微生物共代謝降解 TCE 之優勢，以獲得良好整治效果，提升生物整治工程之效益。

由 effluent 2 管柱降解 TCE 及副產物監測結果如圖 4.19(b)，污染物由 effluent 1 流經 effluent 2 生物透水性反應牆後，effluent 2 管柱出流端於第 30 天監測到 TCE 濃度生成 (0.123 mg/L)，根據批次試驗結果顯示， γ -PGA 基質需要 30 天後才有明顯效果，管柱試驗於第 34 天後 TCE 濃度降為 0.013 mg/L，顯示 γ -PGA 基質確實可有效刺激微生物生長及加速共代謝反應降解 TCE 與副產物，其反應期間皆測得 *c*-DCE、*t*-DCE 及 1,1-DCE 等副產物，但副產物未累積現象之發生，此結果可證實生物反應持續進行，反應後期副產物濃度監測結果皆低於法規管制標準值，亦表示副產物濃度於後期並無累積之現象發生。由此結果可知，反應後期分別測得第 112 天 *c*-DCE 為 0.04 mg/L 及 *t*-DCE 為 0.06 mg/L，皆未超過地下水 (第二類) 管制標準值 (<0.7 mg/L)，證實添加基質有效提升含氯生物降解之潛勢。值得關注的是 effluent 2 管柱中自 TCE 降解反應發生後，皆未造成 VC 濃度的累積現

象，且均符合現行地下水第二類管制標準值(<0.02 mg/L)。因此藉由 γ -PGA 釋碳基質，可當作長時間碳源及電子提供者，增加溶解性含氯乙烯的生物降解，提升厭氧環境下生物降解能力。

由 effluent 3 管柱降解 TCE 及副產物監測結果如圖 4.19(c)，污染物由 effluent 2 流經 effluent 3 微生物反應區後，effluent 3 管柱出流端所測得 TCE 濃度皆未超過管制值(TCE <0.05 mg/L)，但於反應過程中觀察其副產物以 t-DCE 為主，在監測第 100 天 t-DCE 最高濃度為 0.024 mg/L，於實驗第 105 天後穩定下降，c-DCE 於第 100 天測得 0.022 mg/L，而 t-DCE 於第 124 天測得 0.04 mg/L，實驗第 124 天總 DCE 濃度皆以低於偵測極限且未造成副產物累積之現象。由上述結果可證實 γ -PGA 基質所形成生物透水性反應牆，有顯著效果。

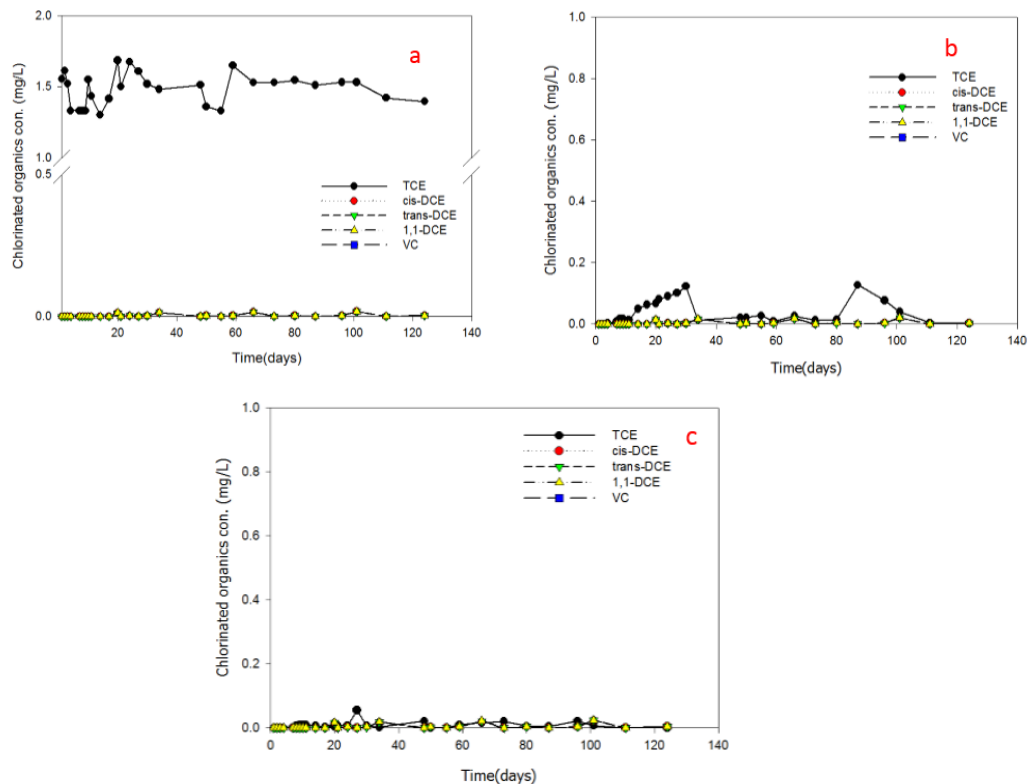


圖 4.19 不同管柱出流端之污染物變化之情形

4.3.3 管柱試驗化學參數變化之影響

過去研究中厭氧性的程序是使用不同的生物降解機制，包括利用硝酸鹽(denitrification)、鐵還原(iron reduction)、硫酸鹽還原(sulfate reduction)及二氧化碳(carbon dioxide)當作最終電子接受者。厭氧性的生物降解作用主要發生在污染團內部(Lee et al., 2015)。根據現地微生物之競爭及環境狀況，將決定何種厭氧性生物降解作用是最主要的機制。在一般典型的地下水缺乏溶氧，所以脫硝反應會先發生，接著進行鐵還原作用、硫酸鹽還原作用及最終的甲烷化作用，當地下水中存在硫酸根離子經由厭氧發酵作用，其最終產物多為硫化氫氣體。因此，相關文獻指出以奈米鐵作為處理養豬廢水中去除硫化氫(楊氏，2011)，因此，硫酸鹽還原作用為厭氧代謝呼吸作用之指標參數。本研究針對管柱不同出流端分別進行總鐵(total iron)/亞鐵(ferrous iron)及硫酸鹽(sulfate)/硫化物(sulfide)監測，觀察反應期間各監測項目濃度變化，推測地下水之氧化還原狀態且評估現地生物整治效益之可行性。

在環境中的溶解態二價鐵(Fe^{2+})來源為主，其受到異化性鐵還原菌(dissimilatory iron-reducing bacteria)代謝生成居多(Lovley, 2013)。然而，異化性金屬還原(dissimilatory metal reduction)是指微生物利用金屬氧化物作為呼吸作用之最終電子受體，於厭氧還原過程中扮演著主要角色，異化性鐵還原菌降解有機物及重金屬污染整治皆有許多研究和應用前景。由總鐵監測結果如圖 4.20 可知，effluent 1 出流端管柱初始第 0 天濃度為 0.44 mg/L，反應期間濃度介於 0.5~4.5 mg/L，在氧化狀態含水層中(pH=7)，鐵溶於水中形成鐵離子，主要為二價鐵(亞鐵)及三價鐵兩種不同離子型態存在，當 pH 值為中性且 ORP 大於零條件下形成氫氧化鐵沉澱物。在地下水中鐵濃度很低通常低於 0.3 mg/L，主要原因為鐵在土壤及礦物中主要以不溶性的氧化鐵及硫化鐵形式存在，有時亦會以微溶性的碳酸亞鐵形式出現，其溶解度極低(Lovley, 2013)。當添加基質於 effluent 2 出流端監測結果顯示，初始第 0 天濃度為 1.7 mg/L，與 effluent 1 管柱相較下總鐵濃度明顯增加，主要可能原因為基質在厭氧還原脫氯過程所產生中間產物(如有機酸、脂肪酸等)，使得地下水中 pH 值降低，間接吸附於土壤中顆粒鐵被釋出於地水體中，而造成水中總鐵濃度上升，其反應期間總鐵濃度介於 2.4~28.5 mg/L，於 effluent 3 管柱出流端第 105 天監測總鐵濃度為最高 69.1 mg/L。經由上述結果證實添加基質能有效刺激現地微生物生長，當厭氧條件下，鐵還原菌能將三價鐵還原成亞鐵離子，並持續供給電子來代謝污染物。因此，反應後期於 effluent 3 管柱出流端監測總鐵濃度降低至 0.8 mg/L。由亞鐵監測結果 effluent 1 管柱出流端第 0 天濃度為 0.05 mg/L，反應第 5 至 140 天濃度介於 0.05~0.4 mg/L，並無明顯變化趨勢。當地下水為厭氧還原態狀態微生物可還原成亞鐵離子，而造成地下水中亞鐵濃度上升。於

effluent 2 反應第 35 天監測為 13.2 mg/L 與 effluent 3 管柱結果皆有相同趨勢。過去相關研究指出模擬鐵還原菌利用鐵礦生長後，以碳酸鹽為主要緩衝系統的環境中所形成的二價鐵礦物菱鐵礦(siderite)。由上述結果可證實本試驗使用 γ -PGA 基質確實可將藥劑有效傳輸至下游生物反應區(effluent 3)，主要提供電子轉換與刺激微生物大量生長外，同時達到還原脫氯降解污染物之目的。

過去研究硫酸鹽還原對含氯有機污染物轉換扮演重要之角色關鍵，當還原脫氯反應不足且反應活性較硫酸鹽還原反應低情況下可能產生(1)硫還原菌之電子供應者供給受到競爭；(2)硫酸鹽還原酵素抑制影響還原脫氯反應；(3)優先使用硫酸鹽為電子供應者，相關微生物群(如 *Desulfitobacterium* spp.)取代還原脫氯反應或(4)在富硫酸鹽環境下，硫還原菌反應數量及反應動力較還原脫氯反應快。由硫酸鹽監測結果，effluent 1 第 0 天濃度為 1.3 mg/L，反應期間濃度介於 1.3~17.5 mg/L，反應期間硫酸鹽濃度明顯增加，可能原因為硫化物主要存在於好氧及厭氧環境中，當有機硫化物於好氧環境下受到微生物分解作用而轉變為硫酸鹽並釋出於地下水中，而造成反應期間地下水硫酸鹽濃度上升情形。當添加基質於 effluent 2 監測結果顯示，第 0 天濃度為 77.1 mg/L，反應期間濃度介於 77.1~410.1 mg/L，而當硫酸鹽存在於厭氧環境中，則會因 SRB 利用，使硫酸鹽產生還原作用轉化為 H_2S 使氧化還原電位下降， H_2S 的毒性可殺死周圍環境中大多數微生物。它的揮發會使環境的 pH 升高，部分重金屬離子可與 H_2S 結合生成硫化物，例如 H_2S 與鐵結合生成黑色的硫化鐵，由於 pH 上升使硫化物沈澱，可利於判斷出它的存在，並以固定化生質去除，因此這些參數可作為 SRB 於環境生長的監測指標(Macías-Díaz et al., 2014)。於 effluent 3 管柱出流端第 85 天監測硫酸鹽濃度為最高 436.3 mg/L，而反應後期硫酸鹽持續被微生物利用消滅趨勢。而 SRB 屬於異營菌有利於硫酸鹽或者其他氧化態硫化物作為電子受體來異化有機物質的絕對厭氧菌，能將硫酸鹽還原為硫化氫(H_2S)、氫硫根離子(HS^-)及硫離子(S^{2-})，其毒性依序為 $H_2S > HS^- > S^{2-}$ ，當水中的 pH 值增加時，硫化氫的毒性會降低，因為未解離的強毒性 H_2S 變成毒性較低的 HS^- 型態。本研究硫化物濃度監測結果管柱試驗微生物未受到抑制生長影響，由文獻指出硫化物濃度高於 50 mg/L 可能會抑制甲烷化作用(Chen et al., 2008)。effluent 1 管柱出流端初始第 0 天濃度為 38 $\mu g/L$ ，反應期間濃度介於 30~60 $\mu g/L$ ，反應期間硫化物濃度較無明顯變化。而當添加基質於 effluent 2 出流端管柱監測硫化物結果顯示，初始第 0 天濃度為 77 $\mu g/L$ ，反應第 17~170 天濃度為 130.1~250.5 $\mu g/L$ ，與 effluent 1 管柱相較下硫化物濃度明顯增加，主要原因添加基質可有效提供硫酸鹽還原菌還原及生長，反應後期當土壤中含金屬鐵離子釋出與硫化氫作用反應下，易生成硫化鐵(Fe_2S_3)沉澱於於地下水體。硫化物在不同 pH 環境下所生成之產物亦不相同，當 $pH > 7$ ，以 HS^- 及 S^{2-} 為主要產物；

pH<7，以 H_2S 為主要產物，由此結果顯示，添加緩衝溶液於反應期間有效控制 pH 值維持中性環境條件下，可有效控制硫化氫所產生之臭味問題，增加環境友善性。

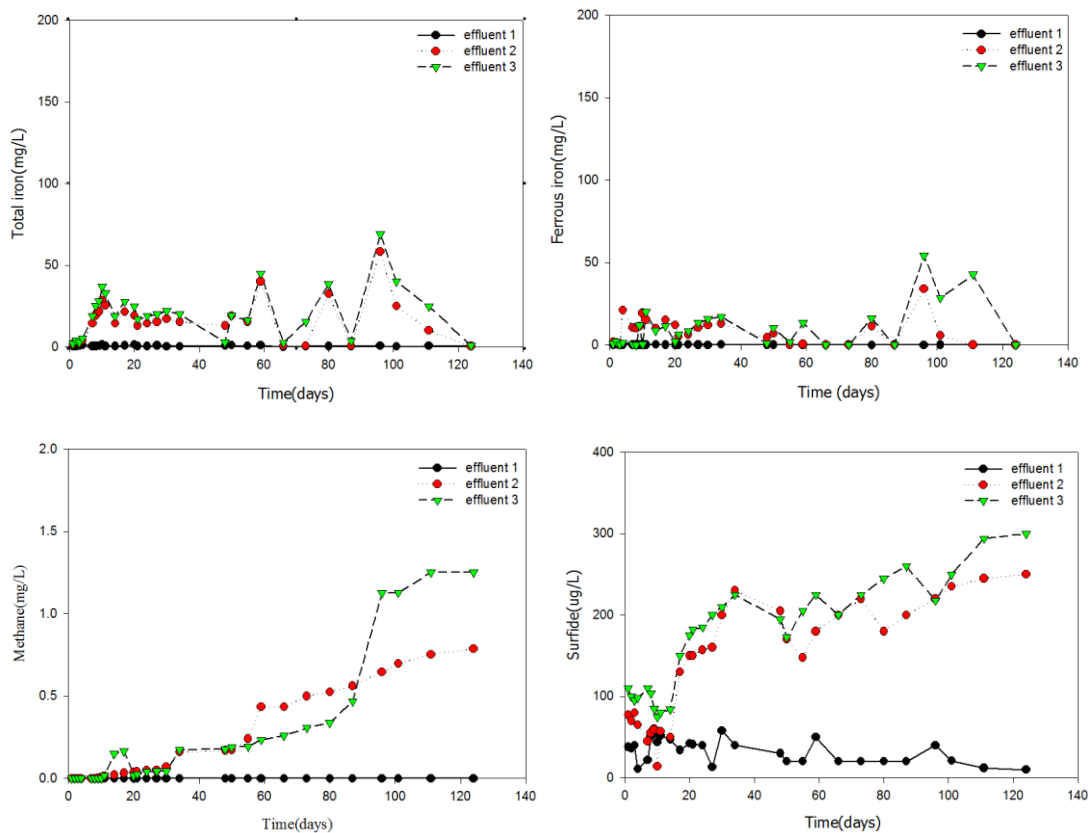


圖 4.20 不同管柱出流端之化學參數變化之情形

4.3.4 管柱試驗成果

本研究結合微生物批次試驗之結果，設計添加 γ -PGA 基質之生物透水性反應牆管柱模擬試驗，並模擬當現地地下水遭 TCE 污染時之整治情形如圖 3.4 所示，水質監測方面，藉由 TOC 濃度變化可知微生物利用不同生物基質分解之情形，由圖 4.21 結果顯示，effluent 1 管柱出流端初始第 0 天濃度為 84.1 mg/L，推測初始地下水中 TOC 濃度較高的可能原因為土壤含水層含微量元素與有機質釋出，在反應初期微生物可利用此碳源作為生長與馴化生物活性條件，來提升生物生理機能與生化代謝污染物之能力。於反應 5 天後由於土壤有機質營養源被微生物耗盡 $\text{TOC} < 50 \text{ mg/L}$ ，進而抑制微生物族群代謝 TCE 的活性，總生菌維持在 $1.48 \times 10^4 \text{ CFU/mL}$ 。effluent 2 初始 TOC 濃度為 125.1 mg/L，總生菌為 $1.86 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ 基質持續灌注，使得反應第 5 天 TOC 濃度為 2275.1 mg/L，反應後期微生物持續利用營養基質並維持穩定下降趨勢，總生菌為 $1.23 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 。反應期間 $\text{TOC} < 50 \text{ mg/L}$ 進行灌注基質，在反應第 27 天 TOC 濃度為最低 50.1 mg/L，TOC 消耗

率為 97%。此時，監測污染物 TCE 有回升現象發生，由相關研究指出，於現地生物整治場址中，基質提供地下水之 TOC 濃度要高於 100 mg/L，才能確保產氫微生物進行發酵產氫作用，進而刺激脫氯菌之還原脫氯反應；若是低於 20 mg/L，需再適度灌入營養基質，來持續且長效提供微生物營養來源，有利於生物降解反應發生才能確保有足夠的電子提供者(Dahan et al., 2017)。effluent 3 初始 TOC 為 99 mg/L，總生菌為 3.10×10^4 CFU/mL，反應期間皆監測到 TOC 濃度，於反應第 17 天 TOC 濃度最高為 1944 mg/L，第 30 天 TOC 為 1700 mg/L，總生菌為 5.30×10^6 CFU/mL，上述結果證實藥劑灌注確實能有效傳輸至下游處，有效促進微生物生長與降解反應發生，增加生物整治效益之可行性。

由 CH₄ 監測結果如圖 4.21 所示，effluent 1 管柱出流端初始第 0 天濃度為 0.001 mg/L，一般而言，在好氧情況下地下水中 CH₄ 濃度均較低，在一個高濃度污染場址中，多數微生物會先消耗地下水中氧氣，緊接著進行的厭氧反應是脫硝作用、鐵還原、硫酸鹽還原及最終的甲烷化反應。因此在一般典型缺乏溶氧的地下水，會先發生脫硝反應，接著進行鐵還原作用、硫酸鹽還原作用及最終的甲烷化作用(Diana et al., 2016)。此時會有大量 CH₄ 產生，CH₄ 的產生亦表示硫酸根(SO₄²⁻)還原作用減少。因此，在反應第 140 天 effluent 2 及 3 管柱出流端皆有監測到 CH₄ 濃度生成 0.48~1.2 mg/L 且 SO₄²⁻濃度僅殘於 22.1~50.1 mg/L，此結果可證實微生物進行厭氧甲烷化還原反應。另一方面，鹵化呼吸作用主要為無氧呼吸的形式之一，在無氧呼吸過程中含氯有機污染物乃作為最終電子接受者，在厭氧還原脫氯的過程中，污染物之氯原子則由氫原子取代，相對產生一個或數個氯離子，而達到還原脫氯之目的。在地下水體中可觀察氯鹽(Cl⁻)濃度上升，顯示微生物開始發生還原脫氯作用，降解含氯有機污染物。

由 Cl⁻監測結果如圖 4.21 所示，effluent 1 管柱出流端初始第 0 天濃度為 7.9 mg/L，由於自然降解反應過程中污染物未完全脫氯情況下，Cl⁻濃度並未有太大變化之趨勢，反應第 34 天監測 Cl⁻濃度有上升情形，推測可能原因為微生物自然衰減作用下將 TCE 共代謝而降低污染物之毒性累積。自然生物降解需較長整治時程，若現地高濃度 TCE 污染水體時，如要達到法規標準增加整治時程及困難度。因此，本研究添加基質於 effluent 2 管柱中能有效刺激現地微生物生長，亦迅速將地下水轉換為厭氧還原型態，此時環境有利於微生物還原脫氯之能力，於實驗第 24 天監測 Cl⁻濃度為 110.5 mg/L，證實添加 γ -PGA 基質中，有效將 TCE 還原脫氯之目的，在監測第 96 天 Cl⁻濃度最高為 352.9 mg/L。反觀 effluent 3 管柱出流端與 effluent 2 管柱結果皆於反應後期 Cl⁻濃度有上升趨勢，上述結果可驗證基質添加確實能有效將污染物進行生物還原脫氯目的，同時基質能促進微生物生長與降解反應發生，增加生物整治效益之可行性。

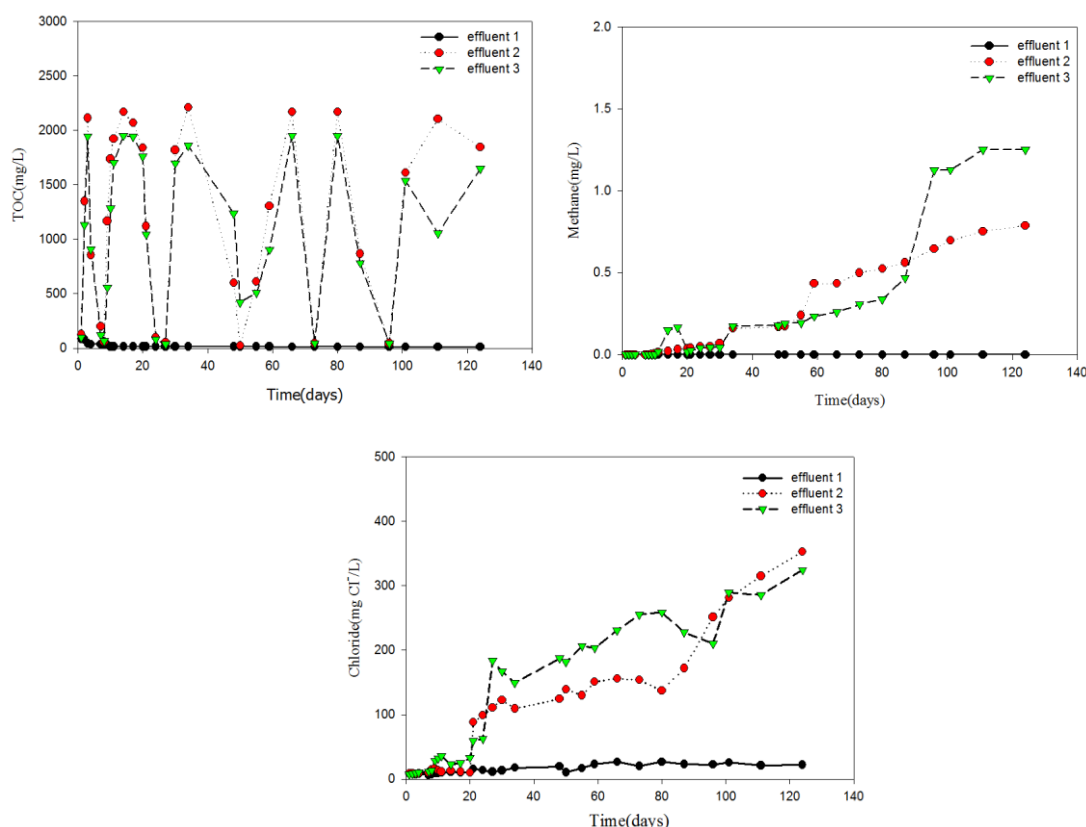


圖 4.21 不同管柱出流端之化學參數變化之情形

4.3.5 管柱試驗菌相分析

(1) DGGE 菌相分析

管柱試驗菌相分析結果如圖 4.22 所示，此圖譜是利用 Quantity One 膠圖分析軟體將各組別之菌相標記，而 Lane1 為原土壤監測初期之組別，Lane2 為生物透水性反應牆監測初期(添加基質)之組別，Lane3 為微生物反應區監測初期之組別，Lane4 為自然降解區監測中期之組別，Lane5 為生物透水性反應牆監測中期組別，Lane6 為微生物反應區監測中期之組別，Lane7 為自然降解區監測後期之組別組別，Lane8 為生物透水性反應牆監測後期之組別，Lane9 為微生物反應區監測後期之組別。綠色 bar 為背景初始菌種，紅色 bar 為與背景相同之菌種，黃色 bar 為與背景不同之菌種，由此標記可瞭解不同亮帶區間位置之菌相表現與菌群活躍性，不同位置出現之亮帶即為一個單一菌種，結由此圖譜呈現多樣性分析。實驗反應期間添加基質有利於菌量生長豐富，在自然降解組，初、中期的菌相有增加的趨勢推估原因為初始為氧化態環境，其存在部分的好氧菌與兼氧菌共生，在反應期間微生物可利用土壤與地下水碳源並將環境轉為還原型態，顯示土壤及地下水中少量之碳源供微生物生長為主要限制因子。然而，在添加 γ -PGA 基質組別(生物

透水性反應牆)，因額外提供碳源刺激微生物生長，初、中、後期菌相比，菌群有明顯增加之趨勢，可證實 γ -PGA 可促進微生物生長，其推估原因為 γ -PGA 有效控制 pH 值在中性條件利於微生物之生長環境。於微生物反應區結果顯示初期與 γ -PGA 基質組別菌相比菌量較少，其可能原因為 γ -PGA 基質組別有馴養菌之原因，反應後期微生物反應區菌群有明顯趨勢較為顯著，但值得關注為當 γ -PGA 有效控制 pH 值在中性條件適合微生物之生長環境，使得菌相在反應後期整體菌群豐富程度有增加趨勢，後續可藉由定序比對結果來佐證具有降解 TCE 之菌群相關性。

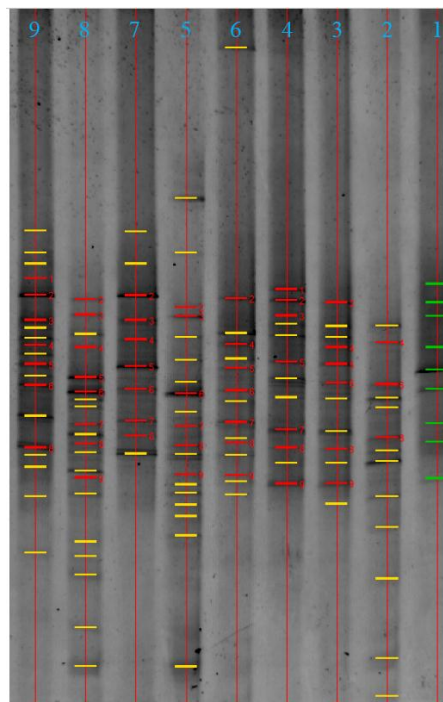


圖 4.22 管柱實驗各組菌相分析圖

(2) q-PCR 定量分析

本研究於管柱生物整治期間偵測不同反應天數之降解組別，分別為三個不同出流端進行定量分析，其採樣天數為第 0、70 及 120 天進行 *DHC* 定量分析，瞭解厭氧還原脫氯過程中針對 *DHC* 菌屬稍長變化之情形。管柱實驗組別以 q-PCR 了瞭解實驗各組別之還原脫氯菌群之生長情形。*DHC* 之菌量結果如圖 4.23 所示，各管柱之初期之菌量在約 $10^3 \sim 10^4$ gene copies/g，於第 70 天菌量 effluent 2 與 effluent 3 大於 10^5 ，其中以 effluent 3 的菌量為最多為 1.02×10^6 gene copies/g，結果亦顯示出具有最佳之 TCE 降解效果，表示 γ -PGA 適合 *DHC* 之菌群利用及生長。從批次試驗與管注試驗結果顯示，而這些菌群環境酸鹼較為敏感，批次試驗乳化油組後期 pH 值低於 6.5 反觀 γ -PGA 後期 pH 值低於 6.5 以上，二種基質 *DHC* 菌量

相差 $10^1 \sim 10^2$ gene copies/g。因此，推估批次實驗乳化油緩衝液組之在反應過程中 pH 持續下降，可能影響生長及還原脫氯之效率，而 γ -PGA 試驗過程呈現良好之中性環境，故證實本研究試驗基質適合還原脫氯之菌群生長，對污染物之降解亦具有最佳之降解效果。

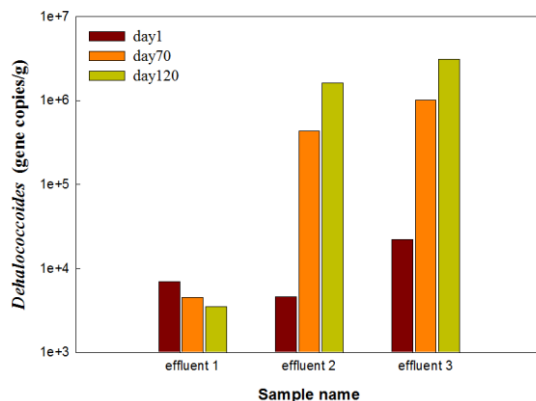


圖 4.23 管柱實驗各出流端 *DHC* 菌屬之變化

由 *tceA* 還原脫氯酶基因之分析結果如圖 4.24，初期 effluent 2 與 effluent 3 之基因量均維持在 2.4×10^2 gene copies/g，在後期 effluent 2 與 effluent 3 之基因數量增加至 4.8×10^2 gene copies/g，因具有 *tceA* 基因能將三氯乙烯代謝成氯乙烯的能力(Dolinová et al., 2017)。*vcrA* 還原脫氯酶基因，effluent 2 與 effluent 3 之基因量為 2.4×10^3 gene copies/g 左右，後期 effluent 2 與 effluent 3 之基因數量 2.4×10^3 gene copies/g，數據顯示未有顯著變化。因具有 *vcrA* 基因能將三氯乙烯代謝成乙烯的能力(Lee et al., 2013)，故從污染物分析結果中也並未有乙烯之生成之結果顯示可能之原因為各管柱之 *vcrA* 存在量較少之緣故。另外，*bvcA* 還原脫氯酶基因之分析結果 *bvcA* 基因含量極少甚至是未檢出，由於 *bvcA* 能將氯乙烯轉換成乙烯的能力。故從污染物分析結果顯示未有乙烯之生成，後續基質應用現地試驗，再觀察各還原基因生長趨勢。

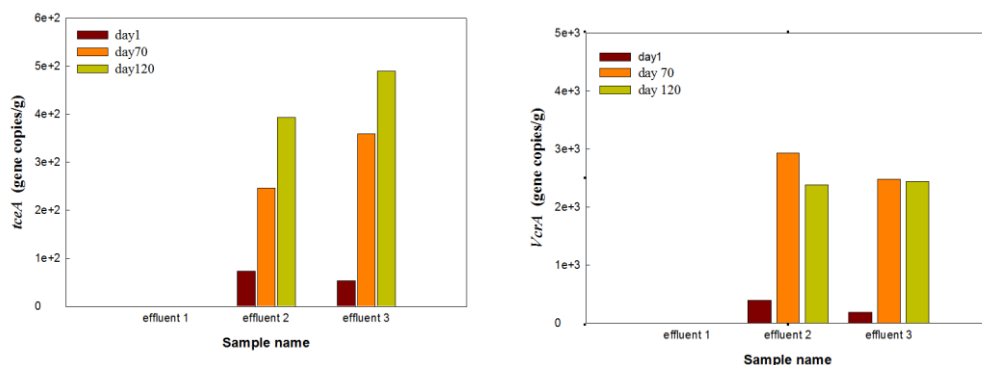


圖 4.24 管柱實驗各出流端 *tceA* 與 *vcrA* 生長趨勢圖

4.5 模場試驗

本研究模場試驗(field scale study)將整合實驗室試驗評估使用 γ -PGA 處理含氯有機物污染之場址進行現地試驗探討其操作條件及改善效果。污染之場址為台南市永康鹽行地段受含氯有機污染物污染場址進行現地生物復育試驗，驗證以 γ -PGA 加強 TCE 之還原脫氯之成效。該場址遭受含氯有機物污染，主要目標污染物為 TCE、cis-DCE 與 1,1-DCE；為加速地下水污染團之還原脫氯作用，添加 γ -PGA 基質以增進處理成效，場址背景 VOCs 與示意圖如表 4.2 及圖 4.25 所示。

本場址地下水 TCE 濃度介於 0.04 至 0.15 mg/L 之間，水力傳導係數為 7.269×10^{-4} cm/s，地下水流速為 41.2 cm/day，地下水流向由西南向東北流動。本計畫設置注藥井 W1 提供現地試驗，並於其地下水下游處約 1~2 公尺設置 3 口監測井 W3、W4、W5，並選 W2 為污染的上游井做為控制井。於注藥井及四口監測井定期採樣。 γ -PGA 藥劑灌注分為二個期程(0、57 天)，灌注量分別為 20 L γ -PGA 藥劑，並稀釋 5 倍後灌入井中，然後再注入 3.6 倍藥劑量的推進水將藥劑向外推出；監測項目包括污染物濃度、地質化學參數變化及 DHC 分析搭配 NGS，以評估以 γ -PGA 為基質的整治成效。

表 4.2 灌注 γ -PGA 前各井含氯有機物濃度

樣品名稱	TCE	t-DCE	c-DCE	1,1-DCE
單位	mg/L			
W1 井	0.127	0.025	0.037	0.020
W2 井	0.066	0.046	0.065	0.025
W3 井	0.150	0.004	0.059	0.009
W4 井	0.044	0.009	0.023	0.005
W5 井	0.039	0.008	0.043	0.002

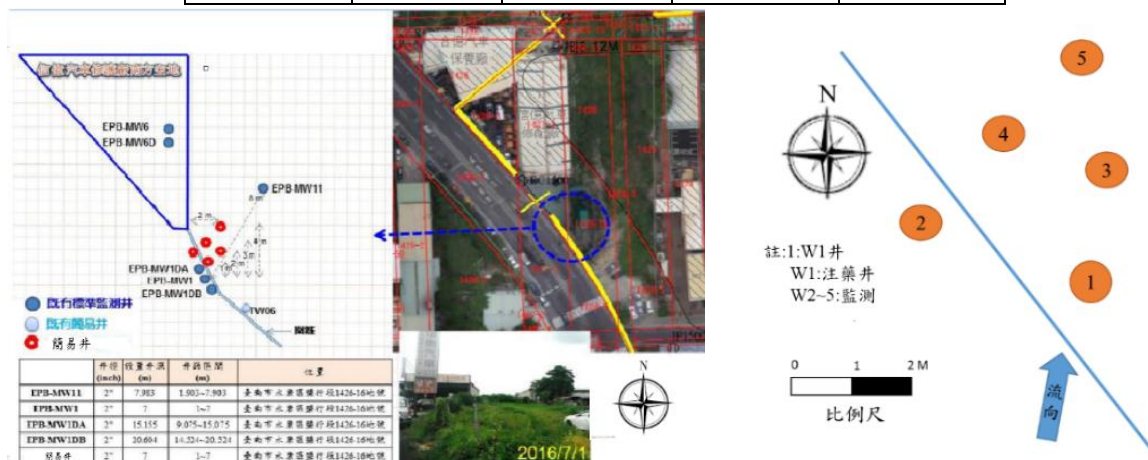


圖 4.25 現地模場與井位示意圖

4.5.1 現地場址基本水質與微生物分析

由地下水採樣分析結果顯示如表 4.3 所示，3 口監測井地下水 C : N : P 比約為 100 : 5~23 : 2~30，氮、磷含量符合生物整治之需求無需額外添加，但碳含量明顯偏低。本計畫擬以 γ -PGA 作為灌注藥劑，期望現地試驗與實驗室類似結果成效，提供脫氯菌生長所需之碳源，藉由增加地下水環境微生物菌量及活性，提高污染物降解速率。模場試驗前經由分子生物技術分析現地環境中 *DHC* 菌量。結果顯示，環境中確實含氯有機物之脫鹵球菌，*DHC* 的數量顯示可作為該場址生物降解指標。

表 4.3 模場試驗地下水脫鹵球菌分析

Well number	W1	W2	W3	W4	W5
TOC	4.5	5.8	3.0	1.9	1.2
N	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3
P	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8
C : N : P	100:5:10	100:5:2	100:10:30	100:20:7	100:23:13
Strain	<i>Dehalococcoides</i> spp				
Amount of bacteria (Gene copies/L)	1.00E+03	4.52E+03	1.15E+03	3.09E+03	1.13E+03

4.5.2 現地灌注試驗水質分析

現地試驗之水質監測結果顯示圖 4.26 所示，模場地下水背景 pH 值介於 6.8~7.0；DO 介於 0.38~1.12mg/L；ORP 介於-24~133 mV。W1 井注藥 7 天後 pH 值上降至 7.51，溶氧降至 0.87 mg/L，氧化還原電位降至-110mV，pH 值灌注基質後上升現象，實驗室批次與管柱試驗均亦有類似現象發生，其推估是導致 pH 值上升， γ -PGA 結構上有 NH_2 胺基之官能基，解離後和水反應形成氨 NH_3 是鹼性物質，後續監測氨氮濃度確定有增加之趨勢，以佐證上述之推測原因。顯示注藥井內已產生厭氧環境。各項基本水質參數明顯變化；注藥第 14 天後注藥井與監測井地下水環境已呈現厭氧狀態(溶氧 0.2~0.5 mg/L；氧化還原電位-150~13 mV)，藉由 γ -PGA 藥劑添加，使現地地下水氧氣逐漸被微生物消耗呈現厭氧狀態，根據文獻指出於厭氧還原脫氯條件下，DO 需小於 0.5 mg/L，當 DO 過高的環境下會抑制厭氧微生物生長，進而影響整治成效(Panagiotakis et al., 2015)。由模場試驗獲知添加 γ -PGA 藥劑可刺激微生物生長，並消耗水中 DO 形成厭氧環境，同時亦證實地下水流向下游移動，且 W1 注藥井形成透水性生物反應牆及厭氧還原環境。

模場整治注入基質於整治期間地下水中環境 pH 值 6.8~7.5 之間維持於中性，推估原因是 γ -PGA 結構上有 NH_2 胺基之官能基解離後和水反應形成氨 NH_3 是鹼性物質，造成 pH 值上升主要原因，亦同時達到緩衝效果。一般地下含水層中，pH 是含氯污染物，於生物轉化過程中極具影響的重要因子，許多生物復育微生物降解污染物之最適 pH 介於 6-8 之間，且許多可進行還原脫氯之重要菌群皆適於中性生長環境。由相關研究指出，污染物降解過程中會因基質快速被微生物分解產生有機酸、脂肪酸之影響，而導致水質 pH 酸化程度之影響(Wen et al., 2017)，當 pH 值小於 6.2 會降低脫氯反應速率且脫氯菌群容易受到抑制之情形(Philips et al., 2013)。當這些有機酸累積時，經常造成地下水體 pH 無法維持於微生物最適 pH 反應區間，進而影響微生物降解污染物之效率及期程，因此調整並維持地下水體環境中最適微生物反應 pH 值是一項極具挑戰的工法。本模場試驗選用 γ -PGA 基質可中和厭氧微生物反應產生之有機酸，維持最適生物反應之 pH，避免厭氧整治期間之酸化問題造成脫氯菌之生長抑制。

由各井口 TOC 監測數據顯示，第一次藥劑灌注經由水流，流向下游監測井，於各監測井測得 TOC 殘餘量，實驗結果證實上游注藥井降解效果顯著亦成功形成透水性生物整治牆，符合現地、被動及生物整治概念之技術即包括現地生物復育(in situ bioremediation, ISB)結合透水性反應牆(permeable reactive barrier, PRB)(Freidman et al., 2017)。現場注入的基質，ORP 維持於-30mV 至-180 mV，這表示此地下水環境下，能有助於提供鐵還原、硫酸鹽還原或甲烷化等反應產生，營造

最佳脫氯條件之環境。由模場監測數據獲知，灌注井在整治期監所測得 ORP 由氧化態轉為還原態，ORP 持續下降能低於-200 mV 能有效促進還原脫率之反應，同時亦顯示地下環境已逐漸形成厭氧狀態，有利於現地在短期內提供厭氧生物循環還原代謝途徑降解污染物。

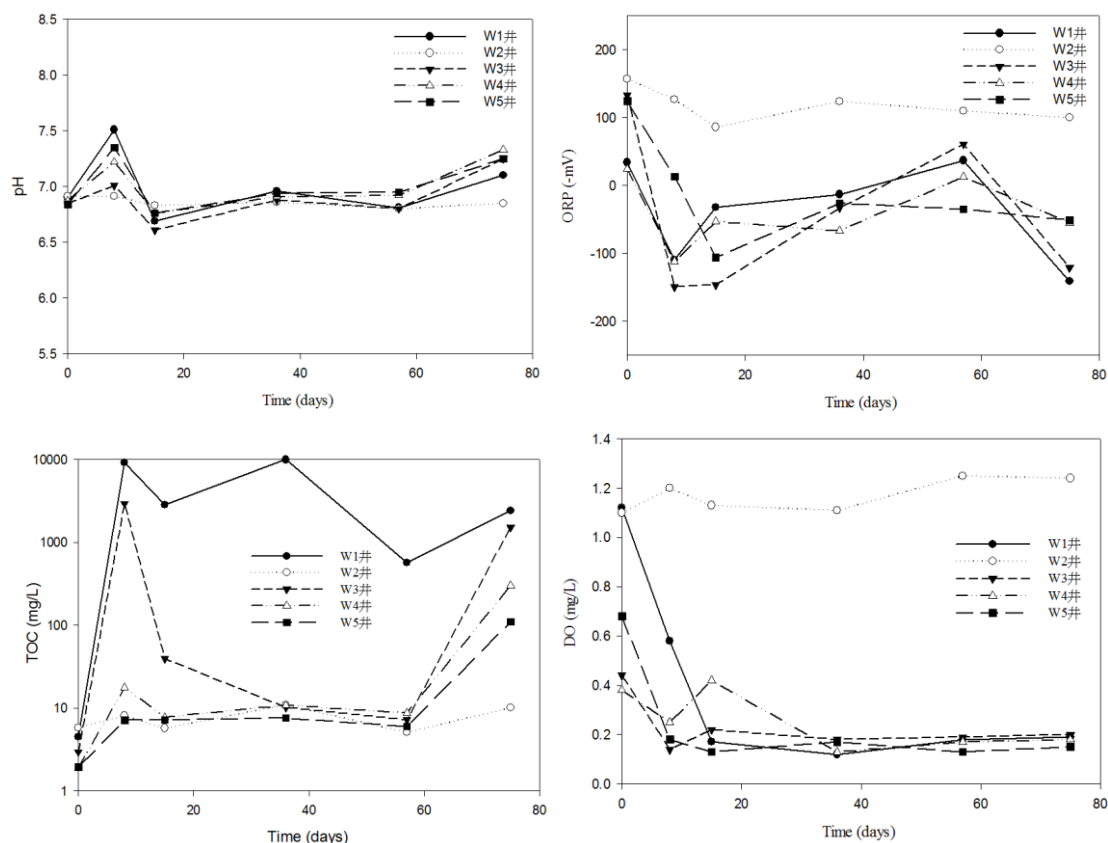


圖 4.26 現地試驗之基本水質監測趨勢圖

4.5.3 地下水厭氧環境下化學參數變化

厭氧生物整治過程，水質參數(pH、DO、ORP)可方便檢視之指標性參數，過去文獻指出還原態的地下環境當中，硝酸鹽、硫酸鹽、二價鐵、三價鐵、硫化物以及甲烷等，亦是厭氧生物整治過程中重要的化學變化參數(Wen et al., 2017)。本模場試驗以 γ -PGA 基質作為電子提供者，營造地下水環境為厭氧狀態，地下水缺乏溶氧，故脫硝反應會先發生，接著進行鐵還原作用、硫酸鹽還原作用及最終的甲烷化作用(Rajic et al., 2016)，因此於厭氧生物整治過程中，監測硫酸鹽、硫化物、甲烷、總菌落數等指標參數，藉此了解厭氧生物整治過程中，地下水環境因脫氯反應產生等變化情形。

模場試驗厭氧生物整治區，硫酸鹽濃度監測圖 4.27 所示，W1~W5 五口井硫酸鹽背景值為 20.1~80.7 mg/L，W1 經灌注基質後，可發現硫酸鹽於監測第 31 天

有上升之現象，濃度於 120.1 mg/L 監測至第 80 天濃度有緩慢下降，當地下水為厭氧環境下，多數兼性厭氧菌以水中的硝酸鹽或硫酸鹽為電子受體，持續進行厭氧還原脫氯能力。亦有文獻指出當硫酸鹽存在於受含氯溶劑污染之地區，其含量會影響還原脫氯作用之成效，而模場所測得的硫酸濃度是呈現下降情形，亦不會影響脫氯之成效(Lee et al., 2015)。然而，W2 井沒有灌注於整治期間硫酸鹽濃度 60.1~80.2 mg/L 沒有太大變化。環境中如有足夠的硫酸鹽，SRB 就可轉化硫酸鹽。由硫酸鹽消耗得悉，反應環境中應該含有硫酸鹽還原菌等菌種，目前已知可行脫氯呼吸作用之硫酸鹽還原菌如 *Desulfitobacterium frappieri* TCE1、*Desulfitobacterium* sp. strain PCE1、*Desulfitobacterium* sp. strain Y51、*Desulfuromonas michiganensis* BB1、*Desulfuromonas michiganensis* BRS1、*Desulfuromonas chloroethenica* TT4B 及 *Sulfurospirillum multivorans* 等，該些菌種皆可以氫氣做為電子接受者，將 PCE 及 TCE 還原脫氯生 c-DCE(Sheu et al., 2015)。文獻指出，硫酸鹽還原菌可分解的基質種類相當廣泛從簡單的揮發酸、C₁₂-C₂₀ 的長鏈碳化物、氨基酸包括 glycine, alanine, serine (Zhou and Xing, 2015)或分解苯環化物的 *Desulfobacula toluolica*(Bozinovski et al., 2014)，顯示 SRB 可利用之基質種類相當多元化。硫酸鹽於還原態狀態下，會進行還原反應轉換成硫化物，此反應可得知微生物行硫酸鹽還原作用，經各井硫化物濃度有微量上升，最高為 80.5 µg/L，由此得知，因硫酸根離子被硫酸鹽還原菌還原而會形成硫化物，模場監測數據有發現硫化物之形成，但硫化物濃度背景值並無太大差異，並沒有造成硫化物累積現象的產生。硫化物不僅會造成井管的腐蝕，容易使得地下水水質產生惡臭，且對生物體造成毒性的一種無機化合物，在水中為一個具有高毒性之物質，任何水系統中只要存在有機物及硫酸鹽類，便有硫化物之生成(Flynn et al., 2014)。因此，γ-PGA 基質所釋出的氫氧根離子有中和水中酸性及沉澱厭氧產生的硫化物，以減緩地下水酸化及硫化物所造成的臭味問題之潛勢，也可避免硫化物之累積而抑制脫氯菌之生長。

由 CH₄ 監測結果顯示，灌注前各井濃度皆底於 0.01 mg/L，於好氧情況下地下水中 CH₄ 濃度均較低，在一個高濃度污染場址中，多數微生物會先消耗地下水中氧氣，緊接著進行的厭氧反應是脫硝作用、鐵還原、硫酸鹽還原及最終的甲烷化反應。因此在一般典型缺乏溶氧的地下水，會先發生脫硝反應，接著進行鐵還原作用、硫酸鹽還原作用及最終的甲烷化作用(Diana et al., 2016)。二氧化碳為生物代謝作用和發酵過程的產物，它在厭氧環境下可經由生物作用還原成甲烷氣，甲烷為二氧化碳還原後的產物($4\text{H}_2 + \text{CO}_2(\text{g}) \rightarrow \text{CH}_4(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}$)，且它在有溶氧之狀態下，可被嗜甲烷之微生物當作碳源而吸收(Panagiotakis et al., 2015)。由模場厭氧生物整治區監測數據結果得知，額外添加基質會刺激微生物發生硫酸還原及甲烷

化的現象，進而基質所釋出的氫氧根離子有中和水中酸性及沉澱厭氧產生的硫化物，可減緩地下水酸化及硫化物所造成的臭味問題，並能有效控制地下水環境，營造適合脫氯球菌生長之環境條件。此時會有大量 CH_4 產生， CH_4 的產生亦表示硫酸根(SO_4^{2-})還原作用減少。因此，在 80 天監測 CH_4 濃度皆小於 1 mg/L，然而 SO_4^{2-} 濃度介於 88.1~118.2 mg/L，此結果可證實微生物進行未到達甲烷化現象反應。為了證實添加基質是否能使微生物利用生長，因此分析總菌數，以得知微生物生長之情形。由圖 4.27 得知，W1~W5 五口井初期第 0 天總菌落數分別為 3.6×10^4 、 7.2×10^4 、 1.75×10^3 、 5.5×10^3 及 5.6×10^3 CFU/mL，經灌注基質後 W1 井在 80 天所測得之總菌落數約 3.6×10^6 CFU/mL，由此可知，伴隨著整治時間的增添，總菌落數維持上升，因此可證明，此基質有助於提供現地微生物生長所需之碳源，並刺激現地微生物生長，不會抑制微生物之生長且可以有效利用。

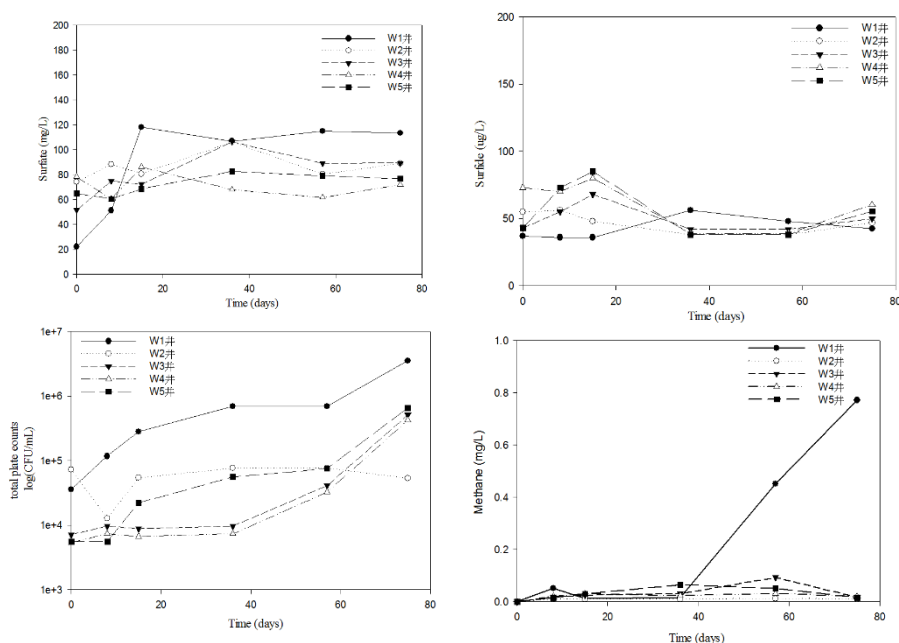


圖 4.27 模場試驗化學參數變化趨勢圖

監測氨氮變化趨勢如圖 28 所示，其主要為驗證前述推估 pH 值上升原因是否有相關性，經由監測結果得知，於灌注基質後除了 W2 井以外其餘井位氨氮濃度均有上升趨勢。基質隨著地下水流流動，第 57 天發現基質將消耗殆盡，後續進行第二次基質灌注。於第 75 天氨氮濃度均有上升現象，其 W1 濃度最高主要是 W1 為基質灌注井，因基質流入監測井需一段時間以及土壤異質性關係，隨著孔隙流入監測井之基質可能僅有一部分而已，才導致監測井之氨氮濃度並未提升很多，後續須進一步深入了解地下水水文狀況。

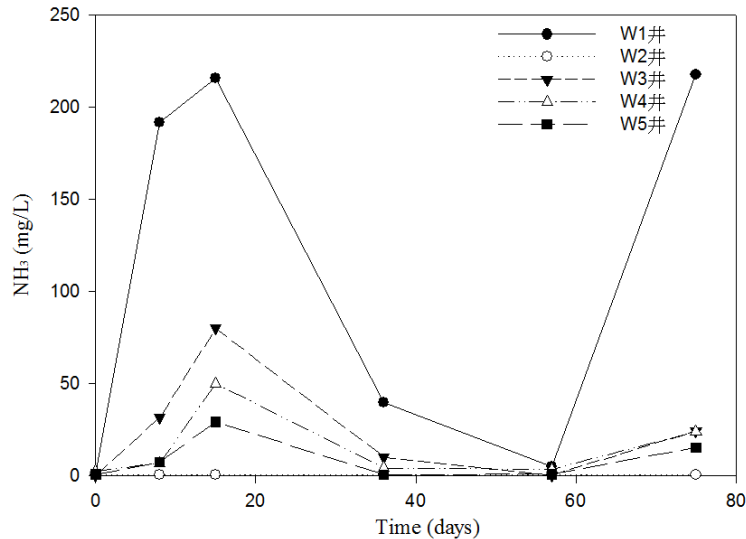


圖 4.28 模場試驗化學參數變化趨勢圖

4.5.4 含氯有機物降解趨勢

經由圖 4.29 結果顯示，於注藥後第 7 天分析 W1 井 TCE 濃度為 0.089 mg/L，實驗持續分析 W1 井，結果發現注藥後反應 75 天，測得現地地下水中 TCE 濃度 0.007 mg/L。監測井結果顯示，W3（距離注藥井 1 m）TCE 濃度 35 天內由 0.149 mg/L 改善至 0.035 mg/L（降解率約為 63.6%），35 至 80 天 TCE 濃度介於 0.004~0.005 mg/L，隨污染濃度微幅變化，TCE 濃度已低於法規標準值。由現地地下水中 TOC 濃度測得濃度持續下降情況(7.2~1520 mg/L)，推測 W1 與 W2 兩井間現地土壤地下水傳輸效果不佳；數據顯示 W4（距離注藥井 1.5 m）TCE 濃度 57 天內由 0.044 mg/L 降解至 0.005 mg/L（降解率約為 88%），W5（距離注藥井 2 m）TCE 濃度 75 天內由 0.039 mg/L 降解至 0.002 mg/L（降解率約為 94%），實驗結果可證實上游注藥井基質有隨著地下水流動將基質帶入下游，監測井污染物濃度均有下降趨勢，其降解效果顯著，亦成功形成透水性生物整治牆。下游 W5 井雖監測到 γ -PGA 藥劑相當微量，但上游 TCE 濃度迅速下降，攔截污染物向下游移動，試驗期間 W5 井 TCE 濃度均小於 0.05 mg/L，其符合法規標準值，所以無安全之虞慮。W2 為污染的上游井做為控制井，試驗 80 天 TCE 濃度呈現下降之趨勢，其 TCE 殘留濃度維持在 0.046 mg/L 左右，TCE 降解效率約 27%。至於後期降解效率趨於平緩，推估原因為現地土壤中之原先營養源被微生物耗盡，造成微生物代謝速率降低之主因，其次注藥井基質可能未經由地下水流向流入 W2 井，導致營養源不足。

W1 井副產物監測結果顯示現地環境背景主要存在之低氯數污染物為 c-DCE 及 1,1-DCE，c-DCE 濃度由 0.036 mg/L 提升至 0.429 mg/L，1,1-DCE 濃度由 0.019 mg/L 提升至 0.118 mg/L，顯示注藥井副產物上升證實現地 TCE 有效被微生物降

解，75 天後 c-DCE 濃度為 0.058 mg/L，1,1-DCE 濃度為 0.011 mg/L，濃度迅速下降並未造成累積風險，顯示注藥井中高氯數污染物降解至低氯數污染物，注藥井研究結果顯示 γ -PGA 藥劑良好之成效。W3 井副產物監測結果顯示，75 天後 c-DCE 濃度介於 0.059~0.253 mg/L 數據證實注藥井副產物上升證實現地 TCE 有效被微生物降解，下游 W3、W4、W5 井結果顯示可能上游部分之降解副產物向下游移動。W3 井中 TCE 濃度 56 天內降解約 76.7%、TCE 濃度 75 天內降解約 96.6%，其結果顯示 W3 可能發生生物降解作用，亦證實上游注藥井有效阻止污染物 TCE 向下游移動。研究顯示下列幾點現象證實 TCE 脫氯反應發生：(1) TCE 濃度下降趨勢與地下水流動路徑相關；(2) 電子接受者被消耗濃度降低(DO 及硫酸鹽) (3) 產生 TCE 降解副產物。以上結果證實 γ -PGA 藥劑與現地生物降解能有效移除目標污染物 TCE 及 DCE，建議後續可持續監測濃度有無持續下降。含氯乙烯類是地下水中常見之污染物，以厭氧生物復育技術處理受污染之地下水時，含有較高氯數的 PCE 和 TCE 並不能有效的完全降解，在此情況下會降解成有毒副產物 DCE 或是 VC，同時會增加健康風險之虞慮。TCE 由於含氯數較高，其降解方式是以還原反應為主，而 VC 含氯數較低，其降解方式則是主要以氧化反應(Alvarez-Zaldívar et al., 2016)，因為在高氯數的含氯乙烯類化合物，其碳原子的氧化電位較高，所以較容易被還原，整治後期為了快速使 VC 濃度下降，可添加微量零價金屬，其中又以零價鐵的應用範圍最廣，因零價鐵的價格低廉且容易取得以及能夠有效地分解污染物，零價鐵對含鹵素之有機化合物的去除機制，主要藉由氧化降解作用所產生的電子轉移，使有機物經由轉化作用(transformation)形成危害物較低的物質。綜合上述結果獲知，本模場所灌注之基質，確實可穩定且有效降解 TCE 及其副產物，並不會產生副產物累積現象，以達環境友善之成效並能阻止污染物 TCE 向下游傳輸，其中 TOC 監測濃度的穩定下降也證實藥劑對生物可利用性與長效緩釋碳的能力，但藥劑傳輸效果於下游井 W4 及 W5 並未於水中測得 TOC 濃度太高變化，顯示研究仍需針對藥劑傳輸問題與地下水水文後續研究。

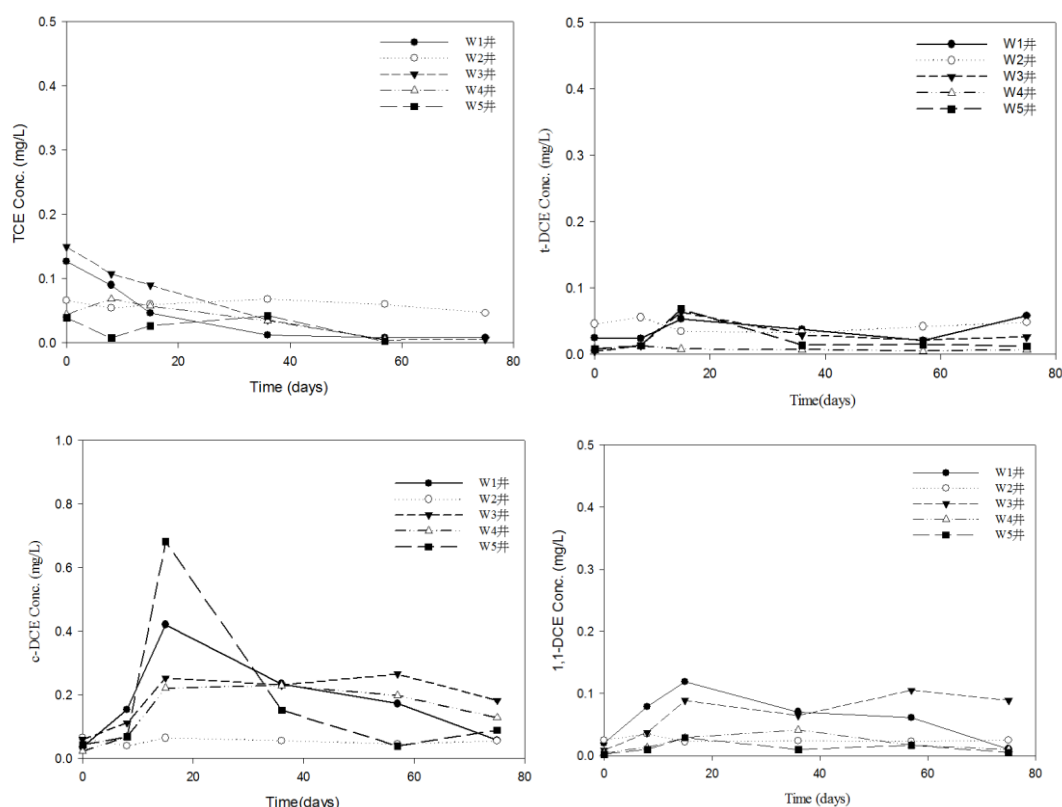


圖 4.29 現地試驗污染物降解趨勢

4.5.5 模場分子生物技術分析

(1) DHC 菌屬數量變化趨勢

模場試驗在厭氧生物整治期間，以分子生物技術 q-PCR 偵測不同時間點 *DHC* 菌屬之含量，因 *DHC* 可將 PCE 和 TCE 還原脫氯形成 VC，並繼續降解成無毒副產物乙烯，因此，可藉此偵測結果，了解現場地下水中 *DHC* 菌屬之含量，並得悉此菌屬在環境中的生長情形，亦可作為評估現地生物整治成效的依據。

模場試驗於厭氧生物區五口井 *DHC* 的 gene copies 數量變化趨勢如圖 4.30 所示，經灌注基質後各井位均有變化趨勢，於第 15 天監測其 *DHC* 菌屬數量均有上升之現象，到了後期第 75 天 *DHC* 菌屬數量大概維持於 $1.1 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^7$ gene copies/L；W2 井無灌注基質，整治期間菌屬數量介於 $1.67 \times 10^3 \sim 4.52 \times 10^3$ gene copies/L 之間，整體而言。由上述結果得知，因 γ -PGA 的灌注有助於提升地下水環境中之 TOC，而 *DHC* 菌屬數量也隨著基質添加而成長許多，整治期間地下水環境 pH 維持於中性，得悉此模場厭氧生物整治區，並不會因基質灌注而造成地下水酸化，進而抑制脫氯菌 *DHC* 菌屬之生長。過去研究指出，地下含水層中 pH 是含氯溶劑生物轉化過程中極具影響的重要因子，許多生物復育技術中，微生物降解污染物之最適 pH6~8 之間，當地下水環境中 pH 逐漸下降，有可能是所注入

的基質已被微生物分解，且進一步產生有機酸而抑制脫氯菌之生長(Wesseldyke et al., 2015)，故 pH 確實影響著脫氯菌生長之重要因素之一，本模場所灌注之基質有助於中和厭氧微生物反應產生有機酸，避免地下水酸化以維持最適生物成長之 pH 環境。另，本計畫選用基質亦突破過去研究，基質須額外添加微量緩衝藥劑才能改善快速酸化問題。

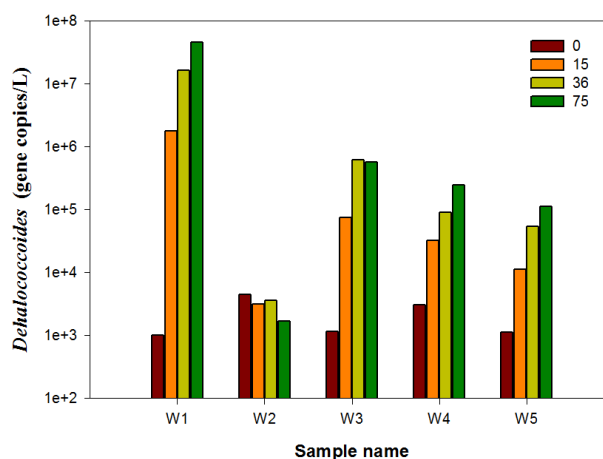


圖 4.30 模場試驗 DHC 菌屬變化趨勢圖

(2)NGS 變化趨勢

如圖 4.31 所示，可得到注藥井 1-1 與下游井 3-1 在屬分類上，所呈現的不同菌相之豐富度。注藥井 1-1 菌相較豐富於下游井 3-1。在注藥井 1-1 井內發現含有 *Clostridium*、*Geobacter* 及 *Dehalogenimonas*，但在下游井 3-1 發現較豐富之 *Dehalogenimonas*，*Dehalogenimonas* 具有完全還原脫氯之潛能(Baldwin et al., 2017)。

兩口井中發現，一些可能還原脫氯之菌種如：*Dechloromonas*、*Desulfococcus* 及 *Geobacter*，高豐富的存在注藥井 1-1 中。這些菌種在一定的數量下，皆可以協助 *Dehalogenimonas* 加快還原脫氯效率。還有發現一些菌種，雖然不能參與直接還原脫氯但可以協助還原脫氯效率提升，如：*Clostridium* 及 *Desulfovibrio* 可以發酵產生氫氣(Ainala et al., 2016; Rabemanolontsoa et al., 2017; Veeravalli et al., 2017)。在厭氧還原脫氯條件下，氫氣可以加快還原脫氯之效果(Wesseldyke et al., 2015)。*Dehalogenimonas* 生長及還原脫氯同時所需之酶輔助因子(e.g., corrinoid cofactor)。酶輔助因子(e.g., corrinoid cofactor)包含維他命 B₁₂ 及其他輔酶因子(Cobalamin or vitamin B₁₂)(Yan et al., 2016)。此兩口井中發現含有 *Geobacter*、*Sporomusa*、*Methylobacter* 及 *Desulfobulbus*，這些菌可以提供 *Dehalogenimonas* 生長之輔酶因子。酶輔助因子(e.g., corrinoid cofactor)對於 *Dehalogenimonas* 是一個很重要之啟動因子(Adrian and Löffler, 2016; Liu et al., 2017)。另，發現有乙酸菌(*Clostridium*)可以產生維他命 B₁₂ 及其他因子供給 *Dehalogenimonas* 使用，進而使

Dehalogenimonas 快速生長及還原脫氯(Yan et al., 2016)。其他菌種為其他之菌種為氮還原、硫酸還原、甲烷氧化及其他可以消耗環境中氧氣之菌種，可以快速塑造適合 *Dehalogenimonas* 生長及還原脫氯之環境 (Wang et al., 2015; Lai et al., 2016; Yu et al., 2016; Fumasoli et al., 2017)。

係利用 Heatmap 圖清楚了解菌相變化差異如圖 4.32 所示，注藥井 1-1 有較多產氫氣及提供輔酶因子之菌種，而下游井 3-1 發現有較豐富之甲烷氧化菌，推估下游井 3-1 有較多之甲烷。而在注藥井 1-1 中發現較多氮還原、硫酸還原及其他可以消耗環境中氧氣之菌種，快速塑造適合 *Dehalogenimonas* 生長及還原脫氯之環境 (Lai et al., 2016; Yu et al., 2016; Fumasoli et al., 2017)。

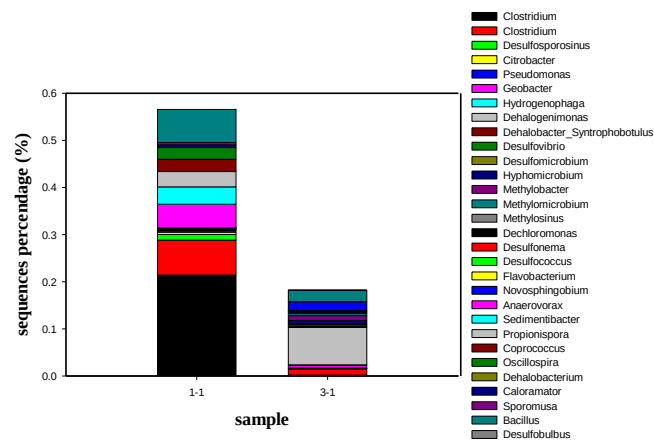


圖 4.31 注藥井 1-1 與下游井 3-1 之菌相豐富度變化圖

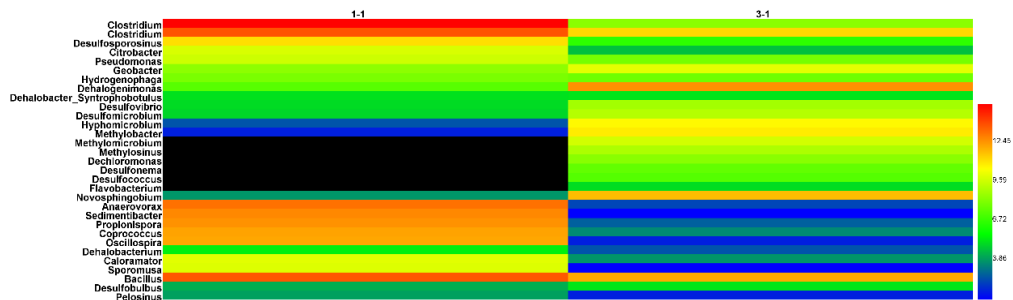


圖 4.32 注藥井 1-1 及下游井 3-1 之 Heatmap 圖

4.6 基質成本效益評估

現地地下水生物整治法與其他整治方法比較起來較具經濟效益，因此本計畫以現地地下水生物整治法整治受三氯乙烯污染之地下水，而美國環保署認為此整治方法較符合現地、被動及生物整治概念之技術即包括現地生物復育結合透水性反應牆(Freidman et al., 2017)。當污染之地下水流過此透水性之反應牆，污染物和反應牆內之反應物質發生生物或物理吸附反應而被分解或移除，流過反應牆地下水即為整治過之地下水。

本計畫收集目前常見基質藥劑操作成本如表 4.4 所列，操作成本計算係以模廠實際運轉後所使用之原物料及能耗進行計算，可供後續檢討及改善評估之參考，市售生物藥劑相關產品如大豆/乳酸納乳化油(EOS)及濃縮型乳化油等售價為每公斤 NT 160 至 190 元之間，自行研製之 γ -PGA 釋碳基質每公斤 NT 30 元，大豆油型釋碳基質須搭配乳化劑、介面活性劑與酸鹼緩衝劑估算每公斤 NT 120~190 元，糖蜜型釋碳基質須添加酸鹼緩衝劑才能適用投入地下水估算每公斤 NT 32~78 元。每個實場性質皆有不同，EOS 雖廣用且有效，但固定藥劑配方通用各種現地，可能會產生預期外狀況。 γ -PGA 釋碳基質之基質優勢，使用既有基質融合現地條件，製備該場最佳化藥劑，其中 γ -PGA 釋碳基質可排除如糖蜜型釋碳基質快速酸化問題，亦較大豆油型基質之傳輸流暢及性質穩定，同時還可維持高量之生物可利用碳並不會對環境造成二次污染。

表 4.4 目前常見基質藥劑操作成本(本團隊繪製)

	substrate	average cost	Ref. & Note
市售藥劑	EOS® (Soy/Lactate Emulsions)(Soybean oil 60%)	\$2.88/ lb	EOS Remediation, Inc. 2006 Using the nine scenarios presented, the nine EOS® scenarios provided in the Cost & Performance Section of the Final Report on the Charleston NWS Pilot Study (ESTCP, 2009)
	RS™(Emulsified Vegetable Oil Substrate) (Vegetable oil 50%)	\$1.80/lb	Kuo, Y. C., et al. 2013
常見釋碳藥劑(2017 年台灣市場物價)	Gamma polyglutamic acid	\$0.45/lb	Note 1. increase of total organic carbon [1,930 mg/L (1 mL γ -PGA in 30 mL groundwater)] Note 2. 可直接注入受污染土壤地下水體。單位售價\$0.45/lb
	Vegetable oil or Soybean oil	\$0.41/lb	須配合乳化劑、介面活性劑與酸鹼緩衝劑 例如 EOS® 及 RS™，單位售價會提升至 \$1.80~2.88/lb。
	Molasses (Taiwan)	\$0.21/lb	(方彥程, et al., 2016) 須配合酸鹼緩衝劑[碳酸氫鉀 KHCO_3 (NT\$ 200/kg)= \$3.00/lb] 單位售價會提升至\$0.50~1.20/lb (10~30% KHCO_3)。

第五章 結論

5.1 結論

本計畫主要之目的為評估以 γ -PGA 為基質，以整治受 TCE 污染地下水之可行性。本計畫在實驗試試驗與模場試驗除了分析污染物濃度和地質化學參數變化外，並以分子生物技術(DGGE 及 q-PCR) γ -PGA 對脫氯菌和菌相的影響。主要的結論包括以下各項：

- (1) γ -PGA 基本特性分析之結果顯示 γ -PGA 之二個主要粒徑包含 437 nm 及 5,423 nm，因此在奈米到微米之間。此粒徑大小可使 γ -PGA 有效分佈到粗細顆粒間(包括黏土到砂粒)，達到均勻分佈及增加生物可及性目標。此外， γ -PGA 之介達電位為 -36 mV 此負電位可使 γ -PGA 向下游傳輸，不會被主要代負電的土壤顆粒吸附在注入點附近。 γ -PGA 主要為碳含量為最高 45%，其餘氫、氮及分別為 5.9、10.5%，其機質有豐富碳源供於微生物利用。
- (2) 厭氧微生物批次實驗結果顯示，實驗中以 γ -PGA 為主要基質時，TCE 具有最佳之降解效率。TCE 濃度由初始濃度之 4.23 mg/L 在 42 天內可持續穩定降解至 0.26 mg/L，反應至 84 天濃度剩餘 0.01 mg/L，降解效率高達 99%，已低於地下水污染管制標準 0.05 mg/L。實驗中以乳化油為主要基質時，TCE 降解效率為 83%，此實驗組雖已添加 pH 緩衝液，但因有機碳濃度較高造成緩衝能力不足，在實驗後期 pH 仍顯著下降，造成 TCE 降解速率趨緩。實驗中以 γ -PGA 為主要基質但添加 pH 緩衝液時，TCE 降解速率較單純添加 γ -PGA 之組別稍低。由於緩衝物質內之金屬離子 γ -PGA 會與結合，進而影響到碳源之釋出，使微生物對碳源的利用率降低，進而影響到 TCE 之還原脫氯。
- (3) 實驗中以乳化油為主要基質時，pH 在第 28 天後迅速下降至 5.95，pH 值並在 84 天後降為 5.66，呈現酸化之情形。而 γ -PGA 組之 pH 值在第 84 天仍在 7.32，維持良好之中性環境，此結果顯示 γ -PGA 具有中和酸性物質的能力。可能的原因為 γ -PGA 具有胺基，胺基釋放後為和水反應產生氨(NH₃)，由於氨為鹼性物質，因此可中和有機碳在厭氧反應後產生的酸，後續將會進一步驗證此理論。
- (4) γ -PGA 之總有機碳初始濃度為 1,977 mg/L，在第 84 天後降為量 646 mg/L，生物利用率為 67.3%。乳化油組之 TOC 初始濃度為 841 mg/L，在第 84 天後為 492 mg/L 生物利用率為 41%。此結果顯示 γ -PGA 具有相當高的微生物可分解性和環境友善性，可有效被微生物分解利用。

- (5) 批次試驗之菌量分析結果可知， γ -PGA 可使環境中之菌相群集豐富度增加， γ -PGA 組之脫氯菌由初始之 10^4 gene copies/g，經過 84 天後增加到 1.49×10^6 gene copies/g，生長效果較乳化油在 84 天之 9.4×10^4 gene copies/g 為佳。結果顯示 γ -PGA 作為碳源可有效促進 DHC 的生長。
- (6) 由管柱試驗結果得知，添加 γ -PGA 於管柱中做為碳源時，反應期間並未監測到出流水質酸化問題，pH 值可維持在中性(6.5-7.5 之間)，而氧化還原電位亦因 γ -PGA 之注入，使 TOC 增加，並使環境由氧化態轉變為還原態(ORP 為 -142 mV，顯示 γ -PGA 可有效做為微生物碳源。實驗過程中環境 pH 均維持在中性。此外，管柱中段出流水亦監測到 TCE 分解副產物(二氯乙烯和氯乙烯)的產生，結果顯示 γ -PGA 可促進 TCE 之還原脫氯反應。管柱試驗結果亦顯示，副產物會持續降解，並未有累積問題。管柱試驗結果說明 γ -PGA 具有實場的應用性，應可實際應用於 TCE 污染場址的厭氧生物整治。
- (7) 管柱試驗之菌量分析，初期各 effluent 菌量在約 $10^3 \sim 10^4$ gene copies/g，於第 70 天 effluent 2 與 effluent 3 大於 10^5 gene copies/g，其中以 effluent 3 的菌量為最多為 1.02×10^6 gene copies/g，管柱試驗成果與批次試驗成果類似，顯示 γ -PGA 適合 DHC 之菌群利用及生長。
- (8) 現地試驗於注藥後 W1 井 TCE 濃度 11 周內為 0.089 mg/L 改善 0.007 mg/L。監測井結果顯示，W3 井 TCE 濃度 5 周內由 0.149 mg/L 改善至 0.035 mg/L，實驗結果證實上游注藥井降解效果顯著亦成功形成透水性生物整治牆，符合現地、被動及生物整治概念之技術即包括現地生物復育結合透水性反應牆。
- (9) 由模場試驗菌量分析結果可知，初期各井脫氯菌量在約 10^3 gene copies/L，經灌注基質後各井位均有變化趨勢，後期第 75 天脫氯菌菌屬維持於 $1.1 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^7$ gene copies/L；W2 井無灌注基質，介於 $1.67 \times 10^3 \sim 4.52 \times 10^3$ gene copies/L 之間。結果顯示 γ -PGA 作為碳源可有效促進脫氯菌的生長。
- (10) 從 NGS 結果顯示，注藥井菌相較豐富於下游井。於 W1 井發現含有 *Clostridium* (梭菌屬)、*Geobacter* (地桿菌)及 *Dehalogenimonas* (綠彎門菌)，但在 W3 井發現較豐富之 *Dehalogenimonas* (綠彎門菌)，*Dehalogenimonas* (綠彎門菌)具有完全還原脫氯之潛能。
- (11) 常見基質操作成本效益評估， γ -PGA 釋碳基質之基質優勢為使用既有基質融合現地條件，製備最佳化藥劑，其中 γ -PGA 釋碳基質可排除過去大豆油型基質或是糖蜜型釋碳基質造成地下水體 pH 值酸化問題，亦較大豆油型基質之傳輸流暢及性質穩定，同時還可維持高量之生物可利用碳。

- (12) 綜合上述之成果，本計畫主要發現包括：(1)以 γ -PGA為基質，可加速TCE之還原脫氯效率，並縮短整治期程；(2) γ -PGA基質黏度低，可提升藥劑傳輸之能力；(3) γ -PGA具有緩衝pH之效果，解決以往生物基質會造成水質酸化之問題，維持良好之中性環境；(4) γ -PGA可有效促進厭氧分解反應，維持厭氧環境和菌種豐富度；(5) γ -PGA釋碳基質可排除過去大豆油型基質或是糖蜜型釋碳基質造成地下水體pH值酸化問題，亦較大豆油型基質之傳輸流暢及性質穩定，同時可維持高量之生物可利用碳物質。
- (13) 目前彙整本計畫成果與味丹公司合作申請該基質專利，以利於未來研究避免衍生爭議。

5.2 建議

- (1) 後續可將 γ -PGA 應用於不同地質之現地場址，評估 γ -PGA 應於各種場址之可行性，並進行改質，使以 γ -PGA 為緩衝釋碳基質之系統成為一種更具經濟效益及環境友善之綠色整治工法。
- (2) 後續可利用分子生物技術，進行微生物定序分析，確認主要之脫氯菌種。
- (3) γ -PGA 之緩衝 pH 效果為 γ -PGA 之主要優勢之一，因此後續將針對 γ -PGA 對地下水 pH 緩衝之特性做深入探討。
- (4) 目前 γ -PGA 以在各個領域均有廣泛之應用，已有學者利用不同之環境條件下衍生製造出不同類型 γ -PGA，如分子量不同而發展出的高分子及低分子之 γ -PGA，另也有與不同金屬結合形成鈉離子型及鈣離子型之 γ -PGA。而不同類型之 γ -PGA 在應用上也有不同之差異。故未來針對不同類型之 γ -PGA 對含氯有機物或其他類型之污染物之處理效益做深入研究。

參考文獻

- Adrian, L., & Löffler, F. E. (2016) . “Outlook—The Next Frontiers for Research on Organohalide-Respiring Bacteria,” In Organohalide-Respiring Bacteria, 621-627
- Ainala, S. K., Seol, E., Kim, J. R., & Park, S. (2016). “Effect of culture medium on fermentative and CO-dependent H₂ production activity in *Citrobacter amalonaticus* Y19,” International Journal of Hydrogen Energy, 41(16), 6734-6742.
- Alvarez-Zaldívar, P., Centler, F., Maier, U., Thullner, M., Imfeld, G. (2016). “Biogeochemical modelling of in situ biodegradation and stable isotope fractionation of intermediate chloroethenes in a horizontal subsurface flow wetland,” Ecological Engineering, 90, 170-179.
- Borden, R.C. (2007). “Effective distribution of emulsified edible oil for enhanced anaerobic bioremediation”, Journal of Contaminant Hydrology, 94(1), 1-12.
- Bajaj, I. and Singhal, R. (2011). “Poly (glutamic acid)-An emerging biopolymer of commercial interest”, Bioresource Technology, 102(10), 5551-5561.
- Bozinovski, D., Taubert, M., Kleinstaub, S., Richnow, H.H., von Bergen, M., Vogt, C., Seifert, J. (2014). “Metaproteogenomic analysis of a sulfate-reducing enrichment culture reveals genomic organization of key enzymes in the m-xylene degradation pathway and metabolic activity of proteobacteria”, Systematic and applied microbiology, 37, 488-501.
- Baldwin, B. R., Taggart, D., Chai, Y., Wandor, D., Biernacki, A., L Sublette, K., ... & Goodwin, B. (2017). “Bioremediation Management Reduces Mass Discharge at a Chlorinated DNAPL Site”, Groundwater Monitoring & Remediation.
- Chen, C., Ren, N., Wang, A., Yu, Z., & Lee, D. J. (2008). “Microbial community of granules in expanded granular sludge bed reactor for simultaneous biological removal of sulfate”, nitrate and lactate. Applied microbiology and biotechnology, 79(6), 1071.
- Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J.A., Díaz, E. (2009). “Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view”, Microbiology and molecular biology reviews, 73(1), 71-133.

- Carrere, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenes, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I. (2010). "Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review", *Journal of hazardous materials*, 183(1), 1-15.
- Chaganti, S.R., Kim, D.H. , Lalman, J.A. (2011). "Flux balance analysis of mixed anaerobic microbial communities: Effects of linoleic acid (LA) and pH on biohydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14141-14152.
- Crane, R. A., & Scott, T. B. (2012). "Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology", *Journal of hazardous materials*, 211, 112-125.
- Chin, D. A. (2012). "Water-Quality Engineering in Natural Systems: Fate and Transport Processes in the Water Environment", John Wiley & Sons.
- Cruz, A., Henriques, I., Sousa, A. C., Baptista, I., Almeida, A., Takahashi, S., ... & Mendo, S. (2014). A microcosm approach to evaluate the degradation of tributyltin (TBT) by *Aeromonas molluscorum* Av27 in estuarine sediments. *Environmental research*, 132, 430-437.
- 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.
- De Biase, C., Maier, U., Baeder-Bederski, O., Bayer, P., Oswald, S. E., Thullner, M., (2012). "Removal of volatile organic compounds in vertical flow filters: Predictions from reactive transport modeling", *Ground Water Monitoring & Remediation*, 32(2), 106-121.
- Dudhagara, P., Bhavsar, S., Bhagat, C., Ghelani, A., Bhatt, S., Patel, R. (2015). "Web Resources for Metagenomics Studies. Genomics", *Proteomics and Bioinformatics*, 13(5), 296-303.
- Dolinova, I., Strojsova, M., Cernik, M., Nemecek, J., Macháčkova, J., & Sevcu, A. (2017). "Microbial degradation of chloroethenes: a review", *Environmental Science and Pollution Research*, 1-22.

- Dahan, O., Katz, I., Avishai, L., & Ronen, Z. (2017). "Transport and degradation of perchlorate in deep vadose zone: implications from direct observations during bioremediation treatment", *Hydrology and Earth System Sciences*, 21(8), 4011
- Eaddy, A. (2008). "Scale-up and characterization of an enrichment culture for bioaugmentation of the P-area chlorinated ethene plume at the Savannah River site", Doctoral dissertation, Clemson University.
- ESTCP. 2009. Edible Oil Emulsion for Treatment of Chlorinated Solvent Contaminated Groundwater at SWMU 17, Charleston Naval Weapons Station, Charleston, SC, Final Report. Prepared by Solutions-IES, Inc., ESTCP Project No. ER-0221, August 2009.
- Findlay, M., Smoler, D., & Fogel, S. (2011). "pH optimum for Dhc and the development of a low-pH-tolerant Dhc culture", In *Proceedings of the First International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies*, Reno Nevada.
- Fam, S.A., Falatko, D.M., McGillicuddy, G., Pon, G., Burkhardt, L.J., Hone J., (2012). "Successful full-scale enhanced anaerobic dechlorination at a NAPL strength 1,1,1-TCA source area", *Remediation Journal*, 22(2), 33-47.
- Flynn, T.M., O'Loughlin, E.J., Mishra, B., DiChristina, T.J., Kemner, K.M. (2014). "Sulfur-mediated electron shuttling during bacterial iron reduction", *Science*, 344(6187), 1039-1042.
- Freidman, B. L., Gras, S. L., Snape, I., Stevens, G. W., & Mumford, K. A. (2017). "A bio-reactive barrier sequence for petroleum hydrocarbon capture and degradation in low nutrient environments", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 26-37.
- Fumasoli, A., Buergmann, H., Weissbrodt, D. G., Wells, G. F., Beck, K., Mohn, J., ... & Udert, K. M. (2017). Growth of Nitrosococcus-related ammonia oxidizing bacteria coincides with extremely low pH values in high strength nitrogen wastewater. *Environmental Science & Technology*.
- Hunkeler, D., Abe, Y., Broholm, M.M., Jeannotat, S., Westergaard, C., Jacobsen, C.S., Aravena, R., Bjerg, P. (2011). "Assessing chlorinated ethene degradation in a large scale contaminant plume by dual carbon-chlorine isotope analysis and quantitative

- PCR. *Journal of Contaminant Hydrology*, 119(1-4), 68-79.
- Hosoda, A., Takahashi, T., Numano, K., Nakajou, K., Higashimoto, A., Toda, M., Arai, H. Hotta, Y. and Tamura, H. (2012). "Rapid Reductive Dechlorination of Trichloroethene in Contaminated Ground Water Using Biostimulation Agent, BD-1, Formulated from Canola Oil", *Journal of Oleo Science*, 61,(3), 155-161.
- Hamonts, K., Kuhn, T., Vos, J., Maesen, M., Kalka, H., Smidt, H., Dejonghe, W. (2012). "Temporal variations in natural attenuation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in eutrophic river sediments impacted by a contaminated groundwater plume", *Water research*, 46(6), 1873-1888.
- Harkness, M., Fisher, A. (2013). "Use of emulsified vegetable oil to support bioremediation of TCE DNAPL in soil columns", *Journal of Contaminant Hydrology*, 16-33.
- Hiortdahl, K. M., and Borden, R. C. (2013). "Enhanced Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene Dense Nonaqueous Phase Liquid with EVO and $Mg(OH)_2$ ", *Environmental science & technology*, 48(1), 624-631.
- Inbaraj, B.S., Wang, J.S., Lu, J.F., Siao, F.Y. and Chen, B.H. (2009). "Adsorption of toxic mercury(II) by an extracellular biopolymer poly(γ -glutamic acid)", *Bioresource Technology*, 100(1), 200-207.
- Kouznetsova, I., Mao, X., Robinson, C., Barry, D.A., Gerhard, J.I., McCarty P.L. (2010). "Biological reduction of chlorinated solvents: batch-scale geochemical modelling", *Water Resources*, 33 (2010), 969–986
- Kuo, Y. C., Liang, S. H., Wang, S. Y., Chen, S. H., & Kao, C. M. (2013). "Application of emulsified substrate biobarrier to remediate TCE-contaminated groundwater: Pilot-scale study", *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 18(2), 04014006.
- Kuo, Y.C., Wang, S.Y., Chang, Y.M., Chen, S.H. and Kao, C.M. (2014). "Control of trichloroethylene plume migration using a biobarrier system: a field-scale study", *Water Science and Technology*, 69(10), 2074-2078.
- Krachunov, M., Vassilev, D., Nisheva, M., Kulev, O., Simeonova, V., Dimitrov, V. (2015). "Fuzzy Indication of Reliability in Metagenomics NGS Data Analysis",

- Procedia Computer Science, 51, 2859-2863.
- Khalil, I. R., Irerere, V. U., Radecka, I., Burns, A. T., Kowalczyk, M., Mason, J. L., & Khechara, M. P. (2016). "Poly- γ -glutamic acid: biodegradable polymer for potential protection of beneficial viruses", *Materials*, 9(1), 28.
- Kwon, K., Shim, H., Bae, W., Oh, J., Bae, J. (2016). "Simultaneous biodegradation of carbon tetrachloride and trichloroethylene in a coupled anaerobic/aerobic biobarrier", *Journal of Hazardous Materials*, 313, 60-67.
- Lyon, D.Y. and Vogel, T.M. (2013). "Bioaugmentation for Groundwater Remediation: an Overview", *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*, 1-37.
- Lee, P. K., Cheng, D., West, K. A., Alvarez-Cohen, L. and He, J. (2013) "Isolation of two new *Dehalococcoides mccartyi* strains with dissimilar dechlorination functions and their characterization by comparative genomics via microarray analysis", *Environmental microbiology*, 15(8), 2293-2305.
- Lovley, D. (2013) "Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes", *Reference Work Entry*, 287-308.
- Liang, S. H., Kuo Y. C., Chen S. H., Chen C. Y., Kao C. M. (2013). "Development of a slow polycolloid-releasing substrate (SPRS) biobarrier to remediate TCE-contaminated aquifers", *Journal of Hazardous Materials Volume*, 254, 107-155.
- Lien, P.J., Yang, Z.H., Chang, Y.M., Tu, Y.T., Kao, C.M. (2016). "Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater with coexistence of fuel oil: Effectiveness and mechanism study", *Chemical Engineering Journal*, 289, 525-536.
- Liguori R. and Faraco V. (2016). "Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy", *Bioresource Technology*, 215, 13-20.
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zou, W. and Li, S. (2016). "Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress challenges and future perspectives", *Biotechnology for Biofuels*, 9(134), 134
- Lai, Q., Cao, J., Dupont, S., Shao, Z., Jebbar, M., & Alain, K. (2016). "Thermodesulfatator autotrophicus sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing

- bacterium from the Indian Ocean”, International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(10), 3978-3982.
- Liu, N., Li, H., Li, M., Ding, L., Weng, C. H., & Dong, C. D. (2017). “Oxygen exposure effects on the dechlorinating activities of a trichloroethene-dechlorination microbial consortium”, Bioresource Technology.
- McCarty PL, Chu M-Y, Kitanidis P. (2007). “Electron donor and pH relationships for biologically enhanced dissolution of chlorinated solvent DNAPL in groundwater”. European Journal of Soil Biology, 43(5-6), 276-282.
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). “Correlation of mRNA and protein in complex biological samples”, FEBS letters, 583(24), 3966-3973.
- Miyata, R., Adachi, K., Tani, H., Kurata, S., Nakamura, K., Tsuneda, S., Noda, N. (2010). “Quantitative detection of chloroethene-reductive bacteria *Dehalococcoides* spp. using alternately binding probe competitive polymerase chain reaction”, Molecular and cellular probes, 24(3), 131-137.
- Mundle, S.O., Johnson, T., Lacrampe-Couloume, G., Pérez-de-Mora, A., Duhamel, M., Edwards, E.A., Sherwood Lollar, B. (2012). “Monitoring biodegradation of ethene and bioremediation of chlorinated ethenes at a contaminated site using compound-specific isotope analysis (CSIA)”, Environmental science and technology, 46(3), 1731-1738.
- Mueller, J.I.M., Lakhwala, F., Vanyo, E.D., Ash, J.M. (2013). “Remediation of 1,2-DCA in Fractured Bedrock Using EHC[®] ISCR”, Águas Subterrâneas.
- Macías-Díaz, J. E. (2014). “A positive finite-difference model in the computational simulation of complex biological film models”, Journal of Difference Equations and Applications, 20(4), 548-569.
- McLean, J.E., Ervin, J., Zhou, J., Sorensen, D.L., Dupont, R.R. (2015). “Biostimulation and Bioaugmentation to Enhance Reductive Dechlorination of TCE in a Long-Term Flow Through Column Study”, Groundwater Monitoring & Remediation , 35(3), 76-88.
- Meyer, J. (2017). “Comparing Rock Matrix Contaminant Profiles Downgradient of a DNAPL Source after 10 Years of Groundwater Dissolution”, In NGWA Conference

- on Fractured Rock and Groundwater, Ngwa.
- O'Carroll, D., Sleep, B., Krol, M., Boparai, H., Kocur, C., (2013). "Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation", *Advances in Water Resources*, 51, 104-122.
- Peale, J.G.D., Mueller, J. and Molin, J. (2010). "Successful ISCR-enhanced bioremediation of a TCE DNAPL source utilizing EHC[®] and KB-1[®]", *Remediation Journal*, 20(3), 63-81.
- Palatsi, J., Illa, J., Prenafeta-Boldú, F.X., Laureni, M., Fernandez, B., Angelidaki, I., Flotats, X. (2010). "Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: Batch tests, microbial community structure and mathematical modelling", *Bioresource Technology*, 101(7), 2243-2251.
- Philips, J., Maes, N., Springael, D. and Smolders, E. (2013). "Acidification due to microbial dechlorination near a trichloroethene DNAPL is overcome with pH buffer or formate as electron donor: Experimental demonstration in diffusion-cells", *Journal of Contaminant Hydrology*, 147, 25-33.
- Pabinger, S., Dander, A., Fischer, M., Snajder, R., Sperk, M., Efremova, M., Krabichler, B., Speicher, M.R., Zschocke, J. and Trajanoski, Z. (2014). "A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data", *Science and Mathematics*, 15(2), 256-278.
- Panagiotakis, I., Antoniou, K., Mamais, D., Pantazidou, M. (2015). "Effects of Different Electron Donor Feeding Patterns on TCE Reductive Dechlorination Performance", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(3), 289-294.
- Puigserver, D., Herrero, J., Torres, M., Cortés, A., Nijenhuis, I., Kuntze, K., Parker, B. L., Carmona, J. M. (2016). "Reductive dechlorination in recalcitrant sources of chloroethenes in the transition zone between aquifers and aquitards", *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18724-18741.
- Palau, J., Yu, R., Hatijah Mortan, S., Shouakar-Stash, O., Rosell, M., Freedman, D. L., ... & Elsner, M. (2017). "Distinct Dual C–Cl Isotope Fractionation Patterns during Anaerobic Biodegradation of 1, 2-Dichloroethane: Potential To Characterize Microbial Degradation in the Field", *Environmental Science & Technology*, 51(5), 2685-2694.

- Ray S., Chowdhury, N., Lalman, J.A., Seth, R., Biswas, N. (2008). “Impact of initial pH and linoleic acid (C18:2) on hydrogen production by a mesophilic anaerobic mixed culture”, *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, 34, 110-117.
- Rabemanolontsoa, H., Van Nguyen, D., Jusakulvjit, P., & Saka, S. (2017). Effects of gas condition on acetic acid fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica* (*C. thermoaceticum*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-7.
- Scheutz, C., Durant, N.D., Hansen, M.H., Bjerg, P.L. (2011). “Natural and enhanced anaerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane and its degradation products in the subsurface-a critical review”, *Water research*, 45(9), 2701-2723.
- Shukla, K., Dikshit, P., Tyagi, M. K., Shukla, R., & Gambhir, J. K. (2012). “Ameliorative effect of *Withania coagulans* on dyslipidemia and oxidative stress in nicotinamide–streptozotocin induced diabetes mellitus”, *Food and chemical toxicology*, 50(10), 3595-3599.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabei, M. (2012). “Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research”, *Molecular Ecology*, 21(8), 1794-1805.
- Shukla, A. K., Upadhyay, S. N., and Dubey, S. K. (2014). “Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review”, *Critical reviews in biotechnology*, 34(2), 101-114.
- Salman, M., Gerhard, J.I., Major, D.W., Pironi, P., Hadden, R. (2015). “Remediation of trichloroethylene-contaminated soils by star technology using vegetable oil smoldering”, *Journal of Hazardous Materials*, 285, 346-355.
- Sheu, Y. T., Chen, S. C., Chien, C. C., Chen, C. C. and Kao, C. M. (2015). “Application of a long-lasting colloidal substrate with pH and hydrogen sulfide control capabilities to remediate TCE-contaminated groundwater”, *Journal of Hazardous Materials*, 284, 222-232.
- Schaefer, C. E., Lavorgna, G. M., White, E. B., & Annable, M. D. (2017). “Bioaugmentation in a Well-Characterized Fractured Rock DNAPL Source Area”, *Groundwater Monitoring & Remediation*.

- Tatusova, T., Ciufu, S., Fedorov, B., O'Neill, K. and Tolstoy, I. (2013). "RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy", *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D553-D559.
- Tang, B., Xu, H., Xu, Z., Xu, C., Xu, Z., Lei, P., Qiu, Y., Liang, J., Feng, X. (2015). "Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation", *Bioresour Technol*, 181, 351-354.
- Volkerling, F. and Pijls, C. (2004). "Factors Determining Reductive Dechlorination of cis-1,2-DCE at PCE Contaminated Sites. Proceedings of the Fourth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds (Monterey, CA; May 2004). Paper 3D-10. Columbus, OH: Battelle Press.
- Viessman, W., Hammer, M.J. (2009). "Water supply and pollution control", New Jersey, Pearson Prentice Hall.
- Veeravalli, S. S., Lalman, J. A., Chaganti, S. R., & Heath, D. D. (2017). Continuous hydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket reactors: effect of organic loading rate on microbial dynamics and H₂ metabolism. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(3), 544-551.
- Varjani, S. J. (2017). "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons", *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- Watson, D.B., Wu, W.M., Mehlhorn, T., Tang, G., Earles, J., Lowe, K., Gihring, T.M., Zhang, G., Phillips, J., Boyanov, M.I., Spalding, B.P., Schadt, C., Kemner, K.M., Criddle, C.S., Jardine, P.M. and Brooks, S.C. (2013). "In Situ Bioremediation of Uranium with Emulsified Vegetable Oil as the Electron Donor", *Environ. Sci. Technol*, 47(12), 6440-6448.
- Wang, Q., Li, Y., Li, J., Wang, Y., Wang, C., & Wang, P. (2015). "Experimental and kinetic study on the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1", *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 565-573.
- Wesseldyke, E.S., Becker, J.G., Seagren, E.A., Mayer, A.S., Zhang, C. (2015). "Numerical modeling analysis of hydrodynamic and microbial controls on DNAPL pool dissolution and detoxification: Dehalorespirers in co-culture", *Advances in*

- Water Resources, 78, 112-125.
- Wang, S.Y., Chen, S.C., Lin, Y.C., Kuo, Y.C., Chen, J.Y. and Kao, C.M. (2016). “Acidification and sulfide formation control during reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane in groundwater: Effectiveness and mechanistic study”, *Chemosphere*, 160, 216-229.
- Wen, C., Sheng, H., Ren, L., Dong, Y., & Dong, J. (2017). “Study on the removal of hexavalent chromium from contaminated groundwater using emulsified vegetable oil”, *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 599-608.
- Wen, L. L., Zhang, Y., Chen, J. X., Zhang, Z. X., Yi, Y. Y., Tang, Y., ... & Zhao, H. P. (2017). “The dechlorination of TCE by a perchlorate reducing consortium”, *Chemical Engineering Journal*, 313, 1215-1221.
- Xiu, Z.M., Gregory, K.B., Lowry, G.V., Alvarez, P.J. (2010). “Effect of Bare and Coated Nanoscale Zerovalent Iron on *tceA* and *vcrA* Gene Expression in *Dehalococcoides* spp”, *Environmental science & technology*, 44(19), 7647-7651.
- Yan, J., Şimşir, B., Farmer, A. T., Bi, M., Yang, Y., Campagna, S. R., & Löffler, F. E. (2016). The corrinoid cofactor of reductive dehalogenases affects dechlorination rates and extents in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*. *The ISME journal*, 10(5), 1092-1101.
- Yu, J., Park, Y., Nguyen, V. K., & Lee, T. (2016). PCE dechlorination by non-*Dehalococcoides*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(8), 1095-1103.
- Yang, Z. H., Dong, C. D., Chen, C. W., Sheu, Y. T., & Kao, C. M. (2017). “Using poly-glutamic acid as soil-washing agent to remediate heavy metal-contaminated soils”, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Zeng, W., Chen, G., Wu, H., Wang, J., Liu, Y., Guo, Y. and Liang, Z. (2016). “Improvement of *Bacillus subtilis* for poly- γ -glutamic acid production by genome shuffling”, *Microbial Biotechnology*, 9(6), 824-833.
- Zhou, J., Xing, J. (2015). “I Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors”,

Biochemical Engineering Journal, 96, 14-22.

王洪斌、成明、盛菊、楊艷艷、李士虎、閻斌倫，(2011)，「 γ -聚谷氨酸明膠膜對重金屬離子吸附特性研究」，湖北農業科學，第 19 期。

王嬌、陳智、陳永強、陳詠竹、徐非一、陽泰、霍蕾、孫啟玲，(2005)，「 γ -多聚谷氨酸吸附銅離子的研究」，四川大學學報：自然科學版，第 3 期。

方彥程、黃國典、王證凱、許哲嘉、張立鵬、張耿榕，(2016)，「地下水含氯有機物污染場址實場整治案例分析」，土壤及地下水污染整治，3(2)，137-149.

行政院勞委會，(2015)，<http://www.iosh.gov.tw/>。

行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會，(2016)，「土壤及地下水污染整治網」，<https://sgw.epa.gov.tw/public/default.aspx>。

行政院環境保護署，(2004)，「土壤及地下水污染整治技術手冊」。

行政院環境保護署，(2015)，「行政院環保署公告網」，<http://atftp.epa.gov.tw/announce/>。

吳群、徐虹、梁金豐、姚俊，(2008)，「甘油對聚谷氨酸合成的貢獻」，南京工業大學製藥與生命科學學院。

吳芳禎、王政捷、施施隆，(2017)，「甘蔗渣廢棄物為原料以發酵生產 γ -聚麩氨酸之研究」，科學與工程技術學報，13 (1)，35-45。

林佩君、柯文慶、謝昌衛，(2008)，「不同種類之 γ -聚麩胺酸吸附重金屬的研究」，大葉大學藥用植物與保健學系，會議論文。

林書弘、胡凱康、劉力瑜，(2013)，「次世代定序資料模擬軟體的比較」，作物、環境與生物資訊。

張文，張樹清，王學江，(2014)，「 γ -聚谷氨酸的微生物合成及在農業生產中的應用」，中國農學通報，30(6) 122，40-45。

郭育嘉，(2013)，「應用現地乳化油生物屏障處理受含氯有機物污染之地下水」，國立中山大學環境工程研究所，博士論文。

陳俊位，(2014)，「聚麩胺酸之特性及其在農業上之應用」，臺中區農業改良場特刊，122 期，237-244。

陳勇志 (2011)，「以天然棉絮交聯聚麩胺酸去除水中鐵離子」，高雄師範大學化學

系，碩士論文。

陳鴻泉、呂文賢、黃世傑、張凱茹，(2007)，「地下水污染生物整治法-慢性釋放營養劑在台灣之應用經驗」，台灣土壤及地下水環境保護協會簡訊，第二十四期，11-16。

黃聖智，(2012)，「奈米級零價鐵分散劑之生物可降解性及其對三氯乙烯自然生物降解影響之研究」，國立暨南國際大學土木工程研究所，碩士論文。