

一、 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		國立中央大學生命科學系					
機構地址		桃園縣中壢市中大路 300 號					
專案主持人		陳師慶		職等／職稱		教授	
協同主持人		簡志青		職等／職稱		教授	
專案 名稱	中文	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水					
	英文	Application of Bioremediation for reduction of Cr(6+) in wastewater					
	關鍵字	Cr, Bioremediation, wastewater					
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：陳師慶		E-mail： osycchna@ksts.seed.net.tw		專線：03-2807144 手機：0929057590	
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		225,590		(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		467,910		(與計畫主體相關)	
	4.	其它研究相關費用		15,300		(差旅與租賃費用)	
	5.	雜項費用		18,000		(1~6 項相加之 5%為限)	
	6.	行政管理費		72,680		(1~5 項相加之 10%為限)	
	專案計畫申請總金額			799,480			

說明：

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

專案主持人： 陳師慶 (簽名及蓋章) 日期： 2017/12/18

**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 18 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	國立中央大學生命科學系	計畫主持人	陳師慶教授
專案名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水		
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					
		(2)研討會論文	1	0	0	0%	成果發表會未舉辦
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1	100%	投稿 Environmental Science & Technology 期刊尚未接受
		(2)研討會論文	0	1	1	100%	
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告	2	1	2	100%	
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
B 人才 培 育	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2	100%	
		(2)博士	1	1	1	100%	
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊	2	2	2	100%	
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
		(4)形成實驗室					

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)
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	發明				
		准	新型/設計				
			合計				
		申	發明				
		請	新型/設計				
		中	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)					

目標達成程度 項目		申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、 技術轉移相關詳細資料)
9.其他指標 (請自行命名)	(請自填)					

(三) 政策面

目標達成程度 項目		申請預 估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 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)

本團隊已經針對受鉻污染地下水其微生物進行馴化與培養，並由該污染場址之地下水中成功篩選數株可還原六價鉻之本土微生物。本計畫將進一步分析比較生物刺激法與生物加強法促進鉻還原之生物復育效果，並建立移除地下水鉻污染的生物復育程序。作為未來鉻污染場址生物復育基礎和應用性研究，達到以台灣本土開發菌種來還原鉻污染並整治之功效。本計畫完成後之具體貢獻如下：

1. 完成本土鉻酸鹽還原菌馴化與培養。
2. 評估以生物刺激法或生物強化法促進六價鉻還原之生物復育效果
3. 完成評估可使用於六價鉻污染地下水現地整治之具還原六價鉻能力之本土優勢菌株，並將其保存於菌種收藏庫，以俾日後研發或實際應用所需。
4. 建立鉻污染地下水整治復育建議操作流程提供未來生物復育工程實作參考
5. 本研究計畫所產出之技術平台與本土菌株，在不違反保密協定與智財規範下，可提供學術界同仁需要時可使用該菌株進行學術研究。

「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」

■修正計畫書 □期中報告

□期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
審查意見		計畫單位回覆		
委員 1				
1. 本專案對未來土壤及地下水污染調查及整治工作推動的貢獻似不易評估。 (1) 計畫主持人已執行土污基金類似計畫多年，其成果的實務應用性均尚待具體說明。 (2) 主持人過去執行的相關菌株篩選研究工作的實務應用說明尚待進一步具體說明。 (3) 本計畫的實務應用性說明似不完整。 2. 本專案預估之成果績效似不易評估。 3. 研究方法可行，對未來實場應用性的說明似不具體。 4. 已執行的計畫未具體說明如何應用，本計畫也未說明實務應用的可行性。 5. 預期成果評估原則與評估條件的說明似不具體。 6. 專案經費編列過高(如耗材費編列)。		1. 感謝委員指教。 (1) 由於現地污染場址申請整治不易，現行還需由環境顧問公司申請現地汙染整治專案，我們已積極洽詢環境顧問公司合作，因限於目前對土基會模場，有一定限制，取得不易，也曾跟土基會長官反映此難題。我們希望未來本研究團隊之研究成果能在專案進行之先導模場試驗中進行現地應用的詳細評估。 (2) 利用生物整治工法整治汙染場址首要為對現地菌群分析及篩選，本團隊於過去執行計畫中已建立相關菌相分析與篩選方法，並於實驗室小模場中得到初步成效，誠如第一點所述，我們已積極洽詢環境顧問公司合作，希望未來本研究團隊之研究成果能在專案進行之先導模場試驗中進行現地應用的詳細評估。 (3) 本計畫首要為調查鉻汙染場址以高效能兼具高通量技術-metagenomics，監測鉻污染地下水在不同生物整治(如 biostimulation or bioaugmentation)過程中微生物相之變化，在環境技術和生物技術相互支援平台，建置具高效率之生物整治策略。本團隊期望建置汙染場址之		

「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」

☒修正計畫書 ☐期中報告 ☐期末報告 **審查意見回覆對照表**

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
		生物菌相資料庫並分離篩選出可降解污染物之關鍵菌株，對於日後污染物相似之污染場址，藉此我們可快速評估應使用生物刺激或生物強化工法進行整治。 2. 感謝委員指教，本計畫之成果績效： A. 以實驗室小模場評估採樣之受污染地下水菌群是否能以生物刺激法完成整治之功效，並於此過程中監測菌相之變化，以利篩選及分離出可將六價鉻還原去除之優勢菌株，建構可還原去除六價鉻之微生物庫。 B. 如實驗室小模場證實該場址之微生物菌群可將六價鉻還原去除，我們便可依菌相分析之結果設計適合六價鉻還原去除菌之生物製劑刺激菌株生長，加強整治功效外並縮短整治時間。 3. 感謝委員指教，誠如第一點所述，我們已積極洽詢環境顧問公司合作，希望未來本研究團隊之研究成果能在專案進行之先導模場試驗中進行現地應用的詳細評估。 4. 感謝委員指教： A. 利用生物整治工法整治污染場址首要為對現地菌群分析及篩選，本團隊於過去執行計畫中已建立相關菌相分析與篩選方法，並於實驗室小模場中得到初步成效，誠如第一點所述，我們已積極洽詢環境顧問公司合作，希望未來本研究團隊之研究成果能在專案進行之先導模場試驗中進		

「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」

■修正計畫書

□期中報告

□期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	■ 研究專案 □ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	■ 整治 □ 評估 □ 預防 □ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
		行現地應用的詳細評估。 B. 本團隊先前執行計畫之研究成果應用性： (1) 建立高通量菌相分析技術，此研究成果可分析及評估該現地污染場址需使用生物刺激或生物強化工法，強化整治成效及縮短整治時間並節省經費。 (2) 若現地污染場址無可降解污染物之菌株，本實驗室先前執行計畫並篩選出之菌株可投入該場址，以達到生物強化整治之功效。 5. 感謝委員指教，本計畫之成果績效： C. 以實驗室小模場評估採樣之受污染地下水菌群是否能以生物刺激法完成整治之功效，並於此過程中監測菌相之變化，以利篩選及分離出可將六價鉻還原去除之優勢菌株，建構可還原去除六價鉻之微生物庫。 D. 如實驗室小模場證實該場址之微生物菌群可將六價鉻還原去除，我們便可依菌相分析之結果設計適合六價鉻還原去除菌之生物製劑刺激菌株生長，加強整治功效外並縮短整治時間。 6. 感謝委員指教，經費已修改。		
委員 2				
1. 本計畫擬開發利用微生物還原法作為地下水中六價鉻污染之整治技術，研究中結合總體基因體學分析技術，探討系統中微生物		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教，若本年度研究成果符合預期		

「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」

☒修正計畫書 ☐期中報告 ☐期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
物族群及功能。還原法係地下水中六價鉻處理重要方法之一，生物還原則相對較新穎，本研究擬結合總體生物基因體技術提升，對於效率預測及操作條件優化，可能可以提供參考基礎，計畫相當具有前瞻性，預期將有學術上之新成果，後續對於實務應用可提供基礎。 2. 本研究計畫主要以實驗室實驗及相關解析為主，工作內容包括水質分析、菌種篩選與測試、菌相及其特性分析等，整體工作規畫清楚。 3. 本計畫僅提出一年期計畫，工作內容也僅止實驗室初步測試，建議若本年度成果佳，則應朝多年期計畫發展，以使技術推廣至實場測試。		效果良好，未來盼環保署能提供模廠進行實場測試，以將研究成果推廣至實場使用。		
委員 3				
1. 計畫目標、架構、內容合理性。 2. 研究人力及工作分配合理。		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。		
委員 4				
1. 應用馴化鉻酸鹽還原菌進行地下水污染場址整治，應為可行性構想，惟因整治過程要長期控制地下環境背景條件並不容易，故建議審慎考量選擇廠址背景條件，以確認順馴化後菌種可發展為優勢菌種，進而達到整治地下水六價鉻之目的。 2. 六價鉻地下水污染場址，往往伴隨不飽和		1. 感謝委員指教，本年度計畫預計以現地地下水先進行實驗室規模實驗，利用次世代定序技術進行菌種分析以找出馴化後可還原鉻酸鹽之優勢菌株，若實驗結果為佳，未來進行實場整治可結合 103 年度計畫所開發使用之緩釋型生物製劑，以達到最佳化應用。 2. 感謝委員指教，未來若有實場可進行研究測		

「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」

■修正計畫書 □期中報告

□期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
含水層之土壤重金屬污染(表層)，故地下水中六價鉻濃度是否因此會有回升狀況，建議納入評估。		試，會加入長時間監測地下水中六價鉻濃度項目。		
土汙基管會				
1. 請將去年計畫成果納入本期計畫內容，延伸應用。		1. 感謝貴署指教，105 年度計畫改良之基因工程菌可能具有多種重金屬固定能力，未來將針對多種重金屬進行測試，以增加菌株之應用性。		

「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」

☐修正計畫書 ☒期中報告 ☐期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水		
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083
審查意見		計畫單位回覆	
委員 1			
1. 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已於 P.39 中說明。 3. 本計畫的執行進度並無落後。 4. 進度符合，依結案標準本計畫應可達成原計畫標的 5. 研究內容與計畫目的相符。 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。 7. 整體研究成果符合預期。 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)。 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。 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。 11. 生成物的穩定性建議評估。 12. 圖 12 的 TOC 濃度建議參考實務可行的濃度(3500 mg/L 的水中 TOC 可能對微生物生長有助益，卻對傳輸無助益)。		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教。 4. 感謝委員指教。 5. 感謝委員指教。 6. 感謝委員指教，本團隊會在後續期末報告說明執行成果。 7. 感謝委員指教。 8. 感謝委員指教。 9. 感謝委員指教，本團隊會在後續期末報告說明。 10. 感謝委員指教，本團隊會在後續期末報告說明。 11. 感謝委員指教，感謝委員指教，感謝委員指教，六價鉻在無氧環境 pH=7 情況下，若 Eh<500mV 則容易形成 Cr(OH) ₃ 沉澱，可參考 P.36 圖 13 鉻之 Eh-pH 示意圖，P. 34 圖 11 可見各組別 ORP 皆小於 500mV，後續整治工作完成後，添加之馴化菌株仍可持續發生作用，可採取定期檢測地下水 pH 值與 ORP 變化，以確保三價鉻無法重新氧化成六價鉻。 12. 感謝委員指教，TOC 濃度過高可能為起始添加的營養鹽比例太高導致，未來試驗可採取少量多次添加方式進行，應當能更優化成本與	

「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」

☐修正計畫書 ☒期中報告

☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水		
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083
		整治成效。	
委員 2			
1. 實際進度符合預期進度。 2. 報告內容未見生物環原沈澱產物分析。 3. 建議宜與廠商進行合作。 4. 期末報告，建議將專利之申請情形進行說明。		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，生物還原沉澱產物以更新於 P. 37。 3. 感謝委員指教，本團隊正在與國內廠商接洽合作，尋找模場進行小規模試驗。 4. 感謝委員指教，本團隊會在後續期末報告說明。	
委員 3			
1. 實務上遭受中金屬污染地下水（如電鍍廢水造成），除了六價鉻之外，可能還有其他重金屬；故應用馴化鉻酸鹽還原菌進行地下水鉻污染場址整治，是否考量到其他重金屬毒性因素？		1. 感謝委員指教，如委員所述電鍍廢水污染通常不只有六價鉻污染，本研究採取現地地下水再額外添加六價鉻進行菌株馴化，因此馴化後之現地菌株應能耐受原污染場址其它重金屬之毒性。	
委員 4			
1. 本研究已完成包括場址地下水特性分析、批次試六價鉻還原實驗、以及相關水質資料與反應動力解析，基本上符合計畫進度。 2. 經生物還原之六價鉻，如果環境改變(例如氧化還原電位改變)，其釋出及氧化回六價鉻可能性為何？建議能評估並提出相關預防建議。 3. 建議後續將本計畫擬注入之營養鹽、及菌，其對環境之衝擊，進行分析，並與傳統還原		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教，感謝委員指教，六價鉻在無氧環境 pH=7 情況下，若 Eh<500 mV 則容易形成 Cr(OH) ₃ 沉澱，可參考 P. 36 圖 13 鉻之 Eh-pH 示意圖，P. 34 圖 11 可見各組別 ORP 皆小於 500 mV，後續整治工作完成後，添加之馴化菌株仍可持續發生作用，可採取定期檢測地下水 pH 值與 ORP 變化，以確保三價鉻無法重新氧化成六價鉻。	

「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」

☐修正計畫書 ☒期中報告

☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
劑注入法比較，以增加實場應用性。		3. 感謝委員指教，後續會在期末報告加入本計畫使用之營養鹽與傳統還原劑對於環境影響之比較。		
土汙基管會				
無				

「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」

☐修正計畫書 ☐期中報告

☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水		
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083
審查意見		計畫單位回覆	
委員 1			
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. 49 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，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：未說明。 10. 本計畫的研究成果的應用潛力建議說明。 11. 對污染整治技術與應用的操作方式建議說明。 12. 地下水中其他相關操作參數建議說明（例如：ORP，TOC... 等等），例如 4.2.3.5 節所建議的 TOC 濃度相對於現地系統是一極高的 TOC 操作濃度，實務上，高濃度的 TOC 所導致的生無過度生長會使得系統無法操作，建議評估。		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教。 4. 感謝委員指教。 5. 感謝委員指教。 6. 感謝委員指教。 7. 感謝委員指教。 8. 感謝委員指教。 9. 感謝委員指教，目前研發成果尚未準備發表專利與技術轉移，國際期刊投稿正在進行中。 10. 感謝委員指教，傳統灌注化學還原劑方法容易造成二次汙染，且成本較為昂貴，利用地下水中微生物作為還原媒介，除較無二次汙染問題外，所使用之營養基質可改為使用糖蜜等，成本十分低廉，在整治結束後微生物仍能持續處理地下水中汙染物，可降低沉澱鉻釋出之可能性，為環境友善且具有經濟價值之整治方法。 11. 感謝委員指教，未來實場應用可於污染場址地下水上游設立灌注井，定期灌注營養基質與馴化菌株，並於下游處設立監測井定期檢測六價鉻與三價鉻含量變化。 12. 感謝委員指教，定時檢測 ORP 與 pH 值可得知地下水中六價鉻還原成三價鉻之傾向，六價鉻在無氧環境 pH=7 情況下，若 Eh<500 mV 則容	

「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」

☐修正計畫書 ☐期中報告 ☒期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水			
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083	
		易形成 $\text{Cr}(\text{OH})_3$ 沉澱；TOC 起始過高問題於後續現地操作可改為降低灌注基質濃度，增加灌注次數，定期灌注，如此即可避免初期微生物過度生長堵塞灌注井與後期碳源不足整治效率下降問題。		
委員 2				
1. 計畫執行工作項目及內容說明完整。		1. 感謝委員指教。		
2. 計畫進度達成原訂目標。		2. 感謝委員指教。		
3. 計畫成果發表於國內文章，國外期刊投稿中，後續情形修正定稿。		3. 感謝委員指教，投稿進度已修正。		
4. 自評表請修正為期末，研究成果文字，請調整適合文字大小。		4. 感謝委員指教，自評表內容已修正。		
委員 3				
1. 本計畫主要工作包括目標場址地下水水質分析、六價鉻還原批次實驗、相關水質資料與反應動力解析，以及微生物分析、沉澱物晶相等，內容豐富。		1. 感謝委員指教。		
2. 本計畫擬發展可以應用的生物還原鉻技術，實場應用時，應還有許多問題須釐清，例如技術優勢、如何在現地進行生物刺激、沉澱鉻釋出可能性等，建議能補充說明這些研究方向。		2. 感謝委員指教，利用生物進行整治較傳統化學還原法成本低廉且較無二次污染之問題，後續現地進行生物刺激可於地下水流上游處設立灌注井，可選用糖蜜等廉價基質定期進行灌注，再於下游處設立監控井，定期檢測地下水中六價鉻含量；沉澱鉻於地下水可定期監控地下水之氧化還原電位與酸鹼值，確保環境傾向還原成三價鉻，本計畫使用生物整治之另一好處為整治結束後，微生物仍可於場址存活並持續處理地下水中污染物，可降低沉澱鉻釋出之可能性。		
3. 建議能與相關競爭技術，例如傳統還原劑注入技術，進行比較其優缺點，以強化研究成果。		3. 感謝委員指教，傳統灌注化學還原劑方法容		

「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」

☐修正計畫書 ☐期中報告

☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	106	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
計畫主持人	陳師慶	研究類別	☒ 整治 ☐ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂
計畫名稱	開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水		
專案連絡人	羅凱泓	連絡專線	(03)4227151 轉 65083
		易造成二次污染，且成本較為昂貴，利用地下水中微生物作為還原媒介，除較無二次污染問題外，所使用之營養基質可改為使用糖蜜等，成本十分低廉，在整治結束後微生物仍能持續處理地下水中污染物，為環境友善且具有經濟價值之整治方法。	
委員 4			
1. 請補充說明若污染場址地下水除了六價鉻之外，亦含有其他重金屬，應用本技術之馴化鉻酸鹽還原菌進行整治，是否可行？		1. 感謝委員指教，本研究使用之鉻酸鹽還原菌整治方法針對六價鉻或可以由還原使毒性降低之重金屬使用，其他重金屬可嘗試使用生物固定之方法，利用菌株將重金屬吸附沉澱，可參考本團隊 105 年度利用金屬硫蛋白開發生物固定菌株計畫。	
2. 本計畫達成目標，同意補充說明後結案。		2. 感謝委員指教。	
土汙基管會			
無			

二、研究成果中英文摘要

中文摘要

工業發展過程中需大量使用鉻重金屬，但由於管理不慎與偷排廢水等情形，導致土壤與地下水鉻污染層出不窮，環境中鉻常以三價鉻 (Cr^{3+})和六價鉻 (Cr^{6+})形式存在，六價鉻則對人體具有高毒性與高致癌性，生物復育法是利用生物材料，例如細菌、真菌或酵素使環境中污染物轉變成低毒性或無毒性的方法，許多環境中微生物帶有六價鉻還原能力，這些微生物體內酵素能將高毒性的六價鉻還原成三價鉻，一般微生物降解污染物速率通常是非常緩慢的，因此利用適合的方式強化微生物處理污染物的能力是值得研究的議題。目前加強式生物復育法可分為兩大類，一、生物刺激法 (Biostimulation)；二、生物強化法 (Bioaugmentation)。期中報告部分研究執行內容與成果顯示，使用生物刺激法添加 NB 作為營養物質可促進現地地下水微生物生長，增加六價鉻還原效率，此外，將生物強化法結合生物刺激法可大幅增加六價鉻還原效率，使整體整治時間降低並達到更好的整治成效。次世代定序菌相分析結果顯示鉻污染地下水經整治處理後鉻還原相關菌屬 *Bacillus*、*Acinetobacter* 和 *Delftia* 等比例大幅增加，由此結果推測本研究使用之整治策略可使地下水中鉻還原相關微生物大量增生，加速六價鉻還原，未來可將本研究成果應用於現地模場試驗，以推廣生物整治技術應用。

關鍵字: 鉻、生物刺激法、生物加強法、次世代定序、地下水

英文摘要

Chromium is a heavy metal which is used in large quantities in the process of industrial development. Due to the bad management and illegally discharge of waste water, more and more soil and groundwater are contaminated by the chromium. In the environment, chromium usually is dissociated into trivalent and hexavalent chromium ions, the latter one is highly toxic and highly carcinogenic to the human body. Bioremediation is a waste management technique that involves the use of organisms to neutralize pollutants from a contaminated site. Many microorganisms have an ability to reduce the hexavalent chromium ions into the low toxic trivalent form by the self-express enzymes. Using microorganisms to neutralize pollutants is mild and environmental friendly, so that, it is worthy of study to find a proper way to enhance microbial treatment. In our report, adding NB medium for biostimulation can promote the local groundwater microbial growth, in hence, improving the hexavalent chromium reduce efficiency. Besides, bioaugmentation combined with biostimulation can also increase largely hexavalent chromium reduce efficiency, therefore, the overall remediation time is down and achieve to better remediation effectiveness. The results of Next Generation Sequencing show that ratio of Bacillus, Acinetobacter and Delftia in chromium contaminated groundwater increased after NB medium treat. In the future, this research result can be applied to in-situ bioremediation to promote the application of bioremediation technology.

Keywords: Chromium, Biostimulation, Bioaugmentation, Next Generation Sequencing, Groundwater

行政院環境保護署

106年度土壤及地下污染整治基金補助研究與模場試驗專案

目次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
圖次.....	5
表次.....	6
第一章：計畫前言與研究目的	1
第二章：研究目的	14
第三章：研究方法與過程	16
3.1 試驗地下水之介紹	16
3.1.1 目前場址營運狀況	16
3.1.2 污染情形	19
3.2 地下水基本性質分析	20
3.2.1 地下水水質參數分析 (酸鹼值 (pH)、電導度 (EC)、氧化還原電位 (ORP)、溶氧量 (DO)).....	20
3.2.2 地下水重金屬分析 (三價鉻、六價鉻、總鉻).....	20
3.2.3 地下水總溶解性有機碳分析	21
3.2.4 地下水總氮分析	21
3.2.5 地下水中總磷分析	22
3.3 鉻酸鹽菌馴化培養	22
3.4 現地地下水六價鉻還原微型試驗 (microcosm experiments).....	22
3.5 以一階反應探討探討六價鉻生物還原與去除率	25
3.6 生物還原沈澱產物分析	25
3.7 抽取地下水總 DNA	26
3.8 次世代定序菌相分析組裝流程	26
3.8.1 微生物 16S rDNA V3-V4 區域放大純化	26
3.8.2 建庫與定序	26
3.8.3 定序結果組裝	26
3.8.4 OTU 群集與物種註釋	27
第四章：實驗結果	28
4.1 地下水基本性質分析	28
4.2 現地地下水六價鉻還原微型試驗	29
4.2.1 地下水六價鉻降解趨勢	29
4.2.2 以一階反應探討探討六價鉻生物還原與去除率	31

4.2.3 各試驗參數與微生物之關聯性探討	31
4.2.3.1 批次試驗之酸鹼值(pH)的變化	31
4.2.3.2 批次試驗之電導度 (EC)的變化	32
4.2.3.3 批次試驗之溶氧 (DO)的變化	33
4.2.3.4 批次試驗之氧化還原 (ORP)的變化	34
4.2.3.5 批次試驗之總溶解性有機碳 (TDOC)的變化	35
4.3 生物沈澱之表面特性環境掃描式電子鏡 (SEM)之分析	36
4.4 能量色散 X-射線光譜(EDAX)之成分分析	38
4.5 次世代定序菌相分析	41
第五章： 結論與建議	49
第七章： 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	51
第八章： 參考文獻	53

行政院環境保護署

106年度土壤及地下污染整治基金補助研究與模場試驗專案

圖次

圖 1. 人為活動及環境條件下之鉻酸鹽污染途徑示意圖.....	3
圖 2. 微生物抵抗鉻機制圖	10
圖 3. 研究架構與實驗流程圖	15
圖 4. 場址之地理位置圖	17
圖 5. 為該場址地下水水位圖及流向圖	18
圖 6. 場址之配置及井號示意圖	19
圖 7. 控制組與其他組別之六價鉻殘餘率圖	30
圖 8. 各試驗組別之酸鹼值 (pH)的變化趨勢圖	32
圖 9. 各試驗組別之電導度 (EC)的變化趨勢圖	33
圖 10. 各試驗組別之溶氧 (DO)的變化趨勢圖	34
圖 11. 各試驗組別之氧化還原 (ORP)的變化圖	35
圖 12. 各試驗組別之總溶解性有機碳 (TDOC)變化圖	36
圖 13. 鉻之 Eh-pH 示意圖. (Huang et al., 2014)	37
圖 14. 馴化菌組 (IBN) 及自然降解組 (IG) 之生物沈澱掃描圖像之探討.....	37
圖 15. 植菌組沈澱物之微生物必需元素及鉻元素之變化 (a)第 35 天；(b)第 102 天	39
圖 16. 植菌組沈澱物之金屬元素 (鉻、鎳、銅及鐵)之變化 (a)第 35 天；(b)第 102 天	39
圖 17. 自然降解組沈澱物之金屬元素之變化 (a)第 7 天；(b)第 35 天	40
圖 18. 自然降解組沈澱物之碳及金屬元素 (鉻、鐵及砷)之變化 (a)第 52 天；(b)第 102 天	40
圖 19. 自然降解組中不定型礦物之組成成分.....	41
圖 20. 以門為分類階層，處理前後菌相變化	42
圖 21. 以屬為分類階層，處理前後菌相變化	42
圖 22. 物種豐富度排名曲線圖	47
圖 23. 定序量與菌種累積曲線圖	48

行政院環境保護署

106年度土壤及地下污染整治基金補助研究與模場試驗專案

表次

表 1. 六價鉻於國際組織之列管危害類型及劑量限值	1
表 2. 六價鉻攝入後之毒性及危害症狀	2
表 3. 台灣國內歷年之鉻相關污染案例介紹	4
表 4. 我國與國外之土壤及地下水鉻整治技術及案例彙整	5
表 5. 環境中常見的鉻酸鹽還原/耐受菌菌種分類彙整	7
表 6. 分子生物鑑定菌相技術比較	13
表 7. 各實驗組別之所添加內容物	24
表 8. 土壤及地下水之八大重金屬污染物質現行制標準	28
表 9. 地下水之水質基本性質分析	29
表 10. 控制組與其他組別六價鉻濃度表	29
表 11. 各組之一階反應速率常數 k 值及六價鉻總還原率	31
表 12. 以菌種做分類，處理前後菌相變化	43
表 13. 以菌屬做分類，處理前後菌相變化	44

第一章：計畫前言與研究目的

重金屬鉻在日常生活中用途十分廣泛，舉凡鞣革產品染劑、橋樑與車體零件之防鏽鍍材、電子產品之防鏽劑與電鍍製程中防鏽塗料，皆有大量使用鉻金屬，此外建築、木材與印刷產品的塗料和醫療等相關民生用品也常使用，因此鉻與民眾生活息息相關。

工業發展過程中需大量使用鉻重金屬，但由於管理不慎與偷排廢水等情形導致的土壤與地下水鉻汙染層出不窮，在台灣，近四十年來隨著工業發展，電鍍業一直扮演著重要的電化學製程一環，長期操作營運的工廠及土地利用在世代交替下之移轉，使得污染場址持續不斷地發現及公告。由土壤及地下水污染整治基金管理會資料顯示，國內鉻污染情況迄今至少有 35 筆是公告為土壤控制場址（含地下水受限使用）、11 筆為土壤整治場址；地下水則有 8 筆是公告為地下水控制場址（含地下水受限使用），其中包含 4 筆的地下水整治場址（土污基管會, 2015），其中我國最為著名為後壁鉻米事件及嘉義後湖農田受重金屬鉻之污染（環資中心網站, 2015）。

環境中鉻常以三價鉻 (Cr^{3+}) 和六價鉻 (Cr^{6+}) 形式存在，其中三價鉻為人體必需微量元素，六價鉻則對人體具有高毒性與高致癌性，六價鉻是具有致突變 (Puzon et al., 2002)，致癌 (Codd et al., 2003) 及致畸胎 (Asmatullah et al., 1998) 特性，並以被許多管制機構優先列管為必須控制污染物之一，其中包含美國環保署 (US Environmental Protection Agency, U.S. EPA) 及美國衛生與人群服務部 (The Department of Health and Human Services, DHHS)、國際癌症研究中心 (The International Agency for Research on Cancer, IARC) 納入列管，其管制分類為表 1 結果所示。

表 1. 六價鉻於國際組織之列管危害類型及劑量限值

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

人體急性意外暴露或故意攝入的高劑量六價鉻化合物，包括鉻酸 (Chromic acid)、重鉻酸鉀 (Potassium dichromate) 和重鉻酸銨 (Ammonium dichromate) 的研究報告顯示，急性高劑量暴露患者之臨床症狀有腹痛、噁心、嘔吐、嘔血、肌肉痙攣、發燒、急性腎臟衰竭、變性血紅素症、便血、鉻潰瘍、過敏性接觸皮膚炎、鼻中膈潰爛或穿孔、口咽食道胃十二指腸灼傷、胃腸道出血、貧血、血紅素低下、紅血球異常、溶血、化膿、結疤、肝腎功能衰竭 (吸入大量時 72 小時後會發生肺水腫)、紫紺、代謝性酸中毒、低血壓和休克。組織病理檢查則發現肝脂肪及腎小管病變壞死。眼睛接觸時，亦會造成刺激，引起角膜混濁，有喪失視力的永久傷害危險。經由評估人體攝入六價鉻的致死劑量大約為 4.1~357 毫克/公斤體重。

於慢性中毒部分，根據國際癌症研究中心 (IARC) 指出長期於六價鉻環境暴露下可能引起癌症，尤其是肺癌。長期暴露下對人類之呼吸系統如支氣管炎、氣喘、喉炎皆有影響，六價鉻攝入後之毒性與危害症狀彙整於表 2 (USEPA, 1998；Chromium Compounds, USEPA, 2000；Chromium (VI) Compounds, IARC, 1973-1990；環境毒物研究中心整理之口服六價鉻毒性資料，2014)。

表 2. 六價鉻攝入後之毒性及危害症狀

危害情況	臨床症狀	服用劑量
急毒性暴露	危害分類	致死劑量大約為 4.1~357 毫克/公斤體重。
	攝食：腹痛、噁心、嘔吐、嘔血、貧血、紅血球。異常、溶血。	
	吸入：鼻中膈潰爛或穿孔。	
	皮膚接觸：過敏性接觸皮膚炎、紫紺、鉻潰瘍。	
慢毒性中毒	表態徵狀：肌肉痙攣、發燒、化膿、結疤、低血壓和休克。	—
	器官病變：急性腎臟衰竭、變性血紅素症、便血、口咽食道胃十二指腸灼傷、胃腸道出血、肝腎功能衰竭(吸入大量時 72 小時後會發生肺水腫)、代謝性酸中毒。	
	輕者：支氣管炎、氣喘、喉炎。 重者：致癌性。	

備註：「—」表示無特別陳述或指出

六價鉻對於環境衝擊來源最主要是由中小企業之產品工業加工製程產生、排放、不慎貯存之洩漏，而造成環境地下水體破壞、污染及鄰近居戶健康影響，而生物毒性及擴散特性而言，是最為主要之必須立即掌控之污染物。在地下水體中，因水體傳輸本具有水文條件及流向問題，不比土壤為一固定污染源，因此，即鉻污染一旦導入水體時便會加速其傳遞及擴散。

鉻酸鹽主要五大污染途徑如下列所述 (圖 1):

1. 廢棄鉻液貯存洩漏
2. 瀉湖、池塘或沼澤中廢水滲入
3. 中小企業、工廠製程廢液管線洩漏及排放至農田
4. 工廠製程廢水排放至河川污染泵井
5. 半儲存鉻液不慎滲漏

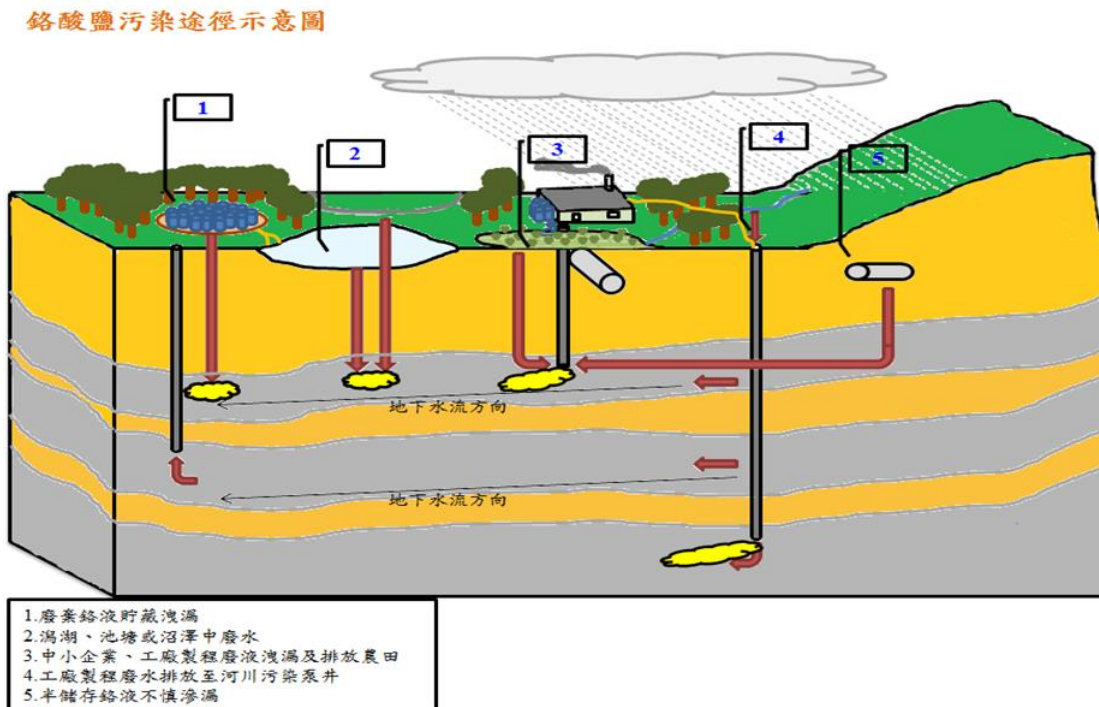


圖 1. 人為活動及環境條件下之鉻酸鹽污染途徑示意圖

工業經濟起飛至迄今，國內重金屬污染案例已不再少數，下表 3 主要是針對為國內之鉻相關污染區域之案例介紹：

表 3. 台灣國內歷年之鉻相關污染案例介紹

案例名稱	污染來源	參考資料
台南後壁鄉農地鉻污染事件	事業爐渣	行政院環保署新聞
台南○林公司鉻污染事件	電鍍工廠	行政院環保署新聞
嘉義後湖工業區農地重金 屬鉻污染	事業廢棄污水	大紀元
雲林北港鎮果園鉻污染事件	皮革工廠	環境資源中心
二仁溪污染事件	工業廢水	土水環境期刊(第 46 期)

一般常見物、化學方法的原理，是運用污染物或被污染之介質的物化特性，而達到破壞、分離或穩定污染物之目的。此類方法的效果比較雖較佳，且時程較短，但相對整治過程費用可能是相當昂貴的，並且運用於低濃度之污染物場區處理不僅達不到預期效果，更有可能投入更多不必要的時間、經費及人力去解決這些遺留問題。下表 4 列出我國與國外受鉻污染之土壤及地下水整治技術及案例彙整。

表 4. 我國與國外之土壤及地下水鉻整治技術及案例彙整

技術名稱	整治 類型	處理 機制	處理 對象	污染場址
還原劑注入法 (Reducing Agent Injection Method)	現地	化學	地下 水	美國北、中加州木材貯 存場址
地下水抽除處理法 (Pump and Treat)	現地	物理 化學	地下 水	美國德州 odessachromium 污染場 址 美國奧勒岡州 Corvallis,unitedchrome 污染場址
反應帶整治法 (Reactive Zones)	現地	化學 生物	地下 水	美國華盛頓州 100 darea 污染場址
電動力/分離法 (Electrokinetics)	現地	電化 學	地下 水	彰化縣和美鎮
土壤混合稀釋/排土/客土法 (Soilmixing/Dumping/Dressing)	現地	物理	土壤	嘉義市遠東段 全國污染農地控制場址
土壤固化/安(穩)定化法 (Solidification/Stabilization(S/S))	離場	化學	土壤	嘉義市遠東段

前言提到六價鉻毒性遠大於三價鉻，在於六價鉻可利用硫酸鹽運輸途徑進入細胞內使酵素功能被失調，進而產生大量自由基 (ROS)傷害蛋白質與核酸，最終導致細胞死亡。文獻指出三價鉻於 pH 值小於 5.5 時會轉換成非水溶氧化物或氫氧化物，且穩定性良好，此外細胞膜對於三價鉻的通透性極低，導致三價鉻之毒性與生物可利用性遠低於六價鉻 (He et al., 2009)，因此將六價鉻還原成三價鉻達到降毒性的目的是很重要的 (Thatoi et al., 2014)。

化學還原法處理六價鉻污染是一種很常見的方式，利用還原劑如：鐵 (0)、鐵 (II)或硫化物等將污染場址中六價鉻還原，但此方法需投入大量藥劑且對於低濃度的六價鉻效果不佳，且藥劑本身會導致場址的二次污染，因此鉻污染處理近年來朝向以生物復育法為主之方式。

生物復育法是利用生物材料，例如細菌、真菌或酵素使環境中污染物轉變成低毒性或無毒性的方法，此方法成本低廉，雖成效較慢，但不易對環境造成二次傷害，為一種環境友善之復育技術，生物復育法技術門檻高，需要

大量環境微生物背景研究，因此各國正積極發展生物復育相關研究以改善傳統物理化學法之成本限制與二次污染等問題 (Thatoi et al., 2014)。

許多環境中微生物帶有六價鉻還原能力，這些微生物體內酵素能將高毒性的六價鉻還原成三價鉻，由遭受鉻污染及未受污染之自然環境下，普遍存有相當多樣化之微生物菌種，並利用生物技術之分離及鑑定發現於普遍環境中有數種微生物有鉻酸鹽還原 Cr(VI) 至 Cr(III) 能力及耐受 Cr(VI) 毒性的特性，而此特性分類的菌群，亦統稱為鉻酸鹽還原/耐受菌(Chromium reducing/tolerance bacteria, CRB/CTB)。文獻指出 *Bacillus cereus* strain sj1 菌株，能於含 1 mM K₂CrO₄ LB 培養基內 72 小時能將 Cr(VI)完全還原成 Cr(III) (He et al., 2010)；*Lysinibacillus fusiformis* zc1 能於含 1 mM K₂CrO₄ LB 培養基內 12 小時能快速將 Cr(VI)完全還原成 Cr(III)，此菌株帶有 ChrA、YieF 與許多可能與鉻酸鹽還原相關的還原基因 (He et al., 2011)，此外文獻指出許多菌屬皆具有還原六價鉻能力，例如：假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)、芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)，腸桿菌屬 (*Enterobacter*)、異球菌屬 (*Deinococcus*)、希瓦氏菌屬 (*Shewanella*)、農桿菌屬 (*Agrobacterium*)、大腸桿菌屬 (*Escherichia*)、棲熱菌屬 (*Thermus*)等 (Ohtake et al., 1987)。

依前所述學者研究結果發現普遍能夠處理鉻酸鹽的菌群通常為 α -、 β -及 γ -proteobacteria 綱類等菌群，並將其文獻指出資料初步分類彙整成一般環境中普遍常見具鉻酸鹽還原及耐受功能特性之革蘭氏陰、陽性相關菌屬，整理資料如表 5 所示：

表 5. 環境中常見的鉻酸鹽還原/耐受菌菌種分類彙整

菌種分類	微生物族群	革蘭氏陽(G(+))性	革蘭氏陰(G(-))性
<i>Proteobacteria</i>			
<i>Alpha proteobacteria</i>	<i>Acetobacterales</i>	+	—
	<i>Azospirillales</i>	+	
	<i>Bradyrhizobiales</i>	+	—
	<i>Caulobacterales</i>	+	—
	<i>Consistiales</i>	+	
	<i>Rhizobiales</i>	+	—
	<i>Rhodobacterales</i>	+	—
	<i>Rickettsiales</i>	+	—
	<i>Sphingomonadales</i>	+	—
	<i>Other α-Proteobacteria</i>	+	—
<i>Beta proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	+	—
	<i>Methylophilales</i>		—
	<i>Neisseriales</i>	+	—
	<i>Nitrosomonadales</i>	+	—
	<i>Rhodocyclales</i>	+	—
	<i>Other β-Proteobacteria</i>	+	
<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillales</i>	+	
	<i>Aeromonadales</i>	+	—
	<i>Alteromonadales</i>		—
	<i>Chromatiales</i>	+	—
	<i>Enterobacteriales</i>	+	—
	<i>Legionellales</i>	+	—
	<i>Methylococcales</i>	+	
	<i>Oceanospirillales</i>	+	—
	<i>Pasteurellales</i>	+	—
	<i>Pseudomonadales</i>	+	—
	<i>Symbionts</i>	+	
	<i>Thiotrichales</i>	+	
	<i>Vibrionales</i>	+	
	<i>Xanthomonadales</i>	+	
	<i>Unclassified</i>	+	—
	<i>Other γ-Proteobacteria</i>	+	—
<i>Proteobacteria</i>			

Delta proteobacteria	Bdellovibrionales	+	
	Desulfobacterales	+	—
	Desulfovibrionales	+	—
	Myxococcales	+	—
	Syntrophobacterales	+	—
	Other δ-Proteobacteria	+	—
Actinobacteria			
Acidimicrob iales	Acidobacteriaceae	+	—
	Actinomycetaceae	+	
	Corynebacteriaceae	+	
	Gordoniaceae	+	
	Microbacteriaceae		—
	Micrococcaceae	+	
	Micromonosporaceae	+	
	Mycobacteriaceae	+	
	Nocardiaceae	+	
	Propionibacteriaceae	+	
	unclassified	+	
	Other Actinomycetales	+	—
	Bifidobacteriaceae	+	
	Rubrobacteraceae	+	
	Other Actinobacteria		
Bacteroidetes			
Bacteroidete s Flavobacteri a Sphingobact eria	Bacteroidales		
	Flavobacteriales	+	—
	Sphingobacteriales		—
		+	
Firmicutes			
	Bacillales	+	—
	Lactobacillales	+	
	Clostridiales	+	—
	Catabacter (class)	+	

<i>Desulfotomaculum (class)</i>	+	
<i>Mollicutes (class)</i>	+	
<i>Other Firmicutes</i>	+	—

註：16S rRNA 雜交信號強度分析，相異場址地點之同分類菌種群別或許具不相同顯性特性，僅資參考。

「+」代表「革蘭氏陽性菌」，為雜交技術系統下高度相關親緣屬

「—」代表「革蘭氏陰性菌」，為雜交信號強度

微生物為對抗鉻污染通常有以下幾種方式：一. 減少鉻吸收，由於 CrO_4^{2-} 結構與硫酸根離子 (SO_4^{2-}) 類似，因此可輕易的通過硫酸鹽的運輸路徑 (Qi et al., 2000)，前人研究指出處於 Cr(VI) 壓力下之微生物會快速演化出突變的硫酸鹽運輸路徑，以降低 Cr(VI) 的攝入，並能增加 Cr(VI) 的抗性；二. 主動排出，在鉻抗性菌株上常帶有 *chr* operon，其中 *chrA* 基因帶有六價鉻運送蛋白，能針對六價鉻利用氫離子梯度將菌體內六價鉻移出，增加菌株對 Cr(VI) 的抗能力 (Ramírez-Díaz et al., 2008)；三. 還原減毒，由於六價鉻毒性遠高於三價鉻 (Cr(III))，微生物會利用 *chrR*、*yieF*、*nemA*、Ferrodoxin-NADP oxidoreductase 等細胞內氧化還原基因以有氧方式或 cytochrome 系統以厭氧方式將 Cr(VI) 還原成 Cr(III) 以降低鉻酸鹽毒性，微生物抵抗鉻機制如下圖 2 所示 (Thatoi et al., 2014)。

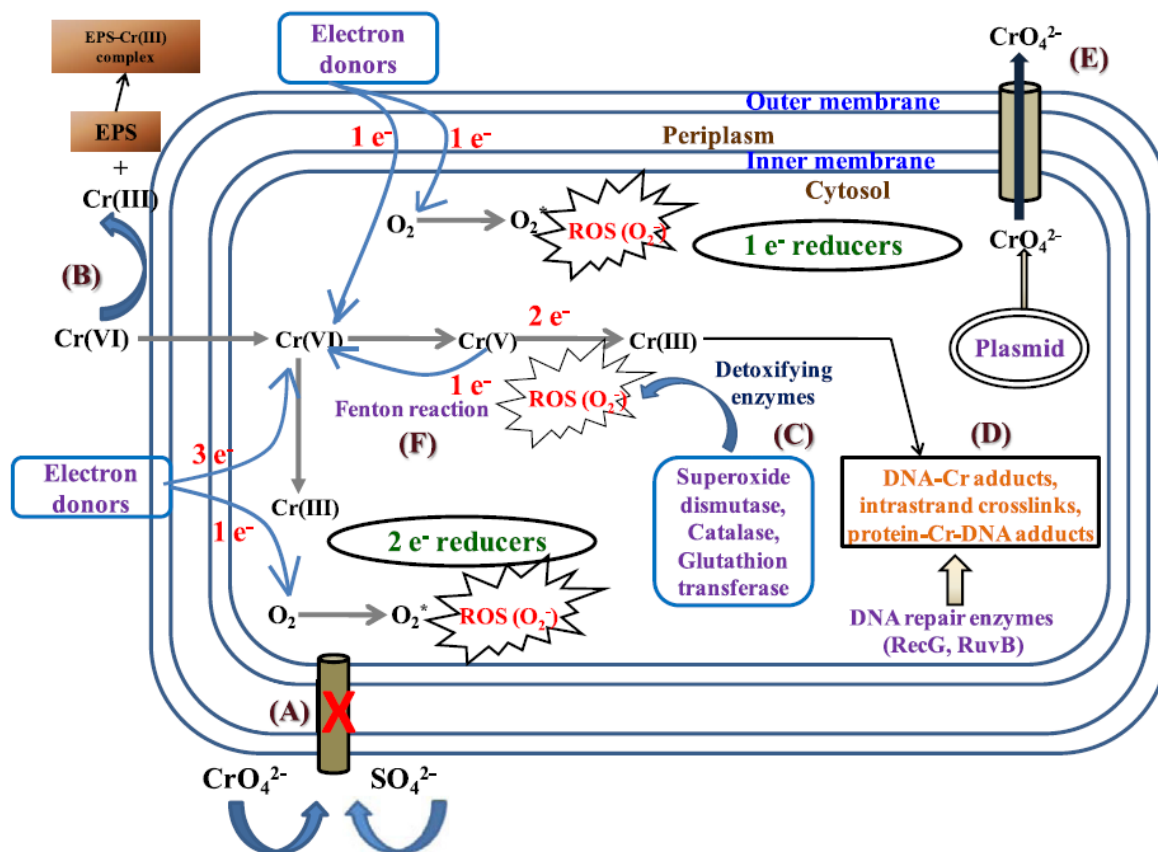


圖 2. 微生物抵抗鉻機制圖

一般微生物降解污染物速率通常是非常緩慢的，對於生物復育過程實際的可行性應用是備受限制 (Whiteley and Lee, 2006)，因此利用適合的方式強化微生物處理污染物的能力是值得研究的議題。目前加強式生物復育法可分為兩大類，一、生物刺激法 (Biostimulation)；二、生物強化法 (Bioaugmentation)。生物刺激法是利用將特定營養物質添加於污染場址中，使可降解污染物之菌株其數量與污染分解能力增加，以達到快速降解污染物的目的；生物強化法是場址中不具有或數量極低可降解污染物之微生物，利用人工培養再添加方法，將具有降解污染物能力之菌株添加入場址中使污染物被微生物降解，此兩種方法可結合使用達到更快速處理污染物之成效。

可行性試驗分析分為兩個階段，其一是實驗室中進行規模的批次試驗，另一則為實驗室之規模模廠試驗或現場的模場試驗。依實驗室之規模批次(或連續流試驗)而言，主要目的是於：

- (1) 了解污染場址中之標的污染物之生物可分解性；
- (2) 維持該生物之分解過程所需要之環境條件及營養鹽需求等；
- (3) 理想條件及實場條件間差異及改善方法；
- (4) 理想狀態下，生物分解的速率及程度；
- (5) 現地原生菌對於標的污染物之分解能力；
- (6) 是否添加微生物之必要性及必要時之添加量；
- (7) 生物分解過程之可能產生之中間及最終產物；
- (8) 實場運用下，所欠缺或不足之條件的可能改善程度；
- (9) 整治目標之可達成的程度；
- (10) 整治時程之推估等。

一般可行性評估先以「批次」反應的型態探討前述之推估因子，藉此了解在最為「理想」之條件下，現地生物復育之可行性，及同時了解現場環境條件及「理想」間之異同特性，以作為後續模場試驗之參考依據。

於批次實驗過程中有三項重要因子必須詳加討論：

- (1) 現場污染場址介質中的營養鹽含量是否充足、是否須額外添加營養鹽、添加量及添加的形式及方法。
- (2) 電子供給及接受者間之關係：依污染物及場址特性決定最佳電子接受或提供者，並加以定量，再探討污染場址內電子接受者是否足夠。
- (3) 現地原生菌種之分解能力及其分解標的污染物所需馴化期長短。若該地菌種能力不佳條件下，則須繼續探討具分解能力之菌種添加必要性及其相關配合因子，如添加量、添加頻率等。

實施有效的生物修復策略依賴於與生俱來的微生物群落的動態，結構和功能 (Shah et al., 2013)，因此針對污染場址完整的微生物菌相分析是進行生物整治所需要的重要背景資料。在污染場址的環境中，可分解污染物的細菌可能由於污染物的篩選作用廣泛地分佈在這些環境，這些微生物將污染物進行分解代謝成無毒性或低毒性的代謝產物。此外，由於單一微生物是很難完成所有的代謝反應，進而降解環境污染物。因此，菌相分析技術可分析不同的細菌或可共同交互執行所有的代謝反應的生物群落 (Shah et al., 2011)，為設計生物整治工法強而有力的基石。但是，超過 99% 的存在於環境中的微生物不容易培養 (Schloss and Handelsman, 2005)，因此，環境微生物菌相分析研究因培養問題，導致沒有深入相關生物技術探討或基礎研究 (Kimura, 2006)。傳統之分子生物方法無法有效釐清場址內部所含菌種種類或因菌數含量過低造成菌種鑑定之遺漏，本研究採用之次世代定序技術將可有效克服菌數過低無法鑑定之缺憾，可有效鑑定場址內全菌種種類及相關代謝途徑，用以評估生物整治法策略效能，進而擬定具有更加效能之生物整治策略。(表 6. 分子生物鑑定菌相技術比較)

以次世代定序技術 (Next generation sequencing) 為基礎的新興學門稱為 metagenomics (也被稱為宏基因組學，Ecogenomics 或環境基因組學)，其目的是測定特定的所有生物體內功能基因或其序列 (shah et al., 2011)。Dellagnezze 等人在 2014 年研究指出，在汽油污染場址使用 metagenomics 分析污染場址之菌相與傳統分析方式分析菌相，並在此兩種分析方式中篩選優勢之降解汽油相關菌株進行汽油降解研究，結果顯示以 metagenomics 分析之優勢降解菌株可於 21 天後降解超過 94% 的汽油，相較以傳統方式篩選出之菌株只能降解 50-75% 的汽油 (Dellagnezze et al., 2014)。

本研究團隊成功在 103 年“地下水中含氯有機污染物厭氧生物整治計畫”以次世代定序技術建立污染場址之環境微生物基因體，及環境微生物之總功能性基因分析，在基因體分析中發現含量豐富多元的降解多氯乙烯之功能性基因，極可能參與多氯乙烯的降解，驗證功能性菌株的相關機能，不但成功證明關鍵菌株 *Dehalococcoides* sp. 存在，並進一步剖析相關之代謝途徑及共代謝菌株，足見次世代定序技術在基因體及轉錄體學研究上之重要性，並展現出此技術在環境污染的生物復育、基因功能分析 (Genetic and Functional Analysis) 及環境污染鑑識上之應用潛力。

表 6. 分子生物鑑定菌相技術比較

分析方式	優點	缺點及限制
T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)	1. amplicon 長度較無限制 2. 高通量 3. 若電泳膠圖結果較單純，可用來分析親緣關係 (Phylogenetic relationship)	1. 限制酶作用不完全，會造成結果的差異 2. 需要 2 種以上限制酶才可得到更精確的結果 3. 若圖譜過於複雜，例如 band 太多容易造成親緣關係分析錯誤
DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)	1. 高解析度(1bp) 2. 高通量 3. 電泳膠片上的 band 可切下來進行定序	1. GC clamp primer 的 PCR 效果不佳而且容易形成 dimer 2. 膠片上的 heteroduplexing band 會造成判讀錯誤 3. 操作技術層面高 4. amplicon 長度必須小於 500bp
SSCP (single strand conformation polymorphism)	1. 高解析度(1bp) 2. 高通量 3. 不需要 clamped primer 以及限制酶作用 (restriction enzyme digestion) 4. 電泳膠片上的 band 可切下來進行定序	1. 當 amplicon 濃度太高時，單股 DNA 容易 reannealing 2. 相同的物種可能會呈現 multiple bands，造成判讀困難 3. amplicon 長度必須小於 300bp
cloning and sequencing	1. 高解析度(1bp) 2. 可用來分析親緣關係 (Phylogenetic relationship)	1. Cloning 過程耗時困難 2. 需要定序許多 clone 才能呈現複雜的族群組成圖譜
NGS (Next Generation Sequencing)	1. 高解析度(1bp) 2. 高通量 (>100,000,000 reads)，能夠呈現高度複雜的微生物組成 3. 樣品製備容易，只需 amplicons 4. 可用來分析親緣關係 (Phylogenetic relationship) 5. 可結合 multiplexing 方式來提高定序效率	1. 單次定序成本較高

環境科學家認為生物修復是一種相當具有潛能之整治技術。最近的多項研究報告指出以 metagenomics 分析之菌相結果，篩選出之菌種與其他方法相比，對環境污染物具有較好的降解率。然而目前就 Metagenomics 技術分析菌相分析，特別是鉻污染水樣，目前尚無文獻報告，因此，本研究利用 Metagenomics 分析台灣南部鉻污染場址菌相，可作為菌種可移除鉻之佐證。

第二章：研究目的

工業發展過程中需大量使用鉻重金屬，但由於管理不慎與偷排廢水等情形導致的土壤與地下水鉻污染層出不窮，在台灣，近四十年來隨著工業發展，電鍍業一直扮演著重要的電化學製程一環，長期操作營運的工廠及土地利用在世代交替下之移轉，使得污染場址持續不斷地發現及公告。

環境中鉻常以三價鉻 (Cr^{3+})和六價鉻 (Cr^{6+})形式存在，其中三價鉻為人體必需微量元素，六價鉻則對人體具有高毒性與高致癌性，六價鉻是具有致突變 (Puzon et al., 2002)，致癌 (Codd et al., 2003)及致畸胎 (Asmatullah et al., 1998)特性，並以被許多管制機構優先列管為必須控制污染物之一。

許多環境中微生物帶有六價鉻還原能力，這些微生物體內酵素能將高毒性的六價鉻還原成三價鉻，由遭受鉻污染及未受污染之自然環境下，普遍存有相當多樣化之微生物菌種，一般微生物降解污染物速率通常是非常緩慢的，對於生物復育過程實際的可行性應用是備受限制 (Whiteley and Lee, 2006)，因此利用適合的方式強化微生物處理污染物的能力是值得研究的議題。目前加強式生物復育法可分為兩大類，一、生物刺激法 (Biostimulation)；二、生物強化法 (Bioaugmentation)。生物刺激法是利用將特定營養物質添加於污染場址中，使可降解污染物之菌株其數量與污染分解能力增加，以達到快速降解污染物的目的；生物強化法是場址中不具有或數量極低可降解污染物之微生物，利用人工培養再添加方法，將具有降解污染物能力之菌株添加入場址中使污染物被微生物降解，此兩種方法可結合使用達到更快速處理污染物之成效。

環境科學家認為生物修復是一種相當具有潛能之整治技術。實施有效的生物修復策略依賴於與生俱來的微生物群落的動態，結構和功能 (Shah et al., 2013)，因此針對污染場址完整的微生物菌相分析是進行生物整治所需要的重要背景資料。最近的多項研究報告指出以 metagenomics 分析之菌相結果，篩選出之菌種與其他方法相比，對環境污染物具有較好的降解率。然而目前就 Metagenomics 技術分析菌相分析，特別是鉻污染水樣，目前尚無文獻報告，因此，本研究利用 Metagenomics 分析台灣南部鉻污染場址菌相，可作為菌種可移除鉻之佐證。

研究架構與實驗流程

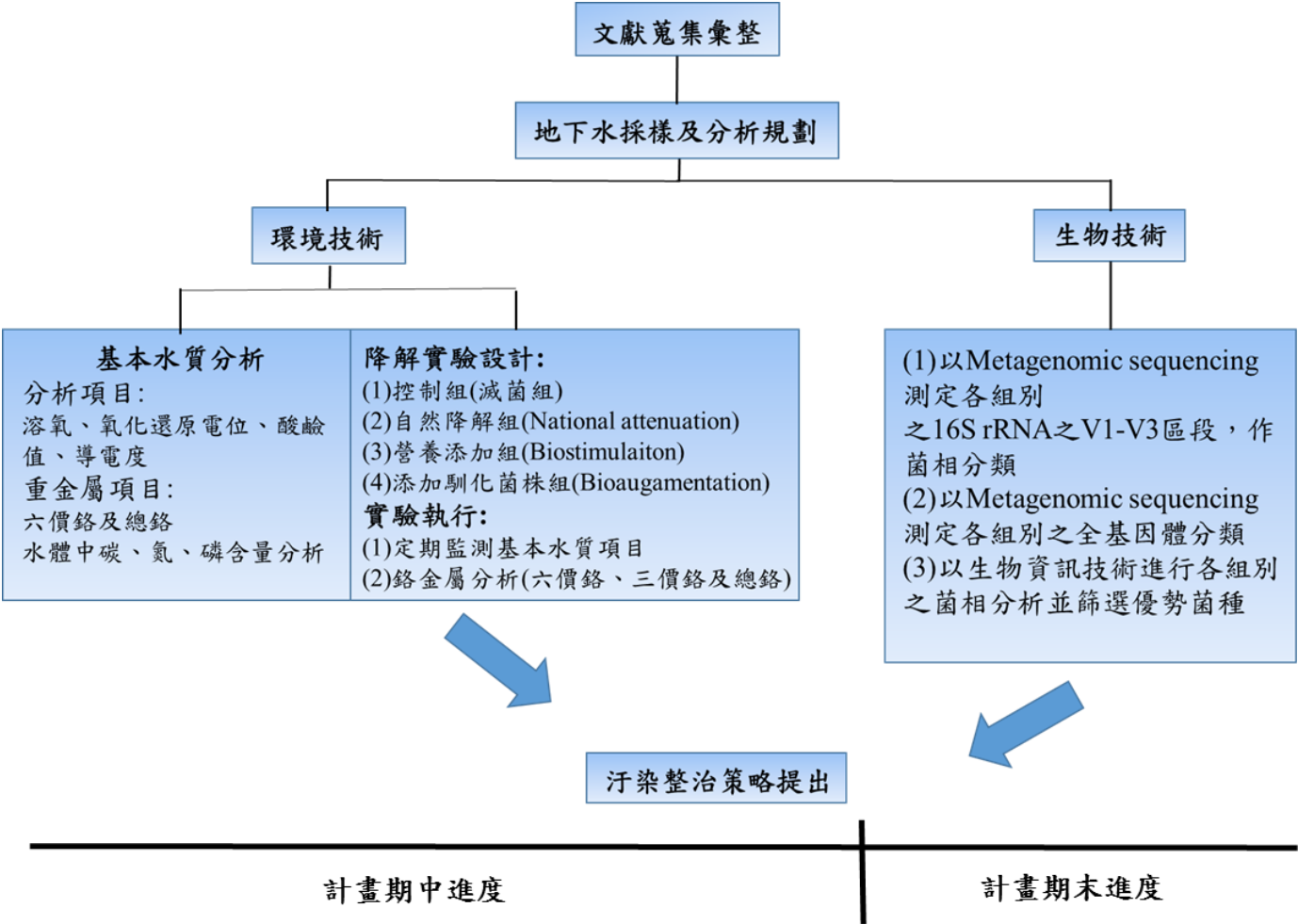


圖 3. 研究架構與實驗流程圖

第三章：研究方法與過程

3.1 試驗地下水之介紹

3.1.1 目前場址營運狀況

本研究污染場址座落台南永康區，土地使用分區類別為建地，目前使用現況為工業使用且正常營運中，原電鍍區污染場址面積大小約 63 m²，發現鄰近該電鍍公司出現六價鉻電鍍液洩漏處，該場址之地理位置圖，如圖 4 所示。

污染場址的東北方約 3 公里處為永康工業區，場址的四周多為工廠，夾雜部份住家；場址北邊約 3 公里為鹽水溪，東邊約 4 公里為許縣溪；東北東方向約 7 公里為潭頂淨水廠(新市鄉)(圖 4)。

本場址及鄰近地區未使用該地地表水及地下水作為飲用水源。由於本地地下水污染區域經由「土壤與地下水污染整治場址土壤、地下水調查評估結果報告(修正二版)」的調查結果顯示引響範圍不大，因此附近區域的地下水使用均未發生本案污染物擴散被抽出的情形。

該區地下水井均為加壓抽取式深水井(深度達 15 米以上)，研究所採集為廠內污染濃度最高點位 YL-10 井，樣品以聚丙烯瓶密閉乘裝且全程以 4℃ 進行保存，並儘快送回實驗室，進行水質基本性質分析及前導試驗與菌種馴化培養。

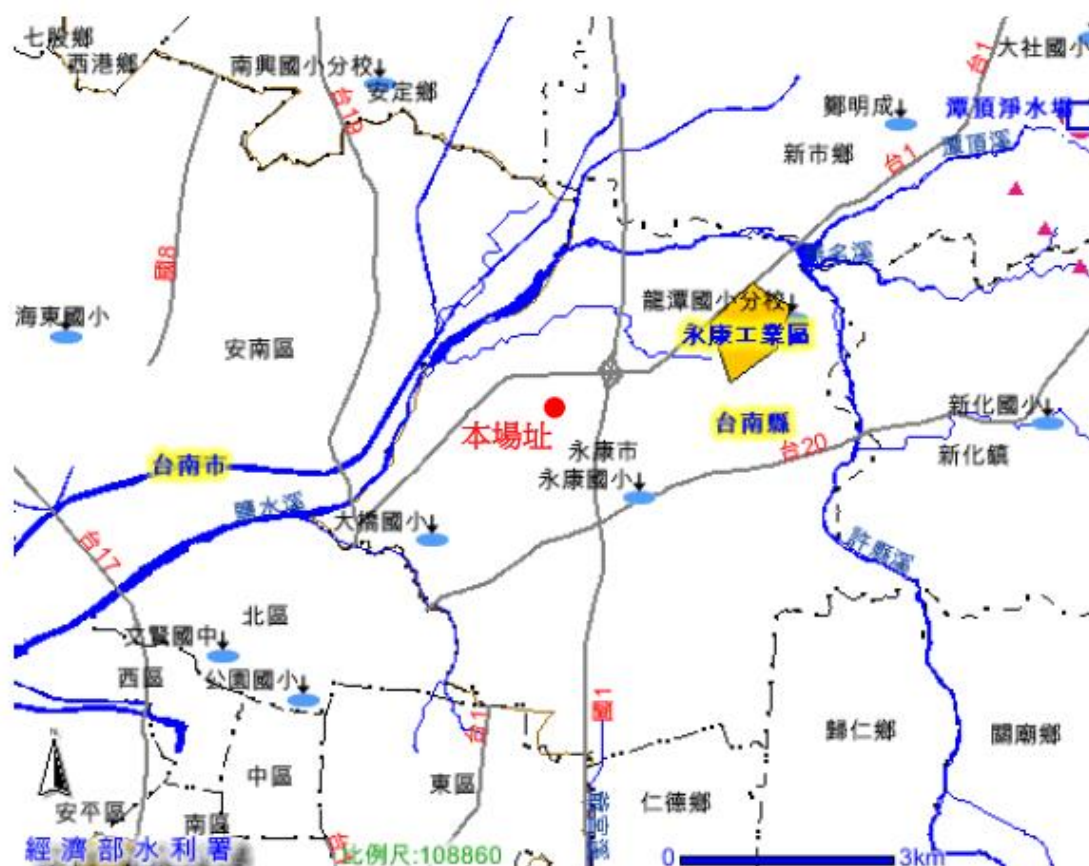


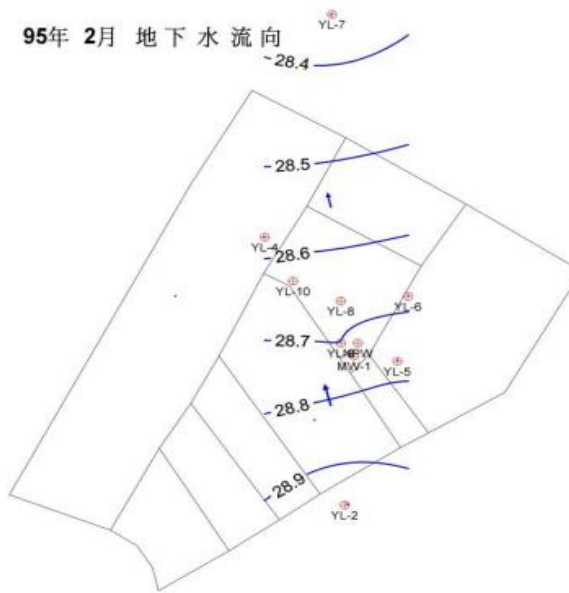
圖 4. 場址之地理位置圖

場址整治前地下水流的調查結果，非受壓含水層進行四次微水試驗(slug test)，得其平均的水力傳導係數(hydraulic conductivity)為 1.1×10^{-4} m/s；由 92 年 7 月 11 日的水位等高線圖，得場址的水力坡降(hydraulic gradient)為 0.006，假設有效孔隙度為 0.3 (總孔隙度為 0.4)，則場址的地下水流速估計為 70 公尺/年 (20 公分/天)。

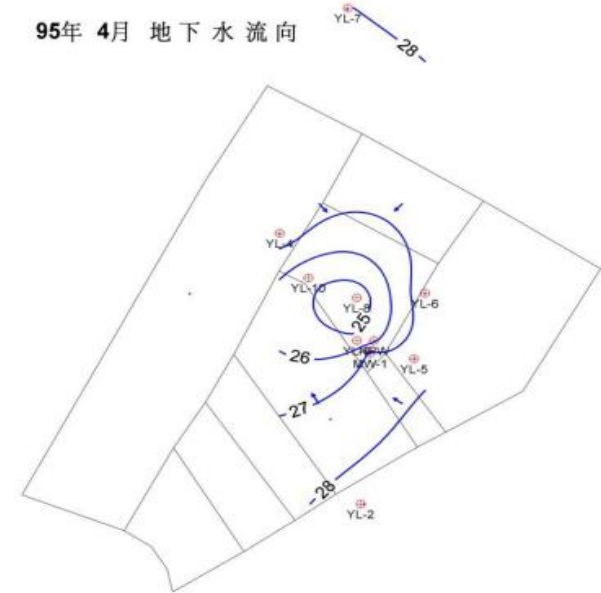
圖 5 為此場址於不同時間的地下水水位圖，圖 5(a)顯示在整治措施實施前，亦即沒有抽水與土壤淋洗等地下水注入的動作，背景地下水由南向北流，雖然大台南的區域性地下水流向西或西南邊的海岸線，但是此場址的地下水向北流，原因可能是地下水補注到場址北邊的鹽水溪，在污染整治計畫的執行期間到現在，持續監測此場址地下水水位變化的資料顯示，此背景地下水流向仍由南向北流。



(a)



(b)



(c)

圖 5. 為該場址地下水水位圖及流向圖
(a)及(b)未抽水； (c)抽水量：50 公噸/日

3.1.2 污染情形

整治場址公告中，地下水遭受污染的污染物為重金屬鉻。根據「土壤與地下水污染整治場址 土壤、地下水調查評估結果報告(修正二版)」的調查結果，最高污染濃度總鉻 224 mg/L，原污染範圍為以沿著鉻酸槽為軸線，在監測井 MW-1 與 YL-10 之間，長度約 12 公尺，深度以地下水位線(4 m deep)以下，透水層以上(aquitard, 10 m deep)。污染物位置涵蓋監測井 YL-8, YL-9, YL-10, 和 MW-1，並推測廠區內原鉻酸槽正下方，深度在最低地下水位線約 4 公尺處以上到地表。土方面積監測井部份約 27 m²，廠區內鉻酸槽約 36 m²，總面積約 63 m²。因此土方體積約 252 m³。場址監測井相關位置如圖 6 (a)及 (b)所示。

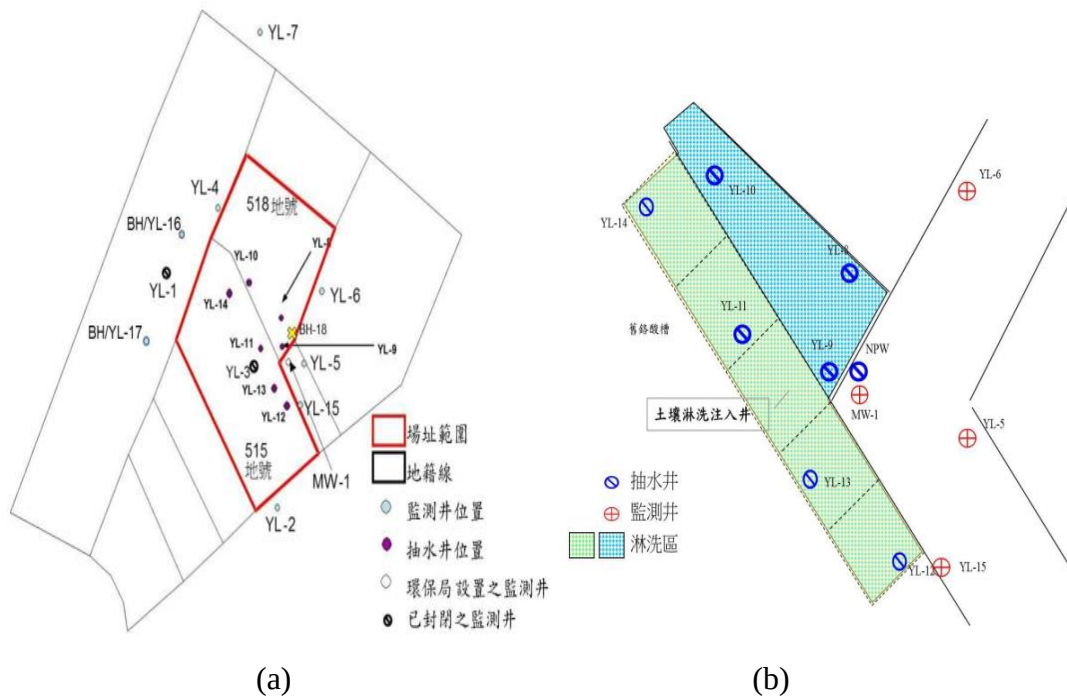


圖 6. 場址之配置及井號示意圖

(a) 場址現有監測井與抽水井相關位置；(b) 現有監測井與抽水井位置

3.2 地下水基本性質分析

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

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

3.2.2 地下水重金屬分析 (三價鉻、六價鉻、總鉻)

(1) 六價鉻分析

研究分析採用方法是參考 NIEA W320.52A 及 APHA, AWWA, WEF 方法 (1995) 以等量比例方法縮小整合之方法，其方法檢測概念以不違背標準檢測方法為主。先取 4.7 mL 原地下水樣於室溫下，加入約 12 μL 濃磷酸及 0.1 M 硫酸溶液調整至 pH 介於 2.0 ± 0.5 ，再加入 100 μL 二苯基二氨脲溶液，混合均勻並以試劑水 (deionised water) 定量至 5 mL 量瓶。靜置 10 分鐘後，再以分光光度計於波長 540 nm 讀取吸光度且紀錄數值，再以六價鉻檢量線 ($R^2 \geq 0.9995$) 求得濃度值 ($\text{mg Cr}^{6+}/\text{L}$)。

(2) 總鉻分析

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

(3) 三價鉻分析

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

3.2.3 地下水總溶解性有機碳分析

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

3.2.4 地下水總氮分析

本研究分析方法是採納水中氮氮檢測方法—靛酚比色法 (NIEA W448.51B)、水中凱氏氮檢測方法 (NIEA W451.51A)、水中亞硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法 (NIEA W418.52C) 及水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法 (NIEA W419.51A)，為我國環境保護署檢驗所公告之方法。

(1) 氮氮分析

水中凱氏氮操作方法是取 50 mL (或適量稀釋水樣) 於消化管中，加入 4 mL 硼酸鹽緩衝溶液，安裝至蒸餾裝置調整蒸餾時間為 480 秒及調整氫氧化鈉溶液加入量 (控制 pH 至 9.5) 且以硫酸吸收溶液進行吸收後，取出適量 (稀釋) 體積，再加入酚溶液、亞硝酸鐵氰化鈉溶液及氧化劑溶液進行 1 小時呈色，並於波長 540 nm 進行吸光度分析，由合宜標準之氮氮檢量線求得換算得出濃度值 $(\text{mg NH}_3\text{-N/L})$ 。

(2) 凱氏氮分析

凱氏氮是取 50 mL (或適量稀釋水樣) 於消化管中，添加 10 mL 消化液及少許沸石，置入 380°C 消化裝置中消化 2 小時，待冷卻後以試劑水定量至 50 mL，然後依照水中氮氮檢測方法—靛酚比色法步驟操作，求得水中之總凱氏氮及氮氮含量 (mg TKN-N/L) 。

(3) 亞硝酸鹽及硝酸鹽分析

水樣以 0.22 μm 進行過濾 (去除懸浮固體及細胞干擾)，取 50 mL (或適當稀釋水樣) 以 1 M 鹽酸或氫氧化銨調整水樣 pH 值於 5–9 間，再加入呈色試劑，靜置 10 分鐘後於波長 543 nm 下，量測吸光值，並代入適當檢量線，換算求得水樣亞硝酸鹽濃度 ($\text{mg NO}_2\text{-N/L}$)；而硝酸鹽則是以取 50 mL (或適當稀釋水樣) 過濾水樣，加入 1 mL 1 M 鹽酸後，於波長 220 nm 及 275 nm 下操作分析，利用公式 $\text{OD}_{\text{net}} = \text{OD}_{220} - (2 \times \text{OD}_{275})$ ，求得吸光度並以檢量線求得該濃度，即硝酸鹽濃度值 ($\text{mg NO}_3\text{-N/L}$)。

3.2.5 地下水中總磷分析

本研究以參考水中磷檢測方法—分光光度計／維生素丙法 (NIEA W427.53B) 為操作範例。先取 50 mL (或適當稀釋) 水樣於消化管中，分別添加濃硫酸及濃鹽酸 (2:1) 並加入些許沸石，置入 380°C 消化裝置中消化 2 小時，待樣品冷卻至室溫加入 1 滴酚酞指示劑，以氫氧化鈉溶液調整水樣至淡粉紅色出現，再以試劑水定量至原體積 (50 mL) 且置於三角錐形瓶中，再加入混合試劑，混合均勻後，呈色 10–30 分鐘，以分光光度計 (DR-6000) 於波長 880 nm 測得吸光值，並由檢量線求得水中總磷濃度 (mg P/L)。

3.3 鉻酸鹽菌馴化培養

將現地地下水以等比 (v/v) 1:1 添加含 40 ppm Cr^{6+} nutrient broth (NB) 混和，曝氣至微 (缺) 氧狀態 (0.10 mg/L) 以 200 rpm 30°C 進行現地地下水菌種培養，過程中利用分光光度計以吸光值 OD_{600} 進行量測，待吸光值大於 0.5 後取菌液與含 40 ppm Cr^{6+} nutrient broth (NB) 以 1:9 比例混和進行繼代，再以 200 rpm 30°C 進行培養，待吸光值大於 0.5 時，重複繼代步驟，第二次繼代完成菌液培養至吸光值大於 0.5 時，即可作為後續微型降解實驗植菌組馴化菌液使用。

3.4 現地地下水六價鉻還原微型試驗 (microcosm experiments)

汙染場址地下水六價鉻需藉由生物厭氧代謝作用還原成三價鉻降低毒性，由於地下水中缺乏大量穩定的營養來源，因此自然分解速率通常較低，本研究使用加強式生物復育法進行實驗室模場試驗，模擬在最佳環境下地下水微生物還原六價鉻速率，並比較單純使用生物刺激法或結合生物強化法情況下，能達到最佳還原速率之條件。

本試驗使用微生物易利用及攝取之營養基質 (Nutrient broth, NB) 作為碳源，試驗組別分為 4 組，分別為控制組 (Control, C)、自然降解組 (IG)、營養添加組 (IN)

與植菌組 (IBN)，以厭氧培養方式模擬污染場址現地地下水狀態進行試驗，各設計組別如下與表 7 所示。

(1) 控制組 (Control, C)

控制組為鉻污染地下水進行滅菌後作為其他組別之對照組。將 3L 鉻污染之地下水裝入血清瓶添加 0.35% (3.5 g/L) NB 培養基，再以高壓蒸氣滅菌釜設定溫度 121°C，壓力 1.2 Kg/cm²，滅菌 40 分鐘後待其溫度降至室溫，再以曝氣裝置 (含 99.5% 高純度氮氣) 灌氣至溶氧量低於 0.1 mg/L，添加 2,000 ppm 之氯化汞確保微生物無法存活，再將水樣於厭氧操作箱中分別注入滅菌之反應玻璃瓶中。

(2) 自然降解組 (IG)

本組別為直接取鉻污染地下水，曝氣至溶氧量低於 0.1 mg/L 後，直接將水樣於厭氧操作箱中分別注入滅菌之反應玻璃瓶中，模擬現地微生物自然降解六價鉻的趨勢。

(3) 營養添加組 (IN)

本組別為取鉻污染地下水，添加等同於控制組營養基質添加量 0.35% NB 培養基，曝氣至溶氧量低於 0.1 mg/L 後，再將水樣於厭氧操作箱中分別注入滅菌之反應玻璃瓶中，模擬以生物刺激法添加營養源至現地污染地下水，促進微生物生長增強六價鉻還原效率。

(4) 馴化菌株組 (IBN)

本組別為取鉻污染地下水，添加等同於控制組營養基質添加量 0.35% NB 培養基與添加 5% (v/v) 馴化菌液，曝氣至溶氧量低於 0.1 mg/L 後，再將水樣於厭氧操作箱中分別注入滅菌之反應玻璃瓶中，模擬將生物刺激法結合生物強化法，於現地污染地下水添加營養源並額外添加經由含鉻培養基馴化後之菌株，比較結合生物強化法之可行性。

表 7. 各實驗組別之所添加內容物

實驗組別	代號	添加內容物	初始溶氧值 (mg DO/L)	試驗操作條件
控制組	C	(1) 0.35% NB 培養基 (2) 2,000 mg/L 之氯化汞 (3) 滅菌污染地下水		
自然降解組	IG	(1) 僅現地鉻污染地下水		溫度：室溫
營養添加組	IN	(1) 0.35% NB 培養基 (2) 現地污染地下水	<0.1	轉速：50 rpm
馴化菌株組	IBN	(1) 0.35% NB 培養基 (2) 5% 地下水馴化菌液 (3) 滅菌污染地下水		

3.5 以一階反應探討六價鉻生物還原與去除率

生物還原六價鉻研究過程中，一階衰減模式常被應用計算微生物分解之效率外(Girotti et al., 2008)。本試驗結果依 Mishra 等人(2012)微生物一階還原反應模式，來表示微生物還原六價鉻過程其反應速率，此模式中，污染物之分解速率和六價鉻濃度差異呈指數衰減關係，微生物一階還原方程式如下所述式(1)：

$$\triangleright y = \frac{c}{c_0} = ae^{-kt} \quad (1)$$

轉為為線性模式時，如式(2)：

$$\triangleright \ln \frac{c}{c_0} = \ln a - kt \quad (2)$$

其中，各計算參數所代表意義如下所述：

a 為反應常數

y 為 t 時之六價鉻還原率(%)

c 為初始(0 時)之六價鉻濃度值(mg/L)

C0 為時間 t 時之六價鉻濃度(mg/L)

k 為反應速率常數(day⁻¹)

t 為反應時間(day)

3.6 生物還原沈澱產物分析

本研究之試驗組生物還原沈澱產物分析以環境掃描式電子顯微鏡結合 X 光成分分析系統 (SEM-EDS)進行分析，藉由參考 Das 等人 (2014)及 Pan 等人 (2014)所採用之檢測方法進行微觀調查，以利鑑別生物還原產物之性質及菌體細胞與沈澱產物之相關特徵。

試驗分析主要流程取試驗組水樣以迴轉式震盪器充分混合 10 分鐘，再以真空過濾以 0.22 μm 孔徑玻璃纖維濾紙進行過濾並以負壓式冷凍乾燥裝置進行 2 至 3 天的乾燥後，以真空加壓鍍金上膜，接著使用 SEM-EDS 觀察還原沈澱產物的型態及主要元素成分構成。

Das 等人在 2014 年為了確認細菌細胞與還原產物間之關聯性，其首先以過濾薄膜進行過濾，接著再以 pH 8.0 緩衝液及 3% (v/v) 戊二醛沖洗數次，再以 Tris-HCl 緩衝液洗滌數次，最後以去離子水進行洗淨且樣品用乙醇沖洗後進行一般乾燥，並將其鍍金後，以 SEM (Jeol-840A, Japan) 於 200kV 進行觀察及同時使用 EDX 進行細菌細胞的所需元素分析。另一方面，Pan 等人 (2014) 則是將樣品先進行離心，將細胞沈澱物使用 2% 戊二醛浸泡 24 小時，再用 0.1M SDA (sodium dimethyl arsenate) buffer 每 3 分鐘沖洗 (共三次) 後，以 1% osmic acid 浸泡 2 小時。後續再以 0.1M SDA buffer 清洗三次 (每 3 分鐘一次) 及分別利用不同濃度丙酮 (35%，50%，70%，80%，95% 及 100%) 每 3 分鐘進行脫水，並由 SEM (Jeol JSM-6700F) 結合 EDS (Oxford, Japan) 進行細胞沈澱分析。

3.7 抽取地下水總 DNA

地下水總 DNA 抽取使用 DNeasy PowerWater Kit (Qiagen)，詳細操作流程可參考 Qiagen 網站

(<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=bb731482-874b-4241-8cf4-c15054e3a4bf&lang=en>)

3.8 次世代定序菌相分析組裝流程

3.8.1 微生物 16S rDNA V3-V4 區域放大純化

使用專一性引子以 PCR 擴增微生物 16S rDNA V3-V4 區域後，使用 2% 瓊脂凝膠進行電泳檢測。切下 400-450bp 的明亮條帶，以 Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 純化 PCR 產物。所有 PCR 反應均用 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) 進行。

3.8.2 建庫與定序

使用 TruSeq® DNA PCR-Free 樣品製備試劑盒 (Illumina, USA) 按照製造商的建議進行建庫與接上 barcode，建庫後之樣品使用 Qubit® 2.0 螢光光度計與 Agilent Bioanalyzer 2100 系統進行建庫品質評估，品質良好之樣品使用 Illumina HiSeq2500 平台進行 250 bps pair-end 定序。

3.8.3 定序結果組裝

將定序完成之 raw data 去除 barcode 與 primer 序列後，以 FLASH (V1.2.7，<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Caporaso et al., 2011) 軟體進行組裝，組裝完成之序列以 QIIME (V1.7.0，<http://qiime.org/index.html>) (Youssef et al., 2009) 進行

quality control 以獲得品質良好之序列 (Segata et al., 2011)。使用 UCHIME 算法 (UCHIME Algorithm, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) 將序列與 Gold 資料庫 (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) 進行比對檢測嵌合體序列，移除後獲得有效序列 (Foster et al., 2017)。

3.8.4 OTU 群集與物種註釋

序列分析由 Uparse 軟體 (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) (Asnicar et al., 2015) 進行。具有 $\geq 97\%$ 相似性的序列被分配給相同的 OTU。篩選每個 OTU 的代表性序列使用基於 RDP 的 GreenGene 數據庫 (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (Jami et al., 2013) 進行註釋。

第四章：實驗結果

4.1 地下水基本性質分析

根據土壤及地下水污染整治法記述，地下水之八大重金屬管制標準規定六價鉻管制值於第一類及第二類地下水質限值分別為 0.05 mg/L 及 0.50 mg/L (表 8)，依此，認研究場址之六價鉻污染地下水測得 Cr^{6+} 濃度為 40.22 mg/L，於第二類用途已超過管制標準值八十倍，依現地情況 (地下水農作灌溉等用途) 及污染物質特性 (高毒性與移動性) 判定，該污染場址是一處不容忽視之鉻酸鹽地下水污染整治場址。

根據地下水質基本性質(表 9)，發現該污染場址地下水之碳、氮及磷源比為 1.0:2.6:0.8 (TDOC、TN 及 TP)，顯示污染場址地下水中碳源明顯不足，微生物難以大量生長，而六價鉻還原速率與微生物數量有高度相關性，因此後續實驗將以生物刺激法，於污染地下水中添加常見高營養液態培養基 NB 作為碳源，長時間觀察碳源增加後六價鉻速率變化。

表 8. 土壤及地下水之八大重金屬污染物質現行制標準

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

a. 第一類：飲用水水源水質保護區內之地下水。

b. 第二類：第一類以外之地下水。

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

表 9. 地下水之水質基本性質分析

分析項目	單位	檢測數值
酸鹼值 (pH)	—	6.98
溶氧 (DO)	mg/L	5.11
電導度 (EC)	μS/cm	934
氧化還原電位 (ORP)	mV	206
三價鉻 (Trivalent chromium)	mg/L	1.29
重金屬 六價鉻 (Hexavalent chromium)	mg/L	40.2
總鉻量 (Total chrome)	mg/L	41.5
總溶解性有機碳 (TDOC)	mg/L	1.02
總氮 (TN)	mg/L	2.61
總磷 (TP)	mg/L	0.89

4.2 現地地下水六價鉻還原微型試驗

4.2.1 地下水六價鉻降解趨勢

批次實驗結果如下表 9 顯示，各組別經過 123 天六價鉻濃度分別由起始濃度 41.51 mg/L 降至控制組 (38.64 mg/L)、自然降解組 (36.43 mg/L)、營養添加組 (20.62 mg/L) 與馴化菌株組 (5.79 mg/L)，由此結果得知自然降解組六價鉻濃度經過 123 天實驗雖有緩慢下降，但與控制組相差不多，顯示原污染場址地下水若不處理其自然降解速率極低，營養添加組經過 123 天處理相較於控制組雖能有效降低六價鉻濃度，但仍有一半六價鉻存在，馴化菌株組效果最佳，相較於其他組別六價鉻下降速率最高。

表 10. 控制組與其他組別六價鉻濃度表

實驗組別	Control	IG	IN	IBN
第 0 天 (mg/L)	41.51	41.51	41.51	41.51
第 123 天 (mg/L)	38.64	36.43	20.62	5.79

由圖 7 可見於 123 天時各組別六價鉻殘餘率分別為 C (93.09%)、IG (87.73%)、IN (49.67%) 與 IBN (13.95%)，由圖可知，C、IG、IN 及 IBN 組別於第 123 天降解濃度趨勢分別為 $IBN > IN > IG > C$ 組，因 IN 添加營養鹽，能有效刺激現地微生物大量生長促進降解六價鉻污染物外，初期微生物於還原六價鉻相當良好，唯在第 81 天後，IG 及 IN 組六價鉻還原速率逐走向趨緩，而 IBN 組則是在第 102 天時，才逐漸反應還原六價鉻趨緩情況，推估是微生物因營養缺乏及降解過程副產物 (ROS) 抑制產生 (Chi et al., 2013)，使得微生物生長率低於死亡率，導致微生物代謝及生物還原力降低。

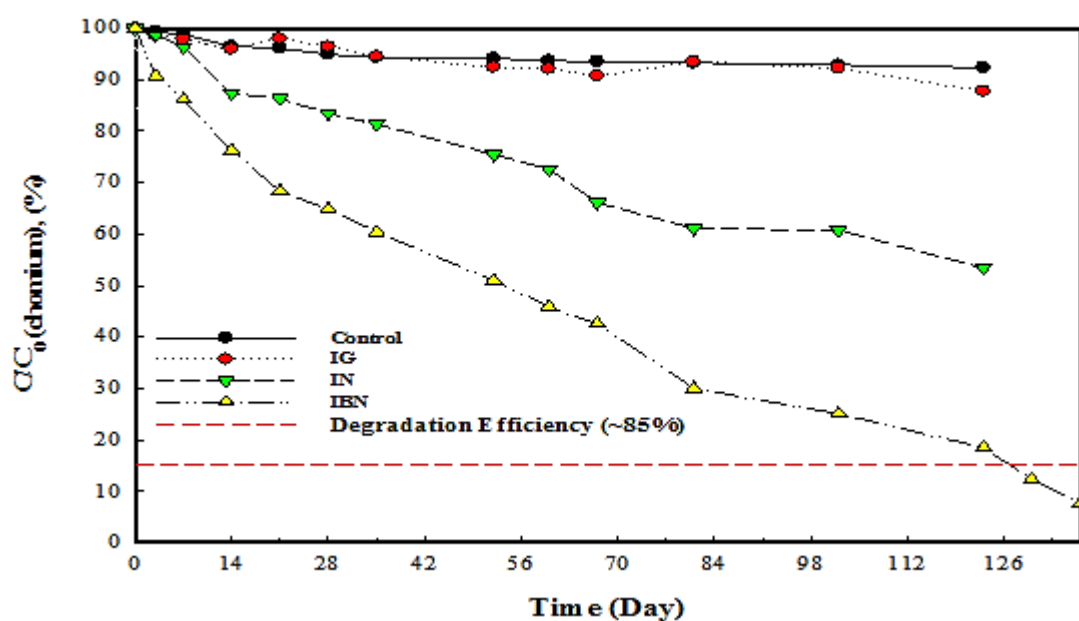


圖 7. 控制組與其他組別之六價鉻殘餘率圖

4.2.2 以一階反應探討六價鉻生物還原與去除率

本研究探討 0 - 21 天及 35 - 137 天兩階段之六價鉻還原之 k 值，判斷反應前 3 週與後期生物反應速率之差異。由表 10 中知道，各組別控制組 (C)、自然降解組 (IG)、營養鹽組 (IN) 及馴化菌組 (IBN)，其第一階段(第 0 - 21 天)反應速率為 C 組 $5.57 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1}$ 、IG 組 $1.14 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$ 、IN 組 $1.07 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$ 與 IBN 組 $8.16 \times 10^{-3} \text{ day}^{-1}$ ；第二階段(第 35 - 137 天)反應速率以 C 組 $5.48 \times 10^{-5} \text{ day}^{-1}$ 、IG 組 $7.19 \times 10^{-5} \text{ day}^{-1}$ 、IN 組 $1.49 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1}$ 與 IBN 組 $2.43 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1}$ 。由此結果可得知，第一階段反應速率皆大於第二階段，IBN 組於第一階段反應速率遠大於其他組別，顯示添加馴化菌株確實能顯著的提高六價鉻的還原速率，而第二階段 IN 與 IBN 組之反應速率降低且差距縮小，推測可能為添加的營養物質被微生物消耗使微生物缺乏能量來源作為六價鉻還原使用，因此導致六價鉻還原效率降低。

表 11. 各組之一階反應速率常數 k 值及六價鉻總還原率

組別	第一階段 反應速率 k_1 值(d^{-1})	第二階段 反應速率 k_2 值(d^{-1})	六價鉻總還原率(%)
Control	5.57×10^{-4}	5.48×10^{-5}	7.65
IG	1.14×10^{-3}	7.19×10^{-5}	12.23
IN	1.07×10^{-3}	1.49×10^{-4}	46.61
IBN	8.16×10^{-3}	2.43×10^{-4}	92.44

4.2.3 各試驗參數與微生物之關聯性探討

4.2.3.1 批次試驗之酸鹼值(pH)的變化

酸鹼值高低通常決定污染物質於水體中之分佈和呈現型態、化學沈澱及生物反應速率、微生物生長環境適宜性。

由 pH 變化趨勢情況 (圖 8)，IN 及 IBN 組別於第 0-7 天 pH 值分別從 8.71 及 9.02 降至 7.78 及 7.74 之情況，於第 7 天後皆 pH 皆維持穩定狀況，推測此兩組別相較於 IG 組之微生物之質量較高，而產生脂肪酸量較高的緣故，因此 pH 值較為偏低，此外，在控制組別 (Control) 中，能夠發現添加氯化汞之反應，而解離產生氯離子 (Cl^-) 及水解之質子 (H^+) 結合成氯化氫 (HCl) 溶液或其他偏酸性產物，使 pH 呈現弱酸性之環境。

早期研究表示由不同環境分離細菌進行還原六價鉻之適合 pH 值在 6.0 - 9.0 (Mishra et al., 2012)，本研究結果 IN 及 IBN 組別之 pH 值為 7.0 - 8.0 範圍是適合

微生物生長的情況，其亦表明六價鉻及三價鉻 ($\text{Cr}^{6+}/\text{Cr}^{3+}$) 之間的比值，pH 值的高低是決定最終六價鉻還原之標準氧化還原潛勢的強弱因素之一。

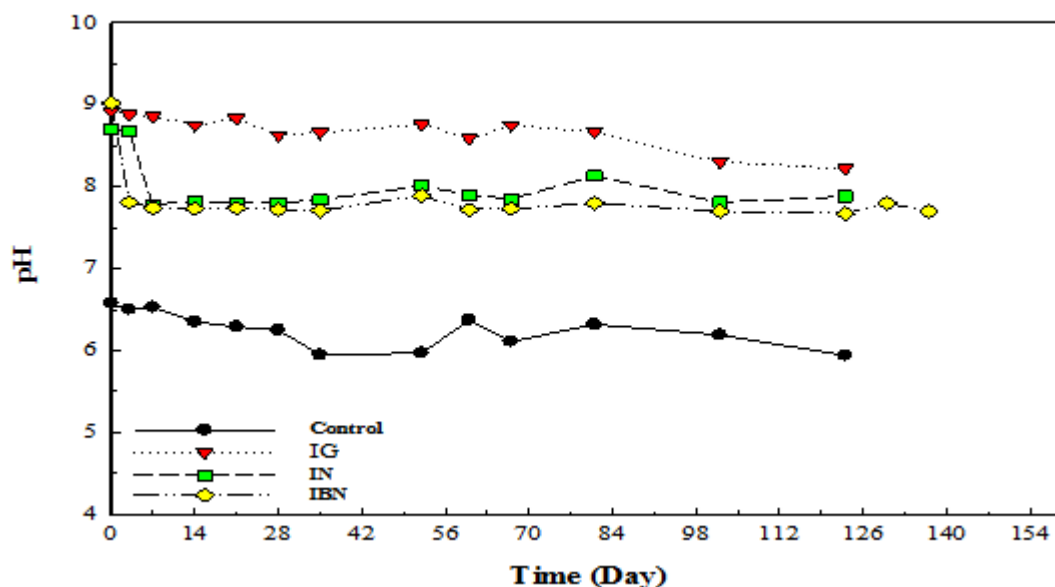


圖 8. 各試驗組別之酸鹼值 (pH) 的變化趨勢圖

4.2.3.2 批次試驗之電導度 (EC) 的變化

由圖 9 研究結果顯示，以含有菌群之微生態系統 (microcosm) 反應組別中，IG 組別隨時間 (第 0-123 天) 電導度呈下降之趨勢 (EC 由 1.10 至 0.70 (ms/cm))，而其他組別 (如 IN 及 IBN 組) 之電導度則有浮動情形，由 IG、IN 及 IBN 組別看來，電導度趨勢強度相當明顯地依序為 IBN 組 > IN 組 > IG 組。根據了解，電導度之強度與水中離子總濃度 (自由電子強度)、移動性、價數、相對濃度及水溫有關之外 (行政院環保署，2015a)，微生物及二氧化碳濃度變化亦會促使導電率之上升。推測初期 IN 及 IBN 組別電導值升高是因為微生物大量生長速度遠大於營養消耗及污染物還原率而造成，經過第 35 天試驗期後，而維持兩者之動態平衡，第 52 天開始呈現導電度下降現象，是因為水中之污染離子及生物細胞之結合，發生生物沈澱的作用，而累積至反應器之底部地情形。

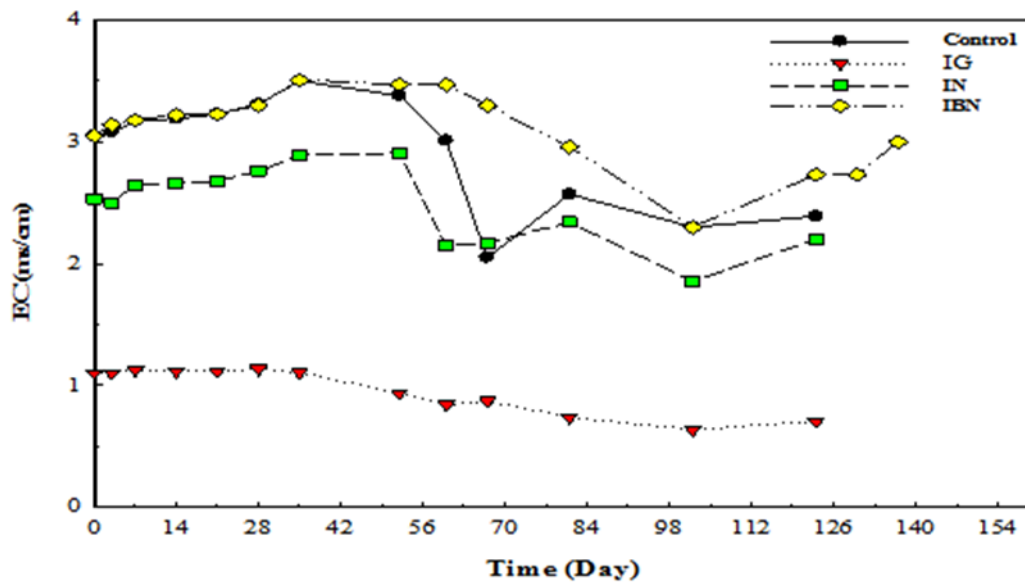


圖 9. 各試驗組別之電導度 (EC)的變化趨勢圖

4.3.2.3 批次試驗之溶氧 (DO)的變化

由圖 10 結果顯示，在試驗期間（第 0 - 137 天），溶氧量皆維持 1.15 mg/L 以下，是符合一般地下水還原所要求之環境條件。實驗於第 35-60 天及第 67-102 天時間範圍中，溶氧皆有顯著升高趨勢。從含有微生物之各組別中 (IG、IN 及 IBN 組) 發現，溶氧在第 52 天 (DO_{52})及第 81 天 (DO_{81})也達到最大值情形，分別為 IG ($DO_{52}=1.06$ mg/L 和 $DO_{81}=1.05$ mg/L)、IN ($DO_{52}=1.14$ mg/L 和 $DO_{81}=1.15$ mg/L)及 IBN ($DO_{52}=0.99$ mg/L 和 $DO_{81}=0.98$ mg/L)。

含微生物三個組別中，第 52 天 (DO_{52})及第 81 天 (DO_{81})之溶氧值高低分別為 DO_{52} (mg/L)：IN (1.14)> IG (1.06)> IBN (0.99)與 DO_{81} (mg/L)：IN (1.15)> IG (1.05)> IBN (0.98)。依 DO_1 及 DO_2 之溶氧值前後變化，IG 及 IN 之 DO_{52} 並無明顯差異，然而 IBN 之 DO_{52} 和 DO_{81} 呈現較低之情況，推測經過添加馴化菌株能快速及減緩氧化壓力所造成有害影響。

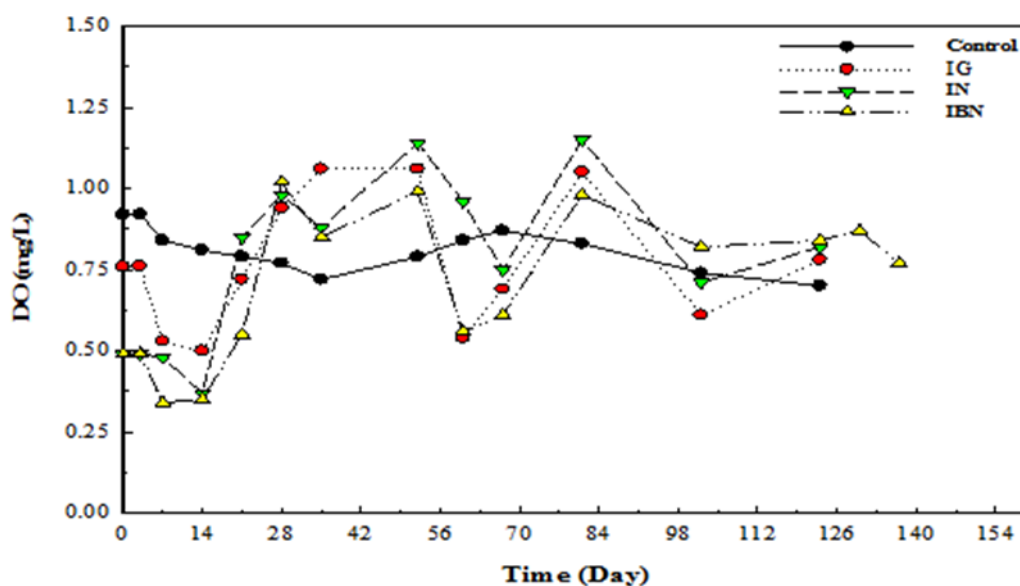


圖 10. 各試驗組別之溶氧 (DO) 的變化趨勢圖

4.2.3.4 批次試驗之氧化還原 (ORP) 的變化

環境狀態中，氧化還原程度電位 (Redox potential) 程度通常電子於介質中傳遞情形及水溶液之氧化還原能力指標，其中最主要電子傳遞表示在污染物處理過程中，電子接受者 (Electron Acceptor, EA) 及電子供給者 (Electron donor, ED) 扮演的角色。

依圖 11 結果表明，添加氯化汞之控制組 (Control) 的氧化還原電位並無明顯變化情形 (ORP (mV) = 238 - 261)，相較於自然降解 (IG)、營養添加 (IN) 及馴化菌組 (IBN) 的反應情況，具有較大差異性；其中，三個組別中氧化還原電位趨勢排序以 IBN 組 > IN 組 > IG 組。因此，比較氧化還原電位與六價鉻還原速率 (表 10) 之關係，可得出 IBN 組之 ORP 還原電位呈現較低趨勢，而六價鉻還原速率則為最高。

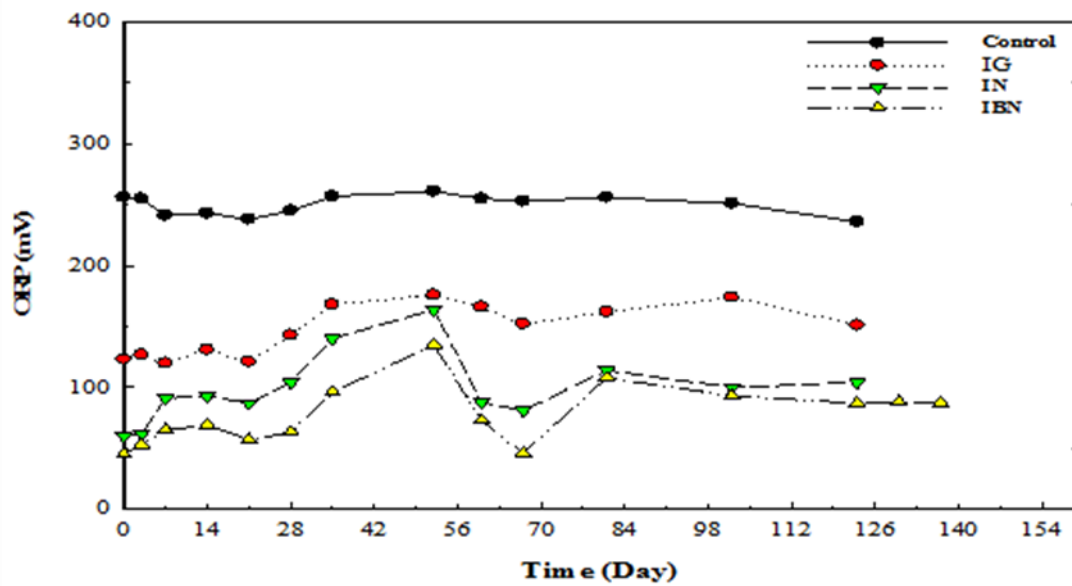


圖 11. 各試驗組別之氧化還原 (ORP) 的變化圖

4.2.3.5 批次試驗之總溶解性有機碳 (TDOC) 的變化

根據圖 12 結果顯示，整個實驗時程，控制組 (Control) 之總溶解性有機碳變化範圍為 3473 - 3431 (mg DOC/L)，並無明顯有機碳被微生物利用；IG 組因沒有足夠營養源提供生物生長，但結果亦顯示仍有碳源被利用情況。而營養添加 (IN) 及馴化菌組別 (IBN) 能清楚發現，從第 0 - 123 天為止，所提供之碳源皆有持續下降趨勢，兩組別之 TDOC 值變化分別為 3455 - 1034 (mg DOC/L) 及 3484 - 864 (mg DOC/L)，依兩者之間 TDOC 差異，則以 IBN 消耗為最佳，推測原因是植菌組之菌群經過馴化，能妥善生長繁殖且持續利用碳源，因此，能夠維持 TDOC 其較佳之利用率。且達到最佳六價鉻還原轉換能力。隨後，個別以 IBN 組別，持續監測結果顯示，其總溶解性有機碳有持續降低情形 (TDOC 濃度變化為 864 降至 796 (mg DOC/L))。

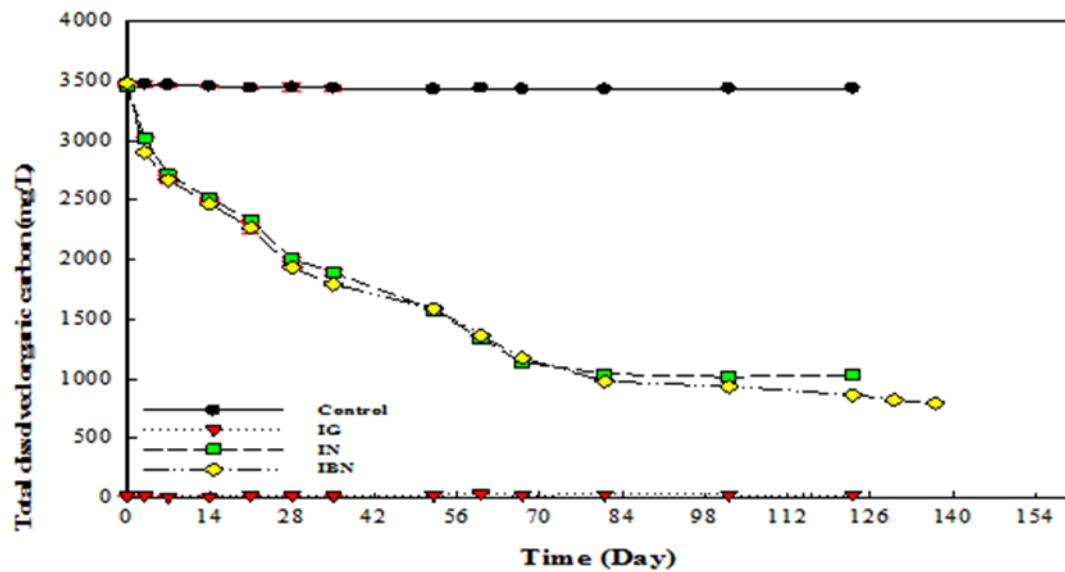


圖 12. 各試驗組別之總溶解性有機碳 (TDOC)變化圖

4.3 生物沈澱之表面特性環境掃描式電子鏡 (SEM)之分析

早期研究普遍指出，六價鉻(Cr^{6+})被還原轉化成三價鉻(Cr^{3+})後，會形成不溶性生物沈澱且直接於生物細胞內累積(Priester et al., 2006; Prigione et al., 2009; Contreras et al., 2011)。

將各實驗組別進行鉻之 Eh-pH 型態分佈比對 (圖 13)沈澱物種，發現所有沈澱物可能之物種為 $\text{Cr}(\text{OH})_3(\text{s})$ 。將含菌組中六價鉻差異最明顯的兩組(IG 及 IBN 組別)進行生物沈澱型態分析，以做為生物還原沈澱物結構特徵探討。由圖 14 結果 (a)–(f) 觀察發現，其兩者皆有生物最終複合產物被產生現象，

依圖 14 (a)及(d)與六價鉻還原效率之顯示，透過放大 200 倍及 5,000 倍宏觀方式發現兩者(IG 及 IBN)沈澱物質量及外觀有很顯著得差異性；此外，根據圖 14 (b)及(e)顯示，將沈澱物之放大倍率分別為 20,000 及 80,000 倍，能夠發現生物最終產物外觀如絮凝膠體狀，值得關注的事，亦發現微生物有附著於沈澱物表面現象，如圓形狀、長桿狀及不定型之物質，此現象與 Chatterjee et al. (2011)發現相似。另一方面，圖 14 (b)及(c)發現，馴化菌組(IBN)於不同時間，生物沈澱絮凝厚度有顯著增厚情況及菌群更加密集。

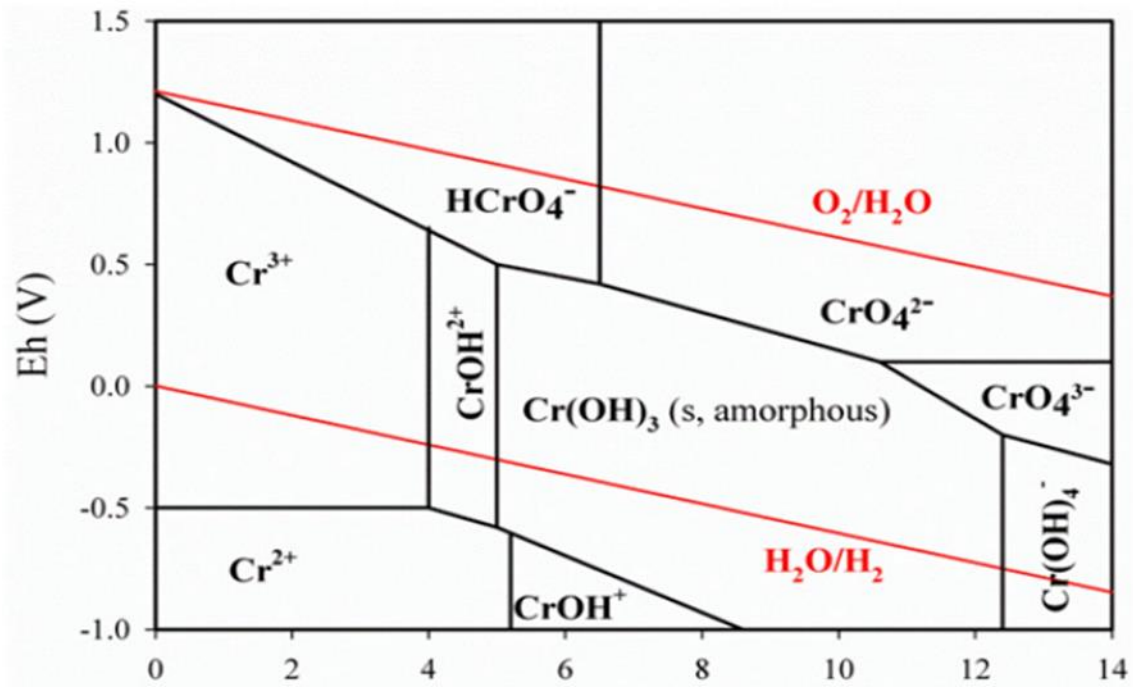


圖 13. 鉻之 Eh-pH 示意圖. (Huang et al., 2014)

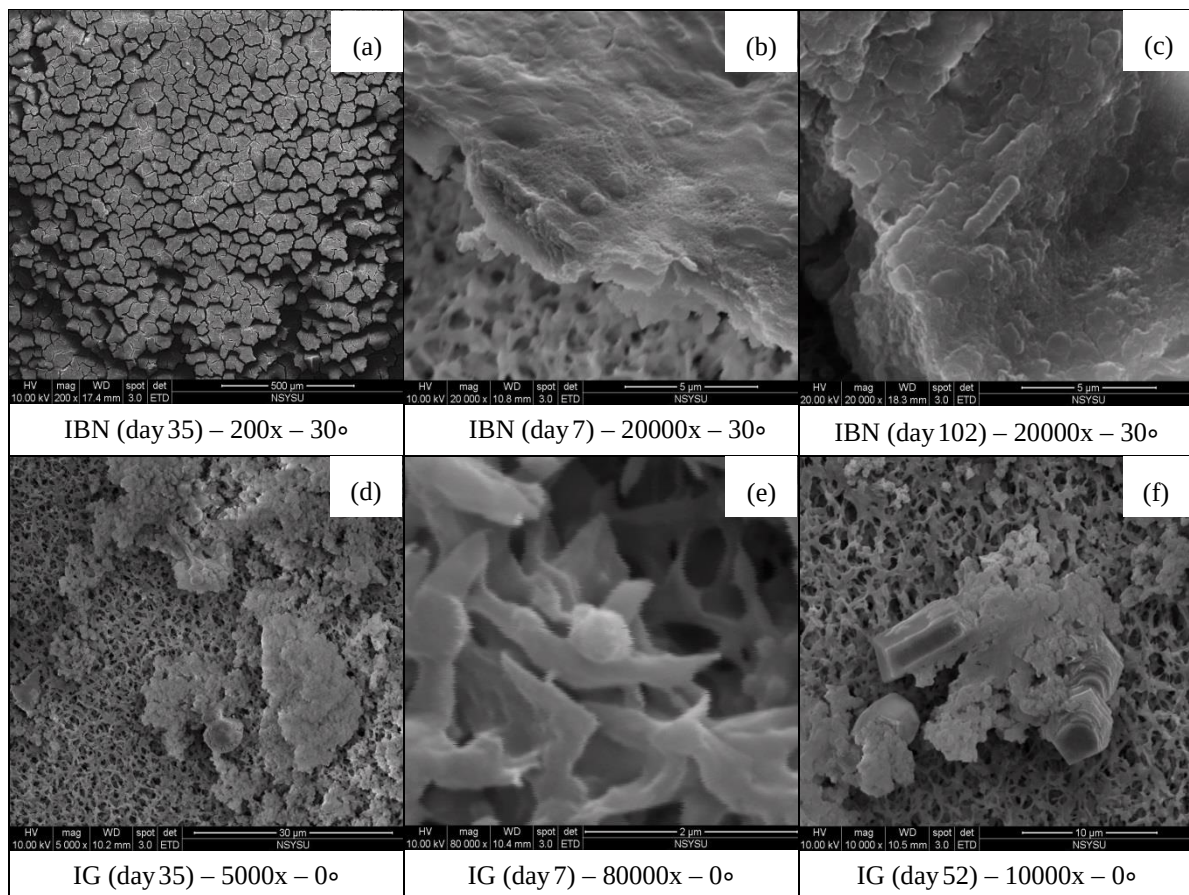


圖 14. 馴化菌組 (IBN) 及 自然降解組 (IG) 之生物沈澱掃描圖像之探討。

圖 (a) – (f) 為 自然降解組 及 馴化菌組 之 沈澱 差異 型態 與 菌種 觀測 圖

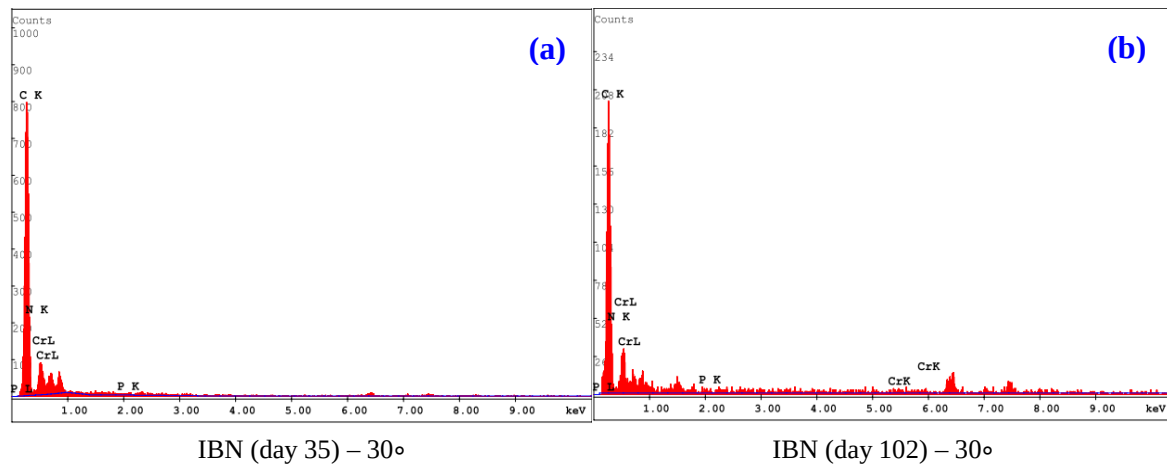
4.4 能量色散 X-射線光譜(EDAX)之成分分析

本研究結果將所有組別沉澱物進行成分分析，依圖 15 (a)及(b)所示，由第 35 天至第 102 天，針對面成分分析發現碳、氮及磷含量有增加之趨勢，推測是細菌增長而導致，前後六價鉻含量亦有減少情況 (31.99 %, wt 至 0.79 %, wt)；接著，由圖 16 (a)及(b)顯示，此沈澱物型態最主要以鉻、鎳、銅及鐵元素沈澱為主。然而，鉻元素則下降現象，依據 Das et al. (2014)表示會有部份鉻殘留於細胞體內，另一部分則以三價鉻沈積及被吸附於細菌細胞體表面，因此，推測此結果與之相似。另外，由 EDAX 生物沈澱產物發現 C：N：P 比值為 93.7：6.0：0.17，代表生物質量及鉻結合產物的出現。

另一方面，根據圖 17 (a)及(b)，針對自然降解組之沈澱物發現有鎳及銅情形，主要原因為現地污染也包含鎳及銅，但仍以 Cr^{6+} 為主要污染物，自然狀態下，雖六價鉻有被還原轉化為三價鉻，但微生物質量不足，所以導致無法細胞內及細胞外吸附並不顯著。因此，在 $\text{pH} \geq 7.0$ 環境下，將導致藉由生物分子進行化學還原產生之三價鉻(Cr^{3+})形成氫氧化物中間產物($\text{Cr}(\text{OH})_3$)附著於細胞表面上，隨後聚積而產生沈澱 (Kanmani et al., 2012)。

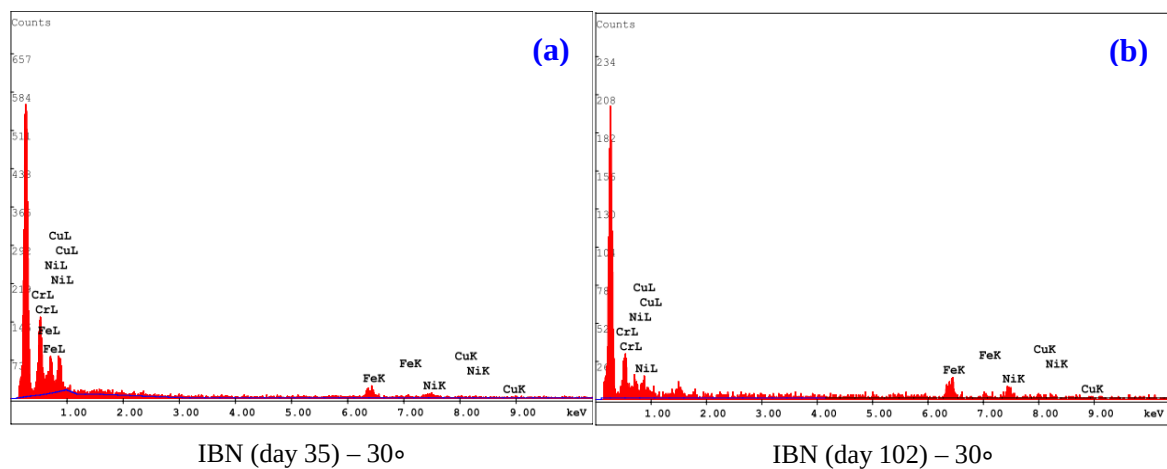
在圖 18 (a)及(b)觀察到，過濾生物產物除含有鉻以外，也發現有鐵及極微量的砷存在，經過從第 52 天及第 102 天菌群作用，能夠察覺金屬鉻及砷減少；此外，鐵含量則為增加情況及碳含量亦有上升趨勢，此現象與植菌種之微生物增生亦同，唯鐵含量之所以上升之情況皆未能了解，必須做更進一步查驗。

最後，針對自然降解組之長方斜晶狀沈澱物進行成分分析 (圖 19)表明，其主要由碳(C)、鐵(Fe)、銅(Cu)及鎂(Mg)構成，由此，能夠瞭解微生物不僅能還原及沈澱三價鉻以外，還包含其他金屬沈澱物之還原作用，像是硫化鐵、硫化銅或氫氧化鎂沈澱物產生，亦能助於目標污染物外之金屬移除地功能。



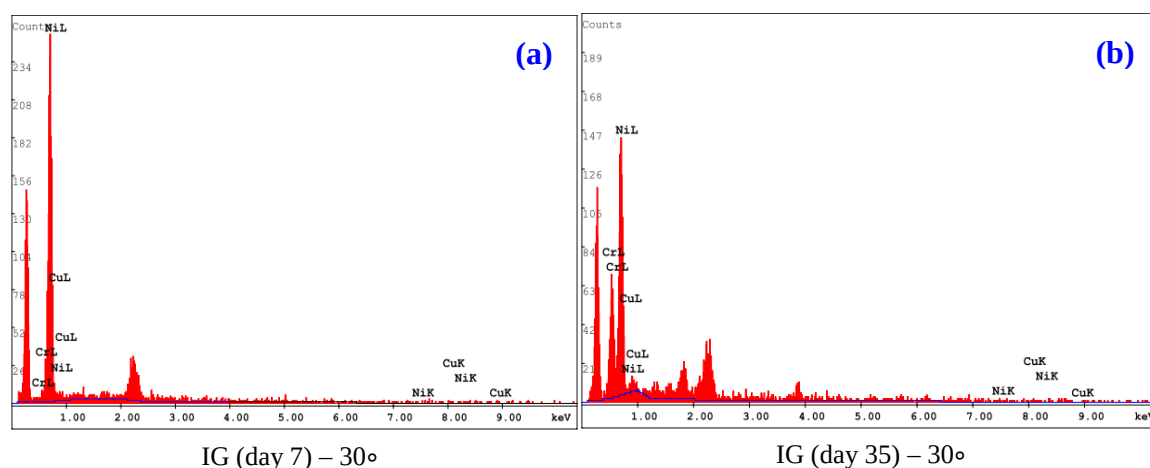
Element	Day 35		Day 102	
	Wt(%)	At(%)	Wt(%)	At(%)
C	65.32	87.11	91.92	93.65
N	2.62	3.00	6.87	6.00
P	0.07	0.03	0.43	0.17
Cr	31.99	9.85	0.79	0.18

圖 15. 植菌組沈澱物之微生物必需元素及鉻元素之變化 (a)第 35 天；(b)第 102 天



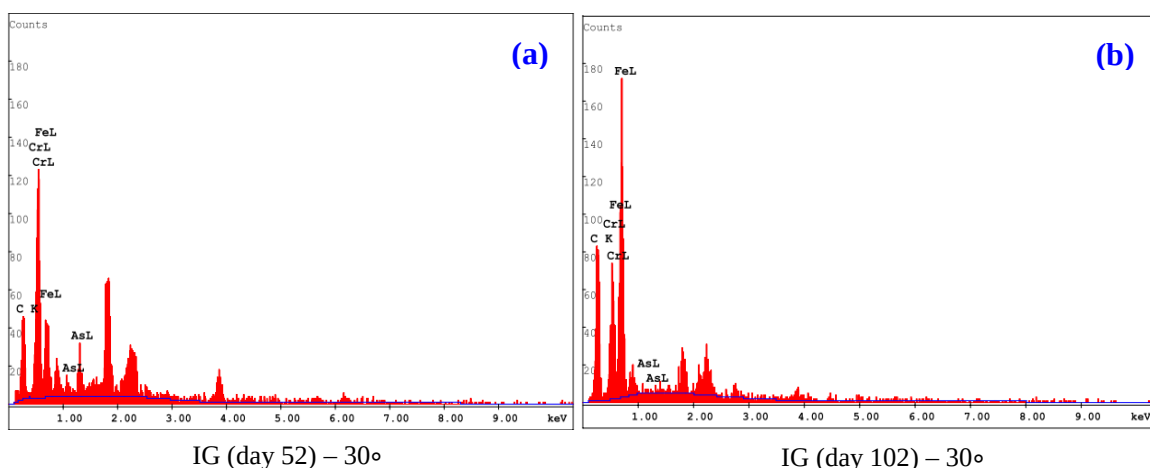
Element	Day 35		Day 102	
	Wt(%)	At(%)	Wt(%)	At(%)
Cr	74.71	76.54	58.53	60.96
Ni	8.74	7.93	16.05	14.80
Cu	2.22	1.86	3.63	3.09
Fe	14.33	13.67	21.80	21.14

圖 16. 植菌組沈澱物之金屬元素 (鉻、鎳、銅及鐵)之變化 (a)第 35 天；(b)第 102 天



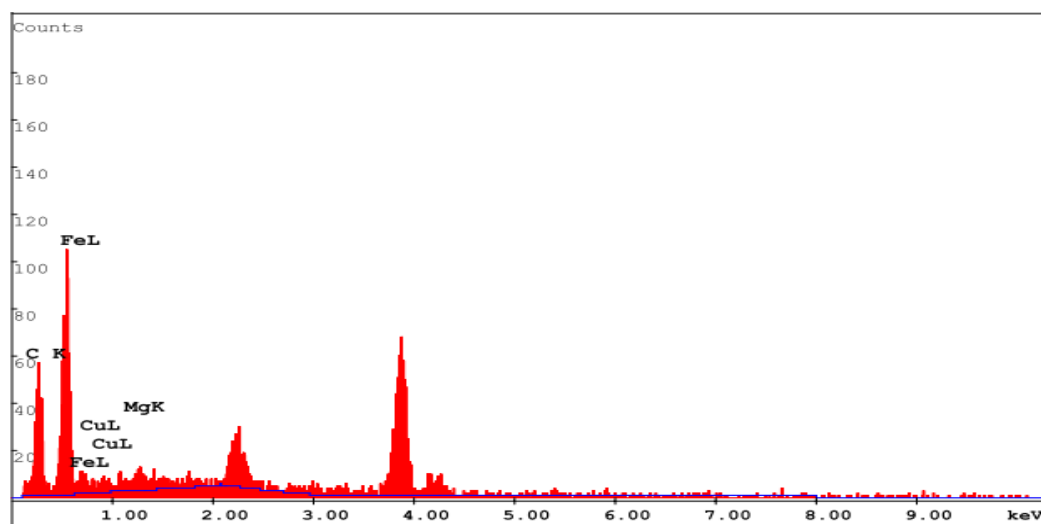
Element	Day 7		Day 35	
	Wt(%)	At(%)	Wt(%)	At(%)
Cr	25.32	28.93	49.34	53.85
Ni	15.95	16.14	12.46	12.04
Cu	58.74	54.93	38.20	34.11

圖 17. 自然降解組沈澱物之金屬元素之變化 (a)第 7 天；(b)第 35 天



Element	Day 52		Day 102	
	Wt(%)	At(%)	Wt(%)	At(%)
C	12.52	39.10	22.05	56.31
Cr	55.94	40.34	21.54	12.70
Fe	27.91	18.74	56.41	30.98
As	3.63	1.82	0.00	0.00

圖 18. 自然降解組沈澱物之碳及金屬元素 (鉻、鐵及砷)之變化 (a)第 52 天；(b)第 102 天



IG (day 52) – 斜晶體沈澱物

Element	Day52	
	Wt(%)	At(%)
C	68.49	89.54
Fe	18.98	5.34
Cu	7.45	1.84
Mg	5.08	3.28

圖 19. 自然降解組中不定型礦物之組成成分。

4.5 次世代定序菌相分析

將自然降解組與馴化菌組取六價鉻還原一半天數進行過濾抽取微生物 DNA，經過 16S rRNA 序列 PCR 擴增後上機，定序完成後得到的原始數據 (Raw Data)，會經由成對序列拼接 (Raw Tags)、過濾得到 Clean Tags，再進行去除嵌合體得到可用於後續分析的有效數據 (Effective Tags)。接著基於有效數據進行相似度 (大於 97%) OTUs (Operational Taxonomic Units) 聚類和物種分類分析。OTUs 聚類結果對代表序列做物種注釋，得到對應的物種資訊和基於物種的豐度分佈情況如下 (表 12 與表 13；圖 20 與 21)。表 12 與表 13 中以菌種與菌屬作分類經處理後有增加者標示為紅色；圖 20 顯示以門為分類階層，發現經處理後微生物以 *Proteobacter* 和 *Firmicutes* 為主。圖 21 顯示以屬為分類階層，發現經處理後微生物以 *Bacillus*、*Acinetobacter* 和 *Delftia* 為主。本研究發現經處理後地下水 *Bacillus cereus* 大量增加，*Bacillus cereus* 已被證實可還原 Cr^{6+} (He et al., 2010; Chen et al., 2012; Tripathi and Harg, 2014; Kumari et al., 2016)。 *Acinetobacter lwoffii* 亦發現大量出現在處理過後地下水。有報告指出 *Acinetobacter lwoffii* 可自 Cr^{6+} 污染工業污泥分離出現 (Tekeriekopoulou et al., 2010)。本研究發現 *Delftia* 屬大量出現在處

理過後地下水，但無法鑑定相關菌種。雖然如此，相關菌株 *Delftia* sp. JD2 被證明是一種 Cr^{6+} 還原菌 (More et al., 2011)。

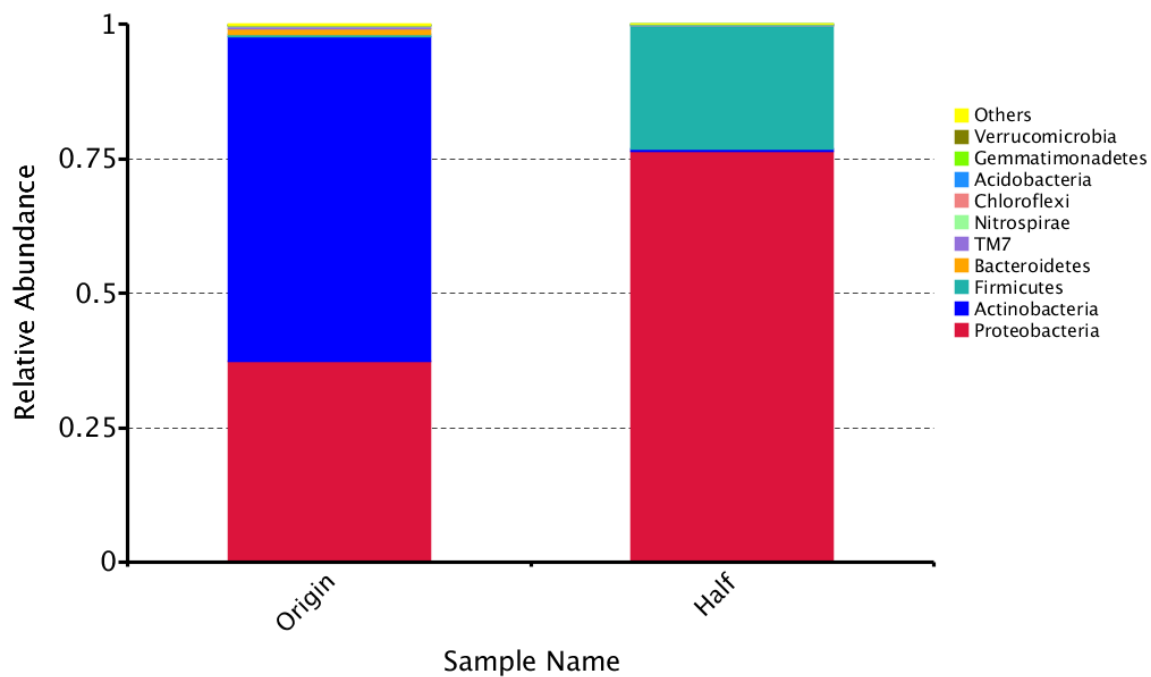


圖 20. 以門為分類階層，處理前後菌相變化

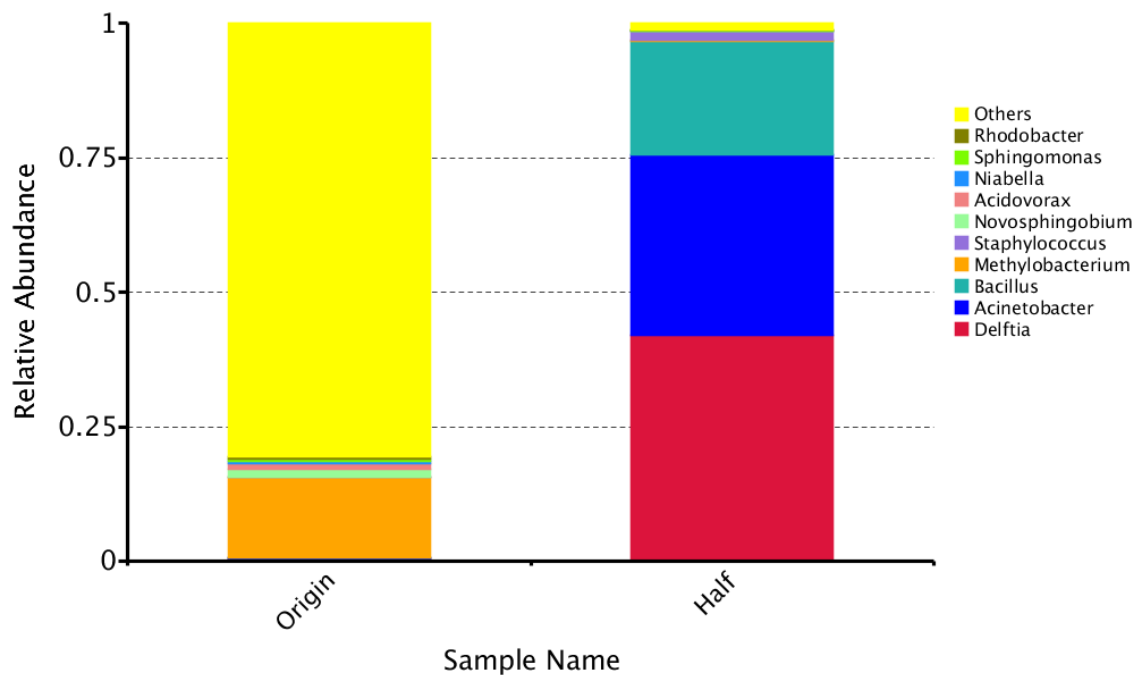


圖 21. 以屬為分類階層，處理前後菌相變化

表 12. 以菌種做分類，處理前後菌相變化

Taxonomy	Origin	Half	Tax_detail
cereus	0.000693	0.181465	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;s__cereus;
flexus	0.000135	0.030443	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;s__flexus;
lwoffii	0	0.005523	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__lwoffii;
prausnitzii	9.62E-05	0.0005	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium;s__prausnitzii;
coprophilus	0	0.000115	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides;s__coprophilus;
longum	0	5.77E-05	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__longum;
marcescens	0	3.85E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Serratia;s__marcescens;
cauensis	0.001058	0	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__Lacibacter;s__cauensis;
columnare	0.001039	1.92E-05	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium;s__columnare;
ramosa	0.000404	5.77E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Sinobacteraceae;g__Nevskia;s__ramosa;
bromii	3.85E-05	0.000346	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminococcus;s__bromii;
muciniphila	0.000115	0	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Akkermansia;s__muciniphila;
wittichii	7.70E-05	0.000115	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas;s__wittichii;
distasonis	0.000115	3.85E-05	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides;s__distasonis;
alaskensis	9.62E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingopyxis;s__alaskensis;
pullicaecorum	9.62E-05	7.70E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Butyricicoccus;s__pullicaecorum;
caccae	5.77E-05	0	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides;s__caccae;
piscolens	5.77E-05	0	k__Bacteria;p__Synergistetes;c__Synergistia;o__Synergistales;f__Dethiosulfovibrionaceae;g__Pyramidobacter;s__piscolens;
mediolanus	3.85E-05	0	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Agromyces;s__mediolanus;
Others	0.995882	0.781184	Others

表 13. 以菌屬做分類，處理前後菌相變化

Taxonomy	Origin	Half	
Klebsiella	0	0.001616	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Klebsiella;
Staphylococcus	5.77E-05	0.017588	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Staphylococcaceae;g__Staphylococcus;
Bacillus	0.000827	0.211908	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus;
Acinetobacter	0.001597	0.333757	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;
Delftia	0.003887	0.421179	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Delftia;
Iamia	0.001155	0	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobiia;o__Acidimicrobiales;f__Iamiaceae;g__Iamia;
Lacibacter	0.001058	0	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__Lacibacter;
Limnohabitans	0.000847	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Limnohabitans;
Sediminibacterium	0.000789	0	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__Sediminibacterium;
BD2-6	0.00077	0	k__Bacteria;p__Nitrospirae;c__Nitrospira;o__Nitrospirales;f__[Thermodesulfobivibrionaceae];g__BD2-6;
Modestobacter	0.0005	0	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Geodermatophilaceae;g__Modestobacter;
Coprococcus	0.000269	0	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Coprococcus;
Emticicia	0.000212	0	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Emticicia;
Lachnospira	0.000154	0	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospira;
Sulfuritalea	0.000115	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Sulfuritalea;
Akkermansia	0.000115	0	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Akkermansia;
Pseudomonas	9.62E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;
Methylosinus	9.62E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylocystaceae;g__Methylosinus;
Zoogloea	7.70E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Zoogloea;
HB2-32-21	7.70E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Alteromonadales;f__Alteromonadaceae;g__HB2-32-21;
Azospira	7.70E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Azospira;
Burkholderia	7.70E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Burkholderiaceae;g__Burkholderia;

Methyloversatilis	5.77E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Methyloversatilis;
Actinoplanes	5.77E-05	0	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micromonosporaceae;g__Actinoplanes;
Pyramidobacter	5.77E-05	0	k__Bacteria;p__Synergistetes;c__Synergistia;o__Synergistales;f__Dethiosulfovibrionaceae;g__Pyramidobacter;
Agromyces	3.85E-05	0	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Agromyces;
Steroidobacter	3.85E-05	0	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Sinobacteraceae;g__Steroidobacter;
Niabella	0.005138	1.92E-05	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprosirae];o__[Saprosirales];f__Chitinophagaceae;g__Niabella;
Flavobacterium	0.001039	1.92E-05	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium;
Methylibium	0.000577	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Methylibium;
Hylemonella	0.000443	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Hylemonella;
Bradyrhizobium	0.000346	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Bradyrhizobiaceae;g__Bradyrhizobium;
Caulobacter	0.000269	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Caulobacterales;f__Caulobacteraceae;g__Caulobacter;
Nitrospira	0.000135	1.92E-05	k__Bacteria;p__Nitrospirae;c__Nitrospira;o__Nitrospirales;f__Nitrospiraceae;g__Nitrospira;
Pedomicrobium	0.000135	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__Pedomicrobium;
Nocardioides	0.000115	1.92E-05	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Nocardioidaceae;g__Nocardioides;
Sphingopyxis	9.62E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingopyxis;
Anaerotruncus	5.77E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Anaerotruncus;
[Ruminococcus]	5.77E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus];
Rubrivivax	3.85E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Rubrivivax;
Bilophila	1.92E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__Bilophila;
Roseburia	1.92E-05	1.92E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia;
Sutterella	0.000289	3.85E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Alcaligenaceae;g__Sutterella;
Parabacteroides	0.000115	3.85E-05	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides;
Brevibacillus	0	3.85E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Paenibacillaceae;g__Brevibacillus;
Serratia	0	3.85E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Serratia;

開發加強式生物刺激還原法整治鉻污染地下水

Nevskia	0.000404	5.77E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Sinobacteraceae;g__Nevskia;
Bifidobacterium	0	5.77E-05	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;
Phenylobacterium	0.001944	7.70E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Caulobacterales;f__Caulobacteraceae;g__Phenylobacterium;
Rhodoplanes	0.000135	7.70E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__Rhodoplanes;
Butyricicoccus	9.62E-05	7.70E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Butyricicoccus;
Phascolarctobacterium	5.77E-05	7.70E-05	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Veillonellaceae;g__Phascolarctobacterium;
Rhodobacter	0.002463	9.62E-05	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae;g__Rhodobacter;
Bacteroides	0.000308	0.000192	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides;
Sphingomonas	0.004214	0.000327	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas;
Ruminococcus	3.85E-05	0.000346	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminococcus;
Acidovorax	0.011469	0.000481	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Acidovorax;
Kaistobacter	0.000597	0.000481	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Kaistobacter;
Faecalibacterium	9.62E-05	0.0005	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium;
Novosphingobium	0.014817	0.00052	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Novosphingobium;
Oscillospira	0.000462	0.000577	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Oscillospira;
Methylobacterium	0.148982	0.001616	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylobacteriaceae;g__Methylobacterium;
Others	0.791922	0.007948	Others

樣品中的 OTUs 依相對豐度由高到低排序得到對應的排序編號，再以 OTUs 的排序編號為橫坐標、OTUs 中的相對豐度為縱座標，以階梯線顯示相對豐度（左方縱軸 Relative Abundance）由高到低的變化趨勢。Rank Abundance Curve 可直觀看出樣本或分組中物種的豐富度和均勻度。物種的豐富程度由曲線在橫軸上的長度來反映，曲線越寬，表示物種的組成越豐富；物種組成的均勻程度由曲線的形狀來反映，曲線越平坦，表示物種組成的均勻程度越高，樣品中各物種所佔比例相似。正如本研究顯示，圖 22 說明經過生物復育過程地下水菌相豐富度不及未經處理後菌相。從圖 20 和圖 21 得知，地下水處理過程（加入經營營養鹽和馴化後菌種），可使具六價鉻還原能力菌種選擇性生長，大多數對六價鉻毒性較敏感菌種不易生長。

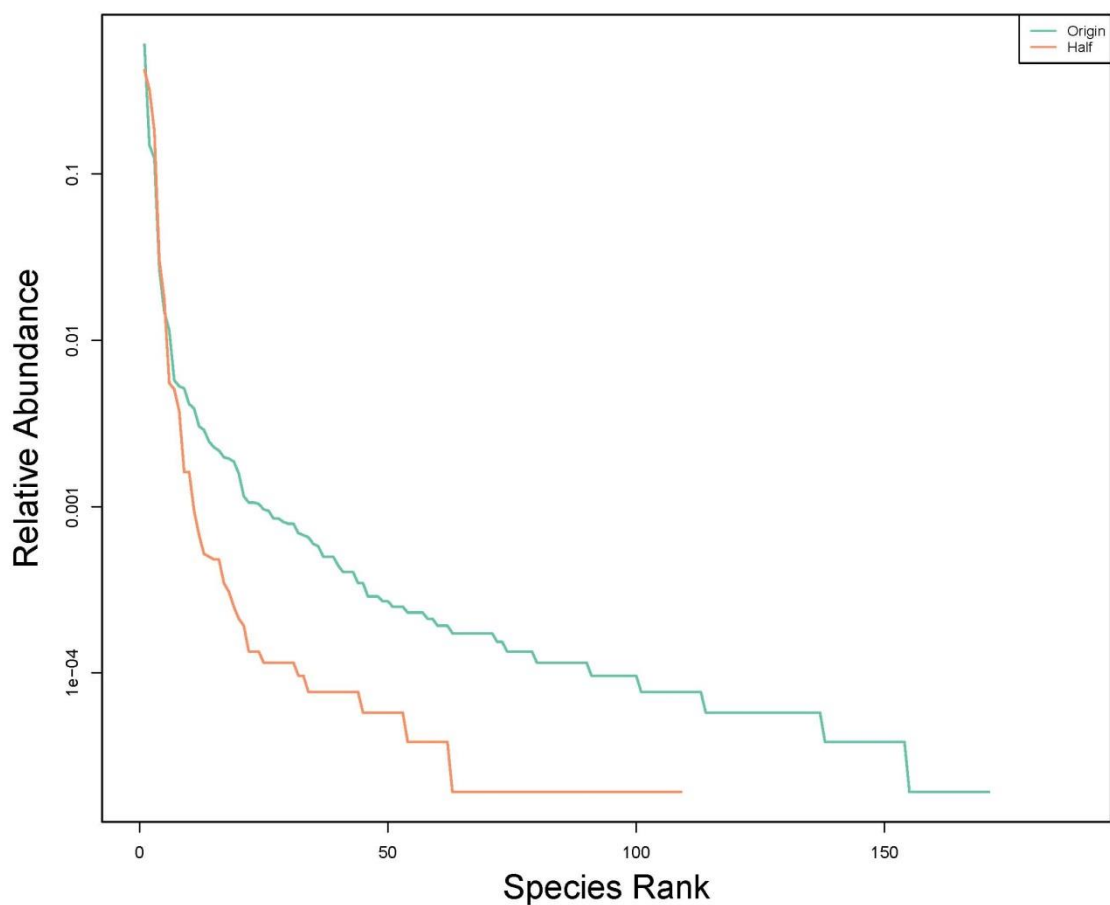


圖 22. 物種豐富度排名曲線圖

Alpha 多樣性是指一個特定區域或者生態系統內的多樣性，用來描述單個樣品的物種多樣性，用以衡量定序量是否足夠的一個標準。從圖 23 顯示處理前廢水飽和曲線，已呈飽和。但經處理後菌相分析，仍未飽和。因此，未來以 metagenome 分析時，需加強深度，期許可找到更多優勢菌。

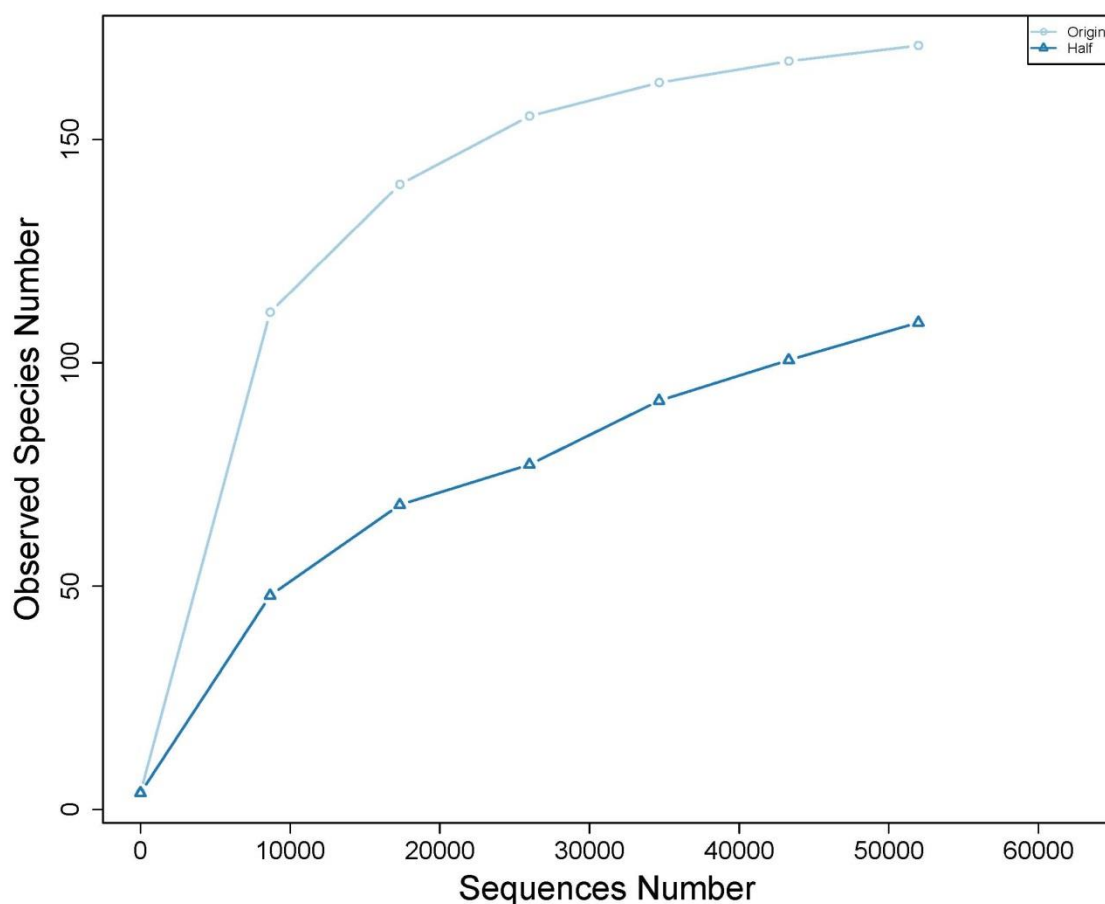


圖 23. 定序量與菌種累積曲線圖

Metagenome 比過去常用 DGGE 分析菌相，不論在靈敏度和 high throughput efficiency 均佔優勢。在許多研究，已漸漸取代 DGGE，成為主流技術。除此之外，他還可提供對六價鉻具有還原能力優勢菌相對分布量，可謂來評估生物復育之效能。

第五章：結論與建議

本研究利用現地鉻酸鹽污染地下水進行生物處理批次實驗，研究利用現地所採樣之地下水進行分子生物分析，研究首先探討添加營養基質及植入馴化菌種，觀察馴化菌株對於地下水中目標污染物六價鉻還原之影響，並提供永續整治方針及分子生物技術於受鉻酸鹽污染之土壤及地下水場址整治規劃。根據批次試驗及評估應用現場結果，將其整理如下：

地下水批次實驗結論

1. 批次實驗降解過程中，因現地過去採用具破壞性化學還原法做為整治，初始 pH 值介於 8.5 – 9.0 之間，實驗期間營養添加組 (IN) 及馴化菌組 (IBN) 其 pH 均維持在 7.5 – 8.0，pH 並無在隨時間造成嚴重之酸化或鹼化現象，均維持在適合微生物生長之範圍內，證實生物強化法適用於此類場址。
2. 依滅菌組 (Control)、自然降解組 (IG)、添加營養組 (IN) 及馴化菌組 (IBN) 之降解能力，依序為馴化菌 > 營養鹽 > 自然降解 > 氯化汞組，顯示添加馴化菌及營養鹽，有利於刺激、生長及補充現地環境因長期化學整治而缺乏之微生物。
3. 營養基質 (NB) 含有豐富之碳、氮源及微量元素 (如維生素及胺基酸等)，加上易溶解且對於微生物有較佳利用性，能夠在污染環境中增加微生物活性及促進分解污染物能力。
4. 六價鉻還原效率 (去除率) 以 92.4% 之馴化菌組最具效果，其次為營養添加組 (46.6%)、自然降解組 (12.2%)，實驗結果得知營養基質添加能加速污染物生物還原，而適當的添加馴化菌種更能提高其效率。
5. 次世代定序菌相分析結果顯示六價鉻還原相關菌群 *Bacillus*、*Acinetobacter* 和 *Delftia* 相對比例大幅上升，證實現地地下水添加馴化菌群與營養基質確實能使地下水六價鉻還原相關微生物增加，強化現地地下水微生物六價鉻污染處理能力。

建議

1. 土壤性質及水文特性為影響加強式生物復育法整治成效之重要因子，整治前必須先進行土壤質地及水文相關分析試驗，以決定適合灌注時程及營養基質濃度，若地下水流速過快時，則微生物不利於獲得營養；土壤質地如屬於高黏土或砂質性土壤，亦對營養基質及菌種擴散造成影響，因此針對這些困難

能以提高生物及營養濃度，另外，可利用加壓灌注而促進水體擴散形成生物團 (bio-plume) 均勻分佈。

2. 植菌還原降解六價鉻效率為最佳，未來應用於實場上之成本上考量，可選擇添加混合式營養基質 (如食用級糖蜜、工業級尿素及酵母粉調配基質) 替代營養基質，均能有效提供微生物生長，亦可加強現地菌種針對六價鉻還原功能。
3. 本方法可與其他整治處理技術結合運用，近些年最廣受歡迎之整治列車與永續環境概念，如在高濃度污染區可考慮以物理及生物技術進行整治(挖除、抽除及生物淋洗劑)，低濃度污染區則考量成本及環境友善影響，可選擇非破壞性之監測式自然衰減 (MNA) 或生物整治工法進行整治 (現地生物刺激及生物加強式法)，整治後現地土壤及地下水能再供應於其他用途，達成永續發展精神。
4. 整治現地除了需要考慮地形選擇生物試劑灌注外，現場採樣及定期監測分析結果亦必須做為後續生物試劑添加及改善現地環境條件，如此方能有效控制各項因子，使整治作業順利進行，縮短生物整治期限。
5. 利用次世代定序技術分析環境微生物變化需先參考前人研究決定定序深度，若無參考資料可將定序深度提高，避免定序量不足無法完整分析樣本菌相資料。

第七章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備 註
鉻汙染地下水取樣	■	■											
地下水基本性質與鉻 濃度分析		■	■										
鉻酸鹽菌馴化培養		■	■										
六價鉻還原去除微型 試驗		■	■	■	■	■							
微型試驗後地下水性 質分析					■	■							
水樣微生物總 DNA 萃 取純化						■	■						
以 PCR 技術放大菌種 16S rDNA 片段						■	■						
次世代定序技術分析 各組別 DNA 序列						■	■	■	■	■			
以生物資訊分析各組 別完整菌相分布									■	■	■		
成果報告撰寫與發表											■	■	
工作進度估計百分比 (累 積 數)	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	95%	100%		
預定查核點	期中		1. 完成地下水基本性質與鉻濃度分析 2. 完成六價鉻還原去除微型試驗 3. 微型試驗後地下水性質分析，完成期中報告										

	期末	1. 完成水樣微生物總 DNA 萃取純化 2. 完成次世代定序技術分析各組別 DNA 序列 3. 以生物資訊分析各組別完整菌相分布，完成期末報告
說明： 1、 工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。 2、 「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1) 工作天數，(2) 經費之分配，(3) 工作量之比重，(4) 擬達成目標之具體數字。 3、 「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。		

第八章：參考文獻

土污基管會.(2015). 土壤及地下水污染品質查詢.

at: <http://sgw.epa.gov.tw/public/ContaminatedSitesMap/Default.aspx>

環境資源中心網站(環資中心網).(2015). 毒米樂！躲摸摸！農村再生上天堂！及嘉義農田遭重金屬污染地上物將銷毀.

at: <http://e-info.org.tw/taxonomy/term/14973>

國家環境毒物研究中心.(2014). 環境毒物研究中心整理之口服六價鉻毒性資料.

at: <http://nehrc.nhri.org.tw/toxic/ref/Chromium20141107.pdf>

大紀元^[1] (EPOCH TIMEZ). (2015).

at: <http://www.epochtimes.com/b5/tag/+鉻污染.html>

環境資源中心網站^[2] (環資中心網). (2015).

at: <http://e-info.org.tw/taxonomy/term/36694>

行政院環保署新聞專區^[3]. (2015).

at: http://enews.epa.gov.tw/enews/fact_index.asp

行政院環保署土壤及地下水污染整治基金管理.(2013). 土壤及地下水污染整治十年有成專刊(第三章 整治技術介紹).

at: http://sgw.epa.gov.tw/public/Action_index.asp

Chromium (VI) Compounds, IARC, (1973).

at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-9.pdf>

USEPA, 2000, Chromium Compounds.

at: <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/chromium.html>

USEPA. (1998). Toxicological Review for Chromium^{VI}, CAS NO. 18540-29-9, U.S. Environmental Protection Agency.

at: www.epa.gov/iris/toxreviews/0144-tr.pdf

- Asmatullah, A. Asma, A. Latif and A. R. Shakoori (1999). Effect of hexavalent chromium on egg laying capacity, Hatchability of eggs, thickness of egg shell and post-hatching development of *Gallus domesticus*. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* Vol. 12, No.6 : 944-950.
- Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, Huttenhower C, Segata N (2015) Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* 3:e1029 doi:10.7717/peerj.1029
- Branco et al. (2005) “Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river.” *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 54:35–46.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1:4516-22 doi:10.1073/pnas.1000080107
- Chen Z, Huang Z, Cheng Y, et al. (2012) Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere* 87(3):211-6 doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.050
- Codd, R., Irwin J. A., and Lay P. A. (2003). Sialoglycoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 213-219.
- Chen et al. (2012) “Bacterial Community Shift in Two Sectors of a Tannery Plant and its Cr (VI) Removing Potential.” *Geomicrobiology Journal*, 29:1–10.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N. N., and Thatoi, H. N. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121.
- Desai et al. (2008) “Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes.” *Research in microbiology*, 160(1):1-9.
- Dellagnezze, B. M., de Sousa, G. V., Martins, L. L., Domingos, D. F., Limache, E. E., de Vasconcellos, S. P., & de Oliveira, V. M. (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine pollution bulletin*,

- 89(1), 191-200.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N. N., and Thatoi, H. N. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121.
- Foster ZS, Sharpton TJ, Grunwald NJ (2017) Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS computational biology* 13(2):e1005404 doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- Gentile et al. (2006) “Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing.” *Environmental microbiology*, 8(12):2150-2161.
- He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y., He, C., 2009. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. *J. Hazard. Mater.* 163 (2e3), 869e873.
- He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S.J., Rensing, C. Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol.* 2010, 10:221.
- He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S.J., Wang, G. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *J Hazard Mater.* 2011, 185(2-3):682-8.
- He M, Li X, Guo L, Miller SJ, Rensing C, Wang G (2010) Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC microbiology* 10:221 doi:10.1186/1471-2180-10-221
- Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I (2013) Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal* 7(6):1069-79 doi:10.1038/ismej.2013.2
- Katsaveli et al. (2012) “Bacterial diversity in Cr(VI) and Cr(III)-contaminated industrial wastewaters.” *Extremophiles*, 16:285–296.
- Kumari V, Yadav A, Haq I, et al. (2016) Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *Journal of environmental management* 183:204-211

doi:10.1016/j.jenvman.2016.08.017

- Kimura N 2006. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. *Microb Environ* 21:201–215.
- Li et al. (2006) “Phylogenetic analysis of bacterial diversity in Pacific Arctic sediments.” *Acta microbiologica Sinica*, 46(2):177-83
- Morel MA, Ubalde MC, Brana V, Castro-Sowinski S (2011) Delftia sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of microbiology* 193(1):63-8 doi:10.1007/s00203-010-0632-2
- Martins et al. (2010) “Anaerobic bio-removal of uranium (VI) and chromium (VI): Comparison of microbial community structure.” *Journal of Hazardous Materials*, 176:1065–1072.
- Ohtake, H., Cervantes, C., Silver, S., 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169 (8), 3853-3856.
- Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics* 12:385 doi:10.1186/1471-2105-12-385
- Puzon, G. J., Petersen, J. N., Roberts, A. G., Kramer, D. M., and Xun, L. (2002). A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium (III)–NAD⁺ complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(1), 76-81.
- Pan, X., Liu, Z., Chen, Z., Cheng, Y., Pan, D., Shao, J., Lin, Z., and Guan, X. (2014). Investigation of Cr (VI) reduction and Cr (III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633. *Water Research*, 55, 21-29.
- Qi, W., Reiter, R.J., Tan, D.X., Garcia, J.J., Manchester, L.C. Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ Health Perspect.* 2000, 108(5):399-402.
- . Ravenschlag et al. (1999) “High bacterial diversity in permanently cold marine sediments.” *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3982–3989.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J.

- Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*. 2008, 21(3):321-32.
- Shah V, Zakrzewski M, Wibberg D, Eikmeyer F, Schlüter A, Madamwar D. 2013. Taxonomic profiling and metagenome analysis of a microbial community from a habitat contaminated with industrial discharges. *Microb Ecol*. 2013 Jun 25.
- Shah V, Jain K, Desai C, Madamwar D 2011. Metagenomics and integrative ‘-omics’ technologies in microbial bioremediation: current trends and potential applications. In: Marco D (ed) Metagenomics: current innovations and future trends. *Caister Academic Press, Norfolk*, pp 211–240.
- Schloss PD, Handelsman J 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* 6:229.
- Segata N, Izard J, Waldron L, et al. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology* 12(6):R60 doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Singh A, Vyas D, Malaviya P (2016) Two-stage phyto-microremediation of tannery effluent by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. and chromium resistant bacteria. *Bioresource technology* 216:883-93 doi:10.1016/j.biortech.2016.06.025
- Tian et al. (2009) “Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis.” *Polar Biology*, 32:93–103.
- Tekerlekopoulou AG, Tsiamis G, Dermou E, Siozios S, Bourtzis K, Vayenas DV (2010) The effect of carbon source on microbial community structure and Cr(VI) reduction rate. *Biotechnology and bioengineering* 107(3):478-87 doi:10.1002/bit.22837
- Tripathi M, Garg SK (2014) Dechlorination of chloroorganics, decolorization, and simultaneous bioremediation of Cr⁶⁺ from real tannery effluent employing indigenous *Bacillus cereus* isolate. *Environmental science and pollution research international* 21(7):5227-41 doi:10.1007/s11356-013-2479-y
- Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, et al. (2013) Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* (Silver Spring, Md) 21(12):E607-15 doi:10.1002/oby.20466

- Wallenstein et al. (2007) “Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils.” *FEMS Microbiol Ecol*, 59:428–435.
- Whiteley, C. G., and Lee, D. J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3), 291-316.
- Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, Huttenhower C, Segata N (2015) Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* 3:e1029 doi:10.7717/peerj.1029
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1:4516-22 doi:10.1073/pnas.1000080107
- Chen Z, Huang Z, Cheng Y, et al. (2012) Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere* 87(3):211-6 doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.050
- Foster ZS, Sharpton TJ, Grunwald NJ (2017) Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS computational biology* 13(2):e1005404 doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- He M, Li X, Guo L, Miller SJ, Rensing C, Wang G (2010) Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC microbiology* 10:221 doi:10.1186/1471-2180-10-221
- Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I (2013) Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal* 7(6):1069-79 doi:10.1038/ismej.2013.2
- Kumari V, Yadav A, Haq I, et al. (2016) Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *Journal of environmental management* 183:204-211 doi:10.1016/j.jenvman.2016.08.017
- Morel MA, Ubalde MC, Brana V, Castro-Sowinski S (2011) *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of microbiology* 193(1):63-8 doi:10.1007/s00203-010-0632-2
- Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM (2011) Interactive metagenomic visualization

- in a Web browser. BMC bioinformatics 12:385 doi:10.1186/1471-2105-12-385
- Segata N, Izard J, Waldron L, et al. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome biology 12(6):R60 doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Singh A, Vyas D, Malaviya P (2016) Two-stage phyto-microremediation of tannery effluent by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. and chromium resistant bacteria. Bioresource technology 216:883-93 doi:10.1016/j.biortech.2016.06.025
- Tekerlekopoulou AG, Tsiamis G, Dermou E, Siozios S, Bourtzis K, Vayenas DV (2010) The effect of carbon source on microbial community structure and Cr(VI) reduction rate. Biotechnology and bioengineering 107(3):478-87 doi:10.1002/bit.22837
- Tripathi M, Garg SK (2014) Dechlorination of chloroorganics, decolorization, and simultaneous bioremediation of Cr⁶⁺ from real tannery effluent employing indigenous *Bacillus cereus* isolate. Environmental science and pollution research international 21(7):5227-41 doi:10.1007/s11356-013-2479-y
- Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, et al. (2013) Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. Obesity (Silver Spring, Md) 21(12):E607-15 doi:10.1002/oby.20466
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA, Elshahed MS (2009) Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. Applied and environmental microbiology 75(16):5227-36 doi:10.1128/aem.00592-09