



行政院環境保護署

109年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋 整治工法：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： 國立中央大學／生命科學系
專案主持人： 陳師慶 教授
專案執行期間： 109年01月30日起至
109年12月04日止

中 華 民 國 109 年 12 月 印 製





109 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申請書

一、專案基本資料表

申請編號：

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案技術編碼	LAB - S - R - C1 - B	
專案類別(單選)	☐ 研究型 ☒ 模場型		研究主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其他	
申請機構系所	國立中央大學 生命科學系				
機構地址	桃園市中壢區中大路 300 號				
專案主持人	陳師慶	職等/職稱	教授		
協同主持人	張志豪	職等/職稱	專案副理		
專案名稱	中文	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法—現地模場試驗			
	英文	Develop high-efficiency dechlorination bio-gel and optimize the immobilized strategy of bioremediation in chlorinated contamination: pilot study			
	關鍵字	脫鹵球菌, 生物膠體, 氯乙烯, 完全脫氯			
執行期程	自民國 109 年 01 月 30 日起 至民國 109 年 12 月 04 日止				
專案主持人	姓名：陳師慶	E-mail： osycchna@ksts.seed.net.tw	專線：03-4227151#65083 手機：0929057590		
專任助理	姓名：	E-mail：	專線： 手機：張國章 教授		
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估 總經費		第一年 申請金額	第二年 申請金額	編列說明
	1.	人事費用	700,000	700,000	(1~5 項相加之 50%為限)
	2.	貴重儀器使用含維護費	0	0	(與計畫實驗相關)
	3.	消耗性器材與主要費用	1,320,909	1,230,000	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	50,000	50,000	(含差旅與租賃費用)
	5.	雜項費用	20,000	20,000	(1~6 項相加之 5%為限)
	6.	行政管理費	209,091	200,000	(1~5 項相加之 10%為限)
	7.	自籌款	0	0	(申請單位自行籌備款項)
	申請補助金額(1~6 項)		2,300,000	2,200,000	總金額：4,500,000
計畫總金額(1~7 項)		2,300,000	2,200,000	總金額：4,500,000	

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

陳師慶

陳師慶

日期：2020/02/09

(請蓋上申請單位大小章)





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

109 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：109 年 10 月 30 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	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：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	0	0	0	0	
		(2) 研討會論文	0	0	2	100%	1. 中華民國環境工程學會 2020 土壤與地下水研討會，開發新穎性包埋 Dehalococcoides mccartyi 及 Clostridium butyricum 之長效脫氯膠體 (2020/11/27) 2. 中華民國環境工程學會 2020 土壤與地下水研討會，脫鹵球菌生物添加應用及本土高效脫氯菌群篩選 (2020/11/27)
	2. 國外投稿 (篇數)	(1) 期刊論文	1	0	0	0	將於計畫第二年發表國外論文
		(2) 研討會論文	0	0	0	0	



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)	
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	1	0	1	100%	南港生技展，高效脫氯 膠體 (2020/07/26)	
		(2)研究報告	0	0	0	0		
	4.專著 (本數)		0	0	0	0		
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會	0	0	0	0		
		(2)成果發表會	0	0	1	100%	108 年土壤及地下水研 究與模場試驗成果發表 會，應用產氫菌提升產 氫量以加強含氯有機污 染物還原脫氯效率：現 地 模 場 試 驗 (2020/07/29)	
		(3)論壇	0	0	0	0		
	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術	0	0	0	0		
		(2)技術平台	0	0	0	0		
	B 人 才 培 育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	2	100%	陳庭萱、黎如月
			(2)博士	1	1	1	100%	呂哲瑋
8.研究團隊 (個數)		(1)跨領域團隊	0	0	0	0		
		(2)跨機構團隊	0	0	0	0		
		(3)形成研究中 心	0	0	0	0		
		(4)形成實驗室	0	0	0	0		
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						



(二) 產業面

目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	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)
項目								
A 智慧 財產 權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明	0	0	1	100%	包埋微生物膠體、其製備方法以及降解含氯有機物的組合物,發明專利證號 I701324(2020/8/11)
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
		申 請 中	發明	1	1	1	100%	包埋微生物膠體、其製備方法以及降解含氯有機物的組合物,申請號第 108114190 號
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
B 研 發 技 術 轉 移	2.先期技術 成果移轉	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍 生 利 益 金 (仟元)		0	0	0	0	
	3.技術移轉 (專利)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍 生 利 益 金 (仟元)		0	0	0	0	
	4.技術移轉 (應 用 技 術)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍 生 利 益 金 (仟元)		0	0	0	0	
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)		0	0	0	0	
		(2)品種/系(件數)		0	0	0	0	
C 產 學 研 合 作	6.促成合作 研究	件數		0	0	0	0	
		金額(仟元)		0	0	0	0	
	7.促成投資	件數		0	0	0	0	
		投資金額 (仟元)		0	0	0	0	
	8.促成取得 業界科專	件數		0	0	0	0	
		業界投資金額 (仟元)		0	0	0	0	



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)
項目						
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	0	0	0	0
		收入(仟元)	0	0	0	0
	2.諮詢服務	次數	0	0	0	0
		收入(仟元)	0	0	0	0
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策	0	0	0	0
		(2)法規	0	0	0	0
		(3)規範	0	0	0	0
		(4)標準	0	0	0	0
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)		0	0	0	0
	5.獲得獎項(件數)		0	0	0	0
	6.提升能源效率(%)		0	0	0	0
	7.節能減碳效率(%)		0	0	0	0
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，本研究第一年度欲建構絕對厭氧操作技術，大量培養脫鹵球菌，使得菌量達可以達應用於現地整治之標準，延伸開發本土脫氯共生菌群，同時開發高效脫氯生物膠體，包埋脫鹵球菌與產氫菌，結合污染攔截牆工法，有效提升生物基質之利用。第二年度本研究將以桃園台鈴模場作為實場整治試驗地點，優化矽膠生物固定材質配方，降低固定化產氫菌顆粒成本將技術商品化，優化污染攔截牆範圍以及搭配抽水井使用，提升包埋整治工法的反應範圍。結合生物刺激法和生物強化法並配合次世代定序法等，建



立完整系統評估監測機制，使現地地下水含氯有機污染物厭氧生物整治狀態達最佳化，同時將結合過去的研究成果，改良包埋整治工法，使用關鍵脫乳球菌於包埋膠體之中，並將本技術應用於實場中加以驗證，有效解決現地脫鹵球菌菌數不足之問題。此外，脫鹵球菌可以將氯乙烯完全脫氯至無毒的乙烯，希冀透過本模場試驗之成果有效解決現地氯乙烯累積之問題。



行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會

109 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

構想書審查意見表

專案類型	☐ 研究型 ☒ 模場型		申請經費	3,300,000	NO : D2
專案主持人	陳師慶 教授	專案主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它		
服務單位	國立中央大學 生命科學系				
專案名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗				
委員一： 1. 本研究案屬 2 年期模場型專案，本計畫團隊目前技術處於 TRL4-6，研究後可達 6-7。 2. 107 年及 108 年已運用土基會經費作研究，已至現地模場。 3. 本團隊之技術第 1 項次已獲得 2019 年臺灣創新技術競賽銅牌。 4. 本模場型專案可予支持。			1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教。 4. 感謝委員支持。		
委員二： 1. 此為延續性改進現有作業系統計畫，重點在增進現有作業模組之效能。 2. 此團隊有專利技術，技術成熟。 3. 使用方法相對的環境友善，但施作的實質效益仍有待評估。			1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 3. 感謝委員指教，本團隊將會加強效益評估。		



專案類型	☐ 研究型 ☒ 模場型		申請經費	3,300,000	NO : D2
專案主持人	陳師慶 教授	專案主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它		
服務單位	國立中央大學 生命科學系				
專案名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗				
委員三： 本研究團隊於前期成果成功開發本土脫氯菌，證實並確認其含氯有機溶劑去除率，本研究擬進一步研究技術優化為商業化產品開發之測試；構想完整、可行性為應用性高。		1. 感謝委員指教。			
委員四： 1. 本計畫屬於模場型與部分研究導向，國內已有相關研究，但對於地下水現地整治的應用仍待驗證。 2. 本計畫屬於模場型與部分研究導向，對現行國內土水污染技術的突破性與技術應用，仍待驗證。 3. 本計畫是否有專利之價值目前不易評估，待有具體的研究成果後，再加以完整的說明。 4. 本計畫的研究成果具有技術轉移、實場應用性的可能性。 5. 本計畫書中對研究工作的構想與規劃的說明完整。 6. 本計畫對研究方法的說明具體，研究工作與執行流程具可執行性。		1. 感謝委員指教，本團隊會加強現地整治應用方面之驗證。 2. 感謝委員指教，目前國內較少直接利用脫鹵球菌於現地，但是國外已有許多成功的案例，因此可以藉由本計畫使我國土水污染技術再更上一層樓。 3. 感謝委員指教，本團隊會加強專利方面之價值成果。 4. 感謝委員指教。 5. 感謝委員指教。 6. 感謝委員指教。			



專案類型	☐ 研究型 ☒ 模場型		申請經費	3,300,000	NO : D2
專案主持人	陳師慶 教授	專案主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它		
服務單位	國立中央大學 生命科學系				
專案名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗				
委員五： 1. 關鍵核心技術待釐清。 2. 研究/實際流程未提列。 3. 關鍵參數之控制待釐清。 4. 預期成果待釐清。		1. 感謝委員指教，本計畫關鍵技術為培養脫鹵球菌並且結合包埋法應用到現地整治。 2. 感謝委員指教，本計畫第一年將會先在實驗室中進行脫鹵球菌包埋最佳化測試，並且進場調查以及設井，並於第二年將膠體投入實場測試。 3. 感謝委員指教，脫鹵球菌適合生長於厭氧(ORP< -100mV)且 pH>5.5 之環境，相關環境參數如 TCO、ORP、pH、DO 等等，本團隊會加強相關參數之控制。 4. 感謝委員指教，本計畫之目標將發展創新生物膠體並結合分子生物技術與理念，將計畫結果應用於 TCE 污染以及其他環境整治的生物復育應用。預期成果將產出一脫氯生物膠體，一脫鹵球菌培養技術以及現地包埋整治工法之優化。			



行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會

109 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

☒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	109 年度	計畫類型	☐ 研究型 ☒ 模場型
計畫類別	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它	主持人：陳師慶 NO：S-1-4	
計畫名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 主持人與計畫執行團隊 (1) 主持人的學術研究能力與技術發展能力均佳，其專業能力足以勝任本專案計畫。 (2) 主持人近五年的研究成效與(或)土水污染技術發展績效佳。 (3) 主持人與計畫執行團隊的學術研究能力與(或)土水污染技術發展能力佳，其專業能力足以勝任本計畫。 2. 送審的專案計畫價值、意義與專案計畫的可行性 (1) 本專案對未來土壤及地下水污染調查及整治等相關工作之推動具有貢獻。 (2) 由計畫申請書內的成果績效自評表可推知，本專案所預估的成果與績效對土水污染整治具有貢獻，但確切的成果仍有待於未來的執行成果中加以詳細說明。 (3) 本專案計畫書撰寫具體，所研擬的研究方法(流程)可行。研究成果於未來實場的實際可能應用性則未具體說明(確切的應用性有待執行成果中加以明確說明)(操作參數、固定化的傳輸因子、耐受性、		1. 感謝委員指教。 2. 感謝委員指教。 (1) 感謝委員指教。 (2) 感謝委員指教，本團隊會加強此部分。 (3) 感謝委員指教，現地脫鹵球菌菌數不足之問題，其關鍵因子為該類菌之生長速率緩慢，目前已知文獻脫鹵球菌 FL2 複製時間為 2.4 天(He et al. AEM, 2005)，脫鹵球菌 VS 複製時間為 2.5 天(Cupples et al. AEM 2003)，脫鹵球菌 BAV1 複製時間為 2.2 天(He et al. Nature, 2003)，因此即便環境因子適當(如 pH、ORP、DO、鹽度、甲烷菌控制等等)，現地之脫氯速率依然不快，且容易累積氯乙烯於現場。 脫氯生物膠體從根本上解決脫鹵球菌不足之問題，且透過膠體之固定減少菌液之使用及避免受到地下水之物理性稀釋，有效的利用包埋之脫鹵球菌。膠體之相關參數如操作參數、固定化的傳輸因子、耐受性、環境因子之干擾等會在未來的計畫中加以釐清。 (4) 感謝委員指教。	



環境因子…等建議評估)(建議評估現場的限制因子為何? 即計畫書中所述之: “…有效解決現地脫鹵球菌菌數不足之問題…” 的主要關鍵因子為何? 若是環境因子所致,則本計畫的應用性就有待再評估)。 (4) 本專案計畫書中對相關文獻蒐集與整理尚完整。主持人對國內外本研究領域的發展現況了解。 (5) 本專案計畫的執行期限合理,計畫書中對執行的預期成果也已說明。 (6) 本專案計畫屬延續性計畫的第一年度。	(5) 感謝委員指教。 (6) 感謝委員指教。
委員二 1. 本項計畫擬以二年期程研發高效脫氧生物膠體,並辦理實場測試,計畫書內容完整,目標、工項及期程明確。 2. 本計畫研發團隊包含產業界專業人士,具備學術背景與實務經驗,應可順利執行本案研發工作,並獲致預期成果,提升本土整治技術能力與水平。 3. 計畫書已針對前期審查意見回復,說明並補充相關資料。 4. 模場試驗使用場址已獲業主出具使用同意文件。	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。
委員三 1. 兩年工作目標明確,第一年(實驗室優先)、第二年(模場整治)惟對模場資料掌握彙整不完整。 2. 第一年研究方法五項,未有具體實驗設計及參數掌控,提及後半年現地模場調查,亦無具體方法參數說明。 3. 第二年研究方法皆未提及可行性待釐清。 4. 經費編列欠缺具體需求說明(330 萬 /), 協同主持人(業界)、研究生 7 人	1. 感謝委員指教,模場整治調查資料包含於第一年之後半部,項目有:現地環境參數之測定,菌相測定,污染物測定等等,模場將於第一年之前半年進場測試。 2. 感謝委員指教,本計畫書僅擬定預期完成工作項目,詳細之實驗設計及參數掌控將會詳細說明於期中報告之中。 3. 感謝委員指教,第二年之相關策略及方法將因應第一年之成果後擬定。



工作配置， 5. 專任助理(1 人)、耗材(223 萬)項目，數量需求亦未對稱研究內容負荷編列。	4. 感謝委員指教，協同主持人之工作配置：協助研究計畫環境工程技術之規劃、設計、執行、數據分析判讀與諮詢討論；研究生之工作配置：相關專題與實驗進行之文件文獻整理、菌相大數據分析，研究與實驗工作進行結果討論及整理，協助實驗採樣及定量 PCR 分析，協助培養脫鹵球菌、GC 檢測以及固定化膠體測試及行政作業。 相關人員對應工作則詳細說明於研究經費中的人事費用中。 5. 感謝委員指教，本次計畫並無聘請專任助理，且耗材費經核定為 123 萬，應符合研究內容負荷編列。
委員四 1. 與科技部計畫「開發高效能生物晶片應用在含氯化物生物整治及策略評估」相輔相成，經本計畫現地模場試驗，目標應訂在完成建立監測模式套件並將之商品化。	1. 感謝委員指教。
委員五 1. 已就委員意見回復說明，無進一步意見。	1. 感謝委員指教。



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

審查意見回復對照表

計畫年度	109 年度	計畫類型	☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它	主持人：陳師慶 NO：A10	
計畫名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 期中報告應有進展說明與階段成果展現。 2. 本計畫為「現場模場試驗」，研究方法應有照片(設備)，實作日期等說明。 3. 工作項目-成果宜掌握。		1. 感謝委員指教，本團隊會加強此部分 2. 感謝委員指教，因本計畫之初期為實驗室開發，本團隊未來於現地模場試驗中會加強此部分。 3. 感謝委員指教，本團隊會加強此部分。	
委員二 1. 批次實驗目前仍在進行中尚未完成，似與期中預定查核點有差異。 2. 目前進行之項目，不知哪些工作該團隊於 107 年執行之計畫成果，亦或本計畫執行之成果，寫明確分別出來。 3. 於報告中宜多提供現場工作之照片，較易了解其工作進行之方式。 4. 本計畫於 KPI 之承諾，缺少了計畫衍生之效益指標，以經驗之規模，沒有效益之指標，實屬可惜。 5. 報告書內容涉及之原理原則太多，不易閱讀。		1. 感謝委員指教，批次實驗將於 8 月份前全數完成，目前進度符合查核點。 2. 感謝委員指教，目前進行之項目皆為本計畫執行之結果，並無重複使用到 107 年執行成果，將會在修正稿中補充表列本次計畫與先前計畫差異之處，並評估可能獲得成果。 3. 感謝委員指教，因本計畫之初期為實驗室開發，本團隊未來於現地模場試驗中會加強此部分。 4. 感謝委員指教，本計畫之技術已成功申請到發明專利一件，已獲初審核准(申請號:108114190)，未來本計畫之技術將可以與公司協商技轉或者商業化的可能性。 5. 感謝委員指教，脫鹵球菌之培養所需要的相關知識非常的多，許多文獻皆報導本菌非常難培養，本團隊彙整了培養脫鹵球菌的重要參數，藉由本團隊之成功案例，提供台灣未來於含氯有機物之研究者參考，已提升我國土水整治實力。	



委員三 1. P.14 宜列明所開發高效脫氯生物膠體適用場域。 2. P.33 宜列明脫鹵球菌穩定性與生長變異性。 3. P.41 宜評析各種含氯有機物濃度對微生物生長與污染物處理效能之影響。 4. P.45 宜規劃進行實場測試與處理效能分析。 5. P.46 宜規劃進行連續管柱測試，以利了解實用性。	1. 感謝委員指教，本膠體預計使用於多氯乙烯污染地下水之場域。 2. 感謝委員指教，本團隊可以穩定培養脫鹵球菌，並且可以持續繼代數十代，由於脫鹵球菌於解凍後須再花費半年重新活化，目前本團隊需辛勤繼代高活性脫鹵球菌，其脫氯活性每一代皆穩定。 3. 感謝委員指教，本團隊將會評估其他種類的含氯有機物用於篩選脫氯菌群。 4. 感謝委員指教，本實驗將以現地地下水作為實場測試之效能評估，將會測定多氯乙烯變化、qPCR 菌數分析、菌相分析，最終結果將形成整治策略。 5. 感謝委員指教，本計畫目前無規劃進行連續管柱測試，將會挖井並進行現地整治以了解實用性。
委員四 1. P.35 章節 4.4 及 P.40 章節 4.5 均有提及 107 年度執行計畫，在先前執行成果下進行精進研究，故建議報告書內文表列本次計畫與先前計畫差異之處，並評估可能獲得成果。 2. 本技術具有實場應用性，但是因實場整治應用時，三氯乙烯可能降解為毒性更高的氯乙烯，若未妥善進行水力控制並掌握整治時效，可能造成毒性較大污氯乙烯污染擴散，故建請列入評估。	1. 感謝委員指教，本團隊將會表列本次計畫與先前計畫差異之處，並評估可能獲得成果。 2. 感謝委員指教，本團隊針對氯乙烯之部份，已特別選用特化氯乙烯降解之脫鹵球菌 BAV1，該菌擁有脫氯酵素 <i>bvcA</i> 可即時降解二氯乙烯及氯乙烯，產生無毒之乙烯，此菌為本次高效脫氯膠體之重要核心，水力控制及整治時效之部份，本團隊會加強監測力度，確保無二次污染產生。
委員五 1. 本研究培養脫鹵球菌，開發本土脫氯共生菌群，同時開發高效脫氯生物膠體，包埋脫鹵球菌與產氫菌，以污染攔截牆工法，提升整治成效。 2. 脫鹵球菌可以包埋後，球菌的活性維持時間，應進行評析。	1. 感謝委員肯定。 2. 感謝委員指教，膠體內之脫鹵球菌的脫氯活性可以維持超過 68 天，此項特性已於膠體長效性及再利用性批次實驗證明，並且同時該實驗持續進行中，目前已超過 90 天膠體內的脫鹵球菌皆保有脫氯活性，因此本膠體非常適合



3. 本計畫擬大量培養脫鹵球菌，使得菌量達可以達應用於現地整治之標準，建議說明相關欲達成的指標。 4. 包埋菌數是否影響脫氯效率，如何控制菌數進行脫氯膠體包埋，建議補充說明。 5. 期中報告指出，膠體可以重複使用至少 9 次以上，建議補充說明現地應用時，如何將膠體重複使用。	應用於實務中長時間整治之需求。 3. 感謝委員指教，本團隊已可以在 9 天大量培養 1L 飽和脫鹵球菌，其菌量可達 10^{11} copies/L，未來在填充每根膠體管柱時需要接近 10 公升之飽和脫鹵球菌，平均每根脫氯膠體管柱總菌數將可達 10^{12} copies，足以利用於現地整治。 4. 感謝委員指教，包埋菌數的確影響脫氯速率，本研究測得當膠體菌數密度達 10^{10}/mL 時，有最佳之脫氯速率，包埋菌數將控制於凝膠前的濃縮菌液之添加量，可以使用離心或者過濾達到菌液濃縮之目的。 5. 感謝委員指教，污染物回流或者溶出是現地整治常見之現象，經常使得污染物濃度再一次上升，同時地下水活化之脫鹵球菌亦會被地下水沖刷而散失，本實驗在模擬現地若有上述之情況發生時，膠體是否可以再一次維持其脫氯活性，本膠體之重複使用及長效之特性已於膠體長效性及再利用性批次實驗證明，因此本膠體非常適合應用於實務中因應污染物變化之需求。
委員六 本計畫期中報告查核點符合預定進度。	感謝委員肯定。
專案主持人：_____ (簽名及蓋章)	



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

審查意見回復對照表

計畫年度	109 年度	計畫類型	☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其它	主持人：陳師慶 NO：A10	
計畫名稱	開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一： 1. 研究成果展現請檢視研究目的/內容(5項)對照說明。 2. 新型膠體配方之有效性/改進效果為何？		1. 感謝委員指教，已將研究成果對應研究目的補充於第五章中。 2. 感謝委員指教，經本團隊優化之脫氯膠體，可成功包埋產氫菌及脫鹵球菌於膠體之中，並且確認本膠體可以長時間使用長達 183 天以上，並且可以維持脫鹵球菌及產氫菌之活性，膠體可以重複使用至少 26 次以上，因此具有現地應用之潛力。	
委員二： 1. 本計畫書撰寫邏輯請重新整理，尤其是前言與目的宜就緣起及為解決什麼問題，而不是撰寫教科書方式，與抬頭並無關聯。 2. 目前所得之實驗結果及數據，與當初之預期是否有落差。惟第二年模場之實驗之規劃要如何進行，可能會遭遇之問題，宜先提出預作準備。 3. P.65 頁所提出之甘特圖為預期之期程及工作項目，宜補充實際執行有無差異，差異在哪裡，如何克服等等，請於報告中補充。		1. 感謝委員指教，第一章已修正為計畫前言與文獻探討，第二章維持研究目的。 2. 感謝委員指教，本計畫第一年之執行結果符合計畫預期，在脫氯膠體的長效性及脫氯活性驗證上有豐碩的成果。第二年的模場實驗本團隊在 108 年度環保署計畫中已有執行經驗，將會對於氯乙炔，pH 及 ORP 進行嚴格監控，提前排除各種整治失敗的相關問題。 3. 感謝委員指教，已修正第六章之查核點檢驗，並註記已完成之項目，並且標註對應之第四章及第五章頁數，即可對應執行差異度及解決方法等，報告內皆有詳盡討論。	
委員三： 1. 第一章計畫前言與研究目的、第二章研究目的，兩者是否為重複敘述；綜審目前第一章大部分內容偏向文獻回顧，建議相關內容移至第二章，並將第		1. 感謝委員指教，第一章已修正為計畫前言與文獻探討，第二章維持研究目的。 2. 感謝委員指教，已修正第六章之查核點檢驗，並註記已完成之項目，並且標	



二章名改為文獻回顧。 2. 第六章僅放研究甘特圖，且無文字說明，建議補充並合併至第四章或第五章，最後章節建議為全案計畫結果與討論、建議；另外 P.63 右上標為「結果與建議」，建議修正章節名稱相同(結論與建議)。 3. 本計畫結論未評估三氯乙烯若降解為毒性更高的氯乙炔，故需要規劃各項對策(如水力控制或複合式整治等技術)，可能造成毒性較大之氯乙炔污染擴散，造成本技術於實場應用之障礙，應結合適當監測，以減少危害風險。 4. 本研究之目的明確，實驗方法架構清晰，結論具體可行，成果豐碩，達成計畫之預期目標。 5. 建議於模場試驗後，建立整治技術之整治成本與相關參數，以供大規模應用參考。	註對應之第四章及第五章頁數，完成章節合併，因此，計畫結果與建議則維持原本第五章，並且將第五章之標題修正為結論及建議。 3. 感謝委員指教，這個部分已經補充於 P64，三氯乙烯若降解為毒性更高的氯乙炔，倘若氯乙炔維持時間過長足以影響計畫期程，本團隊將使用生物添加方法將本團隊所開發之高效脫氯菌群，直接提升現地脫氯速率，達到完全脫率，氯乙炔及相關污染物將會密集監控。 4. 感謝委員肯定。 5. 感謝委員肯定，本團隊將會於第二年期末報告檢附本整治技術之整治成本，以利於未來相關從業者可以參考應用於大規模場地。
委員四： 1. 計畫報告完整，成果豐碩。 2. 建議評估脫鹵球菌的培養成本分析。 3. 本研究目前可以進行單批次之厭氧培養，所使用的厭氧培養液體積可達1公升，建議未來進一步探討大量生產的相關參數及反應器設計。 4. 建議針對包埋的載體特性做更完整的分析，以了解相關的質傳參數及效果。 5. 建議補充說明共包埋產氫菌及脫鹵球菌的相關數據。 6. 建議未來評估本整治方法的成本分析。 7. 如何控制 ORP<-200mV 8. 包埋菌種的營養源，如何在現地進行提供。	1. 感謝委員肯定。 2. 感謝委員指教，脫鹵球菌的成本分析，由於培養脫鹵球菌為高門檻之技術，因此初步分析人力成本將佔 50%，設備耗材佔 20%，培養基佔 20%以及 10%相關場地費用。 3. 感謝委員指教，本團隊已經研發出可量產之脫氯菌群製程，未來可達到百升以上的量產規模，可參考呂等 (2020)，脫鹵球菌生物添加應用及本土高效氯群篩選，2020 環工學會第 32 屆年會暨各專門學術研討會，中央大學。 4. 感謝委員指教，本團隊所開發之膠體並不會在地下水中移動，因此無法討論膠體顆粒的質傳參數，但是，本膠體所包埋的微生物可藉由擴散釋放到地下水中，且細菌具有化學趨向性，往高



	濃度的污染處移動，因此，可以藉由分子生物工具監測菌數的分布探討本膠體的效果。 5. 感謝委員指教，共包埋產氫菌及脫鹵球菌以詳盡研究於 4.4 章中，本膠體是目前首度將脫鹵球菌及產清菌包埋的技術。 6. 感謝委員指教，本團隊將會於第二年之期末報告中加入成本分析。 7. 感謝委員指教，透過加入還原劑(如 Na_2S)即可達到 ORP 約-200，另外藉由厭氧指示劑(刃青天)可確認厭氧狀態，相關學理機制計載於 P28 中。 8. 感謝委員指教，本包埋膠體將會搭配生物刺激法，因此營養源將會來自外部添加。
委員五： 1. 團隊已成功建立脫鹵球菌培養之絕對厭氧系統，可於 10 天內降解 TCE 至 VC。 2. 中文摘要宜含研究成果，期中意見 1(適用場域)、意見 2(穩定性與生長變異性分析)、意見 5(連續管柱測試)尚未列明，宜再予以補充。 3. 第一代與第五代反應差異頗大，尤其 VC 濃度，宜加強探討所培養細菌是否變異及其穩定性。 4. 宜評估其他污染物對本系統之影響，尤其最佳條件建立(尤其乳糖脫氯膠體比例)。 5. 宜列明本系統反應前後菌相變化之差異性，尤其長期(超過 10 天)運轉變化。	1. 感謝委員肯定，本計畫的結果並非 10 天內降解 TCE 至 VC，而是 10 天內降解 cDCE 至乙烯(Ethene)，兩者實場貢獻意義差異甚大，本團隊的技術可解決業界常見的 cDCE 及氯乙烯累積問題。 2. 感謝委員指教，摘要部分已經補充研究成果，期中意見 1: 本膠體預計使用於多氯乙烯污染地下水之場域。；意見 2: 本團隊可以穩定培養脫鹵球菌，並且可以持續繼代數十代，由於脫鹵球菌於解凍後須再花費半年重新活化，目前本團隊需辛勤繼代高活性脫鹵球菌，其脫氯活性每一代皆穩定活性。；意見 5: 本計畫目前無規劃進行連續管柱測試，將會挖井並進行現地整治以了解實用性。 3. 感謝委員指教，這裡指的第一代是剛從環境中或者冷凍管中接種的細菌，其生理狀況較差，因而會影響 VC 的脫氯程度，但是隨著繼代後，通常於第



五代後可以達到穩定的活性及快速脫率，時常的繼代為保持高活性脫鹵球菌的秘訣。

4. 感謝委員指教，本團隊將會評估其他污染物對於系統之影響，如常見污染物 1,2-DCA，但是由於場地已確認關鍵污染物為 TCE 並無其他污染物，因此相關實驗將會在未來其他計畫中進行。

5. 感謝委員指教，由於本次批次實驗已於 30 天內將污染物完全降解，因此，取樣的時間點設定為第 30 天，反應前的菌相應與自然降解組做對照，其變化差異性已撰寫於 4.6.1 中。

專案主持人：_____（簽名及蓋章）





二、研究成果中英文摘要

中文摘要

三氯乙烯含氯有機物因其特性為比水重之非水相液體(dense non-aqueous phase liquid, DNAPL)，進入地下環境後，因其低黏滯性使其可在地表下快速移動，低表面張力使其容易穿入土壤小孔隙或岩石裂隙，造成整治困難度高。生物整治法被喻為自然、環保及節能的處理技術，也是目前環境污染整治的趨勢。現地生物復育技術可行性其中最重要條件之一為場址本身須具有可降解污染物之微生物。當場址中可降解污染物微生物數量較低或場址整治急迫性高時，可額外添加微生物進行生物強化(Bioaugmentation)整治受污染之場址。雖然許多微生物已證明可降解 TCE 至中間產物 Vinyl chloride (VC)，但 VC 具有更高毒性和累積性，因此如何去除環境中 VC 污染，是生物復育一項重要課題。本研究第一年度欲建構絕對厭氧操作技術，大量培養脫鹵球菌，使得菌量達可以達應用於現地整治之標準，延伸開發本土脫氯共生菌群，同時開發高效脫氯生物膠體，包埋脫鹵球菌與產氫菌，結合污染攔截牆工法，有效提升生物基質之利用。本團隊所培養的純種脫鹵球菌可以將 80 μ mole 在 9 天內完全降解成無毒的乙烯。經優化後之脫氯膠體，可成功包埋產氫菌及脫鹵球菌於膠體之中，並且確認本膠體可以長時間使用長達 183 天以上，並且可以維持脫鹵球菌及產氫菌之活性，膠體可以重複使用至少 26 次以上，因此具有現地應用之潛力。

關鍵字：脫鹵球菌、生物膠體、氯乙烯、完全脫氯





英文摘要

Chlorinated organic compounds such as trichloroethene (TCE), which characteristic is dense non-aqueous phase liquid (DNAPL). When entering the underground environment, it can move rapidly under the surface due to its low viscosity, and its low surface tension makes it easy to penetrate the soil small pores or rock cracks, causing remediation difficult. Bioremediation has been hailed as a natural, eco-friendly and energy-saving treatment technology, and also the current trend of environmental pollution remediation. One of the most important conditions for on-site bioremediation technology is that the site itself must have microbes that can degrade contaminants. When the number of the degradable microbes at the site is low or the remediation site is of high urgency, additional microorganisms may be added for bioaugmentation to remediate contaminated sites. Although many microorganisms have been shown to degrade TCE to the intermediate product Vinyl chloride (VC), VC is more toxic and cumulative, so how to remove VC contamination in the environment is an important issue in biological breeding. In the first year of this study, we wanted to construct an absolute anaerobic operation technology, and cultivate a large number of dehalococcoides, so that the amount of bacteria can reach the standard of on-site remediation, extend the development of local dechlorination symbiotic bacteria, and develop high-efficiency dechlorination bio-gel. Dehalococcoides and hydrogen-producing bacteria are combined with the pollution intercepting wall method to improve the utilization of biological substrates effectively.

Keywords: Dehalococcoides, Bio-gel, Vinyl Chloride, Completed Dechlorination



行政院環境保護署

109 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

第一章：計畫前言與研究目的	1
1.1 三氯乙烯 (TCE)	1
1.2 含氯場址整治方法	2
1.3 厭氧還原脫氯生物研究	5
1.4 無氧代謝降解-還原脫氯	6
1.5 參與厭氧降解的細菌	6
1.6 酵素和功能性基因參與 PCE/TCE 厭氧脫氯作用	7
1.7 產氫菌加強 TCE 分解	9
1.8 包埋固定化菌株技術應用	10
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
3.2 模場試驗設井規劃	16
3.3 絕對厭氧操作方法	18
3.4 脫鹵球菌培養方法	19
3.5 地下水基本性質分析	19
3.5.1 地下水水質參數分析 (酸鹼值 (pH)、導電度 (EC)、氧化還原電位 (ORP)、溶氧量 (DO))	19
3.5.2 地下水總溶解性有機碳分析	19
3.5.3 地下水樣品 genomic DNA 萃取	19
3.6 DNA 純化	20
3.7 基因選殖	20
3.8 即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)	22
3.8.1 標準品製備	22
3.8.2 qPCR 上機步驟	23
3.9 TCE 相關代謝物 GC 層析檢測	25
3.10 次世代定序菌相分析組裝流程	25
第四章：實驗結果	27
4.1 脫鹵球菌及脫氯酵素(RDase)鑑定	27
4.2 脫鹵球菌活化及繼代培養	28



4.3 脫鹵球菌生長批次實驗	32
4.4 優化產氫菌產氫效力及脫鹵球菌共培養	35
4.5 脫鹵球菌包埋測試及優化膠體	40
4.6 脫氯膠體現地地下水批次實驗	47
4.6.1 菌相變化分析	49
4.6.2 樣本主座標分析及菌相熱點分析	53
4.7 地下水質基本性質分析及現地菌群批次實驗	57
4.7.1 地下水井設置及污染物調查	58
4.7.2 脫氯膠體管柱配置及現場設置圖	61
4.8 模場整治策略評估	62
第五章：結論與建議	63
5.1 脫鹵球菌培養及開發優化脫氯膠體	63
5.2 地下水水質及脫氯潛力測試	64
5.3 建議.....	64
第六章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	65
第七章：參考文獻	68



行政院環境保護署

109 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. 含氯有機物降解路徑與代謝基因圖.....	8
圖 2. 細胞固定方式示意圖.....	11
圖 3. 研究架構與實驗流程圖.....	15
圖 4. 本計畫場址位置圖、地下水流向、灌注井與監測井示意圖	17
圖 5. 厭氧培養用之加氣站設計圖(A) 操作面板，包含流量調節計、壓力計、氣體控制伐(B) 操作面板背面管線配置圖 (C) 銅管加熱器 (Speers, et al., 2009)	18
圖 6. 脫鹵球菌 <i>Dehalococcoides maccartyi</i> 脫氯酵素基因(<i>bvcA</i> 及 <i>tceA</i>)電泳分析	27
圖 7. 刃天清化學反應機構圖(Wagner, et al., 2019).....	28
圖 8. 脫鹵球菌 BAV1 繼代培養及脫氯反應分析.....	30
圖 9. 脫鹵球菌 FL2 繼代培養及脫氯反應分析	31
圖 10. 起始菌量影響脫鹵球菌 BAV1 脫氯反應測試，四種不同濃度的起始菌量 (A) 10^5 (B) 10^6 (C) 10^7 (D) 10^8 (copies/mL)之脫氯反應趨勢圖; (E) 以 qPCR 檢測脫鹵球菌之生長曲線，起始菌量為 10^6 。本批次實驗皆培養於 100mL 厭氧培養液中，起始 cis-DCE 皆為 80 μ mole，頂空含有 20% 氫氣及 80% 氮氣，醋酸鈉為單一碳源	32
圖 11. 大體積培養脫鹵球菌 BAV1 及其脫氯反應測定(A) 大體積 1L 脫鹵球菌培養及其專用厭氧瓶 (B)不同起始量之脫氯反應趨勢圖，瓶 1 之 cis-DCE 起始量為 800 μ mole，瓶 2 之 cis-DCE 起始量為 500 μ mole，起始菌量為 10^7 copies/mL，頂空為氫氣 20%及氮氣 80%，單一碳源為醋酸鈉(10mM) 34	
圖 12. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 之單一碳源應用生長趨勢圖	35
圖 13. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 使用乳糖厭氧發酵氫氣趨勢圖	36
圖 14. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 使用不同濃度之乳糖厭氧發酵 pH 變化趨勢圖.....	36
圖 15. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 使用不同濃度之乳糖厭氧發酵生長趨勢圖	37
圖 16. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 使用不同濃度乳糖厭氧發酵氫氣趨勢圖 ..	37
圖 17. 產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 使用 1mM 之乳糖厭氧發酵醋酸趨勢圖，產氫菌培養於有添加/無添加 0.8mM 濃度之 cis-DCE.....	38
圖 18. 脫鹵球菌 BAV1 及產氫菌 <i>Clostridium butyricum</i> 共培養批次試驗 (A)沒有	



- 添加產氫菌 (B)添加產氫菌。頂空僅有氮氣，厭氧培養液中提供唯一碳源為乳糖(1mM)，cis-DCE 起始量為 70 μ mole，接種菌量 BAV1 為 10⁶，產氫菌為 10⁹ 39
- 圖 19. 產氫菌與脫鹵球菌共培養降解多氯乙烯共生協同作用機制圖 39
- 圖 20. 不同配方比例之脫鹵球菌包埋膠體測試，烷氧溶液、矽奈米顆粒與菌液比例(A)1:1:0.4; (B)1:1:1; (C)1:1:5; (D)1:1:5 成功膠體之照片，頂空添加 20% 氮氣及 80% 氮氣，碳源為醋酸鈉 10mM，起始量 cis-DCE 為 35 μ mole。 40
- 圖 21. 脫鹵球菌菌數包埋膠體試驗(A)10¹⁰(B)10⁹(C)10⁸ copies/mL 膠體菌數密度，頂空添加 20% 氮氣及 80% 氮氣，碳源為醋酸鈉 10mM，起始量 cis-DCE 為 70 μ mole 41
- 圖 22. 產氫菌與脫鹵球菌包埋膠體測試，菌種膠體密度 BAV1 為 10¹⁰ copies/mL，產氫菌為 10⁸ copies/mL，乳糖(1mM)為單一碳源，頂空僅只有氮氣，起始量 cis-DCE 為 70 μ mole 42
- 圖 23. 包埋產氫菌及脫鹵球菌之脫氯膠體長效性及再利用批次試驗(n=3)，脫氯膠體起始降解 70 μ mole 之 cis-DCE，等待完全脫氯後清除上清液，再重新加入新的厭氧培養液 100mL 以及 30 μ mole 之 cis-DCE，連續培養 26 代，縱軸為總氯化物量(Total Chlorine = cis-DCE_{x2} + Vinyl Chloride, μ mole)，單一碳源為乳糖 1mM，頂空僅有氮氣，包埋菌種膠體密度 BAV1 為 10¹⁰ copies/mL，產氫菌為 10⁸ copies/mL 43
- 圖 24. qPCR 分析包埋產氫菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)完全脫氯時之上清液菌數 44
- 圖 25. qPCR 分析包埋產氫菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)第九代脫氯反應時之上清液菌數及頂空氮氣累積量 44
- 圖 26. (A)包埋產氫菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)之 qPCR 菌數統計分析圖;(B)脫氯速率(Rate)與總氯化物量(Chlorine Conc.)、產氫菌(CLO)及脫鹵球菌(DHC)菌數之相關性分析圖;(C) 脫氯速率與總氯化物量之線性關係圖. 45
- 圖 27. 有機氯化物速率分析統計圖表 46
- 圖 28. 現地地下水脫氯膠體活性微型實驗，組別分別為(A) 自然降解組 (B) 矽膠控制組 (C) 乳糖控制組 (D) 脫氯膠體組，脫氯膠體菌種密度脫鹵球菌 BAV1 為 10¹⁰ copies/mL，產氫菌為 10⁸ copies/mL，乳糖(1mM)為單一碳源，頂空僅只有氮氣，起始量 cis-DCE 為 70 μ mole 47
- 圖 29. qPCR 分析現地地下水脫氯膠體活性微型實驗包埋產氫菌(*C. butyricum*)及脫鹵球菌(Dhc)完全脫氯時之上清液菌數 48



圖 30. 以屬為分類之菌相累積變化圖	51
圖 31. 反應井與監測井之樣本主座標分析圖	53
圖 32. 以種為分類之菌種前 30 名之熱點分析圖	54
圖 33. 目前已知 16 種天然合成之鈷胺(Cobamide)，Lower base 為 DMB 者為維他命 B12, Cobalamin (Yan, et al., 2018)	55
圖 34. <i>Acetobacterium</i> 與 <i>Sporomusa</i> 之脫氯反應關係圖(Puentes Jácome, et al., 2019)	56
圖 35. 現地地下水菌群降解三氯乙烯之批次實驗	57
圖 36. 台鈴場地 8 月挖井施工圖	58
圖 37. 灌注井及監測井之設置圖，其中 IW1 和 IW2 將會作為生物刺激控制組，IW3 和 IW4 將會設置脫氯膠體作為膠體反應井，MW1-MW2 為監測井，TL1-4 為既有監測井	59
圖 38. 固定化產氫菌膠體管柱設置示意圖	61
圖 39. 脫氯膠體微生物組成在多氯有機污染物降解過程中所扮演之角色	62



行政院環境保護署

109年度土壤及地下污染整治基金輔助研究與模場試驗專案

表次

表 1. 地下水整治方法統計表	4
表 2. 聚合酶連鎖反應 (PCR)混合液配置	22
表 3. realtime-PCR 反應 SYBR Green 系統之混合液配方	23
表 4. realtime-PCR 反應 TaqMan 系統之混合液配方	23
表 5. 本計畫所使用之引子與探針序列	24
表 6 常見還原劑及其還原電位(Plugge, 2005).....	28
表 7. 生物刺激之氫氣生成及脫氯相關氫氣利用反應自由能表(He, et al., 2002). 29	
表 8. 微型試驗之實驗組別設計表	47
表 9. 以屬為分類階層之菌相變化表	49
表 10. 灌注井及監測井之地下水污染濃度表	60





第一章：計畫前言與文獻探討

1.1 三氯乙烯 (TCE)

三氯乙烯 (TCE)具有獨特的溶劑特性，因此適用於廣泛的工業應用 (Ohlen 等，2005)。TCE 的使用開始於 20 世紀。目前，它被廣泛用於金屬脫脂 (佔 TCE 總消耗量的 80-90%)，清潔和乾燥有關航空領域電子元件操作 (用於沖洗液態氧)，塗料和塗料印刷油墨生產，在紡織品作為熏蒸劑和冷藏等 (Ohlen et al., 2005 ; Hazen et al., 2009)。TCE 的年度全球生產 2005 年為 6.7×10^5 公噸，消費量為 4.3×10^5 公噸 (Lacson, 2005)。它是一種密集且無色具有類似氯仿氣味的液體 (Jacoby et al., 1998)。TCE 是進入生物圈的有毒污染物，主要是由於處理不當導致洩漏溢出和處理含各種來源 TCE 的流出物 (Fernandes et al., 2009 ; Haest et al., 2010)。根據美國環保局 (2006 年)，在 2005 年 TCE 在美國的環境釋放量超過 2.5×10^3 公噸。1970 年，TCE 首次在地下水中被發現 (美國環保局，2001 年)。如美國環保保護局 (美國環保署，2001 年)，毒品局美國物質和疾病登記處 (美國毒物和疾病登記署，2003 年)和印度中央污染控制委員會 (CPCB，2007)等等。美國環保局和印度 CPCB 已經設定了空氣中三氯乙烯的允許限制最大值分別為 0.003 毫克/立方米和 270 毫克/立方米。由於其釋放到環境中，TCE 對人體健康構成威脅。它是其中之一最危險的揮發性有機(VOCs)化合物之一，已被證明具有致癌性和致突變性 (USEPA, 1997)。幾種慢性疾病包括眩暈、震顫、噁心、嗜睡、疲勞、肝癌、肝炎和心力衰竭等 (美國 EPA，2007)。

TCE 在環境中的命運取決於釋放它的介質 (空氣，土壤或水)。它在正常條件下不水解，但可在水中緩慢被光氧化 (HSDB，2002)。土壤中的三氯乙烯，在不同地點之生物降解分解過程速率較慢，約幾個月至幾年的半衰期。但因 TCE 有較高蒸氣壓，因此主要存在於氣相而不是吸附在大氣中微粒狀態。一旦 TCE 被釋放到空中，它可通過光氧化過程被破壞。在夏季約 3-8 天的半衰期，冬季則是 2 週。由於 TCE 在環境中具有持久性，因此，如何開發有效和經濟的方法去清除 TCE 污染，已成為研究人員主要關切課題。幾種物理和化學方法如泵處理、氣提、活性炭吸附和高級氧化過程已經被開發並應用於清除 TCE 污染的環境 (Yuan et al., 2012)。但這些過程大多耗時、污染並且昂貴 (Abumaizer et al., 1998)。生物修復是一種具有吸引力去除 TCE 方法。微生物降解具有許多優點如成本效益、高效能性及環保性等優點，可將 TCE 完全礦化成二氧化碳和氯 (Russell et al. 1992; Atlas & Philip, 2005)。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

Pant & Pant (2010) 整理過去 20 年中有關 TCE 生物降解研究報告，發現在厭氧條件下的還原脫氯條件以氯化乙烯充當電子受體。然而，其代謝作用需要氧氣用於 TCE 酵素降解。在有氧條件微生物可以直接氧化氯化乙烯，因此可將氯化乙烯充當電子供給者。Shulaka et al. (2014) 指出固氮菌可在微氣候條件生長，並可在缺氮環境中固定氮氣提供氮源，支持相關脫氯菌生長 (Roesch et al., 2008)。甲烷營養菌可在各種不同生存條件下生長，可適應不同的 pH 值，溫度，O₂ 和重金屬濃度 (Dubey, 2005)。利用不同微生物特性，來強化 TCE 降解能力，已經成為生物降解 TCE 之重要方向。

1.2 含氯場址整治方法

依污染物處理實施場所劃分，可分為現地 (*in situ*)、現場 (*on site*) 與離場 (*off site*) 三種，現地處理係指直接於土壤及地下水污染區進行整治工作；離地處理則需先將遭受污染之土壤挖出或地下水抽出至地表面上，再進行整治處理；離場處理係指將遭受污染之土壤及地下水由地表下暴露出後，經由運輸系統運離污染場址後進行處理 (環保署，98 年)。現地處理不需挖掘土壤，且對大範圍污染區域只需以生物、化學進行重複操作的步驟，故可節省大量離場成本且在污染現場即可操作，近年來被大量應用在台灣的含氯有機物污染場址。

依處理方法而言，含氯有機污染物整治方法可分為物理技術、化學處理技術及生物處理技術等三大類別。物理處理技術係利用污染物的物理特性進行整治作業，涵括土壤開挖法、空氣曝氣法、DNAPL 純相回收、地下水抽除處理法及熱處理技術等。化學處理技術係利用氧化還原機制，降低污染物質量、移動性或毒性的方法，包含現地化學氧化法、現地化學還原法、透水性反應牆、零價鐵還原及界面活性劑等。生物處理技術係利用生物代謝轉化並降解污染物，涵蓋植生復育及地下水生物整治等 (工業局，93 年)。

現地生物處理的優點包涵可整治去除污染區溶解相及可脫附的吸附相污染物、對場址的破壞干擾程度較低、成本低廉、現地生物復育整治工程結束後，原場址仍可藉由自然衰減方式，將污染狀況更進一步的加以改善、整治低溶解度及高吸附性的污染物時，整治時程會比抽取處理法為短、較無衍生二次污染物的問題等 (USEPA, 1994)。

根據美國 USEPA 統計 Superfund (超級基金) 整治場址資料顯示，由 2009 年至 2011 年，現地地下水整治方法的趨勢以生物整治及化學氧化為主 (USEPA,



第一章：計畫前言與研究目的

2013)。依前述統計資料，現地地下水整治作業中，生物整治所使用的比例為最多，佔 24%；其次為化學氧化法 (14%)，相關統計資料表如表 1。顯現現地生物復育為美國地下水整治之主要趨勢，而國內代表性場址如桃園 RCA、台中漢翔公司及高雄福德爺廟等地下水含氯有機污染場址，皆採用厭氧還原脫氯之生物處理法為整治方案。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

表 1. 地下水整治方法統計表

Technologies	Total (FY05-08)	Percent Groundwater Decision Documents (FY05-08)	Total(FY09-11)	Percent Groundwater Decision Documents (FY09-11)
Pump and Treat	85	26%	45	22%
Groundwater Pump and Treat	82	25%	44	21%
Surface Water Collect and Treat	5	2%	1	<1%
In Situ Treatment	97	30%	79	38%
Bioremediation	60	19%	49	24%
Chemical Treatment	38	12%	28	14%
Air Sparging	10	3%	12	6%
Permeable Reactive Barrier	7	2%	8	4%
In Well Air Stripping	0	0%	2	1%
Multi-Phase Extraction	1	<1%	2	1%
Phytoremediation	3	1%	0	0%
Fracturing	1	<1%	0	0%
MNA of Groundwater	116	36%	56	27%
Groundwater Containment (VEB)	16	5%	6	3%
Constructed Treatment Wetland	1	<1%	4	2%
For Groundwater Treatment	1	<1%	3	<1%
For Surface Water Treatment	0	0%	1	<1%
Other Remedies	281	87%	177	86%
Institutional Controls	274	85%	173	84%
Alternative Water Supply	26	8%	13	6%
Engineering Control	4	1%	2	1%
Technologies	Total (FY05-08)	Percent Groundwater Decision Documents (FY05-08)	Total(FY09-11)	Percent Groundwater Decision Documents (FY09-11)

備註:各場址選用之整治方案可能為 1 個以上。

資料來源:Superfund Remedy Report 14th Edition, USEPA, 2013



1.3 厭氧還原脫氯生物研究

四氯乙烯 (PCE)和三氯乙烯 (TCE)已是環境中常見工業污染物 (Moran et al.2007)。它們具有特殊的化學性質和很多優點，在工業、農業和軍事領域有廣泛的應用，但它們對環境可造成持久性的毒性影響 (Henschler 1994)。由於 PCE 和 TCE 的密度和粘度高於水，及 PCE 和 TCE 都是疏水性的且溶解度相對較低；因此，在地下水中仍然存在。此外，相對較高的揮發性使其可以釋放到非飽和土壤區 (Wittlingerova et al., 2013)和大氣中。

受污染含水層中的 PCE 和 TCE 來於人工合成，但順式 1,2-二氯乙烯 (cDCE)和氯乙烯 (VC)主要來源於污染環境內微生物降解 (Nijenhuis et al., 2007; Vogel and McCarty, 1985); 但 PVC 塑料的工業生產也可能是 VC 的直接來源 (Hartmans et al.1985)。氯乙烯在含水層中通常可造成持久性污染物，被許多微生物降解產生副產品如 cDCE 和 VC，其毒性比原本 PCE 和 TCE 具有更高的毒性 (Mattes et al.2010)。少量的氯乙烯也可天然產生的。例如，VC 可由土壤內耐腐酸、鐵 (III)和氯化物 (Keppler et al.2002)之間的化學反應產生的，並且 PCE 和 TCE 可通過海藻生物合成產生 (Abrahamsson et al., 1995)。

微生物對 PCE 和 TCE 的厭氧降解都是通過一系列步驟進行的，每個步驟都包括逐一移除氯原子，即反式 1,2-和 1,1-二氯乙烯 (tDCE 和 1,1-DCE)和 VC 到乙烯。cDCE 是有機鹵化物呼吸過程中產生的主要 DCE 異構體，這一過程稱為「微生物還原脫氯」或「生物還原脫鹵」(Tandoi et al., 1994)。各種不同的細菌類群，各自對氯乙烯具有不同的代謝活性，常與氯乙烯污染的含水層共存，它們的實際活性取決於當地的環境條件，即需氧或厭氧 (Imfeld et al., 2011)。氯乙烯的細菌降解可以通過厭氧和有氧代謝降解 (用作電子供體的氯乙烯)、通過厭氧有機鹵化物呼吸作用 (用氯乙烯作為電子受體) (Hug et al.2013; Paul et al., 2016)，或有氧及厭氧共代謝有機鹵化物。這些細菌在微生物代謝過程中可發生，且這過程中沒有提供碳源或能量提供細菌生長 (Mohn and Tiedje 1992; Wilson and Wilson 1985.)。有研究報告 VC 和 DCE 可被厭氧氧化 (Bradley and Chapelle 1998)，但實際上，在低氧濃度仍屬有氧氧化作用 (Fullerton et al., 2014)。同樣，一些細菌，在低氧條件下對氯乙烯通過厭氧氧化降解(Tiehm and Schmidt, 2011)。

有許多研究參與了氯乙烯降解的代謝途徑;為強化目前的生物修復過程，部分研究涉及細菌多樣性，細菌生長和特定細菌群的特定活性的測定 (Dolinová et al., 2016)。許多能夠將氯乙烯降解相關的細菌菌株，現在已被



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

分離出來，並且該類許多細菌菌株的全基因組也完全被定序 (Dolinová et al., 2016)。未來有助於對該類菌種作詳細基礎和應用研究，開發該類菌種對 TCE 降解能力之潛能。

1.4 無氧代謝降解-還原脫氯

有機鹵化物呼吸作用是厭氧環境中氯乙烯降解的主要手段 (Dollinova et al., 2016)。在厭氧有機鹵化物呼吸期間，使用氯乙烯作為電子受體，並且使用來自脫鹵反應產生的能量，用於微生物生長最終的電子提供者通常是氫氣，許多不同的釋氫化合物可以用作主要電子提供者，例如，單化合物如乙酸鹽，苯甲酸鹽，丁酸鹽、甲醇、乙醇、葡萄糖、乳酸鹽或丙酸鹽；或所謂的複合化合物如乳化植物油，有機護膜、糖蜜、乳清和麵粉。因 cDCE 和 VC 不易被細菌通過有機鹵化物呼吸作用而降解，因此，容易在污染場址累積 (Dollinova et al., 2016)。有機鹵化物的呼吸速率可以與生物地球化學過程的相互作用和通過不同微生物群體間氫的競爭會影響 (Dollinova et al., 2016)。因此，加入電子供給者可能不會刺激脫鹵微生物的活性，但可刺激競爭微生物群體的活性，如甲烷菌及乙酸菌之於硫酸鹽，硝酸鹽，鐵和錳還原劑。例如，如果有較高的氫濃度，產甲烷菌就可以競爭氫氣，並將其用於甲烷生成 (Aulenta et al., 2005; Ballapragada et al. 1997)。在低氫濃度下，脫氯細菌對氫氣有很高的親和力，可能與產甲烷菌競爭 (Yang and McCarty 1998)。因此，氫供應的緩慢釋放有利於脫氯細菌 (Fennell et al., 1997; Yang and McCarty 2002)。因此，還原脫氯和氧化還原過程 (如硫酸鹽和鐵還原) 之間的關係對降解過程有重要影響。一些研究證明，硫酸鹽和鐵的還原作用可競爭氫氣，降低脫氯作用 (Aulenta et al., 2008; Azizian et al., 2010)。另外，硫酸鹽還原亦可以減緩 cDCE 和 VC 的脫氯，可能會導致硫化物的累積 (Pantazidou et al., 2012)。除了硫化物和/或氫的競爭 (Berggren et al., 2013)，硫酸鹽的添加可降低 PCE、cDCE 和 VC 脫氯作用。然而，一些研究中顯示添加硫酸鹽反而可提高脫氯效率 (Harkness et al., 2012)。這些矛盾的結果可能是由於在硫酸鹽還原過程中產生了微鹼性條件，使脫氯作用不受影響 (Robinson et al., 2009)。

1.5 參與厭氧降解的細菌

大多數細菌僅能夠通過還原脫氯將 PCE 和 TCE 部分降解為 cDCE 或 VC。



第一章：計畫前言與研究目的

儘管 VC 被認為是脫氯作用代謝產物，但是 *D. mccartyi* strain 195 能夠將 PCE 完全還原脫氯為乙烯 (Maymó-Gatell et al.,2001)。從污染沉積物中分離出兩種其他菌株，*Propionibacterium* sp. HK-1 和 *Propionibacterium acnes* HK-3 顯示出可將 PCE 和 cDCE 降解成為乙烯的兩種厭氧菌 (Chang et al.,2011)。該研究首次證明除 *Dehalococcoides* (Chloryl Chloroflexi) 以外的其他菌株，亦能夠降解 PCE 而不產生有毒的副產物。因此，具有上述這種能力的更多菌種，可能還在等待被發現。儘管如此，*Dehalococcoides* 仍然是三氯乙烯污染場地發現主要菌種，它們的存在與乙烯的形成密切相關。cDCE 和/或 VC 的累積與 *Dehalococcoides* 存在有正相關性 (Hendrickson et al.,2002; Kranzioch et al., 2013)。因此，*Dehalococcoides* 的存在，可證明污染場地具有三氯乙烯的生物降解潛力 (Major et al.2002; van der Zaan et al., 2010)。以氯乙烯作為電子受體和氫作為電子供體的 *Dehalococcoides* 菌株為 *D. mccartyi* (Löffler et al., 2013)。*Dehalococcoides* 限於厭氧條件，並受到氧氣的抑制 (Kaster et al., 2014)一些 *Dehalococcoides* 菌株能夠部分氯乙烯降解，例如，BAV1、CBDB1、FL2、GT、KB-1、MB 和 VS，個別 *Dehalococcoides* 菌株不能完成氯乙烯厭氧降解。

幾種脫鹵球菌屬基因組序列已被測序並描述 (Hendrickson et al., 2002; Kube et al.,2005)。雖然可通過分析 16S rRNA 基因來確定微生物群落成員，但這不適用於解決不同的 *Dehalococcoides* 菌株，因為它們的 16S rRNA 基因序列差異非常小 (He et al.2005; Löffler et al.,2013)。因此，通過 16S rRNA 分析得到的親緣關係測試結果與使用 RDase 基因的水平轉移功能性還原性脫鹵素酶 (RDases)的親緣分析結果比較並不相關 (McMurdie et al., 2009)。儘管脫氯菌產生脫氯效率差異很大，但 *Dehalococcoides* 基因組具有高度保守性，因此，幾乎不可能使用基因組的一小部分來區分個別脫鹵球菌，必須再測定 RDases 基因的存在與活性，來證明 *Dehalococcoides* 脫氯作用。

1.6 酵素和功能性基因參與 PCE/TCE 厭氧脫氯作用

RDase 是有機鹵素呼吸的關鍵酶，因為它們直接催化碳-氯鍵的裂解 (Futamata et al., 2009)。儘管大多數 RDase 都與細胞膜結合，但是在 *Desulfitobacterium*，*Dehalobacter* 和 *Sulfurospirillum multivorans* (Jugder et al.,2015; Maphosa et al.,2012)，可在細胞質發現 RDases 存在。PCE 還原脫鹵素酶 (PCE-RDase) 可將 PCE 和 / 或 TCE 還原脫氯成 cDCE



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

(Neumann,1996)，TCE-RDase 還原 TCE，通過 cDCE 至 VC (Magnuson 等人 1998)，VC-RDase (VcrA) 將 cDCE 和 VC 脫氯成乙烯 (Müller 2004)，1,2-二氯乙烷轉化為乙烯 (Parthasarathy 等, 2015)。VC-RDase (BvcA) 將 VC 氯化為乙烯 (Krajmalnik-Brown 等 2004)。這些 RDase 可能具有更多不同的催化反應 (Lee et al. 2013)。例如，VCRDase (BvcA) 對所有 DCE 異構物進行脫氯作用 (Tang 等, 2013)。

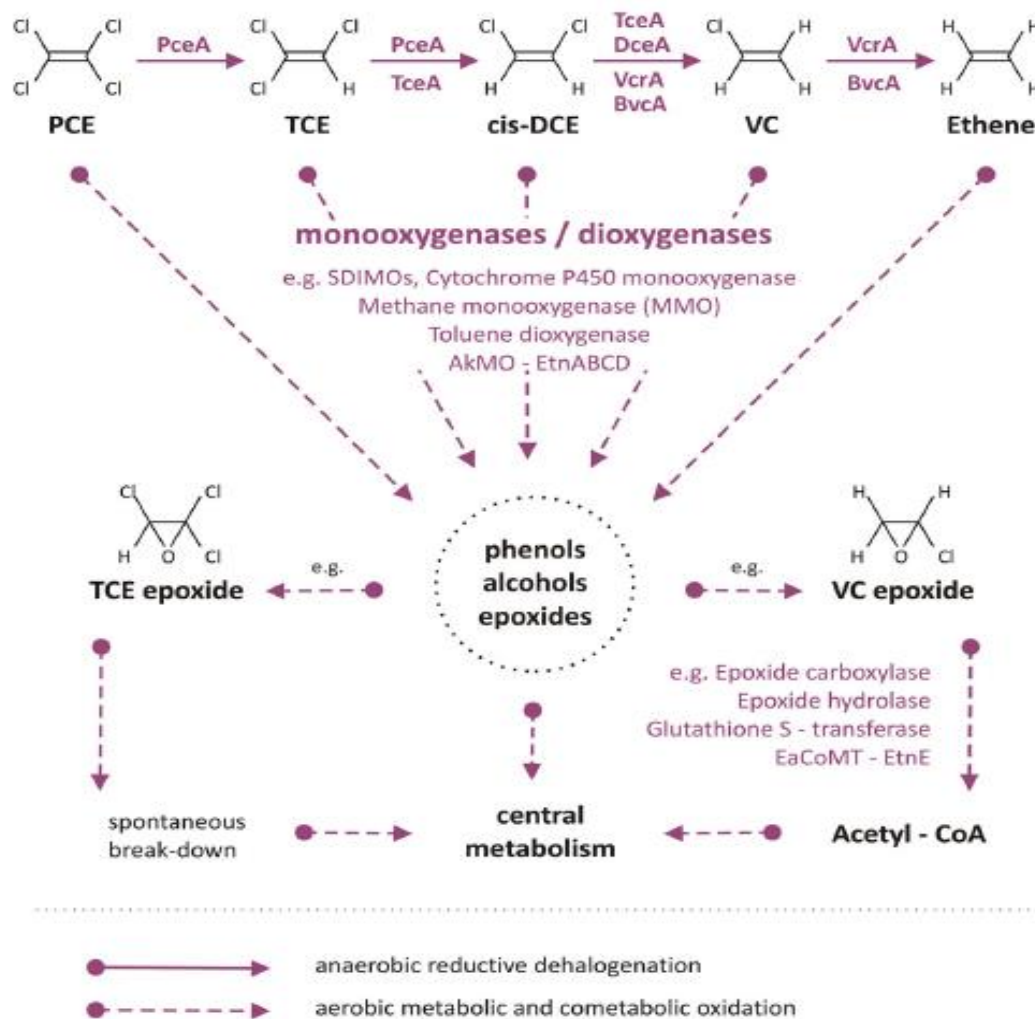


圖 1. 含氯有機物降解路徑與代謝基因圖

測定 RDase 基因的存在和表達可反應脫氯活性程度，並可以克服以 16S rRNA 為主要測定基因方法的局限性。pceA、tceA、vcrA 和 bvcA 於 RDase 基因，分別對不同氯化物具有不同特異性如上圖 1 所示，可用於確定不同脫氯菌生長和脫氯活性。編碼 RDase 的多種基因，可在細胞中存在並表達，通常以多個拷貝的形式出現 (Hug et al., 2013)。大約 650 種已知 rdhA 基因存在 Dehalococcoides (Hölscher et al., 2004; Hug et al., 2013; Kube et al., 2005)。因此，設計合成 pceA、tceA、vcrA 和 bvcA 等 RDase 基因的 primer，可用於

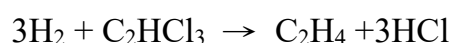


確定氯乙烯降解菌。

三種不同的生物復育方法被應用於降解氯乙烯。首先是「受監控的自然衰減」(MNA)，它採用天然的非生物和再污染現址原微生物降解過程策略。MNA 包括在預測的時間範圍內監測污染場址污染物濃度是否衰減。Wiedemeier 等人 (1998)年制定了評估和實施 MNA 方法。該方法專注於生物還原脫氯。用於評估 MNA 的分析技術僅限於有機和無機化學和無機化學/地球化學 (VOCs、溶解氧、硝酸鹽、Fe(II)、硫酸鹽、甲烷、乙烯、ORP、pH、溫度和鹽度)，並沒有考慮微生物參數。在 MNA 不足以降低污染物濃度到期望目標時，第二種方法被稱為「增強自然衰減」或「生物刺激」。它包括監測自然衰減的原理，但包括碳源或其他電子供體的添加，進一步加速天然氯乙烯的降解 (Dolinová et al., 2016; Lacinová et al., 2013)。為了確認生物刺激法之成功，微生物群體必須已經存在於含水層中。分子生物技術常用來評估污染場地的微生物群體。在實施生物刺激法前，先檢測是否在污染場址是否有分解 TCE 微生物或相關基因。例如，對將氯乙烯轉化成有害的 VC 菌株進行評估。進一步在整治過程中，分析量化特定基因和微生物的變化，可在污染含水層，來評估生物刺激和生物強化效能。第三種方法可以用於目標含水層不含具有分解 TCE 的菌種。生物刺激涉及到添加已知具有降解活性的預培養的細菌，強化污染場址生物復育。目前，具有高效能分子生物技術如 metagenome，可評估污染廠址微生物菌相，不論在整治前後，可決定生物強化或生物刺激成效。

1.7 產氫菌加強 TCE 分解

利用生物代謝含氯碳氫化合物，由於添加基質種類不同，提供微生物代謝生長的自由能則不同，不僅使污染物的生物轉換情形有所差異，同時影響生物代謝途徑。在很多研究中發現，隨著基質種類及濃度不同，會影響含氯碳氫化合物的生物降解情形 (Tsai et al., 2014)。厭氧菌除了利用含氯化合物為電子接受者外，在脫鹵呼吸之過程中，亦需要有電子供給者 (electron donor) 存在以提供電子，一般之電子供給者為氫氣 (hydrogen)、甲醇 (methanol)、乙酸 (acetate) 或甲酸鹽 (formate) 等，下式為三氯乙烯以氫氣作為電子接受者之反應方程式：





氫氣為脫氯反應中電子提供者，微生物經由基質磷酸化之過程產生 ATP。大部分能降解多氯乙烯之微生物其脫氯呼吸之氧化還原電位介於+250 至 +600mV，因此，由熱力學之角度來看，含氯有機化合物在厭氧之狀態下是傾向於作為電子接受者 (Dugat-Bony et al., 2012)；此外，含氯有機物接受電子為自發性反應，並可於反應過程中產生能量。氫氣在還原環境中常常是一個快速且直接的電子供給者，因此氫氣會被許多的微生物族群所競爭，除了脫氯菌 (Hydrogenotrophic dechlorinators) 外，像甲烷菌、硫酸鹽還原菌、氯化菌、脫硝菌、Fe (III) 還原菌等 (Panagiotakis et al., 2015) 都會利用氫氣，尤其是甲烷菌，在很多的厭氧混合族群中，甲烷菌常常是優勢菌種，加上甲烷菌在氫氣的競爭上 (特別是高濃度下) 佔有絕對的優勢，因此是脫氯菌在競爭氫氣上的主要對手。雖然很多的有機物都可以扮演電子提供者的角色，但在近幾年的研究中發現，氫氣在還原脫氯反應中常扮演直接供給電子的角色，而且被認為是促使還原脫氯反應進行的關鍵因子，可直接增加含氯有機物污染場址中的脫氯菌 *Dehalococcoides* 之數量，強化多氯乙烯整治成效。微生物一般將四氯乙烯脫氯到三氯乙烯時的氫氣還足夠，因此脫氯的時間較為快速，但到了後期氫氣逐漸地被消耗殆盡，此時必須透過額外添加氫氣的方式來幫助 *Dehalococcoides* 菌屬的還原脫氯反應。但是額外添加氫氣的成本相對來說較高，已經不符合生物復育的原則。因此可利用額外添加產氫菌株 (例如: *Clostridium butyricum*) 來幫助 *Dehalococcoides* 菌屬的還原脫氯反應，氫化酶 (hydrogenase) 對於微生物發酵產生氫氣來說是一個關鍵的酵素，氫化酶的基因為 *hydA* (Wang et al., 2008)，利用 qPCR 進行定量監測，可了解污染場址中產氫氣的能力，以便對污染場址進行適當的調控。幫助含氯有機物污染場址的整治 (Aulenta et al., 2006)。

1.8 包埋固定化菌株技術應用

固定化微生物技術利用物理或化學手段將具有特定生理功能的游離微生物固定於載體材料內部或表面，使其高濃度密集、保持較高生物活性且可持續使用的一種新型生物工程技術。固定化微生物技術可將選定的高效優勢菌固定在載體上，使該菌在特定處理系統中具有活性高、專一性強、耐受性強 (如 pH、溫度、有毒有害物質)、處理效果穩定、有毒有害物質去除速率快等優點。同時，固定化微生物技術還可以將混合菌屬集於同一載體，使混合菌屬協同處理污染物。固定化微生物技術以其自身的巨大優勢在廢水處理領域中引起普遍的關注，但目前尚處於實驗室水平，要實現由室內模擬階段進入



第一章：計畫前言與研究目的

實際工程應用，還需在以下方面取得突破：(1)篩選對特定污染物去除效率高、耐受能力強的微生物，加強極端微生物的研究，或充分利用複合菌群 (2)研發新型的耐用廉價、強度高、傳質好、性能穩定、環境友好型複合固定化載體 (3)深入研究和探討固定化微生物去除污染物的作用機制。

固定化細胞系統具有許多優點已有報導，其中一些主要原因如下：(1)提供高生物量。(2)提供細胞再利用並減少昂貴的過程。(3)細胞回收和細胞再循環。(4)在高稀釋度下消除細胞清洗問題。(5)高流量允許高體積生產率。(6)提供適合的微環境條件。(7)提高遺傳穩定性。(8)防止剪切損壞。(9)高耐毒性化學品、pH、溫度、溶劑和重金屬 (Bayat et al., 2015)。載體選擇常重要。載體必須具有以下標準：(1)無毒、無污染、不可生物降解。(2)高濃度菌數載重能力。(3)機械，生物和化學穩定性高。(4)長保存期。(5)充足的功能。(6)低成本價格。(7)從流動介質到載體中心的最佳擴散距離。(8)容易從介質中分離細胞和載體。(9)易於處理和再生 (Bayat et al., 2015)。Alginate (藻酸鹽) (由不同比例製成的聚合物和從棕色藻類提取的甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的序列)是大多數固定系統中選擇的聚合物，因為它們易於處理，對人類無害，對環境傷害低，可大量生產且價格便宜。從生理學角度來看，藻酸鹽的主要優點是細胞在固定化過程中不會發生物理化學條件的極端變化，不影響凝膠反應體系統和通透性 (Buque et al. 2002)。已經使用許多不同形式的細胞固定如下圖 2，包括從左到右：(1).吸附 (2).共價結合 (3).包埋 (4).包封。在這些方法中，Entrapping 已被廣泛研究 (Jack and Zajiv, 1977)。

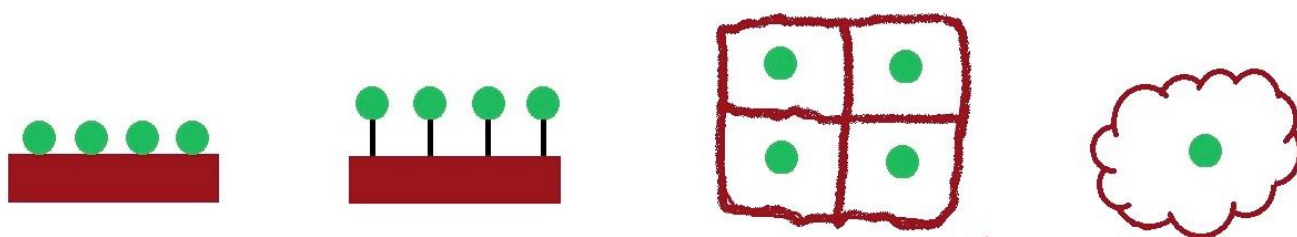


圖 2. 細胞固定方式示意圖

增加了可用的表面積，以促進生物量的生長並且還提高降解速率。Obuekwe 和 Al-Muttawa (2001)發現節桿菌屬和從科威特油湖分離的革蘭氏陰性芽孢桿菌，然後在低營養條件下將這些細菌與木屑，發泡膠或麥麴一起作為載體孵育，形成穩定的外多醣介導的固定化培養物。作者測試了在 45°C



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

下生存和降解碳氮化合物 6 週的能力。新鮮固定的細胞比自由細胞的懸浮液具有更高降低原油的能力。在其他研究中 Quek 等 (2006)報導了 *Rhodococcus* sp.的固定在 F92 聚氨酯泡沫 (PUF)在石油烴生物修復中的應用。Radwan 等人固定化油降解細菌之生物膜塗覆大型藻類。這種天然固定可以保護細菌免受洗滌和稀釋，也可以提供氧氣，以及可能的含氮和磷化合物和維生素提供油降解細菌之用 (Radwan et al., 2002)。Gentili 等 (2002)使用幾丁質和殼聚糖薄片來固定棒桿菌 QBT0。這種支持物是從蝦和螃蟹獲得的天然無毒無污染的可生物降解的生物材料。固定在殼多醣和殼聚糖薄片上的棒桿菌 QBT 顯著增加了原油生物降解。Wiesel 等 (1993)觀察到混合細菌培養固定在顆粒狀粘土上表現出良好的生長，並證明了與模型土壤系統中的自由懸浮細胞相比，表現出對多芳烴 (PAH)的同等降解潛力。Diaz 等人在聚丙烯纖維上固定化細菌團聚體 MPD-M，他們觀察到固定化細胞與自由活細胞相比顯著提高了原油的生物降解率，細菌團聚體 MPD-M 在固定化體系中高度穩定，不受添加鹽度的影響 (Diaz et al., 2002)。

Xu 和 Lu (2010)表明，通過將固定在花生殼粉末上的碳氮化合物降解細菌作為生物載體應用，原油污染土壤中的除油量增加。該生物載體具有較大的表面積和較強的吸附能力，另外提高了氧氣擴散，提高了土壤中的脫氮酶活性。Cocquempot 等人 (1981)檢查了固定化細胞在 PUF 中比固定在藻酸鹽中更好，因為儲存穩定性和微生物活性。由於聚氨酯泡沫的孔隙率，機械性能，疏水性和親水性的廣泛範圍而開發的聚氨酯泡沫的使用。例如 Oh 等人 (2000)固定的解脂耶氏酵母在用於原油降解的聚氨酯泡沫中。Liang 等人 (2009)比較了含有自由活體細菌培養物和活性炭生物載體的污染土壤中原油的降解量。結果表明，活性炭生物載體固定化可以提高土壤的氧氣，營養物質傳質和保水能力，從而提高原油生物降解，細菌群體和總微生物活性。固定化細胞用於其他化合物的生物降解。最近，Maliji 等人使用天然支持物，如 luffa 和海綿來固定蠟樣芽孢桿菌在柴油降解應用。該吸附系統可以控制污染，並且可以很容易地以低成本使用。Kim 等人 (2006)研究了污染物 (苯酚)對游離藻酸鈣和固定化惡臭假單胞菌 MK1 (KCTC12283)對吡啶生物降解的影響。他們證明，固定化的細胞可以有效地增加對苯酚的耐受性，並導致吡啶的降解增加。在某些情況下，石油碳氮化合物的微生物代謝可能會產生有毒的代謝物，如環烷酸，這可能會阻礙隨後的生物降解，因為它們會抑制微生物代謝的毒性 (Lu et al. 2010)。Weir 等人 (1995)使用藻酸銅綠假單胞菌 UG14，粘土和脫脂乳來降解菲。他們觀察到 30 天后包封細胞的存活率較高，而游離細胞持續 18 天。O'Reilly 等人 (1989)通過假單胞菌屬



第一章：計畫前言與研究目的

(*Pseudomonas* sp.)研究了 p-Cresol 的降解。固定在藻酸鈣和聚氨酯中。結果表明，由於其具有較高的機械強度和改善的氧傳遞特性，聚氨酯是一種比藻酸鈣更好的固定基質。 Bay et al. (2015) 整理出固定化菌種對生物降解之應用如下表。

Table 1. Some immobilized cells for use in biodegradation compounds.

Compounds Degraded	Carriers	Microorganisms	References
acrylamide	alginate	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Xanthomonas maltophilia</i>	[54]
Cadmium and Zinc	alginate	<i>Pseudomonas fluorescens</i> G7	[55]
2-chloroethanol	sand	<i>Pseudomonas putida</i> US2	[56]
cyanuric acid	Granular clay	<i>Pseudomonas</i> sp. NRRL B-12228	[57]
Diesel oil	Polyvinyl alcohol	Hydrocarbon-degrading bacteria	[58]
Ethylbenzene	Alginate, agar, polyacrylamide	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -CS2	[59]
Mercury	alginate	nitrogen-fixing bacteria (NFB)	[60]
naphthalene	alginate, agar and polyacrylamide	<i>Pseudomonas</i> sp. strain NGK 1	[61]
p-Nitrophenol	diatomaceous earth	<i>Pseudomonas</i> sp.	[62]
pentachlorophenol	polyurethane	<i>Flavobacterium</i> sp.	[63]
Pentachlorophenol	alginate	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[64]
Pentachlorophenol	k-Carrageenan	<i>Pseudomonas</i> sp. UG30	[65]
phenol	Polyvinyl alcohol (PVA)	<i>Acinetobacter</i> sp. strain PD12	[66]
phenol	agar	methanogenic consortium	[67]
Phenol, trichloroethane	Chitosan	<i>Pseudomonas putida</i> BCRc14349	[68]
sodium cyanide and acetonitrile	alginate	<i>Pseudomonas putida</i>	[69]
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	polyacrylamide	<i>Pseudomonas</i> C12B	[70]
2,4,6-trinitrotoluene (TNT)	alginate	<i>Arthrobacter</i> sp.	[71]
2,4,6-Trichlorophenol	k-Carrageenan/gelatin gel	Microbial consortium	[72]



第二章：研究目的

地下水含氯有機物因其低水溶性及比重大於水等特性，被視為難去除的污染物之一。現地生物整治費用較離地處理低廉、可持續降解氧化後低濃度含氯有機物、將污染物轉為無害物質等優點。本團隊在過去的研究發現，即使我們有效地提供氫氣給予現地的脫鹵球菌使用，脫鹵球菌的數量依舊太少，要達到有效的整治還是需要花費許多時間。同樣的，目前業界中以添加生物基質行多氯乙烯的生物整治工法，也面臨同樣的問題，現地脫鹵球菌的數量不足。

因此，本計劃將結合生物刺激法和生物強化法並配合次世代定序法等，建立完整系統評估監測機制，使現地地下水中含氯有機污染物厭氧生物整治狀態達最佳化，同時將結合過去的研究成果，改良包埋整治工法，使用關鍵脫鹵球菌於包埋膠體之中，並將本技術應用於實場中加以驗證，有效解決現地脫鹵球菌菌數不足之問題。此外，脫鹵球菌可以將氯乙烯完全脫氯至無毒的乙烯，冀透過本模場試驗之成果有效解決現地氯乙烯累積之問題。

第一年針對期中報告我們所主要研究的內容及目的如下：

1. 改良固定化矽膠材質配方大幅降低成本並分析矽膠特性與產氫效率關係。
2. 建立絕對厭氧操作平台，大量培養 *Dehalococcoides* 菌株。
3. 混和包覆產氫菌與脫鹵球菌，以批次實驗測試脫氯生物膠體操作條件與 TCE 降解變化。
4. 評估新型矽膠配方、改良基質與混和包覆生物膠體應用於實場策略，做為第二年度現地模場試驗整治工法使用。
5. 設置現地模場整治灌注井以及監測井，進行初步場地地下水性質分析、污染物分析以及菌相分析。



研究架構與實驗流程

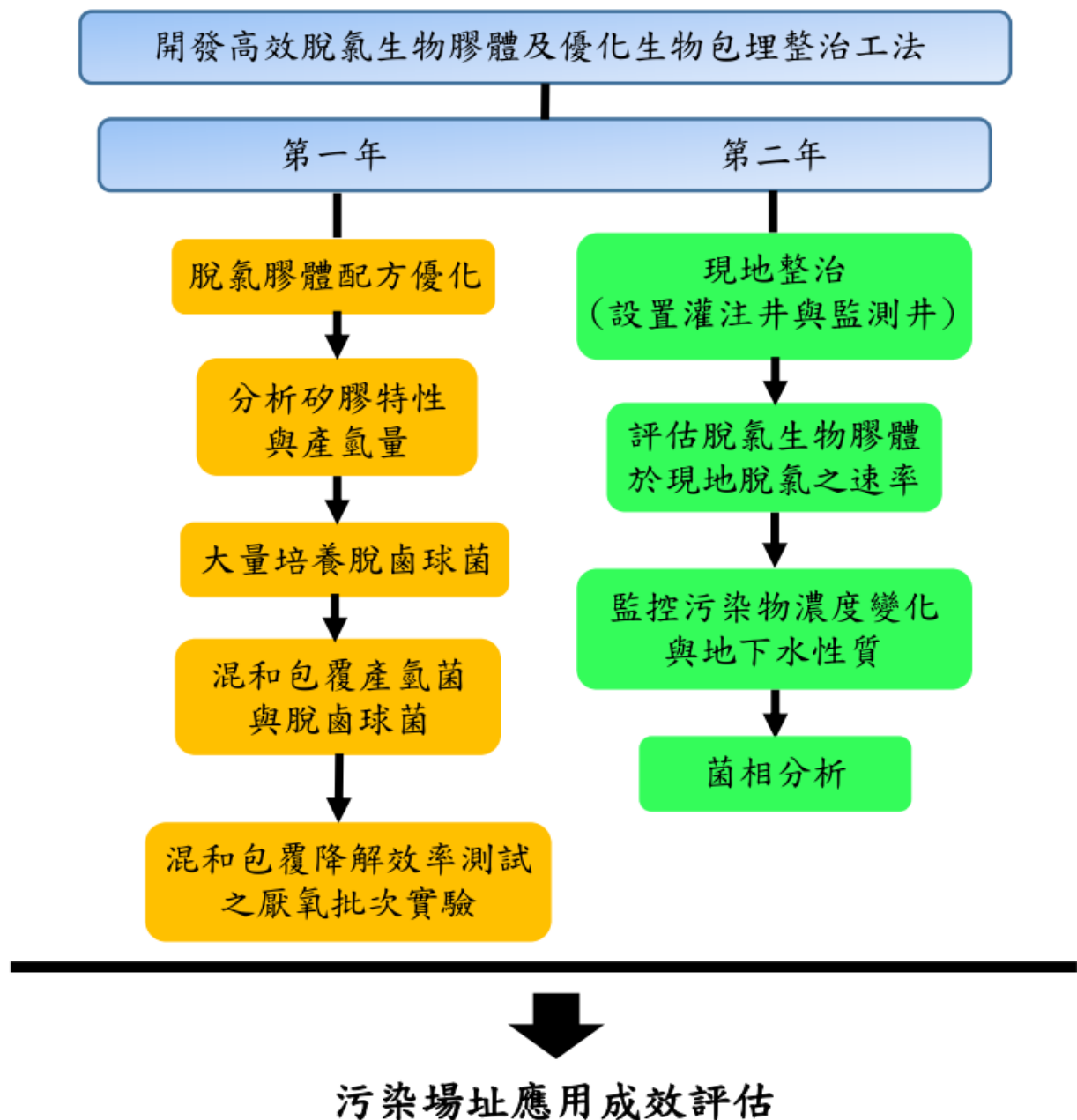


圖 3. 研究架構與實驗流程圖



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

本場址於 104 年 7 月 13 日公告地下水受污染限制使用地區及限制事項；位於桃園市平鎮區平鎮里，本場址所在土地使用分區屬於工業用地，而周遭毗鄰區域北側為工業用地；東側主要為住宅用地及商業地；西側則以農業用地；南側主要為農地用地及低密度住區等。

台鈴工業股份有限公司平鎮廠以生產二輪機車、ATV（四輪沙灘車）、四行程重型機車及相關機車五金零組件為主，本廠曾在熱處理單元使用有機溶劑做為金屬表面清洗脫脂之使用，且主要製作流程皆於密閉設備中進行，而本熱處理單元已於 98 年 4 月停止使用，於本單元運作期間三氯乙烯運作、回收、清運與處理，均依照政府法令之規定申報處理，未有任何洩漏及棄置廢棄物於廠區之事宜，現況為運作中工廠。。

目前本場址之列管狀態為調查中場址，尚未確認污染行為人。惟有桃園市平鎮區鎮安段 323 地號(部分區域)執行土污法第 7 條第 5 項規定辦理應變必要措施計畫，執行 12 個月之改善期程，經環保局驗證，已於 108 年 6 月 24 日函覆驗證結果污染物濃度已低於管制標準。現今台鈴公司平鎮廠北側區外仍有污染，成因尚需釐清，惟為避免地下水污染而影響人體健康，台鈴工業股份有限公司願意配合相關調查及勘查工作，提供本場址作為模場試驗計畫。

3.2 模場試驗設井規劃

圖 4 為預定現場注藥的示意圖。目前規劃設置 5 口注藥井，間距 1 至 2 公尺，下游設二至三監測井，總計七口井，間距 1 至 3 公尺，以進行灌注與監測，後續依現場水文狀況進行調整。此外並將選擇一口上游監測井作為背景監測井。

[illegible]



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

3.3 絕對厭氧操作方法

本團隊使用 Hungate 厭氧培養法(Hungate, 1944)進行厭氧培養操作。本操作技術主要使用橡膠塞以及煮沸後之厭氧還原培養液，透過完全厭氧的氣體以移除培養液中的氧氣達到絕對厭氧。首先，將欲使用的氣體使用流量調節劑在混和器中進行混和(氮氣、氫氣及二氧化碳)，再者，將混和後的氣體通入加熱 300°C 之銅管之中，加熱後之銅管會與通過氣體中的氧氣進行反應產生氧化銅，而通過的氣體將可以達到完全無氧之狀態，因此，此厭氧氣體足以用於進行絕對厭氧培養實驗。當操作完畢後，在加熱的銅管中通入微量氫氣，氫氣會迅速與氧化銅上的氧進行反應，形成水氣後被氣體帶走，因此銅管內的銅將會全部回復到未被氧化的狀態，因此本銅管可以重複使用，厭氧加氣站管線配置及操作方法皆參考(Speers, et al., 2009)，如下圖 5 所示。在操作的過程中，所有的針頭需要以厭氧還原劑($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$)進行潤洗去除表面附著之氧氣，並且針筒內部需要使用去氧氣體進行洗針移除針筒內殘留之氧氣，所有操作過程必須要在有火源的無菌圈中進行。

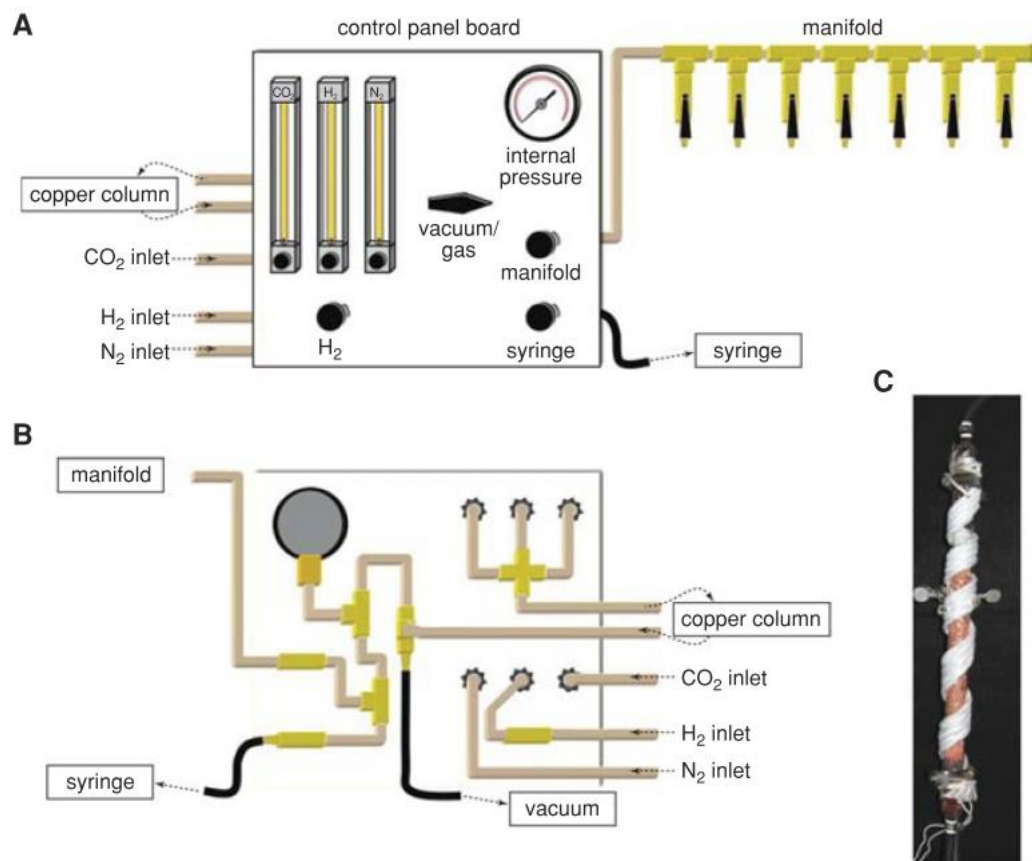


圖 5. 厭氧培養用之加氣站設計圖(A) 操作面板，包含流量調節計、壓力計、氣體控制伐(B) 操作面板背面管線配置圖 (C) 銅管加熱器 (Speers, et al., 2009)



3.4 脫鹵球菌培養方法

脫鹵球菌培養液使用碳酸緩衝系統培養液(Löffler, et al., 2005)，包含鹽類溶液(NaCl 、 $\text{MgCl}_2 \times 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4Cl 、 KCl 及 $\text{CaCl}_2 \times 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、Se/Wo 溶液($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)、維他命溶液(維他命 B3、維他命 B6 及維他命 B12)、厭氧指示劑(Resazurin)、10mM 醋酸及微量元素溶液，混合上述溶液後，煮沸溶液並且使用 N_2/CO_2 (80/20)曝氣將氧氣從溶液中趕出，加入 30mM NaHCO_3 並以 CO_2 調整 pH 至 7.2~7.3，調整曝氣用 N_2/CO_2 比例使得 pH 穩定，加入還原劑 0.2mM L-cysteine 及 0.2mM $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ 使得培養液達厭氧態，將培養液封瓶並確保頂空包含 $\text{N}_2/\text{CO}_2/\text{H}_2$ (70/10/20)，高溫高壓滅菌 30 分鐘，此時培養液應呈現無色澄清(絕對厭氧態, $E_h < -140\text{mV}$)，加入 cis-DCE 或 TCE 靜置過夜後，培養液若無變色即可接種脫鹵球菌，每隔數天抽取頂空樣本測定多氯乙烯及乙烯之變化，抽取 gDNA 後以 qPCR 測定 16s rRNA 基因拷貝數監測生長狀況。

3.5 地下水基本性質分析

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

取出 100 mL 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)。

3.5.2 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 μm 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 ($\text{mg CO}_2\text{-C/L}$)。

3.5.3 地下水樣品 genomic DNA 萃取

將 1 公升的地下水樣品以轉速(25000 $\times$ g)高速離心的方式，離心 10 分鐘，並收集沉積物以及微生物。利用傳統法(CTAB DNA extraction method)來萃取污染地下水中的微生物之 genomic DNA，此方法改良自 1996 年 Zhou 等人所提出的酵素法(Zhou et al.,1996)。

首先加入 DNA extraction buffer，加入的量以蓋過沉積物為主，再以震盪器



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

(vortex)將已加入 DNA extraction buffer 之樣品震盪至均勻為止，再加入 100 μ L 之 Lysozyme (100mg/mL)，將混合完成的液體放置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 1 小時，在 1 小時的反應時間內，每 15 分鐘以震盪器均勻的震盪萃取 DNA 之溶液。結束 1 小時的反應後，加入 20 μ L proteinase K (20mg/mL)以及 30 μ L SDS(20%)，以震盪器將混合好的溶液震盪均勻，再將混合完成的液體放置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中反應 2 小時，2 小時的反應時間，和上述一樣每 15 分鐘需以震盪器，震盪正在萃取 DNA 之溶液。反應 2 小時後，加入 100 μ L NaCl 以及 75 μ L CTAB 至正在萃取之溶液中，以震盪器均勻震盪後。放置於 65 $^{\circ}$ C 之水浴槽反應 30 分鐘，同樣也是每 15 分鐘以震盪器均勻震盪，反應結束後加入等體積的冰 phenol/chloromform/Isoamyl alcohol (25:24:1)，上下緩慢搖晃大約 20 下，以轉速(25000xg)離心 10 分鐘，重複此步驟直到中間層的蛋白質消失，將離心過後的上清液取至新的離心管內，加入 chloromform/Isoamyl alcohol (24:1)，上下緩慢搖晃大約 20 下。以轉速(25000xg)離心 10 分鐘，再將離心過後的上清液取至新的離心管內，加入 2 倍體積的冰 Isoprpanol，上下緩慢搖晃讓液體充分混合均勻，將樣品放置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 overnight 讓 DNA 沉澱。

隔日將樣品取出，以轉速(25000xg)離心 10 分鐘讓 DNA 沉澱，此時將上清液去除，留下沉澱物，利用 500 μ L 之 75%酒精清洗沉澱物，再以轉速(25000xg)離心 15 分鐘後將酒精上清液去除，並在重複此步驟 1 次，再將含有沉澱物的離心管放入冷凍乾燥機中將水分以及酒精去除乾淨，將已滅好菌並且過濾過的二次水(ddH₂O)加入，使 DNA 沉澱物回溶成液態，將液態的 DNA 保存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.6 DNA 純化

土壤或是地下水中有很多的干擾物質，例如腐植酸，可能會影響聚合酶鏈鎖反應(PCR)或是即時定量(real-timePCR)等其他實驗，因此在萃取完 DNA 後必須經過純化的步驟，萃取完的 DNA，使用捷恩麥克公司之 DNA Clean/Extraction kit 來進行純化的步驟。或是進行 cloning 實驗的 ligation 步驟，進行 ligation 此步驟之前會先將目標 DNA 利用 PCR 放大，由於 PCR 的 Taq 以及 buffer 可能會影響 PCR 的產物和載體(vector)之間的黏合，因此在做 ligation 之前也必須進行 DNA 純化的步驟，膠體的純化也是使用捷恩麥克公司 DNA Clean/Extraction kit 來進行純化。

3.7 基因選殖

以 PCR 的方式將目標片段放大，以膠體純化套組進行目標 PCR 產物純化，PCR 產物依照 pGEM-T easy cloning kit 進行接合反應，將混合試劑放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱



第三章：研究方法與過程

overnight 進行 ligation，使 PCR 的產物可以黏合在 pGEM-T Easy Vector 上以利於進行 transformation 的實驗。

將 ligation 混和液與 *E.coli* competent cell 混合均勻後放置冰上 20 分鐘，以熱休克(heat shock)的方式，42°C 加熱 45 秒，將黏合好的 plasmid 送入 *E.coli* competent cell，熱休克完成後再將混合液放置冰上 10 分鐘，此時將混合液加入含有 1mL SOC 培養基之 1.5 mL 離心管，移入 37°C 培養箱進行培養，培養大約一個半小時至兩個小時後，將培養完成的菌液取出。將 100 μ L 菌液塗於含 X-Gal、IPTG、ampicillin 之 LB 培養基上，以 37°C 培養 overnight 進行藍白篩培養，隔日挑選白色菌落使用 T7 以及 SP6 primer 進行 PCR 確認，確認目標的片段是否有成功的接合在 pGEM-T Easy Vector 上，正確的菌落送至基龍米克斯公司進行後續的定序工作。



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

3.8 即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)

3.8.1 標準品製備

先利用各目標序列引子 (表 7.)進行 PCR 將目標片段放大，反應混和液配方如表 4 所示，再依照 3.7 步驟將挑出的菌落培養，並送至明欣生技公司進行後續的定序工作。比對確認含有正確序列質體之菌落，以含有抗生素 LB 培養基以 37℃ 進行搖晃培養，再以小量質體純化套組進行質體純化，將純化後的質體使用分光光度計測量 DNA 的濃度。

將得到的 DNA 濃度帶入公式(A)換算成 gene copies (Ritalahti et al.,2006)。

$$(A) \quad \text{gene copies} = (\text{DNA concentration [ng/}\mu\text{L]}) \left(\frac{1 \text{ g}}{1,000^3 \text{ ng}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol bp DNA}}{660 \text{ g DNA}} \right) \\ \times \left(\frac{6.023 \times 10^{23} \text{ bp}}{\text{mol bp}} \right) \left(\frac{1 \text{ copy}}{\text{genome or plasmid size [bp]}} \right) \\ \times (\text{volume of template } [\mu\text{L}])$$

表 2. 聚合酶連鎖反應 (PCR)混合液配置

Reagent	Volume
ddH ₂ O	18.4μL
10x buffer	2.5μL
dNTP (2.5mM)	2μL
forward primer (50μM)	0.4μL
reverse primer (50μM)	0.4μL
Taq polymerase(5U)	0.3μL
DNA template	1μL

將 DNA 序列稀釋到適當的濃度，將稀釋完成的標準曲線進行 real-time PCR 上機，確認目標序列之標準曲線達到 $R^2 = 0.995$ 以上，以利於後續針對目標序列之濃度定量。



3.8.2 qPCR 上機步驟

將製備完成的標準品由濃度 10^8 以十倍序列稀釋至 10^2 gene copies/ μL ，再依照 (表 5.)配置 real-time PCR SYBR Green 系統之混合液，或是依照 (表 6.)配置 real-time PCR TaqMan 系統之混合液，將混合液分裝到八連排中。

表 3. realtime-PCR 反應 SYBR Green 系統之混合液配方

Reagent	Volume
2X Master Mix Fast SYBR	5 μL
forward primer (25 μM)	0.04 μL
reverse primer (25 μM)	0.04 μL
ddH ₂ O	3.92 μL
DNA template	1 μL

表 4. realtime-PCR 反應 TaqMan 系統之混合液配方

Reagent	Volume
2X Master Mix Fast SYBR	5 μL
forward primer (25 μM)	0.12 μL
reverse primer (25 μM)	0.12 μL
probe(25 μM)	0.12 μL
ddH ₂ O	3.92 μL
DNA template	1 μL



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

表 5. 本計畫所使用之引子與探針序列

Target	Primer	Sequence (5'→3')
<i>Dehalococcoides</i> sp.16S rRNA gene	730F	GCGGTTTTCTAGGTTGTC
	1350R	CACCTTGCTGATATGCGG
	1200F	CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT
<i>Dehalococcoides</i> qpcr	DHC Probe	FAM-TCCTCAGTTCGGATTGCAGGTGAA-TAMRA
	1271R	CAACTTCATGCAGGCGGG
<i>TceA</i> gene	797F	ACGCCAAAGTGCGAAAAGC
	2490R	TAATCTATTCCATCCTTTCTC
<i>TceA</i> gene qpcr	TceA1270F	ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA
	TceA1336R	GCGGCATATATTAGGGCATCTT
	TceA1294Pro	FAM-TGGGCTATGGCGACCGCAGG-
	be	TAMRA
<i>VcrA</i> gene	vcrAF	CTATGAAGGCCCTCCAGATGC
	vcrAR	GTAACAGCCCCAATATGCAAGTA
<i>VcrA</i> gene qpcr	Vcr1022F	CGGGCGGATGCACTATTTT
	Vcr1093R	GAATAGTCCGTGCCCTTCCTC
	Vcr1042Probe	FAM-CGCAGTAACTCAACCATTTCCTGGTAGTGG-
		TAMRA
<i>BvcA</i> gene	bvcAF	TGCCTCAAGTACAGGTGGT
	bvcAR	TTGTGGAGGACCTACCT
<i>BvcA</i> gene qpcr	Bvc925F	AAAAGCACTTGGCTATCAAGGAC
	Bvc1017R	CCAAAAGCACCACCAGGTC



Bvc977Probe		FAM-TGGTGGCGACGTGGCTATGTGG-TAMRA
<i>hydA</i> gene	<i>hydA</i> _f	GCWGATATGACWATWATGGAAGAAG
	BHR	GCWGCTTCCATWACTCCACC
<i>hydA</i> gene qpcr	<i>hydA</i> _f	GCWGATATGACWATWATGGAAGAAG
	<i>hydA</i> _R	CCAAAWATTTGTTGWGGTGA

3.9 TCE 相關代謝物 GC 層析檢測

以針筒抽取 microcosm 瓶中之上層液體，並依不同稀釋倍數抽取合適之體積，注入裝滿超純水的 40 mL 棕色瓶中，將稀釋之樣品放入吹氣捕捉裝置(purge and trap concentrator)和氣相層析儀中，進行氯乙烯類之分析。

三氯乙烯之分析儀器為 GC-ECD (Agilent, 6890 GC/ μ ECD)。採用長度 30 m、膜厚 3.0 μ m、內徑 0.53 mm 之毛細管層析管柱(Agilent DB624)，可承受最高溫度 260°C。載流氣體(carrier gas)及輔助氣體(makeup gas)為零級氮(純度 99.9995%)，流量為 18.8 mL/min，氣體分流比(split ratio)為 10:1，氣體分流量(split flow)為 115 mL/min。注射口溫度 180°C，偵測器溫度 250°C。溫度控制條件為 40°C 維持 3 分鐘後，以每分鐘 8°C 之升溫速度升溫至 200°C 並維持 3 分鐘，分析時間共 26.00 分鐘。三氯乙烯平均停留時間為 2.53 分鐘，經由偵測器測而得之訊號傳送至所連接之電腦分析軟體(HP ChemStation)，可得分析結果。

3.10 次世代定序菌相分析組裝流程

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 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 進行。

建庫與定序

使用 Nextera XT Index Kit 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，建庫後之樣品使用與 4200 TapeStation System 系統進行建庫品質評估，品質良好之樣品使用 Illumina MiSeq 平台進行 300 bps pair-end 定序。

定序結果組裝



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

將定序完成之 raw data 去除 barcode 與 primer 序列後，以 FLASH(Caporado et al., 2011)軟體進行組裝，組裝完成之序列以 USEARCH (Youssef et al., 2009)進行 quality control 以獲得品質良好之序列 (Segata et al., 2011)，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 Silva 數據庫 v 123。

OTU 群集與物種註釋

序列分析由 Qiime 軟體 (Edgar et al., 2013)進行。使用 mothur 計算 α 多樣性指數 (Richness、Chao1、ACE、Shannon 多樣性、Simpson 多樣性、Inverse Simpson, Shannon 均勻度、Simpson 均勻度和 Good's 覆蓋率)。使用 VEGAN9 之 R 套件計算稀疏曲線和物種積累曲線， β 多樣性指數 (Bray-Curtis 矩陣，PCoA 和 NMDS) 也是如此。



第四章：實驗結果

4.1 脫鹵球菌及脫氯酵素(RDase)鑑定

本計畫所選用之現地脫鹵球菌菌種為 *Dehalococcoides maccartyi* strain BAV1(簡稱 BAV1)及 strain FL2(簡稱 FL2)，根據文獻整理，BAV1 具有 BvcA 脫氯酵素(1551bp)，可以將各類 DCE 脫氯至無毒乙烯，FL2 則具有 TceA 脫氯酵素(1664bp)，可以將 TCE 脫氯至氯乙烯(VC)，上述兩個酵素基因於台灣本土地下水中經常測得。利用脫氯酵素基因 *tceA* 及 *bvcA* 專一性引子(表 5)進行 PCR 放大檢測，結果如下圖 6，確認菌種 BAV1 及 FL2 確實具有脫氯酵素基因。

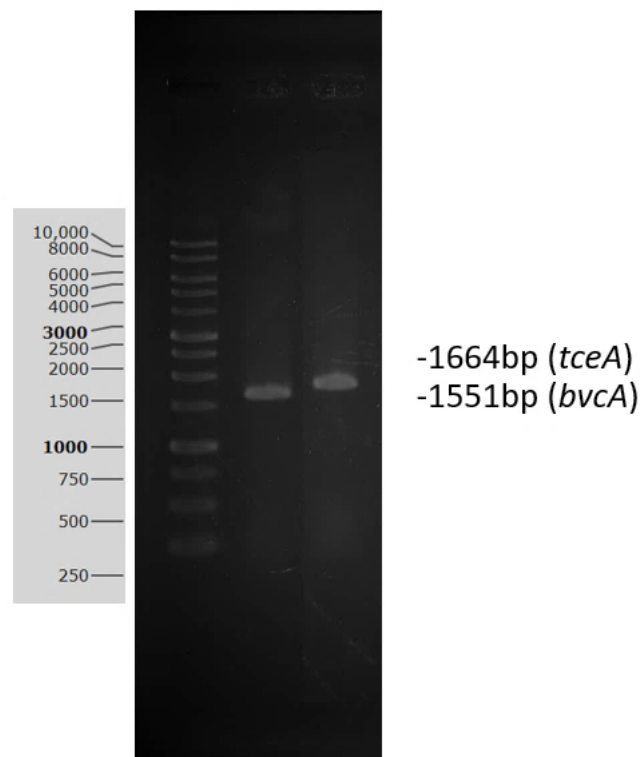


圖 6. 脫鹵球菌 *Dehalococcoides maccartyi* 脫氯酵素基因(*bvcA* 及 *tceA*)電泳分析



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

4.2 脫鹵球菌活化及繼代培養

脫鹵球菌的培養以及維持是非常困難的，需要使用絕對厭氧培養技巧、精準的繼代及正確的培養環境，其培養需要以下條件：

- (1) **氧化還原電位(ORP)範圍落在-100mV 至-250mV**：脫鹵球菌須培養於絕對厭氧之環境，氧化還原電位可以以刃天青(Resazurin)作為厭氧指示計。常態的刃天青為藍色，當 ORP 低於-51mV 時刃天青會轉為粉紅色之 Resorufin 型態，使用還原劑如 Na_2S 或 L-Cystein 則可以進一步轉為無色透明之型態(Dihydroresorufin)，其厭氧還原電位將低於-110mV，此時的培養液將適合培養脫鹵球菌(Wagner, et al., 2019)。

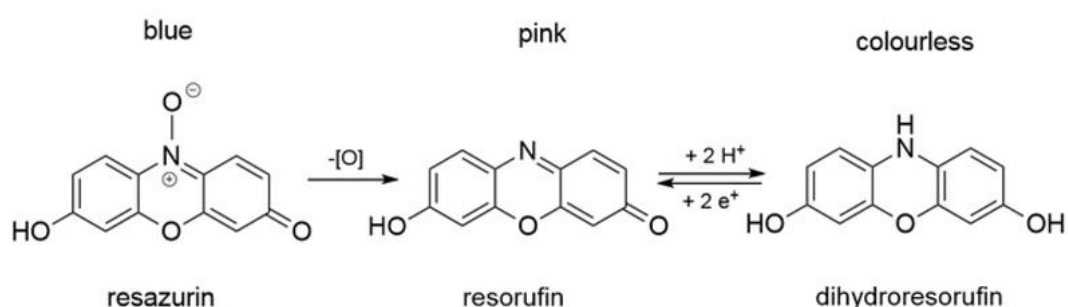


圖 7. 刃天青化學反應機構圖(Wagner, et al., 2019)

通常於厭氧操作時，會使用氮氣對於培養液進行曝氣用以去除氧氣，但是效果有限，因此使用還原劑是必要的，下表 6 為常見的還原劑以及其氧化還原電位(Plugge, 2005)，若有需要可以搭配真空抽氣法，厭氧脫氯還原反應最適當的範圍則落在-100mV 至-250mV。

表 6 常見還原劑及其還原電位(Plugge, 2005)

Compound	E' ₀ (mV)
Dihydroascorbate/ascorbate	58
Dithioglycollate disulfide/thioglycollate	-140
$\text{S}_0/\text{H}_2\text{S}$	-250
$\text{S}_0/\text{HS}^- (\text{Na}_2\text{S})$	-270
Cystine/2 cysteine	-325
Dithiothreitol (DTT) disulfide/DTT	-330
Titanium(IV) citrate/titanium(III) citrate	-480
$2 \text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	-574

- (2) **pH 必須介於 6~8 之間**：脫鹵球菌最佳生長條件為 pH 7，有文獻指出當脫鹵球菌長期暴露於 pH 5.5 之環境將可能導致脫鹵球菌永久性失活 (Yang et al., 2017)。目前最適當使用於培養脫鹵球菌之緩衝系統為 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 緩衝系統 (pH 6.8~7.4)，調配培養液需使用氣體 CO_2 調整 pH 至中性，且必



第四章：實驗結果

須維持頂空環境含有固定比例之 CO_2 以維持長時間 pH 之恆定(Loffler et al., 2012)。另外亦可以使用 Good's 緩衝系統(Good et al., 1966; Carlos et al., 2015)，比較常使用為 MOPS(pH 6.5-7.9)，但是此緩衝系統無法用於厭氧菌群培養，緩衝試劑會被當作碳源所利用因而失去緩衝力。

- (3) **電子提供者及碳源：**目前已知脫鹵球菌僅可以使用的電子提供者為氫氣 (H_2)，在培養純種脫鹵球菌必須額外添加氫氣於頂空(3%~20%)(Loffler, et al., 2005)，脫鹵球菌能使用之碳源已知為醋酸(Acetate)。一般在脫氯菌群中，氫氣可以透過發酵反應獲得，因此使用電子提供者進行發酵產生氫氣是可行的，如乳酸、丙酸、甲醇及乙醇等(He, et al., 2002)，透過發酵一同產生氫氣和醋酸提供脫鹵球菌使用，然而，過多的氫氣會使得電子導向甲烷生成菌以及醋酸生成菌，因此控制適當的電子提供者及碳源將有利培養脫氯菌群，其氫氣的生成及利用可以參閱下表 7。

表 7. 生物刺激之氫氣生成及脫氯相關氫氣利用反應自由能表(He, et al., 2002)

氫氣生成反應	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ/rxn)
$\text{acetate}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	104.55
$\text{propionate}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetate}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	76.48
$\text{butyrate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{acetate}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	48.3
$\text{ethanol} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetate}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	9.65
$\text{methanol}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	23.03
$\text{lactate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetate}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-3.96
氫氣消耗反應	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ/rxn)
$2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{acetate}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-104.55
$\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.56
$\text{PCE} + \text{H}_2 \rightarrow \text{TCE} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-163.57
$\text{TCE} + \text{H}_2 \rightarrow \text{cis-DCE} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-161.17
$\text{cis-DCE} + \text{H}_2 \rightarrow \text{VC} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-141.17
$\text{VC} + \text{H}_2 \rightarrow \text{ethene} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-154.87



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

(4) **電子接受者**：脫鹵球菌所使用的電子接受者為有機氯化物，在本研究即為多氯乙烯，培養脫鹵球菌需要定期餵養多氯乙烯，如 BAV1 則需要代謝二氯乙烯，FL2 則需要代謝三氯乙烯，一般文獻之電子接受者濃度介於 0.6mM 至 1mM (50~100 ppm)，最高濃度可達 4mM(Zhao, et al., 2018)。

(5) **輔酶**：維他命 B12 為脫氯菌還原脫氯之啟動因子，氫氣提供電子至脫氯酶 (RdhA)時，需要以維他命 B12 作為輔酶，但是脫氯菌無法自行合成維他命 B12，僅只能依賴其他菌種製造提供(Wang et al., 2018)，因此在培養脫鹵球菌時，需要額外添加各類維他命且包含維他命 B12。

按照上述條件配置成之培養液，應為無色透明且無沉澱，靜置數日後指示劑沒有變色即為成功。確認培養液後，開始進行脫鹵球菌培養測試，由於脫鹵球菌從凍液或者菌落移植至液態培養中，其菌數及活性皆不高，因此起初必須使用厭氧試管培養(10mL)，並且添加 16 μ mole 之 cis-DCE，過程中必須以氣相層析定期檢測多氯乙烯降解情況以評估脫鹵球菌活性，其實驗結果如圖 8。

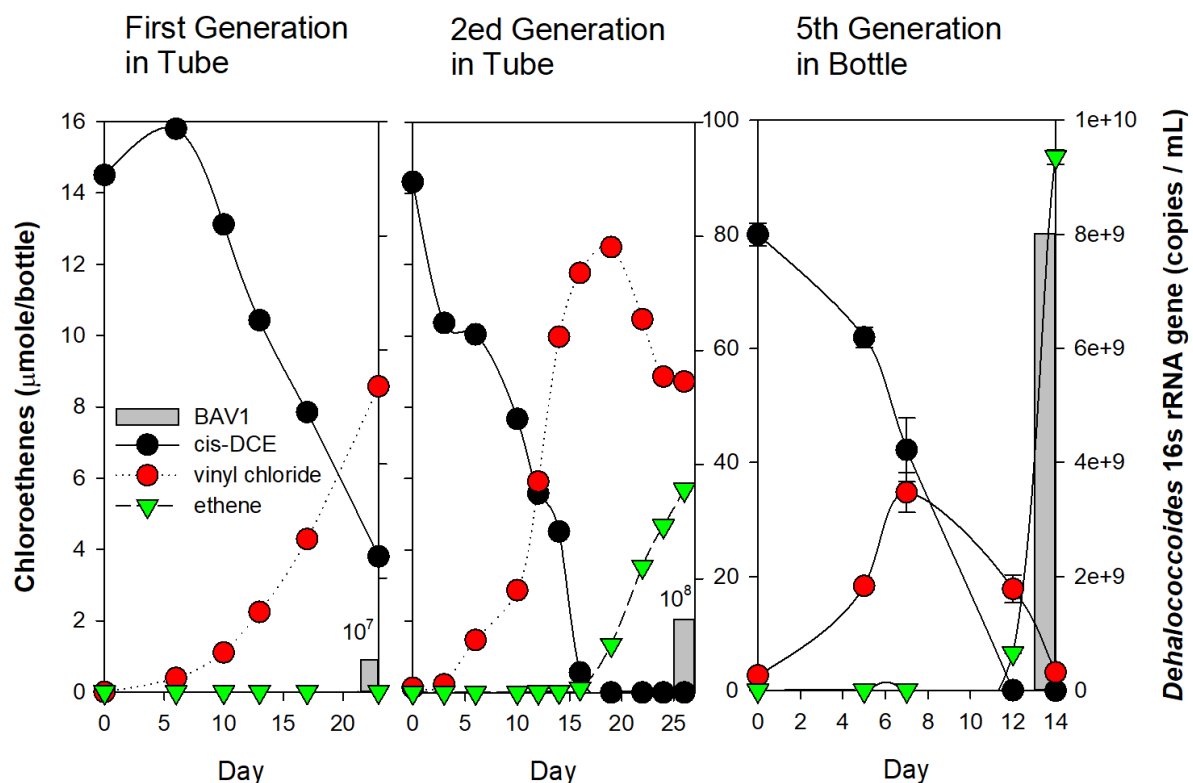


圖 8. 脫鹵球菌 BAV1 繼代培養及脫氯反應分析

由圖 8 顯示，第一代之脫鹵球菌 BAV1 其活性不高，僅能夠在 20 天將一半之二氯乙烯脫氯至氯乙烯，僅測得微量之乙烯，於第 24 天進行繼代至試管並且以 qPCR 分析其菌數得到 10^7 copies/mL。第二代之 BAV1 其脫氯活性增加，於第 15 天完全降解 cis-DCE 並開始測得乙烯生成，於第 25 天測得 VC 降解一半且速



第四章：實驗結果

率開始下降，因此進行繼代培養，此時以 qPCR 分析其菌數得到 10^8 copies/mL。第三代及第四代之 BAV1 其脫氯速率皆差異不大(數據未呈現)，值得一提，第二代的接種成功率為 5 隻試管中僅有一隻試管成功，到了第四代後，成功率提升到 3 隻試管皆成功並有相近的脫氯速率，同時有足夠的菌量可以接種至含有 100mL 厭氧培養液之厭氧瓶，此時增加 cis-DCE 總量增至 $80\mu\text{mole}$ 以提升脫鹵球菌生物質量。第五代之 BAV1 於厭氧瓶中生長良好，並於第 14 天達到完全脫氯完成，以 qPCR 分析其菌數得到 8×10^9 copies/mL。

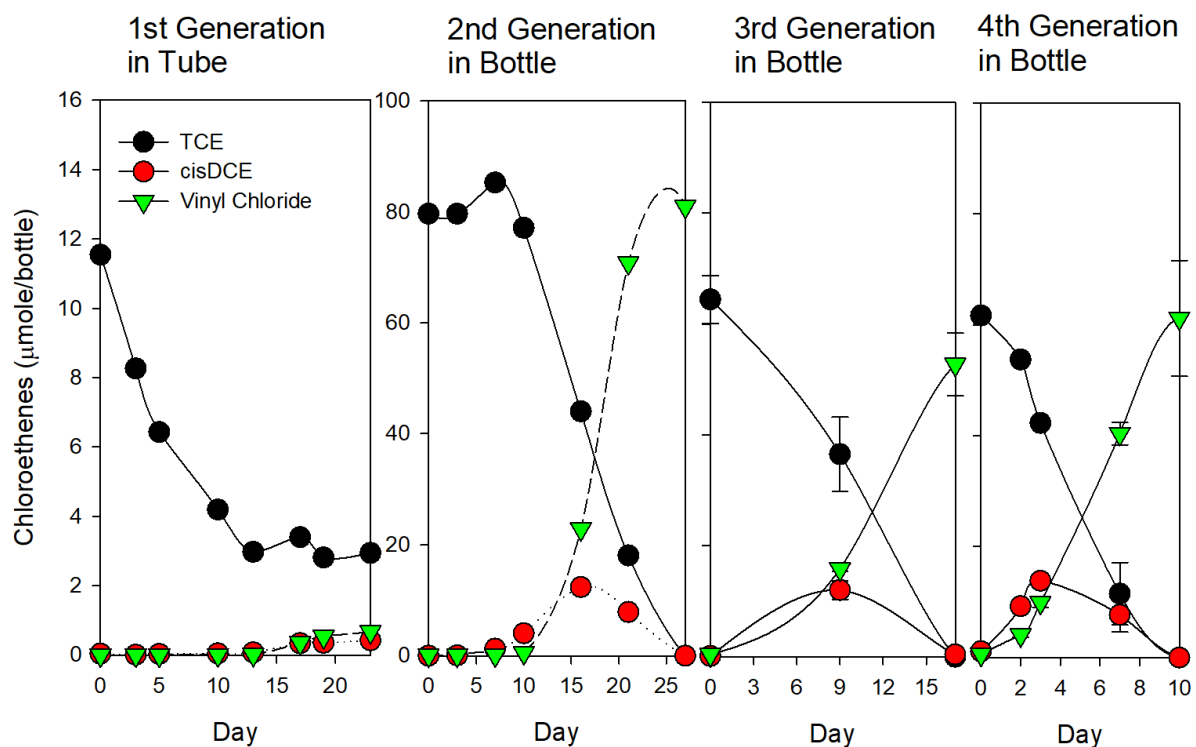


圖 9. 脫鹵球菌 FL2 繼代培養及脫氯反應分析

脫鹵球菌 FL2 按照先前 BAV1 之培養繼代之方法，將 FL2 接種於含有厭氧培養液之厭氧試管中(10mL)，並加入 $12\mu\text{mole}$ 之 TCE，第一代只監測到 TCE 僅部分下降，並且有微量的 cisDCE 及 VC 產生。第二代將全數第一代之 FL2 菌液(10mL)接種至厭氧培養液中(100mL)繼代培養，第二代 FL2 活性增加，並可以在 26 天將 $80\mu\text{mole}$ TCE 全數脫氯至 VC，爾後之第三代及第四代 FL2 皆培養於 100mL 厭氧培養液中，最終第四代可以於 10 天將 TCE 脫氯至 VC，結果如圖 9。

透過培養脫鹵球菌 BAV1 及 FL2，可以確認本團隊已經具備純熟的厭氧操作技術以及脫鹵球菌繼代培養能力，未來此技術可以延伸開發台灣本土地下水脫氯菌群，如目前已知國外商業化脫氯菌群皆以此技術從地下水中獲得，如 KB-1、SDC-9 及 BAC-9 等菌群。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

4.3 脫鹵球菌生長批次實驗

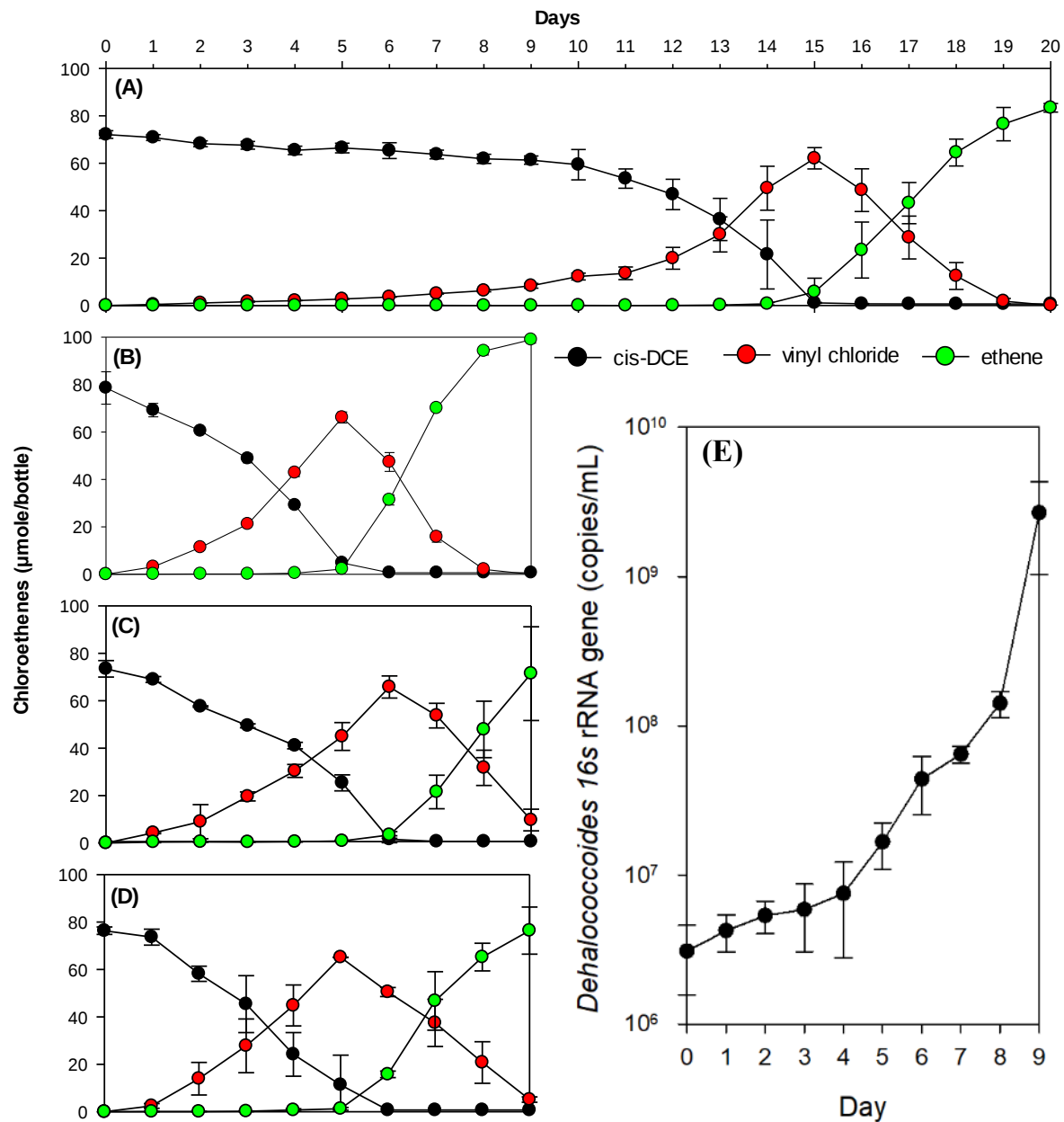


圖 10. 起始菌量影響脫鹵球菌 BAV1 脫氯反應測試，四種不同濃度的起始菌量 (A) 10^5 (B) 10^6 (C) 10^7 (D) 10^8 (copies/mL) 之脫氯反應趨勢圖；(E) 以 qPCR 檢測脫鹵球菌之生長曲線，起始菌量為 10^6 。本批次實驗皆培養於 100mL 厭氧培養液中，起始 cis-DCE 皆為 80 μmole ，頂空含有 20% 氫氣及 80% 氮氣，醋酸鈉為單一碳源

圖 10 進行起始菌量對於脫鹵球菌生長的影響批次實驗，目的為確認最佳脫鹵球菌繼代條件，以利於未來大量培養脫鹵球菌。由圖 10(A)~(D) 可以見得脫鹵球菌起始菌量需大於 10^6 copies/mL 方可維持脫氯速率，可以在 9 天內完成脫氯，提升菌數並不能增加脫氯速率，當菌數為 10^7 及 10^8 copies/mL 時，依舊在 9



第四章：實驗結果

天完成脫氯至無毒的乙烯。當菌數為 10^5 copies/mL 其完成脫氯之時間將會延長至 20 天，因此最佳起始菌量為 10^6 copies/mL，並且可以在 9 天後菌數增加至 10^9 copies/mL 以上，以 qPCR 分析脫鹵球菌生長趨勢之結果如圖 10(E)。

確認脫鹵球菌最佳之起始菌數以及各式培養條件後，本計畫中相當重要之部分為大量培養，未來在場地應用上所需要的脫鹵球菌菌數量經評估後至少需要達到 10^{11} copies/L，因此本團隊訂製了特殊的大容器厭氧瓶，如圖 11(A)，其容量為 1.2 公升，可以進行單批次之厭氧培養，所使用的厭氧培養液體積可達 1 公升，並且只需要避光靜置培養。使用大容器培養脫鹵球菌之結果如圖 11，同時於此批次實驗測試不同起始量之 cis-DCE 是否影響脫鹵球菌生長，由圖 11(B)可知兩者之完成脫氯之時間皆為 8 天，在 cis-DCE 濃度(0.8mM)較高之瓶 1 中其脫氯速率較快，此結果可以呼應 Zhao(2018)團隊之實驗結果，該團隊篩選出一株脫鹵球菌 11G，發現在低濃度之三氯乙烯的培養下(0.5mM)其平均脫氯速率為 0.13 Cl^- mM removal/day，然而，當濃度提升至 1.5mM 至 3.5mM 時，其平均脫氯速率增至為 0.25 Cl^- mM removal/day，其速率為低濃度之兩倍，該團隊結論為高濃度多氯乙烯會提供選擇性之馴化作用。因此，未來在培養脫鹵球菌，維持多氯乙烯濃度可以保持高效脫氯之脫鹵球菌，且本團隊也同時完成量產脫鹵球菌之技術研究。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

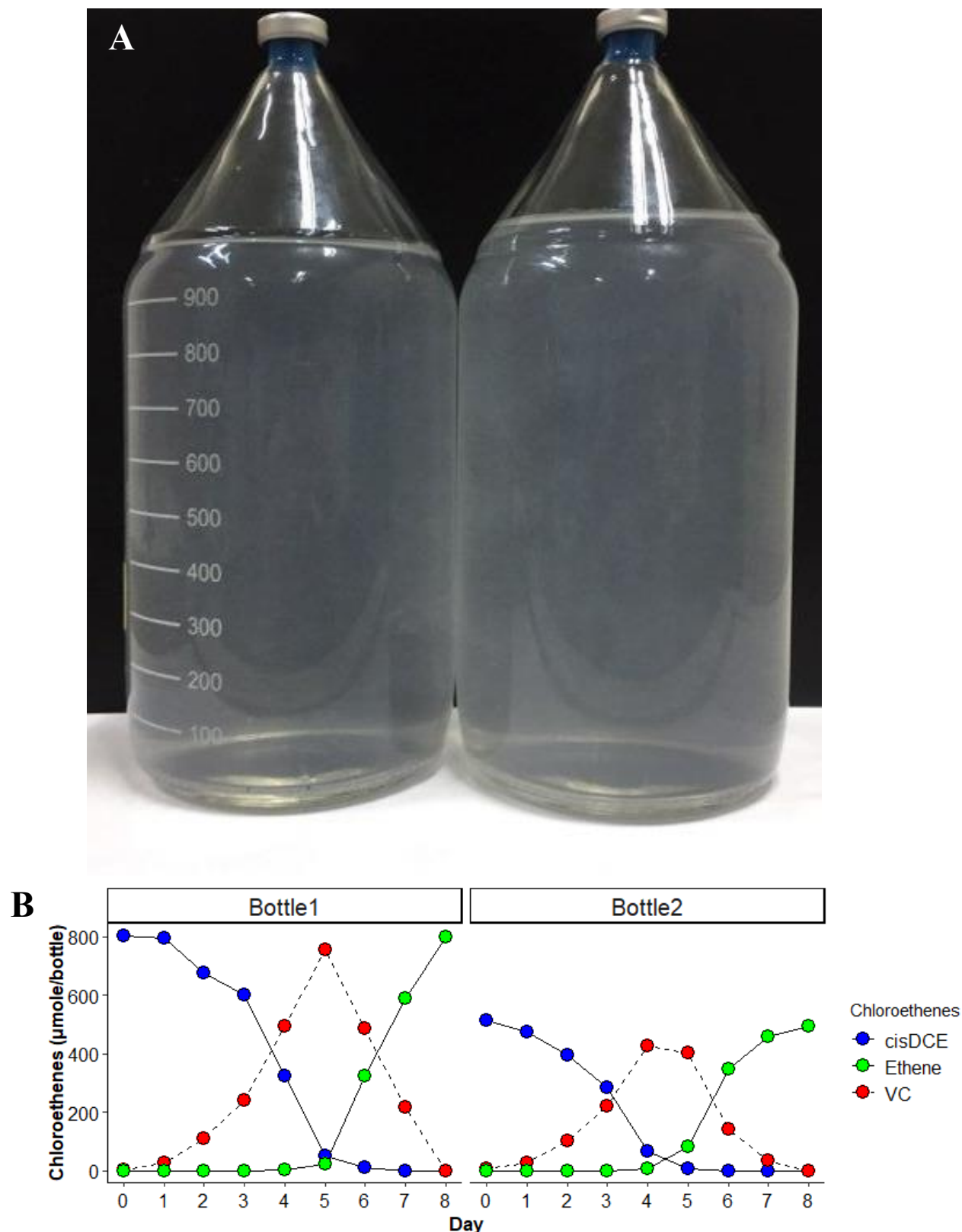


圖 11. 大體積培養脫鹵球菌 BAV1 及其脫氯反應測定(A) 大體積 1L 脫鹵球菌培養及其專用厭氧瓶 (B)不同起始量之脫氯反應趨勢圖，瓶 1 之 cis-DCE 起始量為 800μmole，瓶 2 之 cis-DCE 起始量為 500μmole，起始菌量為 10^7 copies/mL，頂空為氫氣 20%及氮氣 80%，單一碳源為醋酸鈉(10mM)



4.4 優化產氫菌產氫效力及脫鹵球菌共培養

本團隊於先前研究成果確認包埋產氫菌 *Clostridium butyricum* 可以產生氫氣提供環境脫鹵球菌使用，以提升現地模場脫氯速率，使用基質為乳化油 SPRS 複合碳源材料，適合應用於現地菌群使用，然而，脫鹵球菌共培養模型測試需使用單一碳源作為產氫菌發酵來源並且可以產生醋酸提供脫鹵球菌使用，達成互利共生之關係。本團隊於眾多碳源中，選取乳糖(Lactose)作為本實驗之發酵碳源。

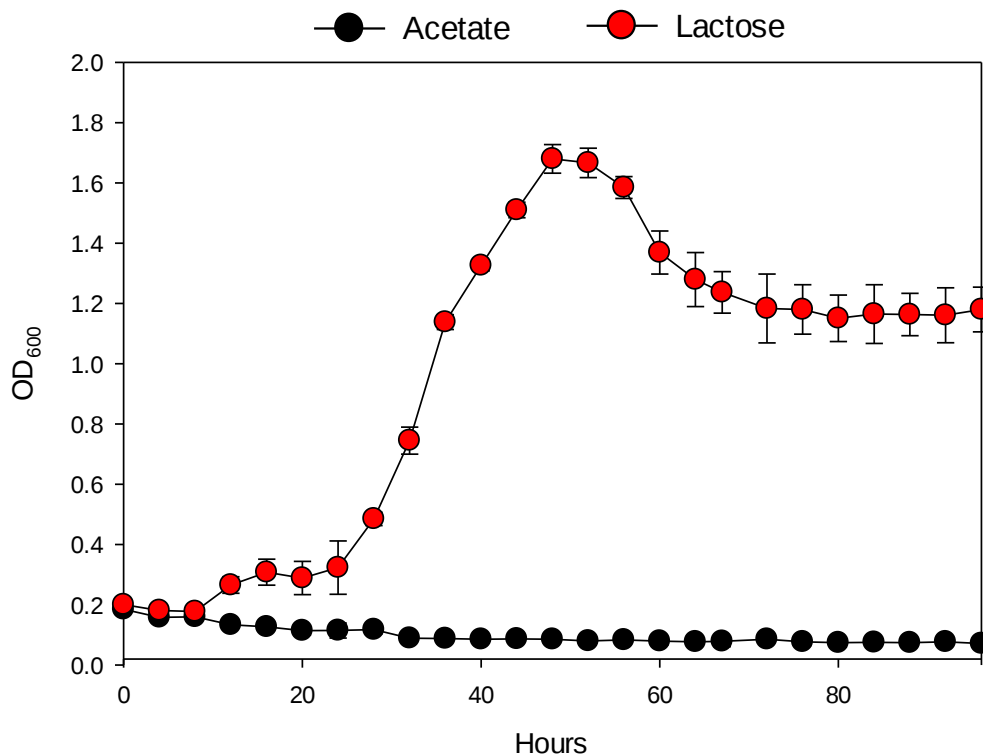


圖 12. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 之單一碳源應用生長趨勢圖

於圖 12 測試產氫菌使用單一碳源之生長情形，本實驗使用乳糖及醋酸鈉作為單一碳源來源，濃度皆為 10mM，由 OD₆₀₀ 濁度試驗可以得知產氫菌可以利用乳糖於厭氧培養液進行生長，並且於 48 小時可以達到生長之最高峰，反之，醋酸鈉並無法被產氫菌使用，由此可以確認產氫菌無法與脫鹵球菌競爭碳源，因此有利於共培養。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

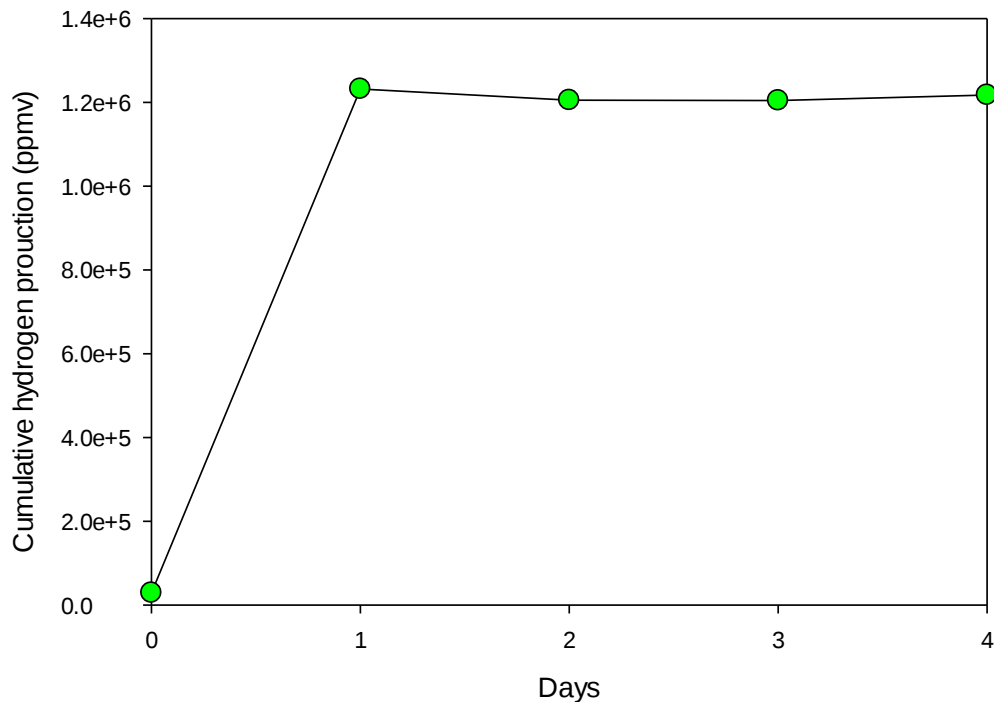


圖 13. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 使用乳糖厭氧發酵氫氣趨勢圖

圖 13 以 GC-TCD 分析產氫菌利用 10mM 乳糖製造氫氣之趨勢，可以見得，於一天後測量頂空氫氣產氫量可以達到 1.2×10^6 ppmv，並維持氫氣濃度可以長時間維持，因此確認產氫菌可以利用乳糖產生氫氣。

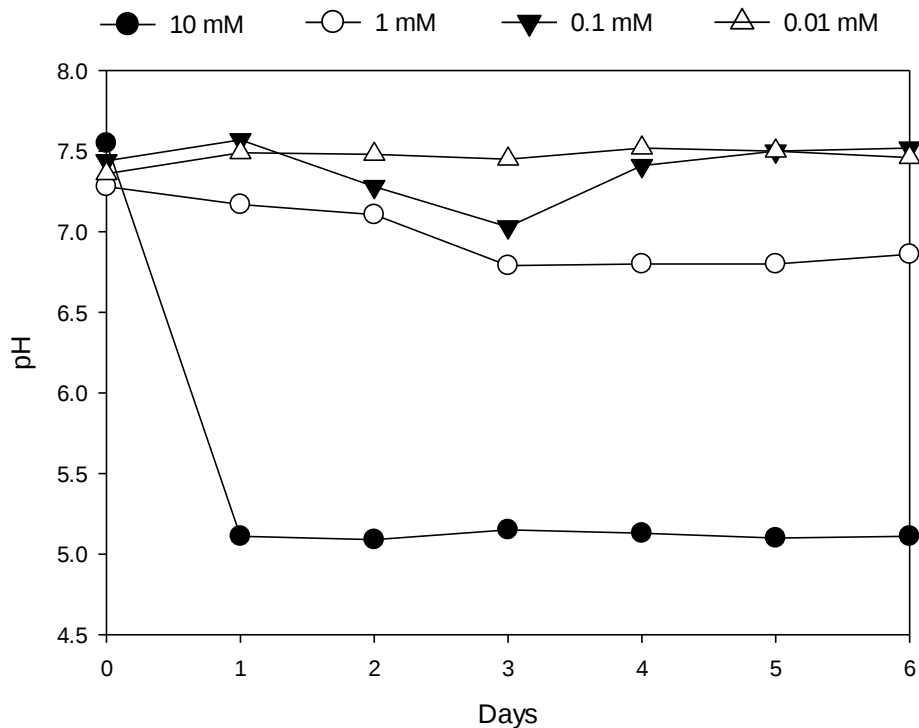


圖 14. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 使用不同濃度之乳糖厭氧發酵 pH 變化趨勢圖



第四章：實驗結果

產氫菌可以使用還原糖進行發酵，經由糖解反應產生丙酮酸(pyruvate)以及電子，電子將用於製造氫氣，pyruvate 將會進入 TCA 循環提供細菌能量，這過程中會產生許多種類的酸，如乳酸、甲酸、醋酸、丁酸等，因此 pH 會隨著發酵反應的進行而下降(Calusinska, et al., 2015)。圖 14 結果顯示，以 10mM 乳糖進行發酵會導致 pH 降至 5.2，在這個 pH 環境下，脫鹵球菌是無法正常進行脫氯反應，因此透過降低乳糖濃度限制發酵反應，當乳糖濃度降為 1mM 時，pH 將維持在 6.8~7.2 之間，已經達到可以適合脫鹵球菌生長的 pH 條件，再下降乳糖濃度到 0.1mM 及 0.01mM 可以使得 pH 再維持在 7.2 以上，但是透過生長趨勢圖分析(圖 15)，在這兩個濃度是不適合產氫菌生存。

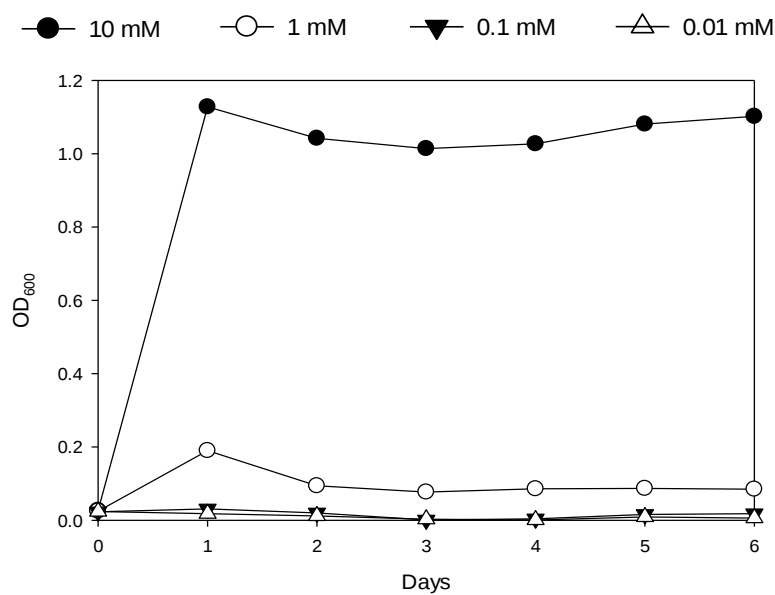


圖 15. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 使用不同濃度之乳糖厭氧發酵生長趨勢圖

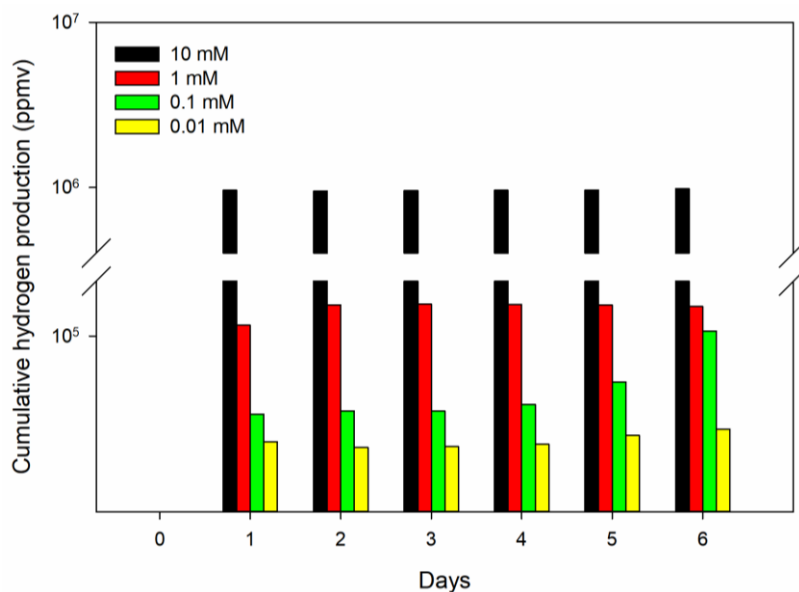


圖 16. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 使用不同濃度乳糖厭氧發酵氫氣趨勢圖



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

圖 16 顯示產氫菌雖在 10mM 乳糖濃度下可以產生 10^6 ppmv 氫氣，但是 pH 過低不利於脫鹵球菌生長，在低碳源之濃度下，1mM 乳糖濃度可以產生至少 10^5 ppmv 氫氣，且可以維持 pH 大於 6.5，使得脫氯反應可以進行。

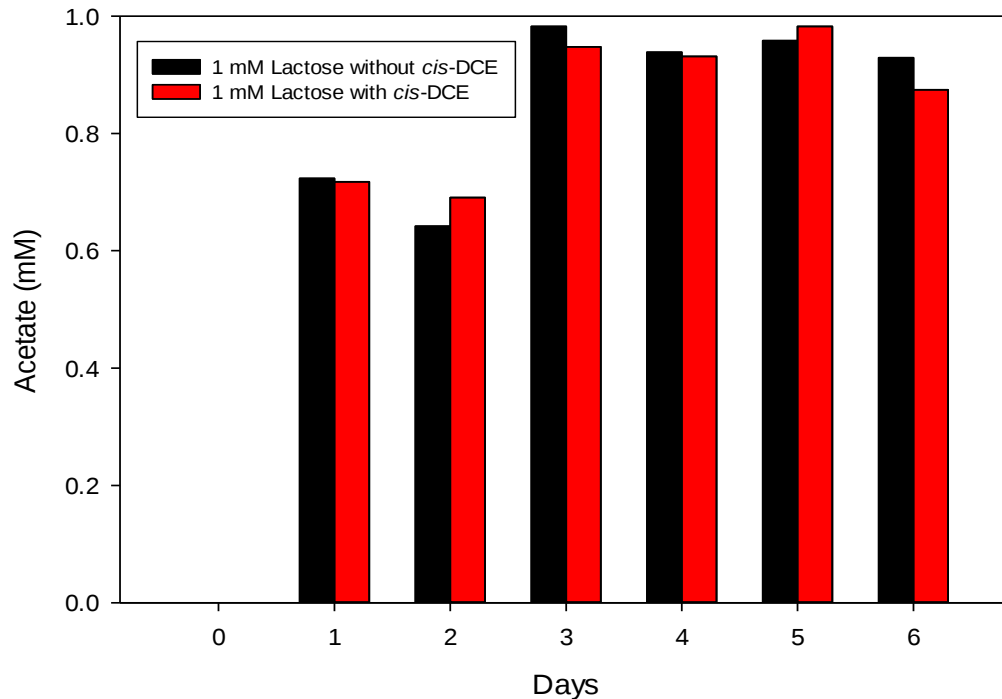


圖 17. 產氫菌 *Clostridium butyricum* 使用 1mM 之乳糖厭氧發酵醋酸趨勢圖，產氫菌培養於有添加/無添加 0.8mM 濃度之 cis-DCE

圖 17 測定產氫菌使用乳糖產生醋酸的濃度，顯示使用乳糖進行發酵確實可以產生醋酸，並且在添加 cis-DCE 的環境(0.8mM)下不會影響其代謝反應，可以於第一天時測得醋酸濃度達 0.7mM，第三天後幾乎 90%以上乳糖可以被轉換成醋酸，在 Collet 團隊(2005)的研究中，乳糖經由 *Clostridium thermolacticum* 可以產生醋酸及乳酸，產生出來之乳酸可以進一步被其他環境菌使用，如醋酸生成菌可以將乳酸代謝成醋酸，這些醋酸可以再被其他環境所利用，因此確認使用產氫菌 *Clostridium butyricum* 可以經由乳糖發酵產生氫氣並且提供碳源給予脫鹵球菌使用。



第四章：實驗結果

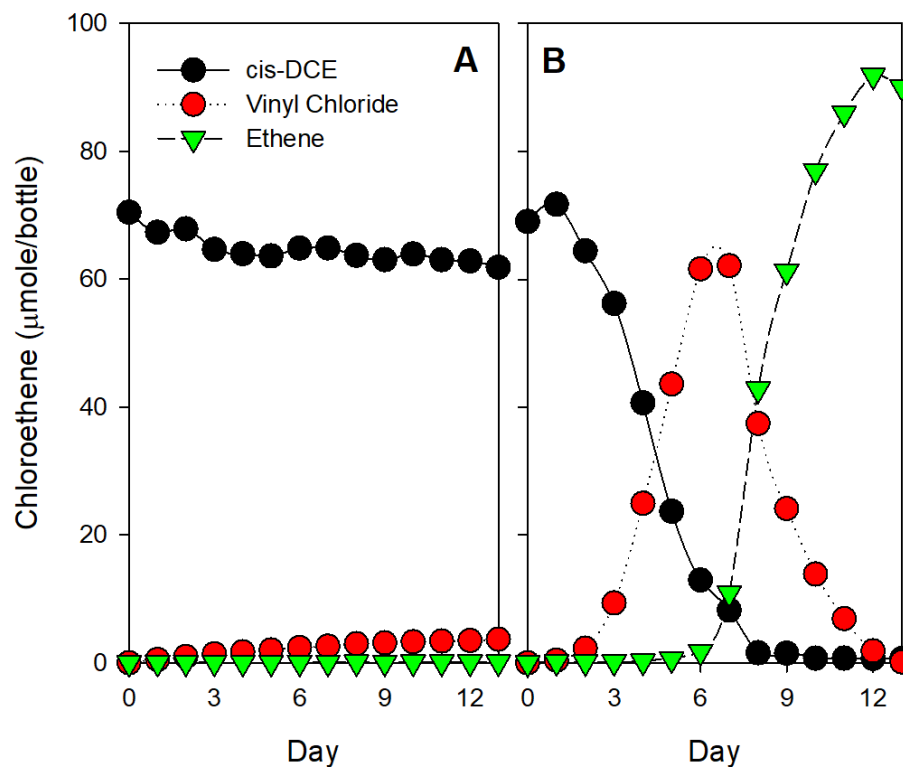


圖 18. 脫鹵球菌 BAV1 及產氫菌 *Clostridium butyricum* 共培養批次試驗 (A)沒有添加產氫菌 (B)添加產氫菌。頂空僅有氮氣，厭氧培養液中提供唯一碳源為乳糖 (1mM)，cis-DCE 起始量為 70μmole，接種菌量 BAV1 為 10^6 ，產氫菌為 10^9

圖 18 為脫鹵球菌與產氫菌之共培養試驗，目的為確認在無外部氫氣及醋酸的提供下，脫鹵球菌可以使用產氫菌所發酵的產物進行脫氯反應。在圖 18(A)可見當沒有與產氫菌共培養時，脫氯反應幾乎停止，然而，在圖 18(B)中，加入產氫菌後，使得脫鹵球菌維持其脫氯之活性，並於 12 天完成完全脫氯。最後，我們確認產氫菌可以與脫鹵球菌共培養，其共生之相互作用模型如下圖 19。

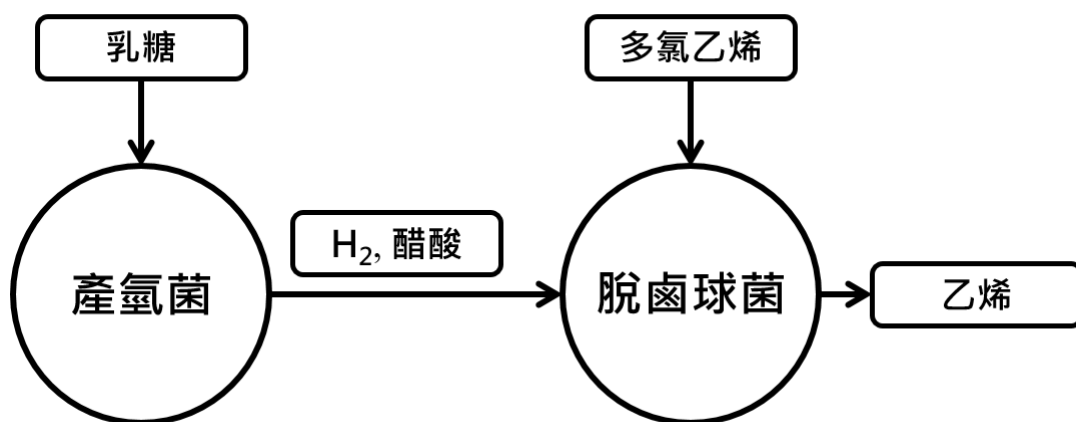


圖 19. 產氫菌與脫鹵球菌共培養降解多氯乙烯共生協同作用機制圖



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

4.5 脫鹵球菌包埋測試及優化膠體

矽膠包埋的過程會使用到 TMOS、MTMS 以及矽奈米顆粒，將 TMOS 與 MTMS 以一定比例混合後，再與 5 mM 鹽酸進行水合反應，使 MTMS 與 TMOS 進行水解反應數小時，獲得烷氧溶液。將烷氧溶液、矽奈米顆粒與菌液(離心菌體溶於 PBS)以 1:1:0.4 的體積比例混合，使烷氧溶液、菌液以及矽奈米顆粒開始進行縮合，同時倒入模具中成形，以獲得包埋微生物膠體。

然而，本團隊一開始針對脫鹵球菌的包埋，以相同比例的條件進行膠體製作，其膠體並沒有脫氯之活性，經過一系列的測試，發現將烷氧溶液、矽奈米顆粒與菌液比例進行調整，以 1:1:0.4、1:1:1 及 1:1:5 之比例進行測試，結果發現於膠體比例 1:1:5 之膠體脫鹵球菌擁有活性，且其形態可以維持完整不易崩解，當菌液比例再增加則膠體會變得無法成形，其結果如下圖 20。由於增加菌液的比例因此提升整體膠體體積，使得成本較原先膠體降至 1/3，達到成本下降之效果，因此本團隊成功開發出脫氯膠體並且將其優化。

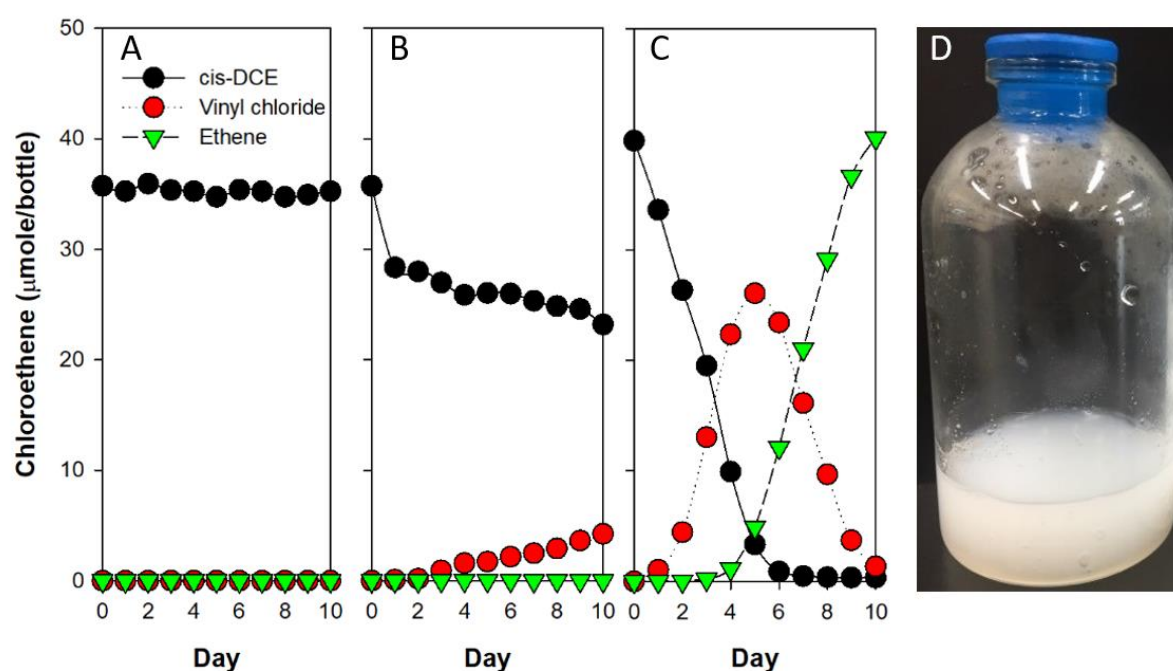


圖 20. 不同配方比例之脫鹵球菌包埋膠體測試，烷氧溶液、矽奈米顆粒與菌液比例(A)1:1:0.4; (B)1:1:1; (C)1:1:5; (D)1:1:5 成功膠體之照片，頂空添加 20% 氫氣及 80% 氮氣，碳源為醋酸鈉 10mM，起始量 cis-DCE 為 35μmole。



第四章：實驗結果

確認脫鹵球菌可以包埋後，再者必須確認其包埋菌數是否影響脫氯效率，並且決定最佳包埋菌量。圖 21 以不同的菌數進行脫氯膠體包埋，其中當膠體菌數密度為 10^8 copies/mL，測試 39 天後該膠體無脫氯反應產生，然而，在膠體菌數密度為 10^9 copies/mL 及 10^{10} copies/mL 則可以保有脫鹵球菌活性，分別在第 33 天及第 24 天完成完全脫氯，其中膠體菌數密度 10^{10} copies/mL 效果最優，後續實驗將以此菌數密度進行包埋。

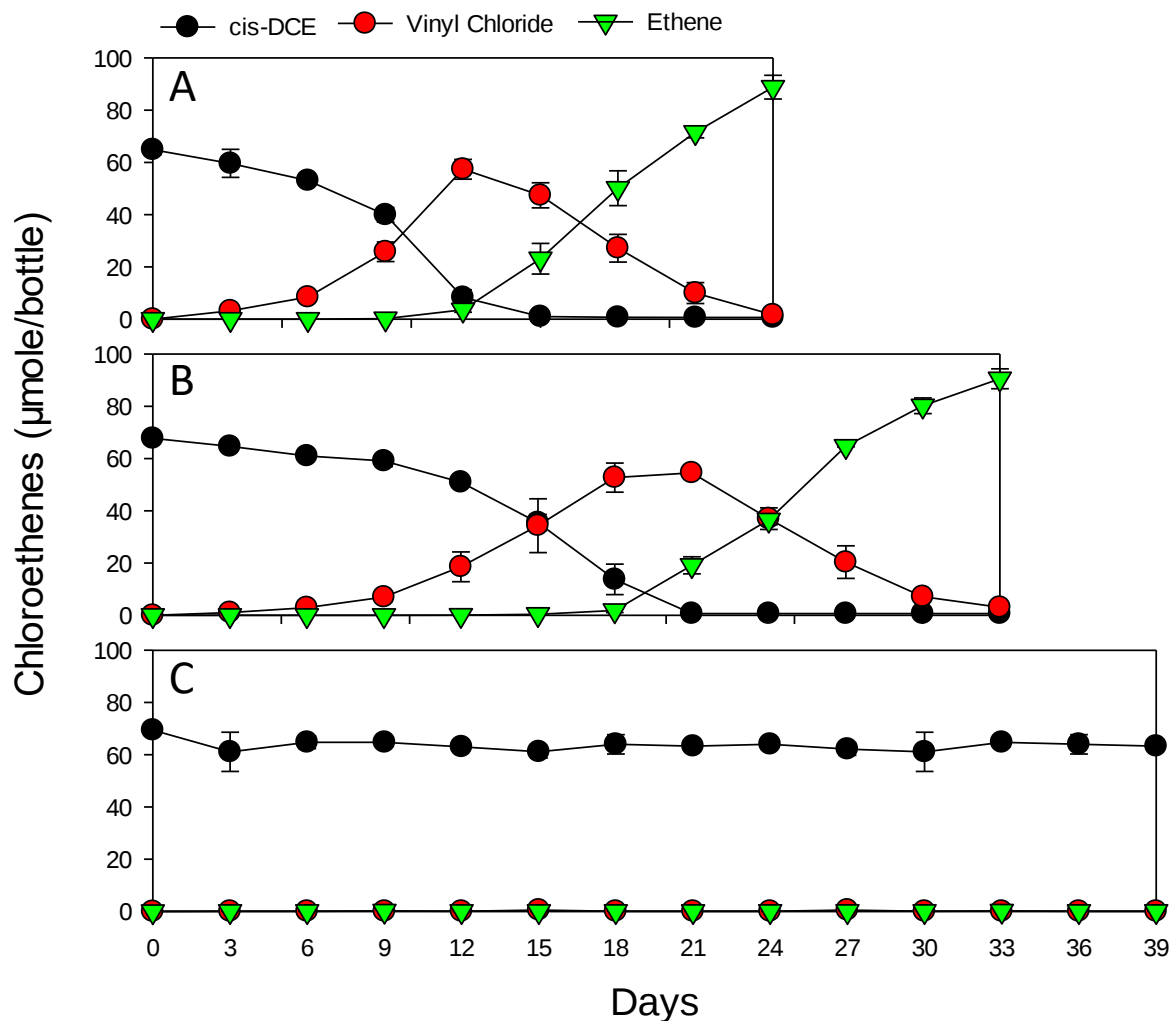


圖 21. 脫鹵球菌菌數包埋膠體試驗(A) 10^{10} (B) 10^9 (C) 10^8 copies/mL 膠體菌數密度，頂空添加 20% 氫氣及 80% 氮氣，碳源為醋酸鈉 10mM，起始量 cis-DCE 為 70 μmole



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

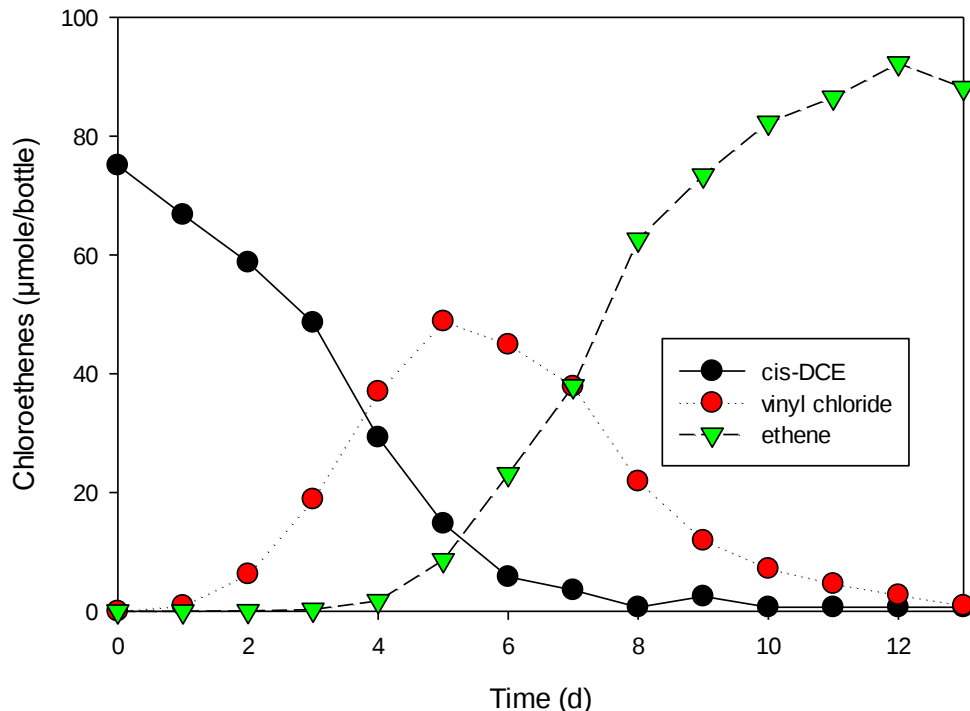


圖 22. 產氫菌與脫鹵球菌包埋膠體測試，菌種膠體密度 BAV1 為 10^{10} copies/mL，產氫菌為 10^8 copies/mL，乳糖(1mM)為單一碳源，頂空僅只有氮氣，起始量 cis-DCE 為 70μmole

圖 22 為產氫菌與脫鹵球菌包埋膠體的脫氯反應批次實驗，目的確認在無外部氫氣及醋酸的提供下，包埋於膠體的脫鹵球菌可以使用使用產氫菌所發酵的產物進行脫氯反應。本實驗可以發現於第 12 天，脫氯膠體可以完全將二氯乙烯脫氯至無毒的乙烯，與僅包埋脫鹵球菌相比，整體脫氯速率提升，可能因為在單一包埋脫鹵球菌的組別可能需要等待頂空之氫氣溶於水後，進入膠體才可以被脫鹵球菌所使用，然而，在包埋產氫菌與脫鹵球菌，氫氣及醋酸透過產氫菌產出，就近直接提供給脫鹵球菌所使用，因此加快整體脫氯速率(Lo, et al., 2020)。

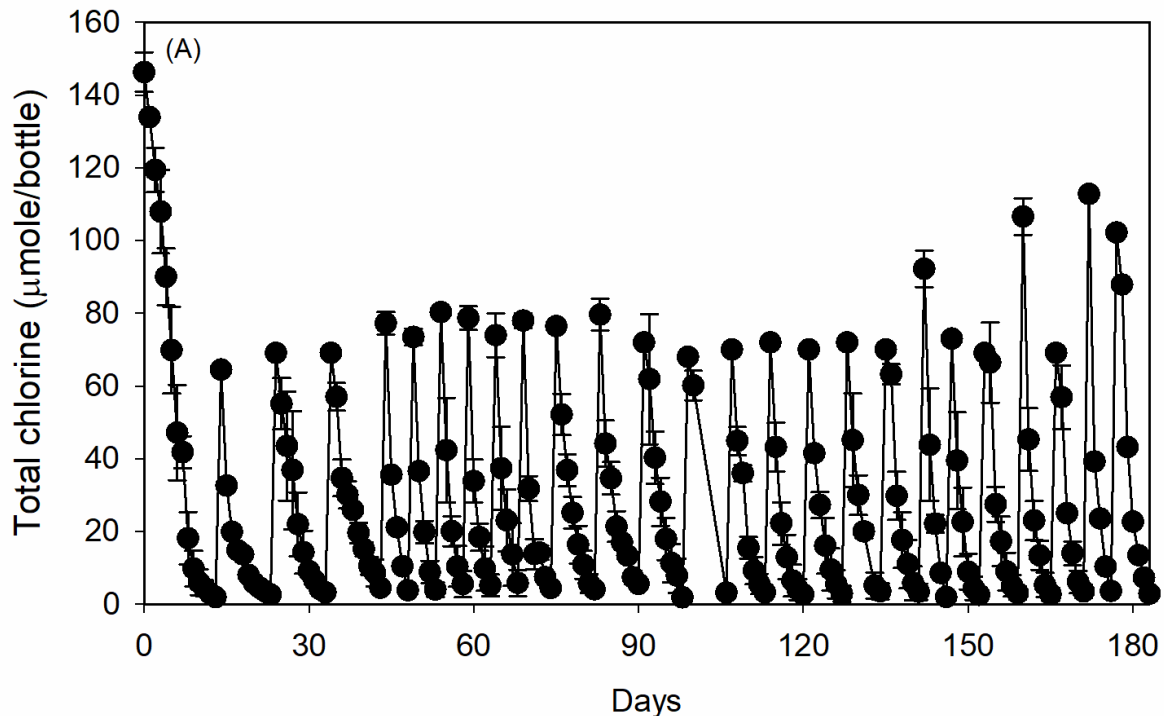


圖 23. 包埋產氫菌及脫鹵球菌之脫氯膠體長效性及再利用批次試驗(n=3)，脫氯膠體起始降解 70 μ mole 之 cis-DCE，等待完全脫氯後清除上清液，再重新加入新的厭氧培養液 100mL 以及 30 μ mole 之 cis-DCE，連續培養 26 代，縱軸為總氯化物量(Total Chlorine = cis-DCE_{x2} + Vinyl Chloride, μ mole)，單一碳源為乳糖 1mM，頂空僅有氮氣，包埋菌種膠體密度 BAV1 為 10^{10} copies/mL，產氫菌為 10^8 copies/mL

圖 23 為包埋產氫菌及脫鹵球菌之脫氯膠體長效性及再利用批次試驗，目的在於確認膠體未來可以長時間應用於現地以及再利用之可能性。當第一代完全降解 70 μ mole 之 cis-DCE 後，將上清液清除，並且重新加入全新的厭氧培養液，再加入 30 $\pm$ 5 μ mole(總氯化物量為 60 $\pm$ 10 μ mole)之 cis-DCE，後續當每一代完成完全脫氯後，重複上述步驟進行下一代的培養。由結果可以發現，在第 2 代到第 4 代時，其平均脫氯速率為 6 μ mole Cl⁻ removal/day，然而，第 5 代到第 9 代時，其平均脫氯速率上升至 18 μ mole Cl⁻ removal/day，速率提升 3 倍，培養到 10 至 20 代，平均速率維持在 11 μ mole Cl⁻ removal/day，當培養到第 20 代至第 25 代時，平均速率又回到 18 μ mole Cl⁻ removal/day，且於第 25 代之脫氯速率達到最高 27 μ mole Cl⁻ removal/day，脫氯速率整體上升的原因，可能是膠體內部的脫鹵球菌迅速的生長以及長時間馴化增加其活性(Shibasaki-Kitagawa et al., 2000; Zhou et al., 2014)，於第 9 代檢測上清液菌量以及累積產氫量(下圖 25)，可以見得持續增長的脫鹵球菌以及產氫菌，氫氣在第 3 天可以達到最高 10⁵ ppmv，證明脫鹵球菌及產氫菌經由 60 天以上的培養，擁有相當好活性且可以持續生長，並且可以持續維持脫氯及產氫超過 180 天，極具有現場應用價值。



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

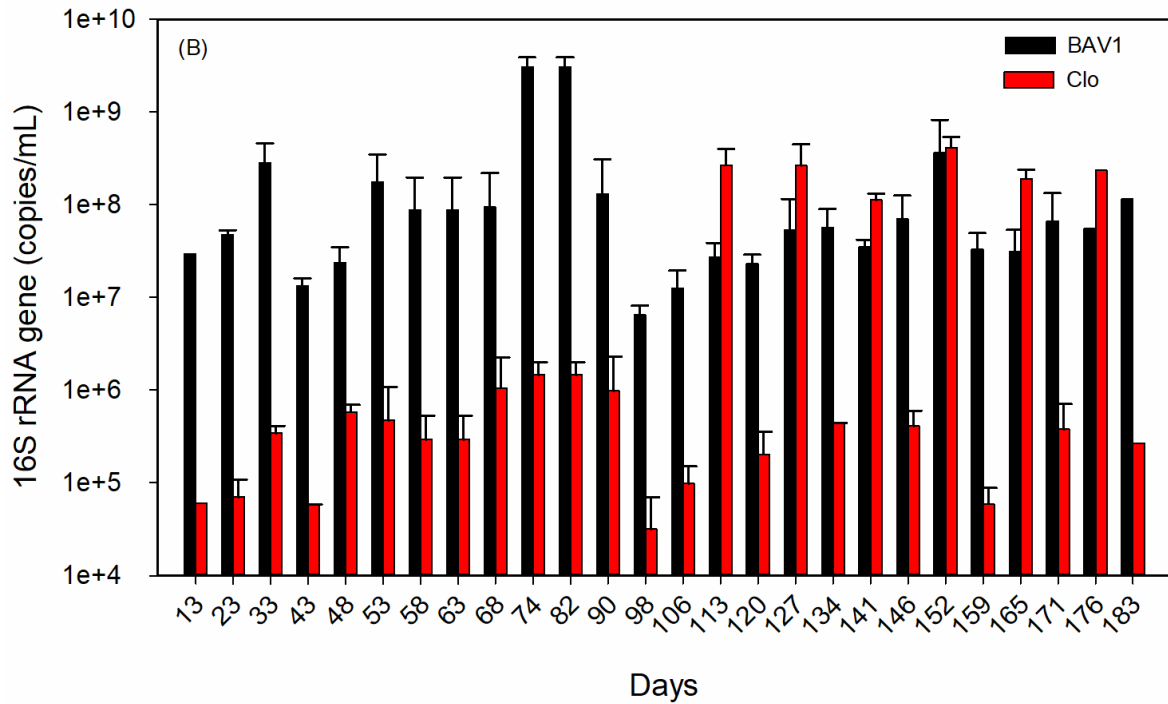


圖 24. qPCR 分析包埋產氮菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)完全脫氮時之上清液菌數

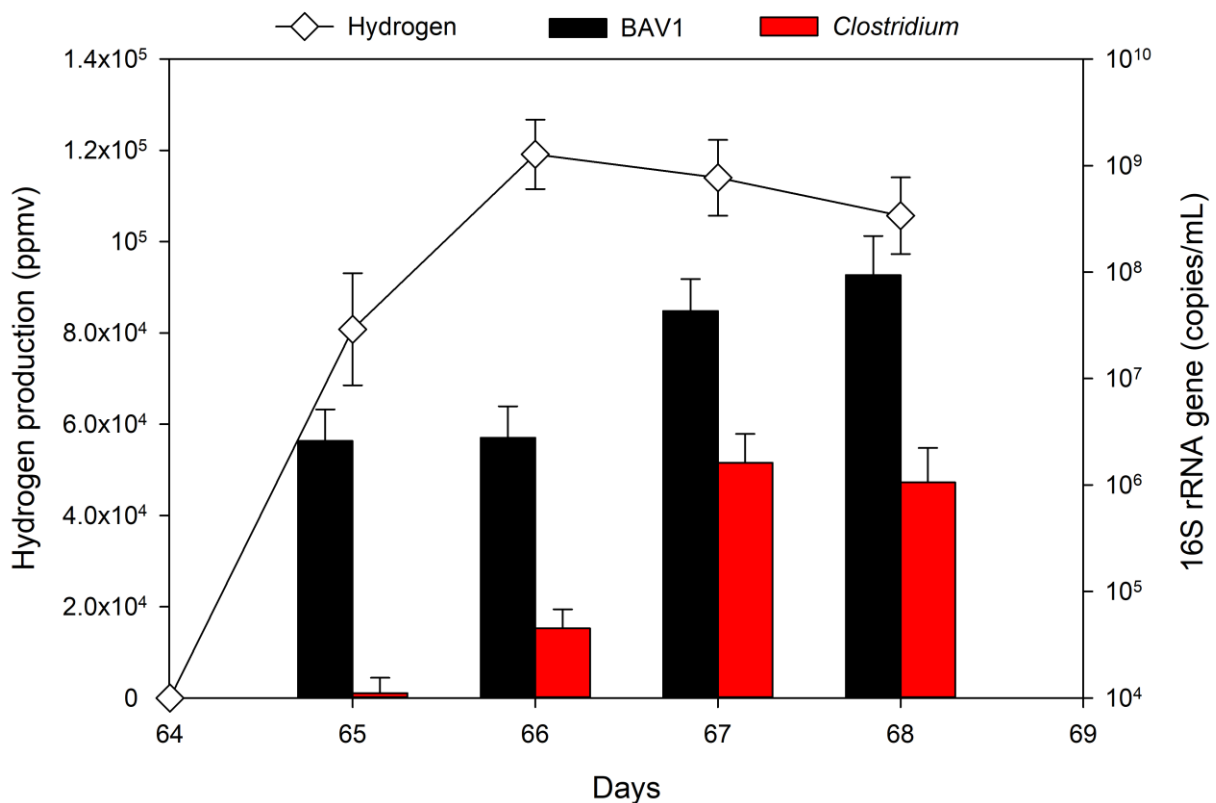


圖 25. qPCR 分析包埋產氮菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)第九代脫氮反應時之上清液菌數及頂空氫氣累積量



第四章：實驗結果

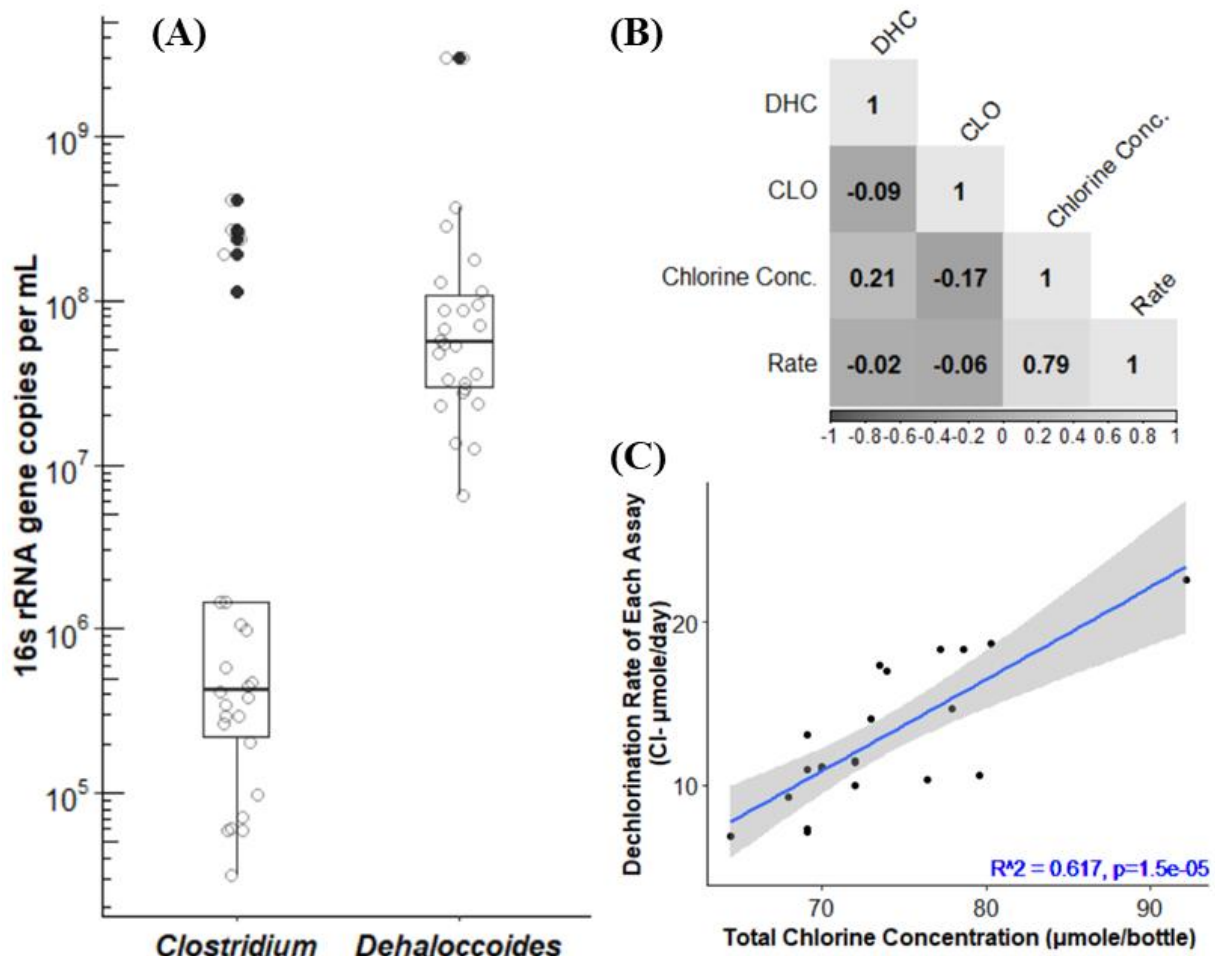


圖 26. (A)包埋產氫菌(Clo)及脫鹵球菌(BAV1)之 qPCR 菌數統計分析圖;(B)脫氯速率(Rate)與總氯化物量(Chlorine Conc.)、產氫菌(CLO)及脫鹵球菌(DHC)菌數之相關性分析圖;(C) 脫氯速率與總氯化物量之線性關係圖

欲深入了解脫氯膠體其脫氯速率是否與脫鹵球菌的菌數有相關性，因此本實驗於每一脫氯完成之階段將會抽取上清液以 qPCR 進行菌數分析，在上清液中脫鹵球菌及產氫菌之菌數經過 26 次 qPCR 測定其結果如上圖 24，於上清液之脫鹵球菌平均為 10^8 /mL copies/mL，產氫菌平均為 10^6 copies/mL(圖 26A)，與膠體包埋之脫鹵球菌及產氫菌比例接近(脫鹵球菌 10^{10} copies/mL;產氫菌 10^8 copies/mL)。同時，將計算出之脫氯速率(Rate)與脫氯菌菌數(DHC)、產氫菌菌數(CLO)以及起始總有機氯化物量(Chlorine Conc.)進行相關係數分析(圖 26B)，可以得知脫氯速率在本次實驗與脫鹵球菌及產氫菌菌數無關(相關係數分別為-0.02 及-0.06, p value > 0.05)，然而，脫氯速率與每次添加之總有機氯化物量成正相關(圖 26(B)相關係數為 0.72，(C) $R^2=0.617$ ， p value < 0.01)。當我們進一步分析，將 26 代脫氯反應每一代總氯化物濃度取對數(ln)與時間(day)進行線性統計作圖，其結果如下圖 27 所示，



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

可以發現本脫氯膠體之含氯有機氯化物濃度降解符合一級反應(first order)， $R^2 > 0.93$ 且斜率 K 介於 0.28 至 0.93， K 值與脫氯速率分布吻合，因此，可確認本膠體於連續脫氯之情況，由於脫氯菌菌數及活性受到膠體保護以及馴化作用保持其穩定，可以維持高效脫氯之功能性。

本次實驗完全脫氯二氯乙烯總計 1.043mmole(144mg)，膠體體積為 10mL，倘若環境狀況極佳，推估每公升脫氯膠體可用於整治二氯乙烯濃度超過管制標準之地下水(0.7ppm)超過 15000 公升。因此，本團隊完成開發高效脫氯膠體，本膠體可以重複使用且具有長效性，未來面對變化多端的現地環境，膠體可以物理性保護脫氯菌及產氯菌，未來使用者僅需維持現場水質參數($ORP < -50mV$ 及 $pH > 6.5$)，所包埋的高密度脫氯菌可以保持高效脫氯活性，應用潛力非常高。

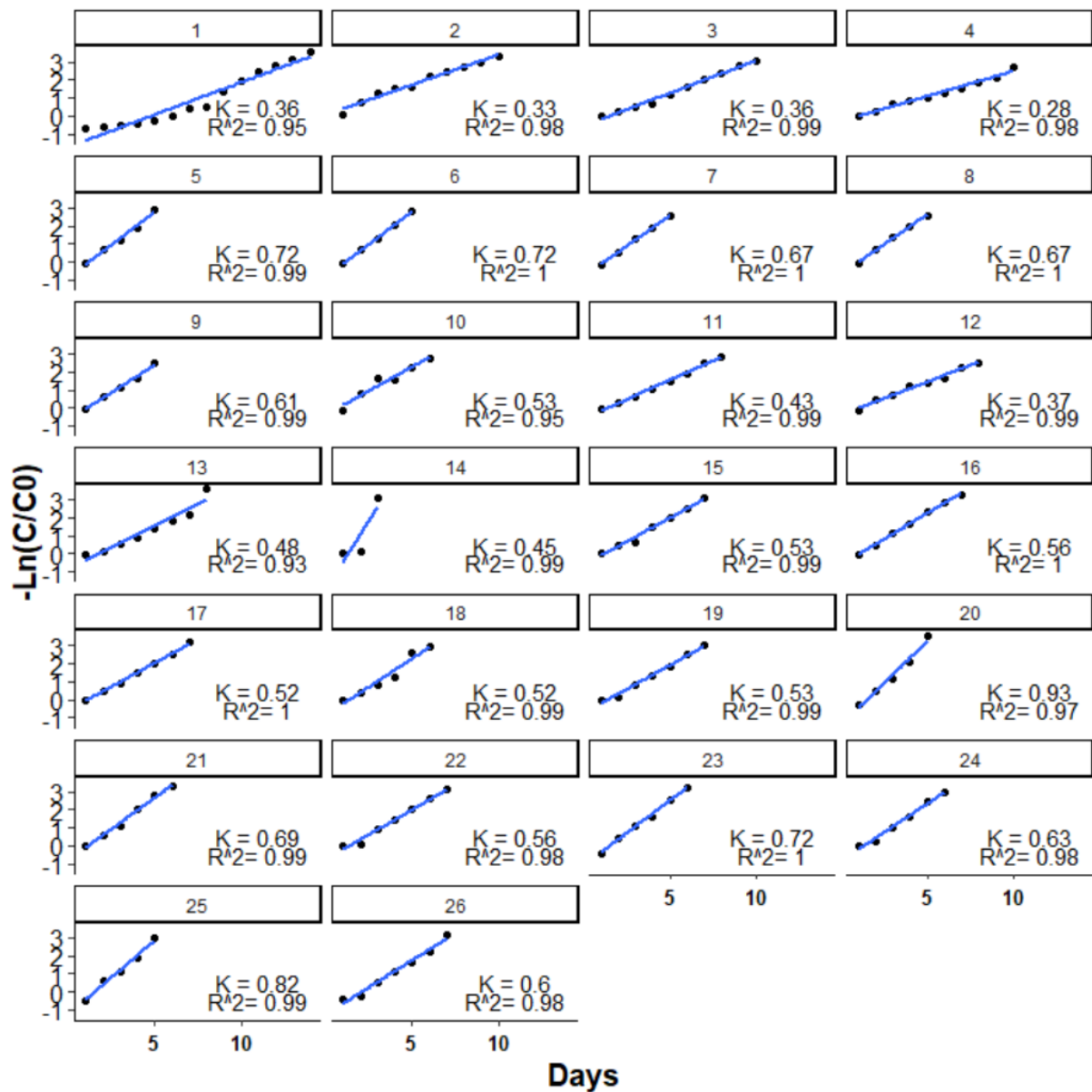


圖 27. 有機氯化物速率分析統計圖表



4.6 脫氯膠體現地地下水批次實驗

欲測試本團隊所開發之脫氯膠體是否直接應用於現地地下水環境，因此本團隊於本次場址之既有井收集地下水體，該水體僅添加小蘇打(30mM)作為緩衝系統，其實驗組別如下表 8，以現地微生態批次系統模擬現地環境，以評估脫氯膠體對含氯有機物之影響。

表 8. 微型試驗之實驗組別設計表

組別	緩衝地下水	乳糖	脫氯膠體	cis-DCE
自然降解組(NA)	100mL			70 μ mole
矽膠控制組(SC)	100mL	1mM	添加(僅矽膠)	70 μ mole
乳糖控制組(LC)	100mL	1mM		70 μ mole
脫氯膠體組(DG)	100mL	1mM	添加	70 μ mole

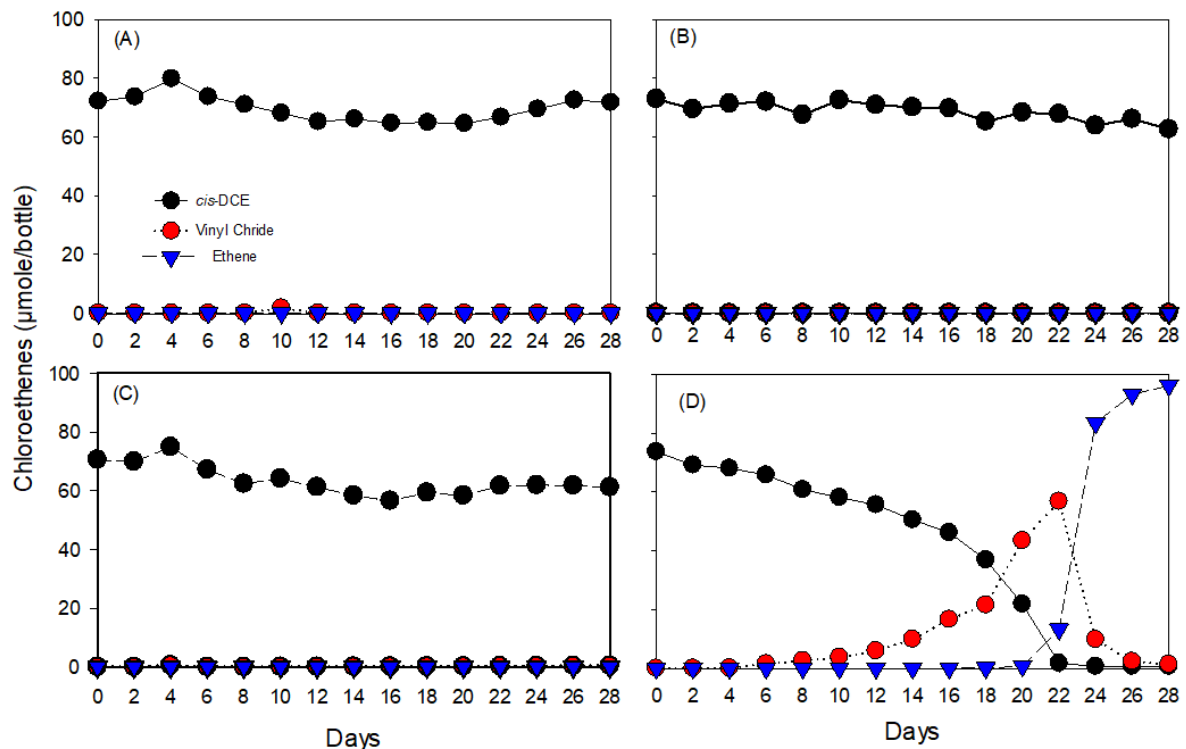


圖 28. 現地地下水脫氯膠體活性微型實驗，組別分別為(A) 自然降解組 (B) 矽膠控制組 (C) 乳糖控制組 (D) 脫氯膠體組，脫氯膠體菌種密度脫鹵球菌 BAV1 為 10^{10} copies/mL，產氫菌為 10^8 copies/mL，乳糖(1mM)為單一碳源，頂空僅只有氮氣，起始量 cis-DCE 為 70 μ mole



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

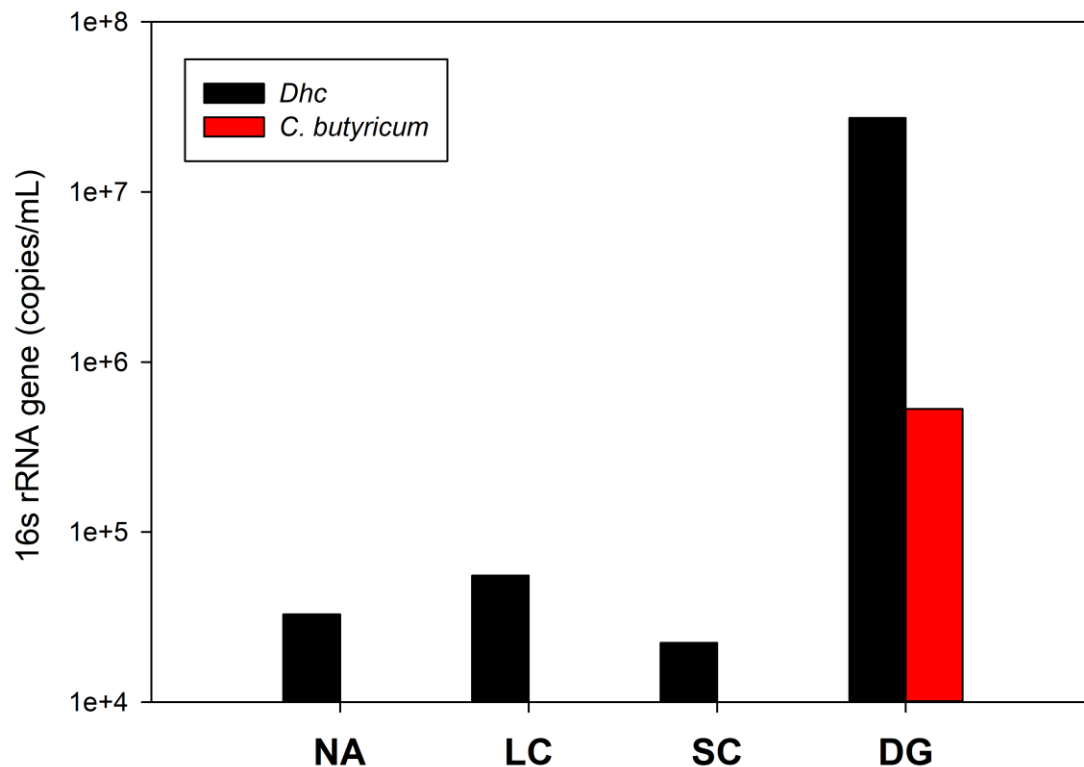


圖 29. qPCR 分析現地地下水脫氯膠體活性微型實驗包埋產氫菌(*C. butyricum*)及脫鹵球菌(*Dhc*)完全脫氯時之上清液菌數

由實驗結果(圖 28)可得知，只有添加脫氯膠體之組別(DG)可以在 28 天內將 70 μ mole 之二氯乙烯完全脫氯成乙烯，反觀現地菌群即使提供碳源，並無法進行脫氯反應(LC 及 SC)，矽膠控制組證明於現地添加矽膠並不會有吸附二氯乙烯之影響(SC)。於實驗結束之 28 天，進行 qPCR 分析(圖 29)，測得現地之脫鹵球菌菌數低於 10⁵ copies/mL(NA、LC 及 SC)，然而，當添加有包埋細菌之脫氯膠體，其上清液的脫鹵球菌菌數可達 10⁷ copies/mL 以及產氫菌可達 10⁵ copies/mL，因此脫氯膠體之組別擁有高效的脫氯活性，其平均脫氯速率為 5 μ mole Cl⁻ removal/day，與先前實驗脫氯速率相近(圖 23)，由此可確認，本次所開發之包埋脫鹵球菌之膠體，可以應用於現地地下水整治。同時，將各組別於 28 天抽出之總 DNA 進行菌相分析，其結果如下：



4.6.1 菌相變化分析

V3-V4 區域 OTU Taxonomy

將 OTU 以屬階層菌量排名前 50 之詳細數據如表 9，其中將與 TCE 降解相關且之菌種以紅色字體標註，以利於後續討論。(此表順序依照 OUT 讀值數總和進行排列)

表 9. 以屬為分類階層之菌相變化表

Taxonomy	Read of Sample			
	NA	SC	LC	DG
Escherichia-Shigella	65	62201	70482	42322
Macellibacteroides	25	46650	53501	2653
Clostridium_sensu_stricto_1	76584	486	467	52
Sporomusa	18	5634	6332	52244
Eubacterium	22	15	23	49381
Victivallis	6	15725	17412	16
Clostridiales_vadinBB60_group_g	7	11553	13950	7
e				
Anaerospira	9	11391	12604	16
Sedimentibacter	4	8345	9146	66
Bacteroidales_or_fa_ge	4	8	11	16518
Peptococcaceae	2	5965	6149	0
Pseudomonas	9023	153	213	7
Oxobacter	2	4231	4310	1
Christensenellaceae	1	3219	3291	70
Raoultella	6	2714	3123	222
Lachnospiraceae	19	2148	2500	15
Anaerovorax	2	1966	2076	50
Desulfotomaculum	1	2015	2045	0
Ruminococcaceae	0	1900	1992	112
Levilinea	0	1955	2026	1
Bacillus	27	1453	1738	7
Desulfovibrio	0	829	859	1525
Caproiciproducens	0	1	1	2789



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

Hydrogenoanaerobacterium	2	1368	1258	77
Lachnoclostridium_5	13	1153	1407	107
Erysipelotrichaceae	0	1191	1389	0
Clostridiales	1	1177	1107	113
Ruminiclostridium_1	0	1174	1099	35
Tyzzarella	0	944	1130	6
Anaerocella	0	0	0	2022
Proteiniphilum	0	942	1040	0
WPS-2_ge	1	865	895	0
Clostridium_sensu_stricto_10	0	124	82	1470
SRB2_ge	0	835	839	2
Citrobacter	0	637	758	231
Geothrix	0	849	729	0
Clostridiaceae_1	0	664	683	0
Victivallaceae_ge	0	591	514	82
Halobacteroidaceae_fa	0	0	0	1042
Ruminococcaceae_UCG-010	0	459	545	0
Christensenellaceae_R-7_group	1	484	481	0
Azoarcus	0	404	539	0
Lutispora	0	400	431	0
Desulfosporosinus	0	361	374	0
Christensenellaceae_fa	0	357	373	0
Rikenellaceae	0	1	0	710
Acetobacteraceae	656	14	10	1
Acinetobacter	633	1	1	0
Bacteroides	61	105	168	248
Desulfurispora	0	265	306	0
Other	989	2964	3676	2596



第四章：實驗結果

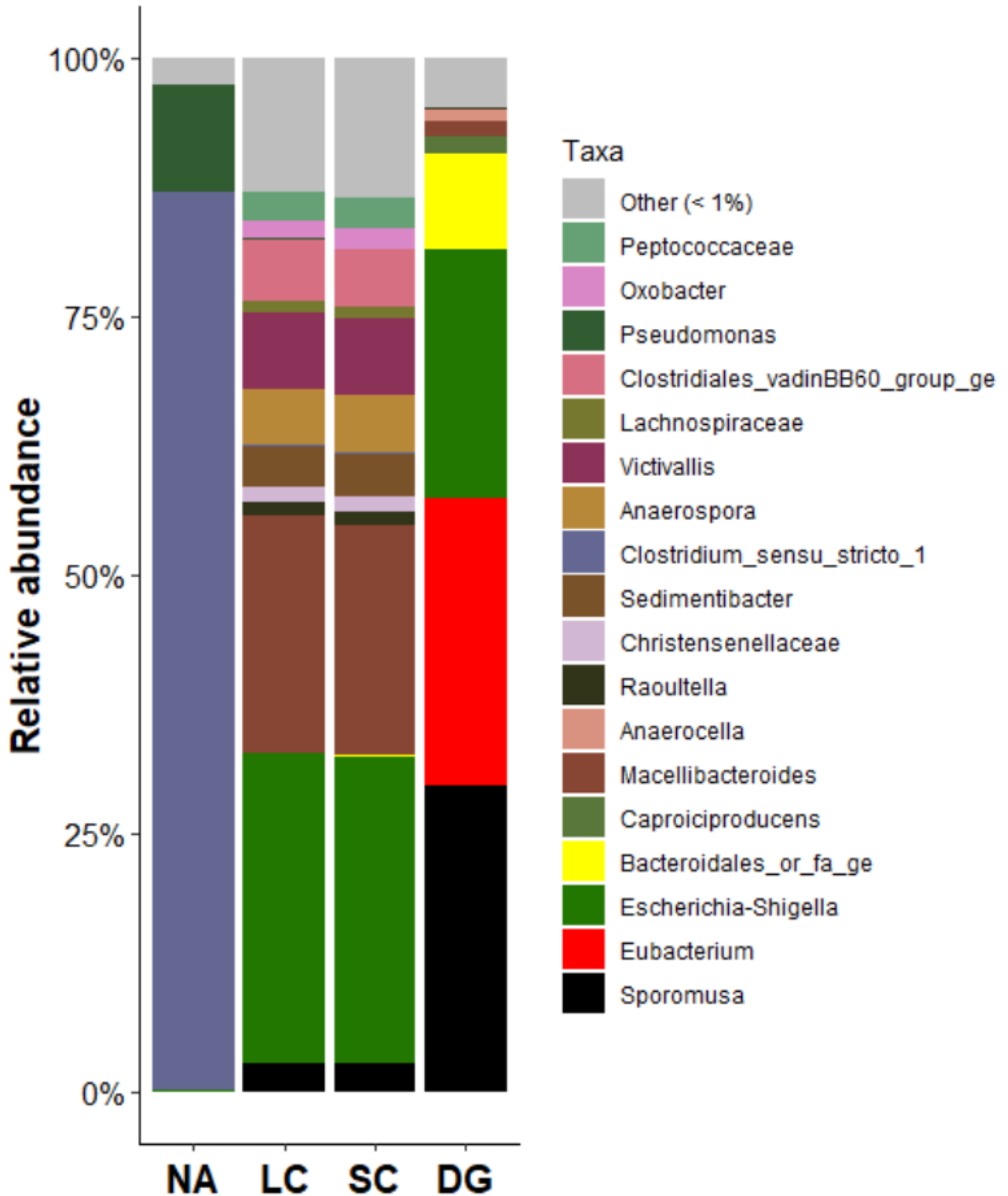


圖 30. 以屬為分類之菌相累積變化圖



開發高效脫氮生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

我們將有 unclassified 以及 unculture 的 Taxonomy 剔除後，將占比低於 1% 之 Taxonomy 歸納制 Other，進行分類比較，其結果如圖 30，各個組別之前三菌群以及關鍵脫氮菌群分別為：

1. **NA:** Clostridium_sensu_stricto_1 (86.8%)、Pseudomonas (10.2%)、Acetobacteraceae (F, 0.7%)
2. **SC:** Escherichia-Shigella (29.8/%)、Macellibacteroides (22.3%)、Victivallis (7.5%)
3. **LC:** Escherichia-Shigella (30.1/%)、Macellibacteroides (22.9%)、Victivallis (7.4%)
4. **DG:** Sporomusa (29.5%)、Eubacterium (27.9%)、Escherichia-Shigella (23.9%)



4.6.2 樣本主座標分析及菌相熱點分析

主成分分析(Principal components analysis, PCA)是一種常用的數據間差異分析方法，PCoA(Principal coordinate analysis, PCoA)則是主座標分析，常利用計算物種距離的方法(Jaccard 和 Bray-Curtis)區分各組樣品，PCA 和 PCoA 最大的區別在於 PCA 分析是基於原始的物種組成矩陣所做的排序分析，而 PCoA 分析則是基於物種組成計算得到的距離矩陣得出，故在資料判讀上 PCoA 較 PCA 容易，已顯示各組的 Beta 多樣性指標。將本實驗各組的數據進行 PCoA 計算後，實驗結果如圖 31，可以看出樣品被區分成 3 區，且組別 LC 和 SC 被歸類於同一區域，處理脫氯膠體後，DG 與其他組別明顯不同。

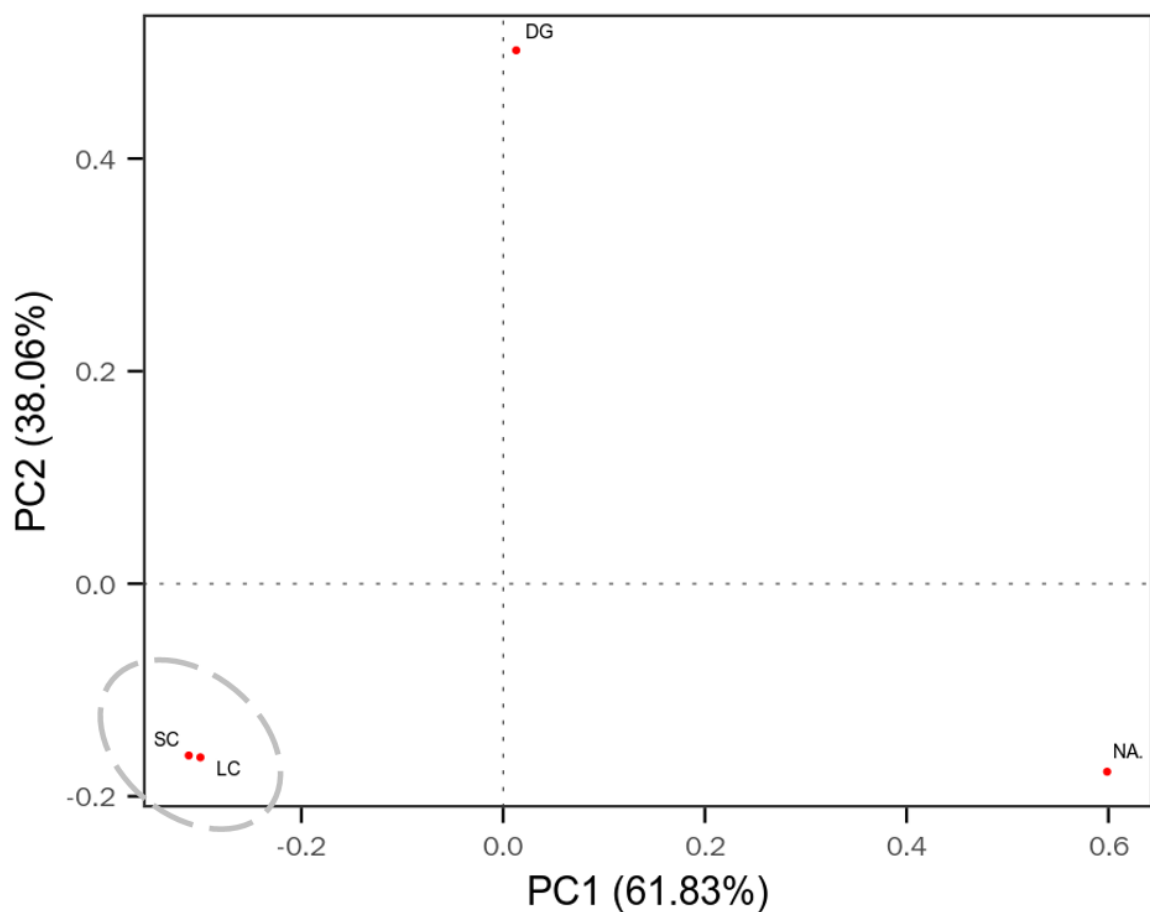


圖 31. 反應井與監測井之樣本主座標分析圖



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

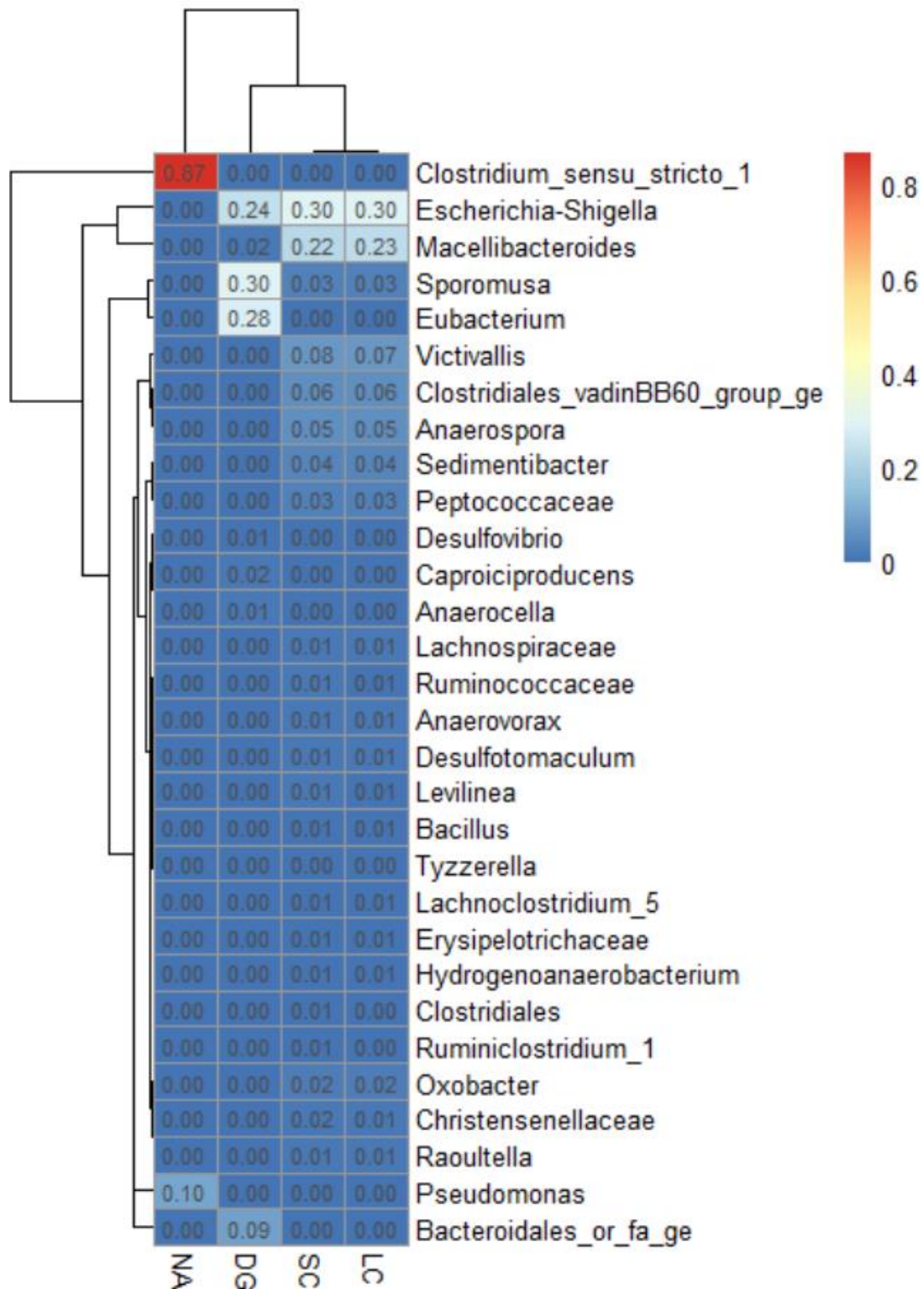


圖 32. 以種為分類之菌種前 30 名之熱點分析圖



第四章：實驗結果

從熱點分析圖綜觀菌相分布(圖 32)，可以得到與 PCoA 分析類似的分群，LC 和 SC 被分入同一群，顯示控制組彼此的菌相相近，添加脫氯膠體(DG)後與對照組們分開距離，顯示脫氯膠體會改變菌相分佈形成脫氯有利的菌相。由菌相變化分析表可以得知，該場地的細菌多為人類的腸道細菌，如 *Escherichia/Shigella*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Eubacterium*、*Victivallis*、*Bacteroidales_or_fa_ge* 等等，並且在這些菌群中分佈占比不低(5-30%)，可能為該地地下水附近應有化糞池，化糞池內容物可能有滲漏至地下水體，在自然降解的狀態下僅只有測得 *Clostridium_sensu_stricto_1* 及 *Pseudomonas* 屬，然而，在 LC 以及 SC 的組別中，我們可以觀察到，一旦提供碳源後這些腸道菌群則會被活化，*Escherichia/Shigella*(30%)、*Macellibacteroides*(23%)、*Victivallis*(7%)、*Clostridiales_vadinBB60_group_ge*(6%)及 *Anaerospira*(5%)，這些菌群主要功能多為發酵或者產生氫氣，部分細菌若被誤食可能導致疾病，因此未來在整治後之地下水的使用上應當要格外注意(Suh, et al., 2014; Gupta, et al., 2009; Zoetendal, et al., 2003; Kang, et al., 2018; Woo, et al., 2005; Jabari, et al., 2012)。

添加脫氯膠體後(DG)，本來在控制組中(LC 和 SC)分佈均勻的菌群則轉變為以 *Escherichia/Shigella* 屬(24%)、*Sporomusa* 屬(30%)以及 *Eubacterium* 屬(28%)為主的菌群，其中 *Sporomusa* 屬是地下水常見的醋酸生成菌(Acetogen)，透過發酵的方式將甲醇及乳酸等碳源轉換成脫鹵球菌可以利用的醋酸(Duhamel, et al., 2007)，Puentes Jácome 團隊(2019)在 KB-1 菌群中發現，當 pH 介於 5.5~6.0 時，菌群中的 *Sporomusa* 屬與 *Acetobacterium* 屬將會為主要醋酸生成菌，其中屬 *Eubacteriaceae* 科的 *Acetobacterium woodii* 以及 *Eubacterium limosum* 已被證實可以產生鈷胺素

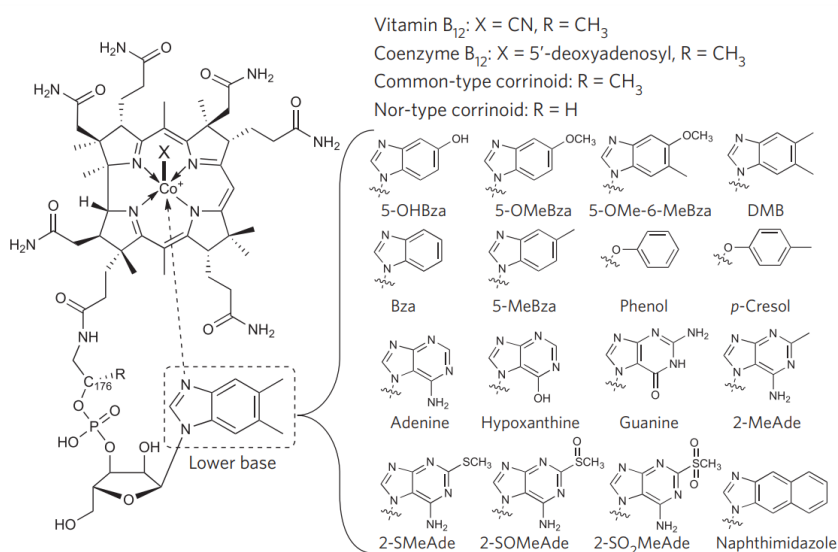


圖 33. 目前已知 16 種天然合成之鈷胺(Cobamide)，Lower base 為 DMB 者為維他命 B12, Cobalamin (Yan, et al., 2018)



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

(Cobalamin, 維他命 B12)之前驅物 5,6-二甲苯并咪唑(DMB), 這兩株菌是目前已知的維他命 B12 生產者(Munder, et al., 1992; Stupperich et al., 1988), 維他命 B12 為脫氯菌還原脫氯之啟動因子, 氫氣提供電子至脫氯酶(RdhA)時, 需要以維他命 B12 作為輔酶, 但是脫氯菌無法自行合成維他命 B12(Yan, et al., 2013), 僅只能依賴其他菌種製造提供, 目前已知有 16 種鈷胺(Cobamide), 其種類如圖 33 所示, 維他命 B12 是其中一種, 但卻是目前僅知可以被脫氯球菌用於脫氯反應(Yan, et al., 2018)。

然而, *Sporomusa* 屬將會產生脫氯球菌不可利用之酚類鈷胺素(phenolic colbamide), 在過去的研究已證實酚類鈷胺素將會抑制脫氯球菌脫氯(Duhamel and Edwards, 2007; Yan, et al., 2013), 其關係圖如下圖 34 所示, 當 *Sporomusa* 屬產生過多酚類鈷胺素給與脫氯球菌製造沒有活性的脫氯酵素(VcrA), 進而導致氯乙烯的累積, 因此 *Sporomusa* 屬的出現可能不利於脫氯反應(Puentes Jácome, et al., 2019)。

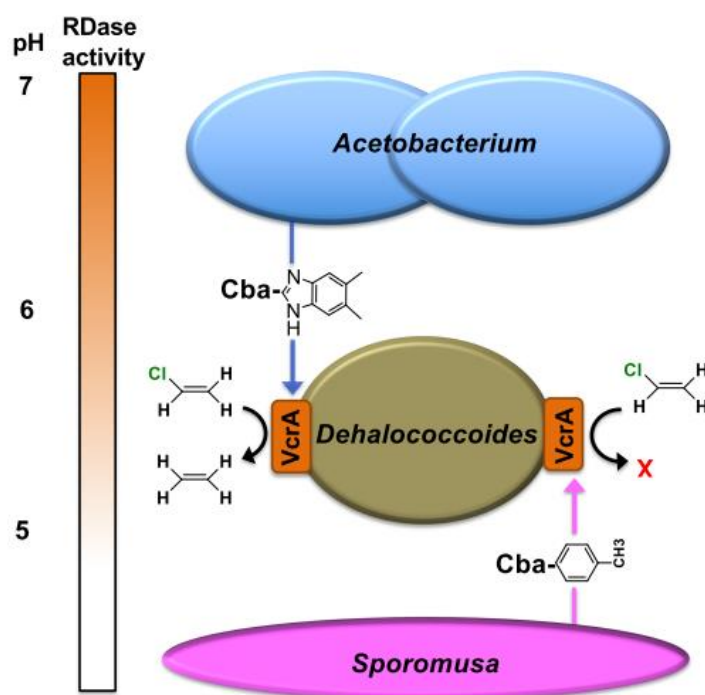


圖 34. *Acetobacterium* 與 *Sporomusa* 之脫氯反應關係圖(Puentes Jácome, et al., 2019)

本次在脫氯膠體添加組別(DG)中的菌相可以看到 *Sporomusa* 屬(30%)以及 *Eubacterium* 屬(28%)菌相比比例相近, 兩之菌屬都可以提供醋酸給於脫氯球菌做使用, *Eubacterium* 屬則可以提供脫氯球菌所需要之維他命 B12, 於脫氯膠體中的產氯菌則可以提供氫氣做為脫氯所需的電子提供者, 結合具有高活性的脫氯球菌, 形成一個穩定的脫氯菌群(Dechlorinating consortia)。



4.7 地下水質基本性質分析及現地菌群批次實驗

本研究抽取場址中現有監測井 MW02 作為後續實驗使用之現地地下水，監測的水質參數項目為總有機碳 (TOC)、水溫、溶氧量 (DO)、氧化還原電位 (ORP) 及 pH 值，現地地下水總有機碳濃度為 1.2 mg/L，水溫為 24.3°C，溶氧量為 0.2 mg/L，氧化還原電位為 274.2 mV，pH 值為 6.8，結果顯示地下水為耗氧態。

地下水中含氯揮發性有機物 (VOC) 分析結果顯示 MW02 井偵測到 TCE 存在，TCE 濃度 0.127 mg/L (管制標準為 0.05 mg/L)，cis-1,2-DCE 濃度為 0.0162 mg/L (管制標準為 0.7 mg/L)，VC 未檢測到 (管制標準為 0.02 mg/L)，結果顯示地下水含氯揮發性有機物仍超出第二類地下水管制標準，主要污染物為 TCE 及次級代謝物 cis-1,2-DCE 累積。

為研究現地地下水菌群是否擁有脫氯降解之能力，因此將蒐集到之地下水以加入緩衝試劑、醋酸鈉、維他命 B12、微量元素以及厭氧還原劑等脫鹵球菌專用配方，並且在頂空添加足量氫氣，測試該地地下水是否擁有原生菌群可以達到完全脫氯，添加 80 μ mole TCE 後經過約 70 天的批次培養，可以見得 TCE 得以在 10 天順利被降解成 cis-DCE，但是隨後就維持在 cis-DCE 後不再下降，其結果如圖 35 所示。本次實驗與現地 VOCs 分佈吻合(表 10)，本地地下水菌群應無法自行進行厭氧還原脫氯至乙烯，需要仰賴外部提供有活性的脫鹵球菌進行環原脫氯反應，因此，本場址將非常適合用於脫氯膠體的現地測試，主要需要 cis-DCE 後續之脫氯降解，包埋脫鹵球菌 BAV1 將會應用於現地整治。

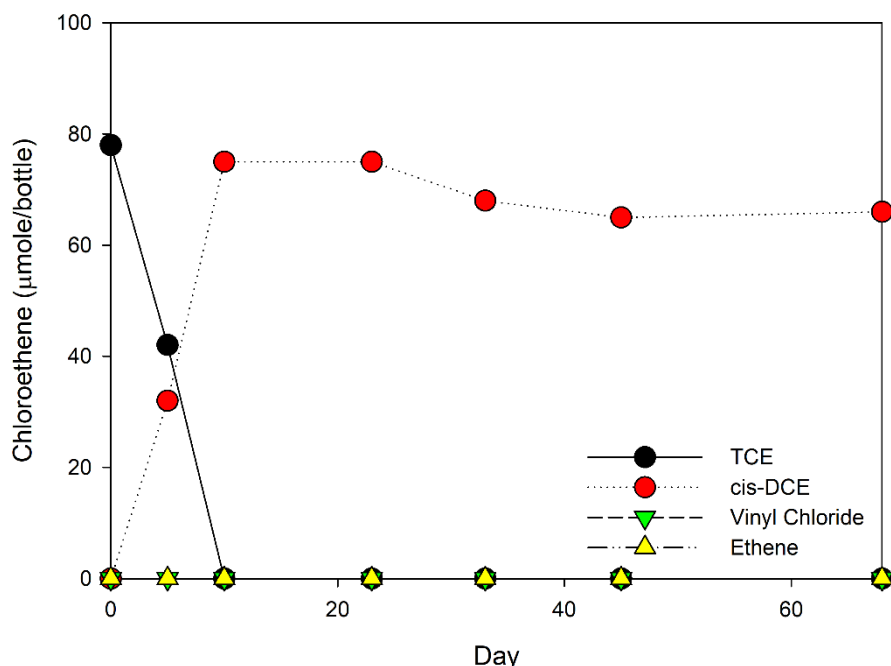


圖 35. 現地地下水菌群降解三氯乙烯之批次實驗



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

4.7.1 地下水井設置及污染物調查

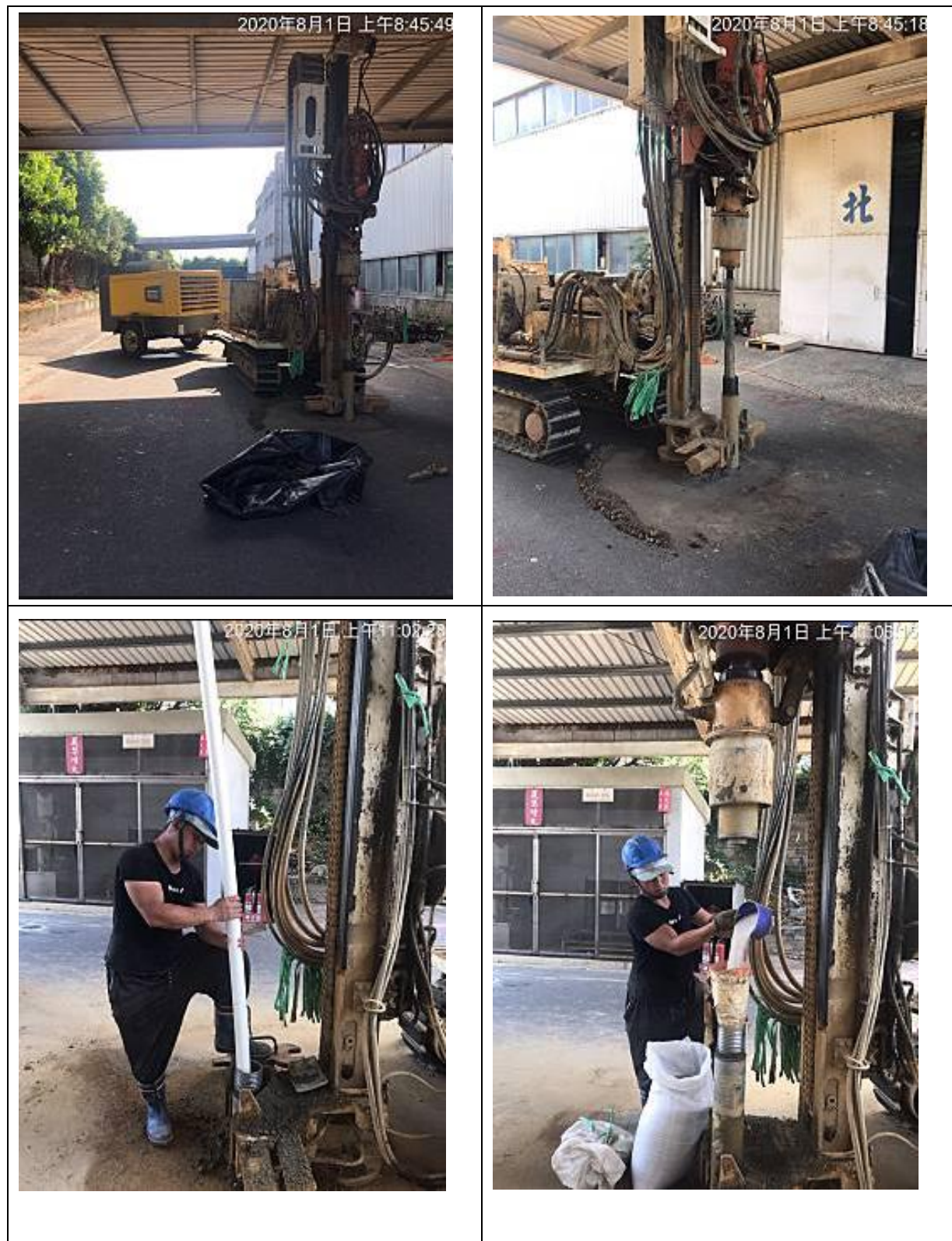


圖 36. 台鈴場地 8 月挖井施工圖

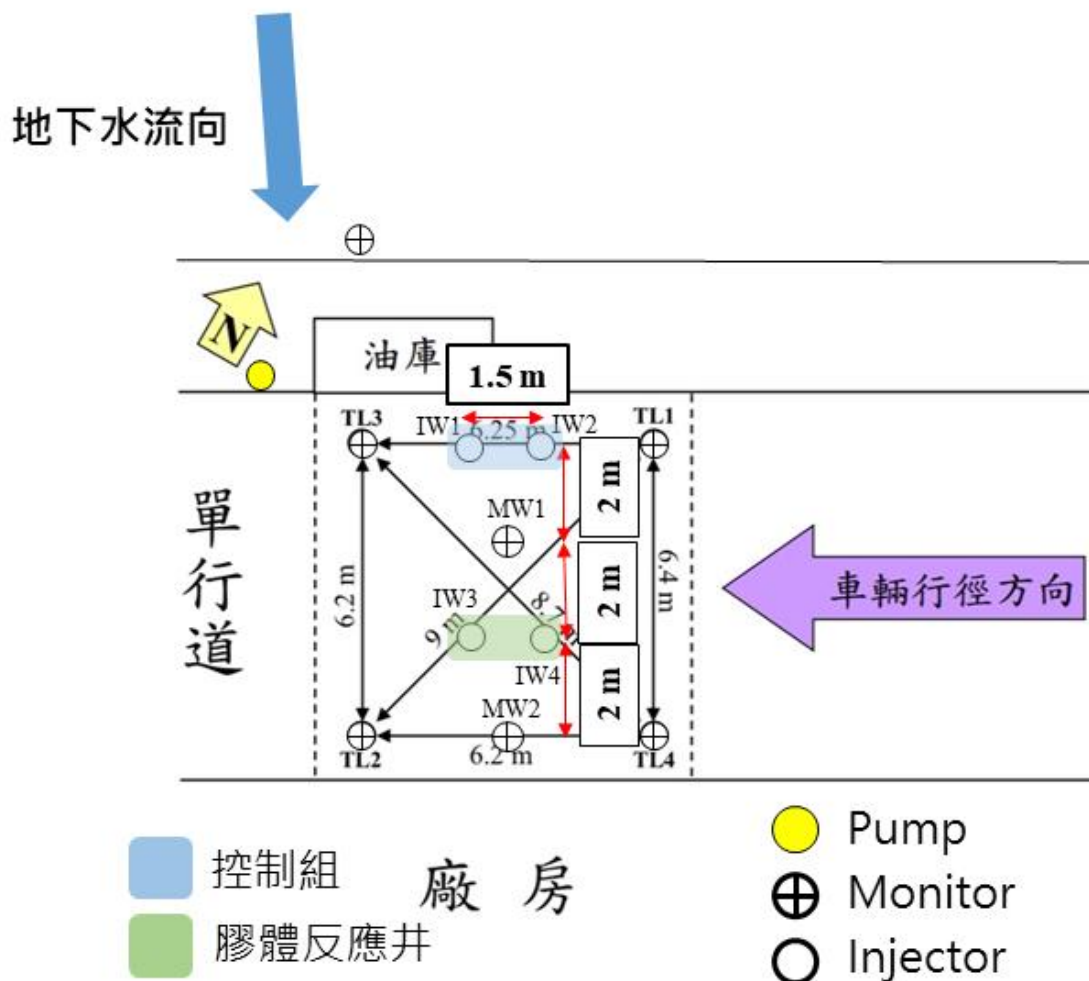


圖 37. 灌注井及監測井之設置圖，其中 IW1 和 IW2 將會作為生物刺激控制組，IW3 和 IW4 將會設置脫氯膠體作為膠體反應井，MW1-MW2 為監測井，TL1-4 為既有監測井

本研究採用固定化脫鹵球菌及產氫菌加強現地脫氯知生物整治技術，本團隊設計一地下水整治系統，上游灌注井(IW1-2)作為生物刺激法之對照組，僅添加生物基質，為於下游的膠體反應井(IW3-4)作為脫氯膠體的實驗組，會添加生物基質以及本研究所開發的高效脫氯膠體，同時，設置 MW1 以及 MW2 做為監測井，搭配現場既有井 TL1-4 也做為本次實驗的採樣監測井，其設計圖如圖 37 所示，以上新設井已於 109 年 8 月進場施作，施作圖如圖 36 所示。設井完後一個月，我們針對此次的污染物進行地下水分析，本次採樣依照標準方法 NIEA W108.50C 進行採樣，其結果如表 10，可以見得現場的三氯乙烯濃度為於各口井的濃度皆高於管制標準(0.05ppm)，其中位於 TL4 中測得高過管制標準(0.02ppm)的氯乙烯，其中大多數的井中有測得微量的 *cis*-DCE。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

表 10. 灌注井及監測井之地下水污染濃度表

Well	深度	TCE*	cis-DCE*	1,1-DCE*	trans-DCE*	VC*
IW1	6m	0.137	0.009	0.001	0.000	0.000
IW1	9m	0.132	0.009	0.001	0.000	0.000
IW2	6m	0.130	0.009	0.001	0.000	0.000
IW2	9m	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000
MW1	6m	0.101	0.000	0.000	0.000	0.000
MW1	9m	0.130	0.009	0.001	0.000	0.000
IW3	6m	0.133	0.009	0.001	0.000	0.000
IW3	9m	0.135	0.009	0.001	0.000	0.000
IW4	6m	0.124	0.000	0.001	0.000	0.000
IW4	9m	0.134	0.009	0.001	0.000	0.000
MW2	6m	0.130	0.009	0.001	0.000	0.000
MW2	9m	0.126	0.009	0.001	0.000	0.000
TL1	6m	0.127	0.008	0.001	0.000	0.000
TL1	9m	0.127	0.009	0.001	0.000	0.000
TL2	6m	0.127	0.008	0.001	0.000	0.000
TL2	9m	0.123	0.008	0.001	0.000	0.000
TL3	6m	0.124	0.000	0.001	0.000	0.000
TL3	9m	0.125	0.008	0.001	0.000	0.000
TL4	6m	0.073	0.000	0.000	0.000	0.057
TL4	9m	0.063	0.000	0.000	0.000	0.030

*: 污染物濃度單位為 ppm



4.7.2 脫氯膠體管柱配置及現場設置圖

本研究之脫氯膠體安裝設置圖如下圖 38，本脫氯膠體已獲得台灣專利 I701324，因此此處只簡易敘述。脫氯及產氫菌株經培養完成後，離心收集菌體，再以厭氧之 PBS 溶液回溶後與矽膠材料混和充填至模具內，待凝固後即完成菌株固定，將菌體填充至管柱內，加入厭氧之 PBS 溶液維持菌體新鮮度，製造過程必須全程保持厭氧，最後封裝於特製鋁箔袋中，填充氮氣可儲存於冰箱至少 2 周，到現場拆開包裝即可投放於現地反應井使用，搭配懸掛系統可以固定於井塞。

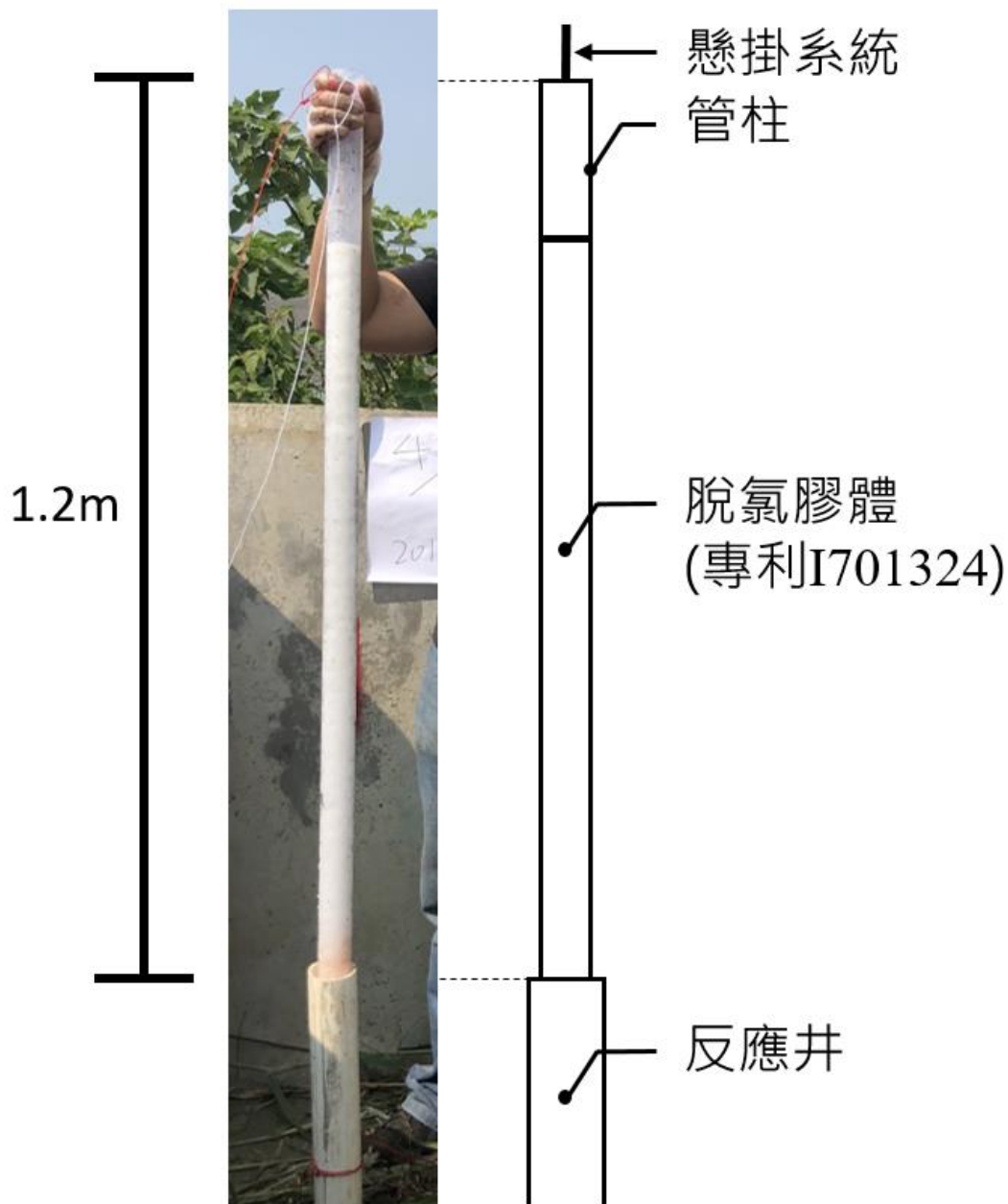


圖 38. 固定化產氫菌膠體管柱設置示意圖



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

4.8 模場整治策略評估

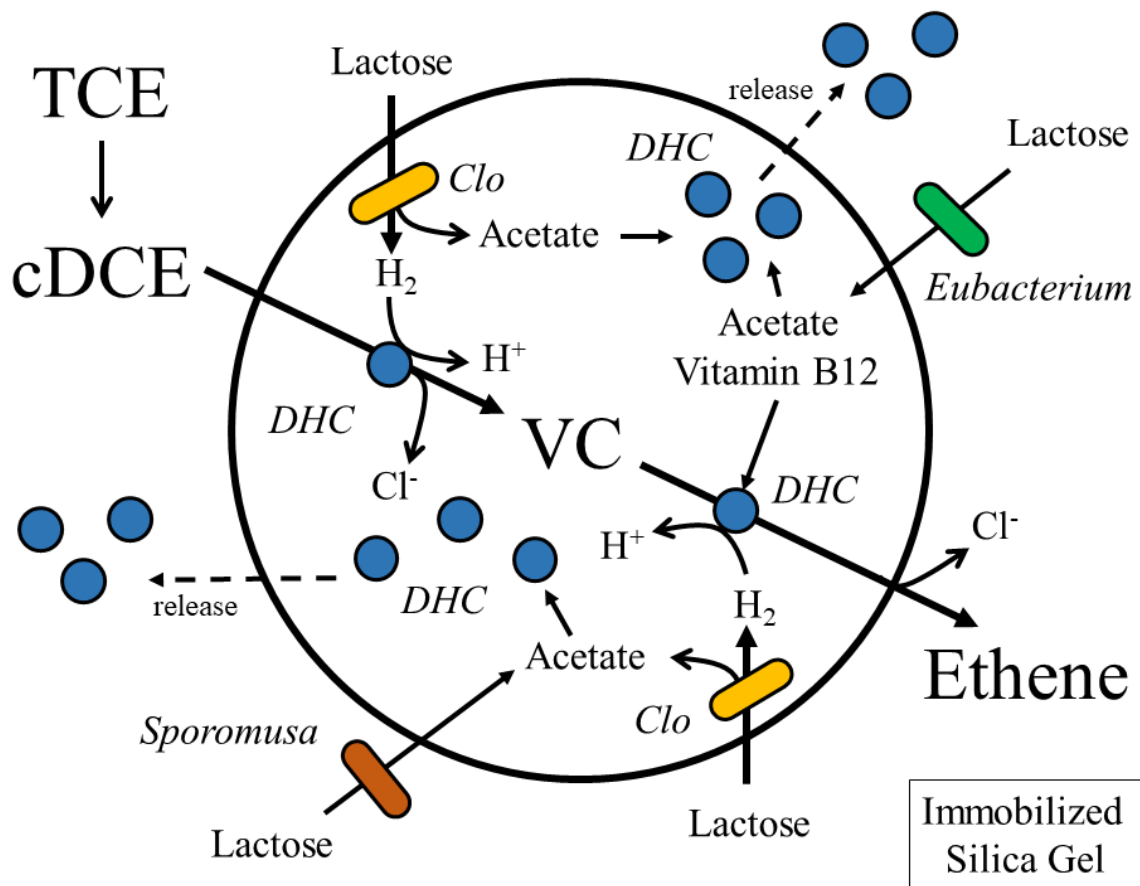


圖 39. 脫氯膠體微生物組成在多氯有機污染物降解過程中所扮演之角色

本計畫成功將脫鹵球菌及產氫菌包埋於生物膠體中，開發出新穎脫氯膠體，透過產氫菌利用碳源發酵醋酸及氫氣，提供脫鹵球菌生長及脫氯，隨著時間增生，脫鹵球菌亦可以從膠體釋出到地下水中增加脫氯反應範圍。我們也證明使用脫氯膠體可以持續脫氯長達 180 天以上，活性及脫氯速率皆非常穩定，非常適合應用於地下水層既開放又動態的環境中。透過採集現地地下水進行脫氯菌群培養，可以確認現地地下水僅只能將三氯乙烯脫氯成二氯乙烯，缺乏可降解二氯乙烯的脫鹵球菌，因此本次試驗我們選用可降解二氯乙烯的脫鹵球菌 BAV1，其包含了關鍵脫氯功能性基因 *bvcA*，我們將 BAV1 包埋於脫氯膠體中，進而增強降解多氯乙烯並達成完全脫氯至乙烯之目的。在脫氯膠體現地地下水批次實驗中，我們確認所開發的脫氯膠體的確能夠應用在現地地下水中，在 28 天則可以達到完全脫氯，透過 NGS 之菌相分析，發現 *Eubacterium* 和 *Sporomusa* 這兩個菌屬與脫氯膠體形成脫氯菌群，其中 *Eubacterium* 可能是關鍵提供維他命 B12 之菌屬，協助脫鹵球菌脫氯反應。結論，本計畫提供一項全新脫氯膠體，並證實本膠體具有一定之脫氯效能，綜合關係圖如圖 39 所示，未來將結合更多模場場址之整治工法，以提升我國多氯乙烯污染整治之能力。



第五章：結論與建議

本計劃將結合生物刺激法和生物強化法並配合次世代定序法等，建立完整系統評估監測機制，使用關鍵脫鹵球菌於包埋膠體之中，並將本技術應用於實場中加以驗證，有效解決現地脫鹵球菌菌數不足之問題，並提供永續整治方針及分子生物技術於三氯乙烯污染地下水場址整治規劃。根據此次計畫結果，將其整理如下：

5.1 脫鹵球菌培養及開發優化脫氯膠體

1. 本團隊成功建立脫鹵球菌培養之絕對厭氧系統，進行脫鹵球菌之繼代培養，經過超過 5 代培養後，可以獲得脫氯活性活躍之脫鹵球菌，菌種 BAV1 可在 9 天內完全降解 cis-DCE 至無毒乙烯，此時菌數可以達 10^9 copies/mL，菌種 FL2 可在 10 天內降解 TCE 至 VC，此兩株菌擁有台灣常見脫氯酵素 *bvcA* 及 *tceA*。
2. 透過不同菌量培養實驗，可以獲得最佳脫鹵球菌起始菌量濃度為 10^6 copies/mL，同時脫鹵球菌可以進行大量培養，可於 8 天在 1L 之專用厭氧瓶中菌數達到飽和，可以獲得 10^{11} copies/L 高濃度脫鹵球菌菌液，因此成功開發量產脫鹵球菌之技術。(研究目的 2 完成)
3. 優化產氫菌之培養條件，給予 1mM 之乳糖可以使得環境不酸化且提供有效氫氣給予脫鹵球菌進行脫氯反應，確認產氫菌可以與脫鹵球菌形成協同共生關係。(研究目的 1 完成)
4. 調整膠體配方優化脫氯膠體，成功包埋產氫菌及脫鹵球菌於膠體之中，並且確認本膠體可以長時間使用長達 183 天以上，並且可以維持脫鹵球菌及產氫菌之活性，膠體可以重複使用至少 26 次以上，因此具有現地應用之潛力。
5. 在脫氯膠體現地地下水批次實驗中，我們確認所開發的脫氯膠體的確能夠應用在現地地下水中，在 28 天則可以達到完全脫氯，脫鹵球菌於上清液的濃度可達到 10^{10} copies/L。(研究目的 3 完成)
6. 透過 NGS 之菌相分析，發現 *Eubacterium* 和 *Sporomusa* 這兩個菌屬與脫氯膠體形成脫氯菌群，其中 *Eubacterium* 可能是關鍵提供維他命 B12 之菌屬，協助脫鹵球菌脫氯反應。(研究目的 4 完成)



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

5.2 地下水水質及脫氯潛力測試

1. 經由現地地下水水樣分析，該地主要為 TCE 污染，其濃度為 0.127 mg/L，超過管制標準，cis-DCE 之濃度為 0.0162 mg/L，低於管制標準。
2. 透過菌群培養批次實驗，該地細菌不具有降解 cis-DCE 之能力，因此需要仰賴外部提供有活性的脫鹵球菌進行還原脫氯反應，使用脫氯膠體含有能夠降解 cis-DCE 至無毒乙烯之脫鹵球菌 BAV1 應能完成現地模場整治。(研究目的 5 完成)
3. 本團隊設計一地下水整治系統，上游灌注井(IW1-2)作為生物刺激法之對照組，僅添加生物基質，為於下游的膠體反應井(IW3-4)作為脫氯膠體的實驗組，會添加生物基質以及本研究所開發的高效脫氯膠體，同時，設置 MW1 以及 MW2 做為監測井，搭配現場既有井 TL1-4 也做為本次實驗的採樣監測井。
4. 於新設井測得 TCE 濃度平均為 0.117ppm，高於管制標準 0.05ppm，於 TL4 這口井測得平均 0.04ppm 之氯乙烯，高於管制標準。

5.3 建議

1. 本團隊已經具備純熟的厭氧操作技術以及脫鹵球菌繼代培養能力，未來此技術可以延伸開發台灣本土地下水脫氯菌群，如目前已知國外商業化脫氯菌群皆以此技術從地下水中獲得，如 KB-1、SDC-9 及 BAC-9 等菌群，開發本土菌群對於台灣多氯乙烯類之水土整治應有實質幫助。
2. 地下水菌群培養測試可以有效評估現地脫氯能力，場地若缺少有活性之脫鹵球菌的情況下，以生物刺激法之生物整治將難以進行且曠日耗時，因此脫鹵球菌生物加強法(Bioaugmentation)將會是有效的整治方法。
3. 三氯乙烯若降解為毒性更高的氯乙烯，倘若氯乙烯維持時間過長足以影響計畫期程，本團隊將使用生物添加方法將本團隊所開發之高效脫氯菌群，直接提升現地脫氯速率，達到完全脫率，氯乙烯及相關污染物將會密集監控。



第六章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

第六章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

第一年進度

工作項目 \ 年月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
文獻蒐集	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
地下水採集與基本性質分析	■	■											
檢測 TCE 降解與脫氯基因含量	■	■											
篩選現地地下水中脫鹵球菌株	■	■	■										
固定化材質測試		■	■	■				※					
厭氧批次實驗			■	■	■	■	■	■		※			
次世代定序分析批次實驗菌相變化						■	■	■	■	■			
模場整治策略與成本效益評估								■	■	■	■	※	
灌注井及監測井設置以及相關前置作業								■	■	■	■	■	※
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%		



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

預定查核點	期中	1. 完成場址背景調查與脫鹵球菌篩選(已完成, P57) 2. 完成脫鹵球菌菌株固定化材質測試(已完成, P40) 3. 完成厭氧批次實驗，繳交期中報告(已完成, P47)
	期末	1. 完成批次實驗微生物總 DNA 萃取純化(已完成, P47) 2. 完成次世代定序菌相分析(已完成, P49) 3. 提出第二年模場整治策略，繳交期末報告(已完成, P62) 4. 完成場址灌注井與監測井設置(已完成, P58) 5. 場地前整治前次世代定序分析(已完成, P49)

第二年進度

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
文獻蒐集													
營養基質與固定化產 菌菌株灌注													
定量 PCR 監測脫氯 基因變化													
含氯有機物濃度與水 質參數監測													
次世代定序分析模場 整治前後菌相變化													
生物復育技術整治成 本與效益評估													



第六章：研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

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. 現地灌注營養基質與固定化脫鹵球菌株 2. 監測含氯有機物濃度與水質參數變化，繳交期中報告										
	期末		1. 完成整治前後地下水菌相變化分析 2. 完成整治前後脫氯基因 qPCR 變化分析 3. 評估生物復育技術整治成本與效益 4. 繳交期末報告										



第七章：參考文獻

- Abrahamsson K, Ekdahl A, Collen J, Pedersen M (1995) Marine algae-a source of trichloroethylene and perchloroethylene. *Limnol Oceanogr* 40:1321–1326
- Abou-Zeid, D.M. (2004). *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-negative, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 54, 951–954.
- Abumaizer RJ, Kocher W, Smith EH. (1998). Biofiltration of BTEX contaminated air streams using compost activated carbon filter media. *J. Hazard. Mater.* 60: 111–126.
- ATSDR. 2003. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. USA: Department of Health and Human Services
- Aulenta, F., Gossett, J. M., Papini, M. P., Rossetti, S., and Majone, M. (2005). Comparative study of methanol, butyrate, and hydrogen as electron donors for long-term dechlorination of tetrachloroethene in mixed anerobic cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 91(6), 743-753.
- Adrian, L., & Marco-Urrea, E. (2016). Isotopes in geobiochemistry: tracing metabolic pathways in microorganisms of environmental relevance with stable isotopes. *Current opinion in biotechnology*, 41, 19-25.
- Battumur, U., Yoon, Y. M., & Kim, C. H. (2016). Isolation and Characterization of a New Methanobacterium formicicum KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(4), 586–593.
- Berggren, D. R., Marshall, I. P., Azizian, M. F., Spormann, A. M., and Semprini, L. (2013). Effects of sulfate reduction on the bacterial community and kinetic parameters of a dechlorinating culture under chemostat growth conditions. *Environ. Sci. Technol.* 47(4), 1879-1886.
- Bradley, P. M., Chapelle, F. H., and Lovley, D. R. (1998). Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8), 3102-3105.



第七章：參考文獻

- Burstein, D., Amaro, F., Zusman, T., Lifshitz, Z., Cohen, O., Gilbert, J. A., ... Segal, G. (2016). Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nature genetics*, 48(2), 167–175. doi:10.1038/ng.3481
- Calusinska, M., Hamilton, C., Monsieurs, P., Mathy, G., Leys, N., Franck, F., Joris, B., Thonart, P., Hilgsmann, S., and Wilmotte, A. (2015). Genome-wide transcriptional analysis suggests hydrogenase- and nitrogenase-mediated hydrogen production in *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Biotechnol Biofuels* 8, 27.
- Chang, Y. C., Ikeutsu, K., Toyama, T., Choi, D., and Kikuchi, S. (2011). Isolation and characterization of tetrachloroethylene- and cis-1,2-dichloroethylene-dechlorinating propionibacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38(10), 1667-1677.
- CPCB (Central Pollution Control Board). 2007. Ministry of Environment and Forests, Govt of India. Material safety data sheets.
- Chen, J. L., Ortiz, R., Steele, T. W., & Stuckey, D. C. (2014). Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*, 32, 1523-1534.
- Chen, M., Liu, C., Li, X., Huang, W., and Li, F. (2014). Iron Reduction Coupled to Reductive Dechlorination in Red Soil: A Review. *Soil Science* 179, 457–467.
- Collet, C., Gaudard, O., Péringer, P., and Schwitzguébel, J.-P. (2005). Acetate production from lactose by *Clostridium thermolacticum* and hydrogen-scavenging microorganisms in continuous culture—Effect of hydrogen partial pressure. *Journal of Biotechnology* 118, 328–338.
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., & Huffnagle, G. B. (2013). The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert review of respiratory medicine*, 7(3), 245–257. doi:10.1586/ers.13.24
- Dolinova, I., Strojsova, M., Cernik, M., Nemecek, J., Machackova, J., and Sevcu, A. (2017). Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental science and pollution research international* 24(15), 13262-13283.
- Dubey SK. 2005. Microbial ecology of methane emission in rice agroecosystem: a review. *Appl Ecol Environ Res* 3: 1–27.



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

- Duhamel, M., and Edwards, E.A. (2007). Growth and Yields of Dechlorinators, Acetogens, and Methanogens during Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes and Dihaloelimination of 1,2-Dichloroethane. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2303–2310.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
- Fernandes, V. C., Albergaria, J. T., Oliva-Teles, T., Delerue-Matos, C., and De Marco, P. (2009). Dual augmentation for aerobic bioremediation of MTBE and TCE pollution in heavy metal-contaminated soil. *Biodegradation* 20(3), 375-382.
- Fullerton, H., Rogers, R., Freedman, D. L., and Zinder, S. H. (2014). Isolation of an aerobic vinyl chloride oxidizer from anaerobic groundwater. *Biodegradation* 25(6), 893-901.
- Futamata, H., Kaiya, S., Sugawara, M., and Hiraishi, A. (2009). Phylogenetic and Transcriptional Analyses of a Tetrachloroethene-Dechlorinating "Dehalococcoides" Enrichment Culture TUT2264 and Its Reductive-Dehalogenase Genes. *Microbes Environ.* 24(4), 330-337.
- Gupta, R.S., and Gao, B. (2009). Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 59, 285–294.
- Haest, P. J., Springael, D., and Smolders, E. (2010). Dechlorination kinetics of TCE at toxic TCE concentrations: Assessment of different models. *Water Res.* 44(1), 331-339.
- Hakemian, A. S., and Rosenzweig, A. C. (2007). The biochemistry of methane oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 223-241.
- Harkness, M., Fisher, A., Lee, M. D., Mack, E. E., Payne, J. A., Dworatzek, S., Roberts, J., Acheson, C., Herrmann, R., and Possolo, A. (2012). Use of statistical tools to evaluate the reductive dechlorination of high levels of TCE in microcosm studies.



- J. Contam. Hydrol. 131(1-4), 100-118.
- He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., and Löffler, F.E. (2002). Acetate versus Hydrogen as Direct Electron Donors To Stimulate the Microbial Reductive Dechlorination Process at Chloroethene-Contaminated Sites. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3945–3952.
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2005). Isolation and characterization of Dehalococcoides sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* 7(9), 1442-1450.
- Henschler D (1994) Toxicity of chlorinated organic compounds: effects of the introduction of chlorine in organic molecules. *Angew Chem Int Ed* 33:1920–1935
- Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D. E., and Ebersole, R. C. (2002). Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2), 485-495.
- Holscher, T., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., Von Wintzingerode, F., Gorisch, H., Löffler, F. E., and Adrian, L. (2004). Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in Dehalococcoides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9), 5290-5297.
- HSDB. (Hazardous Substances Data Bank). 2002. Trichloroethylene. National Library of Medicine. National Institutes of Health. Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A., and Adrian, L. (2013). Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368(1616), 20120322.
- Hug LA, Maphosa F, Leys D, Löffler FE, Smidt H, Edwards EA, Adrian L (2013) Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Biological sciences* 368:20120322.



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

- Hungate, R.E. (1944). Studies on Cellulose Fermentation: I. The Culture and Physiology of an Anaerobic Cellulose-digesting Bacterium. *J. Bacteriol.* 48, 499–513.
- Imfeld G, Pieper H, Shani N et al (2011) Characterization of groundwater microbial communities, dechlorinating bacteria, and in situ biodegradation of chloroethenes along a vertical gradient. *Water Air Soil Pollut* 221:107–122.
- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J.-L., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., Ohkuma, M., Hamdi, M., Fauque, G., Ollivier, B., et al. (2012). *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 2522–2527.
- Jugder, B. E., Ertan, H., Lee, M., Manefield, M., and Marquis, C. P. (2015). Reductive Dehalogenases Come of Age in Biological Destruction of Organohalides. *Trends Biotechnol.* 33(10), 595-610.
- Kang, Y., Li, Y., Du, Y., Guo, L., Chen, M., Huang, X., Yang, F., Hong, J., and Kong, X. (2019). Konjaku flour reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Int J Obes* 43, 1631–1643.
- Kaster, A. K., Mayer-Blackwell, K., Pasarelli, B., and Spormann, A. M. (2014). Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *The ISME journal* 8(9), 1831-1842.
- Keppler, F., Borchers, R., Pracht, J., Rheinberger, S., and Scholer, H. F. (2002). Natural formation of vinyl chloride in the terrestrial environment. *Environ. Sci. Technol.* 36(11), 2479-2483.
- Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I. N., Saunders, F. M., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2004). Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10), 6347-6351.
- Kranzioch, I., Stoll, C., Holbach, A., Chen, H., Wang, L., Zheng, B., Norra, S., Bi, Y., Schramm, K. W., and Tiehm, A. (2013). Dechlorination and organohalide-respiring bacteria dynamics in sediment samples of the Yangtze Three Gorges Reservoir. *Environmental science and pollution research international* 20(10), 7046-7056.



第七章：參考文獻

- Kruse, T., van de Pas, B.A., Atteia, A., Krab, K., Hagen, W.R., Goodwin, L., Stams, A.J. (2015). Genomic, Proteomic, and Biochemical Analysis of the Organohalide Respiratory Pathway in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Journal of bacteriology*, 197(5), 893-904.
- Kruse, S., Türkowsky, D., Birkigt, J., Matturro, B., Franke, S., Jehmlich, N., Bergen, M. von, Westermann, M., Rossetti, S., Nijenhuis, I., et al. (2019). Interspecies metabolite transfer in a co-culture of *Dehalococcoides* and *Sulfurospirillum* leads to rapid and complete tetrachloroethene dechlorination. *BioRxiv* 526210.
- Kunze, C., Bommer, M., Hagen, W.R., Uksa, M., Dobbek, H., Schubert, T., and Diekert, G. (2017). Cobamide-mediated enzymatic reductive dehalogenation via long-range electron transfer. *Nature Communications* 8, 15858.
- 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. *Environ. Microbiol.* 15(8), 2293-2305.
- Lee, I. S., Bae, J. H., & McCarty, P. L. (2007). Comparison between acetate and hydrogen as electron donors and implications for the reductive dehalogenation of PCE and TCE. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94, 76-85.
- Lo, K.-H., Lu, C.-W., Lin, W.-H., Chien, C.-C., Chen, S.-C., and Kao, C.-M. (2020). Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized *Clostridium butyricum* in silica gel. *Chemosphere* 238, 124596.
- Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Muller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H., and Spormann, A. M. (2013). *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis nov.*, order *Dehalococcoidales ord. nov.* and family *Dehalococcoidaceae fam. nov.*, within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(Pt 2), 625-635.
- Löffler, F.E., Sanford, R.A., and Ritalahti, K.M. (2005). Enrichment, Cultivation, and Detection of Reductively Dechlorinating Bacteria. In *Methods in Enzymology*,



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

(Elsevier), pp. 77–111.

- Madsen, T., and Aamand, J. (1991). Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9), 2453-2458.
- Magnuson, J. K., Stern, R. V., Gossett, J. M., Zinder, S. H., and Burris, D. R. (1998). Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4), 1270-1275.
- Major, D. W., McMaster, M. L., Cox, E. E., Edwards, E. A., Dworatzek, S. M., Hendrickson, E. R., Starr, M. G., Payne, J. A., and Buonamici, L. W. (2002). Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* 36(23), 5106-5116.
- Mattes, T. E., Alexander, A. K., and Coleman, N. V. (2010). Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(4), 445-475.
- Maymo-Gatell, X., Anguish, T., and Zinder, S. H. (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by "Dehalococcoides ethenogenes" 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7), 3108-3113.
- McMurdie, P. J., Behrens, S. F., Muller, J. A., Goke, J., Ritalahti, K. M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S., Löffler, F. E., et al. (2009). Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*. *PLoS Genet.* 5(11), e1000714.
- Men, Y., Seth, E.C., Yi, S., Allen, R.H., Taga, M.E., and Alvarez-Cohen, L. (2014). Sustainable Growth of *Dehalococcoides mccartyi* 195 by Corrinoid Salvaging and Remodeling in Defined Lactate-Fermenting Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2133–2141.
- Mohn, W. W., and Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological reviews* 56(3), 482-507.
- Moller, B., OBmer, R., Howard, B.H., Gottschalk, G., and Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* 139, 388–396.



第七章：參考文獻

- Munder, M., Vogt, J.R.A., Vogler, B., and Renz, P. (1992). Biosynthesis of vitamin B12 in anaerobic bacteria, Experiments with *Eubacterium limosum* on the origin of the amide groups of the corrin ring and of N-3 of the 5,6-dimethylbenzimidazole part. *European Journal of Biochemistry* 204, 679–683.
- Neumann, A., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1998). Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180(16), 4140–4145.
- Nijenhuis, I., and Kuntze, K. (2016). Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides-state of the art and remediation strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 33–38.
- Ohlen, K., Chang, Y. K., Hegemann, W., Yin, C. R., and Lee, S. T. (2005). Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidized-bed reactor. *Chemosphere* 58(3), 373–377.
- Pant, P., and Pant, S. (2010). A review: advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *J. Environ. Sci. (China)* 22(1), 116–126.
- Paraiso, I.L., Plagmann, L.S., Yang, L., Zielke, R., Gombart, A.F., Maier, C.S., Sikora, A.E., Blakemore, P.R., and Stevens, J.F. (2019). Reductive Metabolism of Xanthohumol and 8-Prenylnaringenin by the Intestinal Bacterium *Eubacterium ramulus*. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, 1800923.
- Parthasarathy, A., Stich, T. A., Lohner, S. T., Lesnefsky, A., Britt, R. D., and Spormann, A. M. (2015). Biochemical and EPR-spectroscopic investigation into heterologously expressed vinyl chloride reductive dehalogenase (VcrA) from *Dehalococcoides mccartyi* strain VS. *J. Am. Chem. Soc.* 137(10), 3525–3532.
- Pantazidou M, Panagiotakis I, Mamais D, Zikidi V (2012) Chloroethene in the presence of different sulfate concentrations. *Ground water Monit Remediat* 32:106–119
- Poehlein, A., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2013). First Insights into the Genome of the Gram-Negative, Endospore-Forming Organism *Sporomusa ovata* Strain H1 DSM 2662. *Genome Announcements* 1.
- Plugge, C.M. (2005). Anoxic Media Design, Preparation, and Considerations. In



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

Methods in Enzymology, (Elsevier), pp. 3–16.

- Puentes Jácome, L.A., Wang, P.-H., Molenda, O., Li, Y.X. (Jine-J., Islam, M.A., and Edwards, E.A. (2019). Sustained dechlorination of vinyl chloride to ethene in Dehalococcoides-enriched cultures grown without addition of exogenous vitamins and at low pH. Environ. Sci. Technol.
- Russell HH, Mathews JE, Sewell GW. 1992. Groundwater issue: TCE removal from contaminated soil and groundwater. In: Research Report No.EPA/540/S-92/002 of USEPA. USEPA: Washington DC, USA
- Robinson, C., Barry, D. A., McCarty, P. L., Gerhard, J. I., and Kouznetsova, I. (2009). pH control for enhanced reductive bioremediation of chlorinated solvent source zones. Sci. Total Environ. 407(16), 4560-4573. Shukla, A. K., Upadhyay, S. N., and Dubey, S. K. (2014). Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. Crit. Rev. Biotechnol. 34(2), 101-114.
- Saiyari, D.M., Chuang, H.-P., Senoro, D.B., Lin, T.-F., Whang, L.-M., Chiu, Y.-T., and Chen, Y.-H. (2018). A review in the current developments of genus Dehalococcoides , its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. Sustainable Environment Research 28, 149–157.
- Shibasaki-Kitagawa, N., Iizuka, Y., and Yonemoto, T. (2000). Intraparticle cell growth and cell leakage in cultures of Nicotiana tabacum cells immobilized in calcium alginate gel beads. J Chem Technol Biotechnol 7.
- Speers, A.M., Cologgi, D.L., and Reguera, G. (2009). Anaerobic Cell Culture. Current Protocols in Microbiology 12.
- Stupperich, E., Eisinger, H.J., and Kräutler, B. (1988). Diversity of corrinoids in acetogenic bacteria. P-cresolylcobamide from Sporomusa ovata, 5-methoxy-6-methylbenzimidazolylcobamide from Clostridium formicoaceticum and vitamin B12 from Acetobacterium woodii. Eur J Biochem 172, 459–464.
- Suh, M.-J., Kuntumalla, S., Yu, Y., and Pieper, R. (2014). Proteomes of pathogenic Escherichia coli/Shigella group surveyed in their host environments. Expert Review of Proteomics 11, 593–609.
- Tan, H., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., and Chen, W. (2018). Isolation of Low-Abundant



第七章：參考文獻

- Bacteroidales in the Human Intestine and the Analysis of Their Differential Utilization Based on Plant-Derived Polysaccharides. *Front. Microbiol.* 9, 1319.
- Tsai, T.t., Liu, j.k., Chang, YM, Chen, K.F., Kao, C.M. (2014) Application of polycolloid-releasing substrate to remediate trichloroethylene-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *J Hazard Mater* 68:92-101.
- Tang, S., Chan, W. W., Fletcher, K. E., Seifert, J., Liang, X., Löffler, F. E., Edwards, E. A., and Adrian, L. (2013). Functional characterization of reductive dehalogenases by using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(3), 974-981.
- Tiehm, A., and Schmidt, K. R. (2011). Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes--aspects of field application. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22(3), 415-421.
- Uchino, Y., Miura, T., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Ito, M., Takahata, Y., Suzuki, K., and Fujita, N. (2015). Complete genome sequencing of *Dehalococcoides* sp. strain UCH007 using a differential reads picking method. *Standards in genomic sciences* 10, 102.
- US Environmental Protection Agency. 2001. National Air Toxics Program: The integrated urban strategy: Report to Congress
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1997. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. In: Directive No.9200.4-17 P of office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, USA: USEPA.
- Wang, S., Qiu, L., Liu, X., Xu, G., Siegert, M., Lu, Q., Juneau, P., Yu, L., Liang, D., He, Z., et al. (2018). Electron transport chains in organohalide-respiring bacteria and bioremediation implications. *Biotechnology Advances* 36, 1194–1206.
- Wagner, A.O., Markt, R., Mutschlechner, M., Lackner, N., Prem, E.M., Praeg, N., and Illmer, P. (2019). Medium Preparation for the Cultivation of Microorganisms under Strictly Anaerobic/Anoxic Conditions. *JoVE* 60155.
- Wilson, J. T., and Wilson, B. H. (1985). Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(1), 242-243.



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

- Wittlingerova, Z., Machackova, J., Petruzalkova, A., Trapp, S., Vlk, K., and Zima, J. (2013). One-year measurements of chloroethenes in tree cores and groundwater at the SAP Mimon Site, Northern Bohemia. *Environmental science and pollution research international* 20(2), 834-847.
- Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Leung, K., Lau, S.K.P., Woo, G.K.S., Wong, A.C.Y., Wong, M.K.M., and Yuen, K. (2005). *Anaerospora hongkongensis* Gen. Nov. Sp. Nov., a Novel Genus and Species with Ribosomal DNA Operon Heterogeneity Isolated from an Intravenous Drug Abuser with Pseudobacteremia. *Microbiology and Immunology* 49, 31–39.
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S. T., Bai, F., & Tang, I. (2012). High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnology and bioengineering*, 109(11), 2746-2756.
- Yan, J., Bi, M., Bourdon, A.K., Farmer, A.T., Wang, P.-H., Molenda, O., Quaile, A.T., Jiang, N., Yang, Y., Yin, Y., et al. (2018). Purinyl-cobamide is a native prosthetic group of reductive dehalogenases. *Nature Chemical Biology* 14, 8–14.
- Yan, J., Im, J., Yang, Y., and Löffler, F.E. (2013). Guided cobalamin biosynthesis supports *Dehalococcoides mccartyi* reductive dechlorination activity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 368, 20120320.
- Yan, J., Şimşir, B., Farmer, A.T., Bi, M., Yang, Y., Campagna, S.R., and Löffler, F.E. (2016). The corrinoid cofactor of reductive dehalogenases affects dechlorination rates and extents in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*. *The ISME Journal* 10, 1092–1101.
- Yang, Y., and McCarty, P. L. (2002). Comparison between donor substrates for biologically enhanced tetrachloroethene DNAPL dissolution. *Environ. Sci. Technol.* 36(15), 3400-3404.
- Yang, Y., Higgins, S. A., Yan, J., Şimşir, B., Chourey, K., Iyer, R., & Löffler, F. E. (2017). Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes. *The ISME journal*, 11(12), 2767–2780. doi:10.1038/ismej.2017.127
- Yi Yang, Natalie L. Cápiro, Jun Yan, Tyler F. Marcet, Kurt D. Pennell, Frank E. Löffler, Resilience and recovery of *Dehalococcoides mccartyi* following low pH exposure,



第七章：參考文獻

- FEMS Microbiology Ecology, Volume 93, Issue 12, December 2017, fix130,
- Yohda, M., Yagi, O., Takechi, A., Kitajima, M., Matsuda, H., Miyamura, N., Aizawa, T., Nakajima, M., Sunairi, M., Daiba, A., et al. (2015). Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. *J. Biosci. Bioeng.* 120(1), 69-77.
- Yuan, S., Mao, X., and Alshawabkeh, A. N. (2012). Efficient degradation of TCE in groundwater using Pd and electro-generated H₂ and O₂: a shift in pathway from hydrodechlorination to oxidation in the presence of ferrous ions. *Environ. Sci. Technol.* 46(6), 3398-3405.
- Zhao, S., and He, J. (2018). Reductive Dechlorination of High Concentrations of Chloroethenes by a *Dehalococcoides mccartyi* Strain 11 G. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Zhou, Y.-Z., Yang, J., Wang, X.-L., Pan, Y.-Q., Li, H., Zhou, D., Liu, Y.-D., Wang, P., Gu, J.-D., Lu, Q., et al. (2014). Bio-beads with immobilized anaerobic bacteria, zero-valent iron, and active carbon for the removal of trichloroethane from groundwater. *Environ Sci Pollut Res* 21, 11500–11509.
- Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Akkermans, A.D.L., and de Vos, W.M. (2003). *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 211–215.



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

附件一、 場試驗專案工作污染防治及場址衛生安全措施



污染防治及場址衛生安全措施

本模場試驗計畫之現地安全衛生管理除遵守試驗場址規範之安全衛生工作守則外，另針對本執行計畫之相關工作內容，訂定安全衛生管理及緊急應變計畫說明如下。

一、安全衛生管理架構及各級權責

本計畫將擬定現場工作方法及安全衛生工作守則，現場負責人推動各項工作之執行，依現場執行狀況隨時回報計畫主持人，以決定是否需修正工作內容。此外，現場指派一安全負責人專責安全衛生管理工作，負責作業環境安全衛生之監督與檢討，各級負責人的職掌如表 1 所述。

表 1 各級負責人安全衛生權責表

計畫主持人	● 計畫之執行與協調。 ● 研擬及修改安全與衛生計畫。 ● 管理與運作。 ● 專案之組成與運作。 ● 安全與衛生計畫之製定與執行。 ● 與場址單位管理人員之聯繫。
現場負責人	● 現場工作之運作執行。 ● 協助督導勞工安全衛生工作。 ● 現場管制。 ● 運作紀錄。 ● 代理計畫主持人。
安全負責人	● 安全衛生計畫之現場執行，若現場人員之行為逾越本規範，應予以制止且記錄，並向計畫主持人報告。 ● 安全防護設備之檢視。 ● 安全防護設備之維修與保存。 ● 人員是否適於現場工作之安全考量。 ● 緊急應變聯絡者。 ● 現場緊急急救之協調與執行。 ● 工地管制之區劃。 ● 意外紀錄之撰寫與保存。
現場工作	● 注意自身與隊員之健康衛生與安全。 ● 遵守現場衛生與安全計畫之規定。 ● 服從安全衛生管理員之糾正。 ● 依工作計畫書之規定執行其所負責之工作，切勿單獨工作。 ● 若有安全疑慮應向現場經理報告或與安全衛生組討論。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

人員	● 若遇意外發生，立即向現場負責人或安全負責人報告。
----	----------------------------



二、現場安衛作業與程序

根據本計畫內容分析於調查現場可能面臨之危害種類包括：A.物理性危害(如能量傷害：割傷、觸電等、爆炸、火災、噪音)；B.化學性傷害(如揮發性有機物、或其他現場運作化學物質、貯存油料等：外洩、噴濺)；C.人因工程傷害(因作業方式或操作不當：肌肉拉傷、挫傷)及 D.其他作業傷害等 4 種。依據現場處理能力分成 3 級應變措施，並依上述 4 種危害依程度分級擬定對應應變措施。

1. 個人安全防護設備

現場工作人員應依現場負責人或安全衛生負責人建議穿著適當之防護裝備，本整治計畫之個人基本安全防護裝備包括安全帽、安全鞋，安全手套、護目鏡及活性炭口罩則視需要穿戴。並於現場準備半面式過濾防毒面具、氧氣瓶、簡易消防設備（小型乾粉滅火器）、急救箱等，數量與穿用時機如表 2。

2. 個人現場安全防護訓練

現場安全衛生負責人必須對現場工作人員施予防護訓練，使其瞭解正確之個人防護裝備使用方法與作業安全準則。如有須要，本計畫在實施前，並將針對主要污染物依「危險物及有害物質通識規則」，製作質物安全資料表，並標示張貼於作業人員明顯可視之處。

表 2 個人防護設備數量與穿用時機

項目	單位	穿用時機
D 級防護設備(安全帽、棉手套、安全鞋、工作服、活性碳口罩)	套	工地內必備
C 級防護設備(安全帽、連身防護衣、矽膠手套、安全鞋、護目鏡、N95 口罩)	套	有害氣體濃度>100 ppmV
半面式過濾防毒面具	組	有害氣體濃度>500 ppmV
氧氣瓶	組	有害氣體濃度>1000ppmV

三、作業區管制

除一般性勞工作業可能發生意外之防止外，於現場操作時，另應考量預防作業人員受來自作業環境中主要污染物之暴露與接觸危害，原則上至少需達符合國內有關作業場所之勞工安全衛生之法令規定。為維護計畫執行期間之人員安全，將配合工廠內之安全管制措施，例如下述：

1. 凡進入工地工作，所有人員均應配戴安全帽及其他必要之防護具。
2. 每日現場作業執行前應先進行作業安全宣導與當日工作重點提醒。
3. 工作開始前應先執行工作場所與使用設備安全點檢。
4. 每日工作結束後，將工區之施工廢棄物及垃圾清運出場，確保場地整潔。
5. 工廠區內嚴禁煙火，人員不得吸煙、飲食。



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

6.自備滅火器等設備，並了解工廠內消防安全設施位置。

7.於作業區四周設置警示錐或黃色塑膠警示帶。

8.若正進行作業時，接受調查場址之工作人員應管制於警示帶外圍，如有非工作人員或本計畫業務單位進入作業區時，應協調暫時停工並告知。



四、 危害與災害預防

任何工地安全衛生事故之經驗均顯示事前之預防較事後之處理更為重要。本計畫執行期間有關危害與災害預防措施之內容包括以下各點：

- 1.防災設施器材之事前準備，並須留意定期檢查與維護，確保堪用。
- 2.現場操作人員之各項作業制定標準作業程序，避免不當操作造成意外。
- 3.各種應用作業設備定期進行安全檢查，防止支撐鬆動及漏電、短路等意外狀況。
- 4.制定防災措施與執执行程序，並製作書面資料要求作業人員熟悉。
- 5.建立救護與通報程序。
- 6.定期進行防災演練及防災檢查工作。

五、 緊急應變措施

如發生危害事故，但能於現場自行應變進行處理改善者為 1 級，如割傷、噪音、挫傷、中暑等，由現場安全負責人下令暫停作業，並通報轄區環安單位及本計畫主持人，並給予適當之醫療協助；發生現場不能自行處理需由轄區廠商協助者為 2 級，如觸電、遭化學品噴濺等，由現場安全負責人下令停止作業及人員退至安全區域，並通報工廠環安單位及本計畫主持人，並由工廠環安單位給予協助(如回路斷電、管路關閉及或化學品辨視)，並給予適當之後送醫療(毒化災害急救責任醫院優先)；現場發生危害事故其程度需工廠環安單位及專業救災單位進行應變處理者為 3 級，如爆炸、火災、化學品外洩等，由現場安全負責人下令停止作業及人員退至管制區外，並通報工廠環安單位及本計畫主持人，並給予適當之後送醫療(毒化災害急救責任醫院優先)，規劃緊急應變措施，具體內容說明如下：



開發高效脫氯生物膠體及優化生物包埋整治工法：現地模場試驗

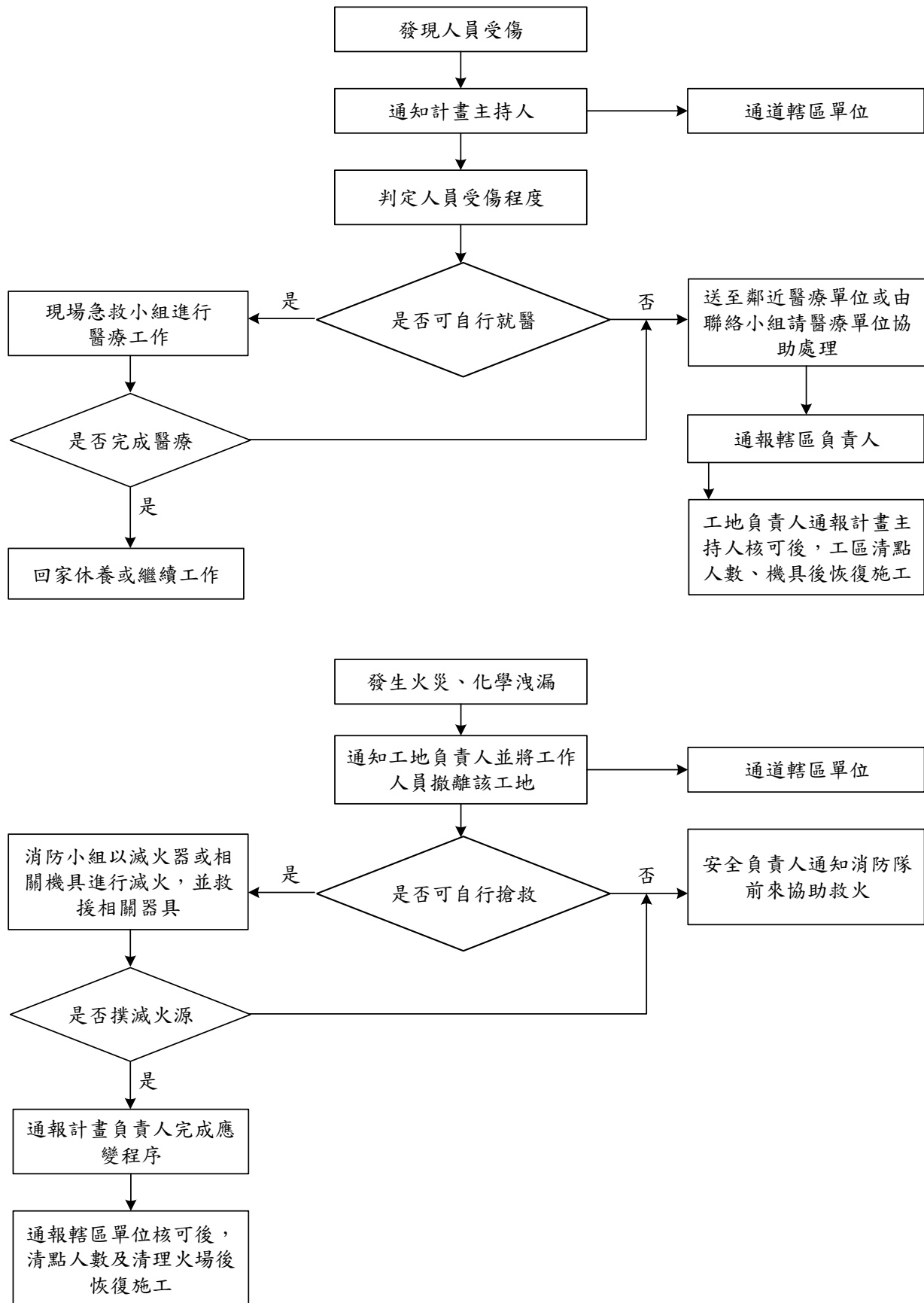


圖 1 施工人員受傷應變程序圖 2 工區發生火災、化學洩漏應變程序



六、 訓練與宣導

緊急事件隨時可能發生，因此應變措施應納入平時教育訓練課程中，且每季定時舉行一次實地演練，以使所有人員均能熟練各程序。在工作現場如發生緊急事故時，應依照本節所述之標準程序處理之。安全衛生負責人應在現場施作區提供一份緊急通報表，並且對所有之工作人員提供緊急應變課程使其瞭解應變程序。可能發生之緊急狀況包括：

- 1.作業人員發生意外或高濃度污染物之感染，使其健康遭受威脅應變。
- 2.其它意外事件如火災、化學洩漏事件等逃生與應變。
- 3.不慎打到地下管線、電纜處置流程。
- 4.作業場所應注意事項與潛在危害。
- 5.人員受傷的應變與急救處理。
- 6.緊急事件處置與連絡方式。



附件二、 場地補充資料



1.1 場址基本資料

1.1.1 場址沿革

本場址之前緣為原公告為土壤及地下水污染控制場址之鎮安段 317 等 9 筆地號，因其污染來源不明確，台北高等行政法院撤銷原地下水處分，環保局遂將此 9 筆地號修正為地下水受污染使用限制區，並執行污染來源鑑識調查計畫，依調查結果認定台鈴平鎮廠內鎮安段 323（部分）地號範圍內之地下水污染為獨立之污染源，因而建立之列管場址，目前尚非屬公告場址，相關之場址大事記整理如表 1.1-2 所示，簡要說明於下。

表 1.1-2 場址大事記彙整表 (1/2)

項次	時間	執行單位	說明
1	99 年 11 月	環保署	行政院環境保護署執行「運作中工廠土壤及地下水含氣有機溶劑污染潛勢調查及查證計畫（第 2 期）」，認定台鈴平鎮廠土壤重金屬鉛 3,040 mg/kg 及地下水三氯乙烯 2.22 mg/L 污染濃度超過管制標準。
2	100 年 4 月	環保局	桃園縣環保局來函要求台鈴平鎮廠提出土壤及地下水污染之應變必要措施。
3	100 年 5 月	台鈴公司	台鈴公司提送「台鈴工業股份有限公司平鎮廠土壤及地下水緊急應變監測計畫」審查通過，立即執行污染補充調查及緊急應變必要措施。
4	100 年 6 月	環保局	桃園縣環保局來函公告台鈴平鎮廠鎮安段 317、318、319、320、321、322、323、324、325 等 9 筆地號為土壤、地下水污染控制場址及污染管制區。另來函要求台鈴公司提送「污染控制計畫」供桃園縣環保局核定。
5	100 年 9 月	台鈴公司	台鈴公司提送「土壤及地下水控制計畫書」呈桃園縣環保局審查。
6	100 年 9 月	環保局	桃園縣環保局檢還「土壤及地下水控制計畫書」，將變更公告場址類別，暫不審理該計畫，俟環保署公告為整治場址後依相關規定辦理。
7	100 年 11 月	環保署	環保署召開「台鈴工業控制場址研商會」，依其協商結論協助辦理後續場外污染來源調查。
8	101 年 1 月	環保局	桃園縣環保局來函要求台鈴公司提送「健康風險評估」報告，並應同時採取相關應變必要措施。
9	101 年 3 月	台鈴公司	台鈴公司提送「土壤及地下水應變必要措施計畫」供桃園縣環保局審查。
10	101 年 10 月	環保局	桃園縣環保局來函表示台鈴公司所提「土壤及地下水應變必要措施計畫」（修正三版）同意備查，並要求台鈴公司每季 15 日前提送工作執行進度。
11	102 年 1 月	環保局	桃園縣環保局來表示台鈴公司所提「土壤及地下水健康風險評估計畫」（修正四版）同意備查，並於文到 6 個月



項次	時間	執行單位	說明
			檢送「土壤及地下水污染控制計畫」。
12	102 年 5 月	台鈴公司	提送「台鈴工業股份有限公司平鎮廠土壤及地下水污染控制計畫書」予環保局審查

表 1.1-2 場址大事記彙整表 (2/2)

項次	時間	執行單位	說明
13	103 年 1 月	行政法院	台北高等行政法院撤銷原地下水處分。
14	103 年 3 月	環保局	核訂「台鈴工業股份有限公司平鎮廠土壤及地下水污染控制計畫書(定稿本)」
15	104 年 7 月	環保局	公告修正台鈴工業股份有限公司平鎮廠所在平鎮區鎮安段 323 地號土地為土壤污染控制場址
16	104 年 7 月	環保局	鎮安段 317、318、319、320、321、322、323、324、325 地號公告修正為地下水受污染使用限制地區及限制事項
17	105 年 2 月	台鈴公司	台鈴公司提送「土壤污染控制計畫完工報告書(修正二版)」供桃園縣環保局審查。
18	105 年 8 月	環保局	土壤污染控制場址解除列管。
19	106 年 3 月	環保局	桃園市環保局來函平鎮區鎮安段 323 地號(部分區域)地下水三氯乙烯項目檢出濃度為 0.0787 毫克/公升,將依土污法第 12 條第 2 項規定公告為控制場址,通知陳述意見。
20	106 年 5 月	台鈴公司	台鈴公司函請願意負責本場址後續改善工作之執行,同時配合環保局相關調查及勘查工作,陳請准予依土污法第 7 條第 5 項進行應變必要措施。
21	106 年 7 月	環保局	桃園市環保局函覆請立即採取應變必要措施並於 107 年 7 月 31 日前完成污染改善,並要求台鈴公司每季 15 日前提送工作執行進度,提供環保局審查。。
22	106 年 8 月	台鈴公司	台鈴公司提送「台鈴工業股份有限公司(平鎮廠)桃園市平鎮區鎮安段 323(部分)地號地下水污染場址應變必要措施計畫之執行計畫書」,供桃園市環保局審查。
23	106 年 9 月	環保局	桃園市環保局函覆同意台鈴公司提送台鈴工業股份有限公司(平鎮廠)桃園市平鎮區鎮安段 323(部分)地號地下水污染場址應變必要措施計畫(修正一版),予以備查。
24	107 年 7 月	台鈴公司	台鈴公司申請「台鈴工業股份有限公司(平鎮廠)桃園市平鎮區鎮安段 323(部分)地號地下水污染場址應變必要措施計畫」改善期限展延至 108 年 1 月 31 日前完成。
25	107 年 8 月	環保局	桃園市環保局函覆同意「台鈴工業股份有限公司(平鎮廠)桃園市平鎮區鎮安段 323(部分)地號地下水污染場址應變必要措施計畫」污染改善後因部分地下水污染濃度值有回升等因素,展延至 108 年 1 月 31 日前完成。



項次	時間	執行單位	說明
26	108 年 1 月	台鈴公司	台鈴公司提送「台鈴工業股份有限公司（平鎮廠）桃園市平鎮區鎮安段 323（部分）地號地下水場址應變必要措施計畫」改善完成報告，予環保局審查
27	108 年 6 月	環保局	桃園市環保局來函平鎮區鎮安段 323（部分）地號地下水污染一案，經環保局驗證結果，地下水污染濃度已低於地下水污染管制標準，故不公告為地下水污染控制場址。



1.1.2 場址公告資料

行政院環境保護署（以下簡稱環保署）鑒於工廠使用含氯有機溶劑時易造成土壤及地下水污染，於民國 99 年執行之「運作中工廠土壤及地下水含氯有機溶劑污染潛勢調查及查證計畫（第 2 期）」，認定台鈴工業股份有限公司（以下簡稱台鈴公司）於桃園縣平鎮市延平路三段 411 巷 75 號（以下簡稱台鈴平鎮廠）地下水三氯乙烯（TCE）已超過第二類地下水污染管制標準之管制值 0.05 mg/L。為釐清污染來源，桃園市政府環境保護局（以下簡稱環保局）於 103 年度執行「103 年度桃園縣地下水含氯場址污染來源鑑識及公告範圍界定計畫」（以下簡稱鑑識計畫），調查結果指出，台鈴平鎮廠內 1 口監測井 MW-11 的地下水 TCE 濃度超標，北邊廠外另有兩口 TCE 超標井（MW-EX-01、MW-EX-02），顯示有兩個污染團存在，經 TCE 之 $\delta^{13}\text{C}$ 比對，南、北兩團 TCE 屬不同來源，而下游 MW11 所屬之 TCE 污染團並非受上游北邊 TCE 污染團所影響。

依據鑑識計畫結果，位於桃園市平鎮區鎮安段 323 地號之監測井 MW-11，地下水三氯乙烯項目檢出濃度為 0.0787 mg/L，超過第二類地下水污染管制標準 0.05 mg/L，桃園市政府將依土壤及地下水污染整治法（以下簡稱土污法）第 12 條第 2 項規定，公告「桃園市平鎮區鎮安段 323 地號（部分區域）」土地為地下水污染控制場址（以下簡稱本場址），範圍如圖 1.1-1 所標示，劃定區域面積為 2,372 平方公尺，並依行政程序法第 102 條於作成土污法行政處分前發函通知台鈴公司陳述意見（106 年 3 月 27 日以府環水字第 10600062375 號函）。

目前本場址之列管狀態為調查中場址，尚未確認污染行為人。雖然本場址地下水污染成因尚需釐清，惟為避免本場址之地下水污染而影響人體健康，台鈴公司願意負責本場址後續改善工作之執行，同時配合環保局相關調查及勘查工作，於 106 年 5 月 5 日以台鈴字第 10605008 號函請環保局同意依土污法第 7 條第 5 項規定辦理（以下簡稱 7 條 5），並給予 12 個月之改善限期，台鈴公司將依污染特性及水文地質條件，選擇積極有效之改善工法，提出應變必要措施計畫，經環保局同意後執行，於期限內達到本場址之地下水污染物濃度低於第二類管制標準，期能得以不公告為控制場址。

環保局於 106 年 7 月 31 日府環水字第 1060179670 號函覆，命台鈴公司依土污法第 7 條第 5 項及第 15 條第 1 項第 7 款規定移除或清理污染物，以減輕污染影響或避免污染擴大，並請台鈴公司應於文到 20 日內提送緊急應變必要措施計



畫報府審查，核定後據以實施。台鈴公司遂委託瑞昶科技股份有限公司（以下簡稱瑞昶公司）進行污染補充調查以及撰寫緊急應變必要措施計畫，提送環保局審查。場址位置如圖 1.1-1 所示，相關公文請見附件附件一。

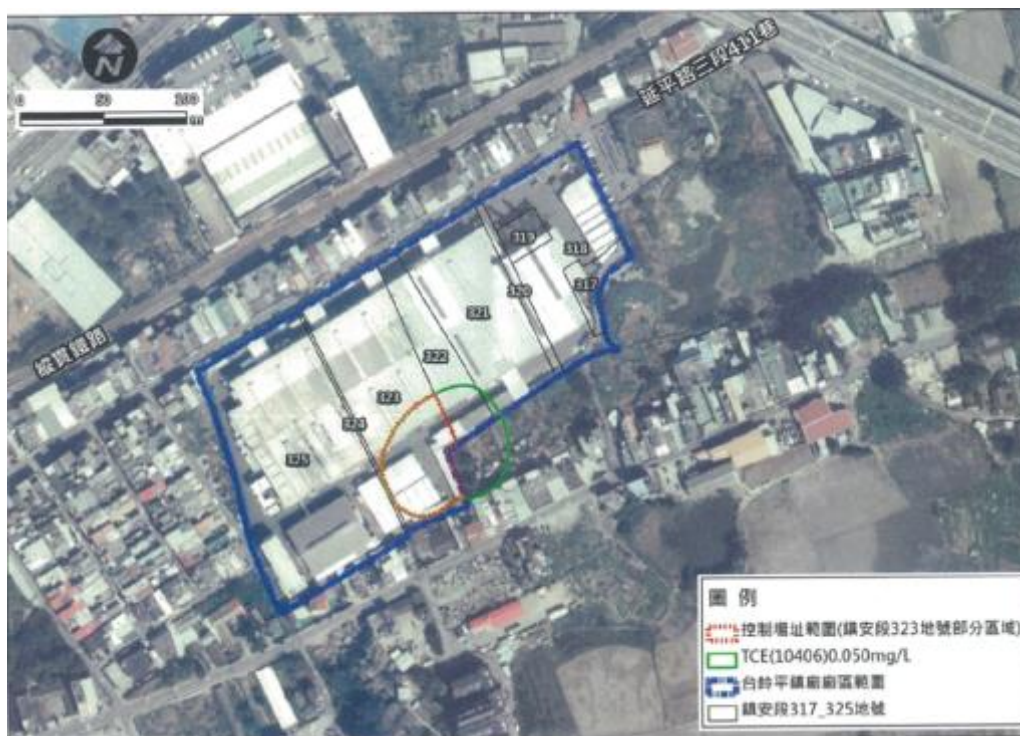
1.2 場址特徵及曾實施調查結果

1.2.1 環保署調查結果

環保署於 99 年執行「運作中工廠土壤及地下水含氯有機溶劑污染潛勢調查及查證計畫（第 2 期）」（以下簡稱 99 年環保署計畫），於本場址設置 3 口監測井（MW9920-01、MW9920-03 及 MW9920-05）進行揮發性有機物採樣檢測作業，採樣監測井位置如圖 1.2-1 所示，其中 MW9920-01 及 MW9920-05 等 2 口檢出三氯乙烯超過地下水污染管制標準（如表 1.2-1 所示），MW9920-05 監測井即位於本場址範圍內，當時所測得之濃度為 0.714 mg/L。而另一超標井 MW9920-01 位於台鈴平鎮廠北測邊界，三氯乙烯濃度為 2.22 mg/L，此兩監測井亦檢出三氯乙烯之還原脫氯途徑之降解產物順-1,2-二氯乙烯，濃度為 0.103~0.139 mg/L。

99 年環保署計畫，佈置 5 條地電阻法測線探測土壤及地下水污染潛勢，其中 L9920-05 測線為位於本場址內之測線，如圖 1.2-2 所示。由於廠區地下管線與地上（下）構造物分佈廣，存在干擾大。地電阻剖面測線均同時採用兩種電極排列分析：四極法、梯度法。

1. 汽柴油儲存區沿線（L9920-01）：圖 1.2-3 之 L9920-01，四極法與梯度法之探測剖面均顯示距測線起點處（東側為起點）24~27 m 處下方為異常高電阻率區域，顯示超過上千 Ohm-m，經由透地雷達法探測推測應屬金屬類之管線所呈現之異常繞射，經由研判該處為汽油輸油管，且油管實際位於測線起點 24~25 m，該處存在異於周遭之高電阻率，呈現向下延伸之相對高電阻率區域，深度約自地表下 4 m 至地下約 15 m 處。
2. 重油儲存區沿線（L9920-02）：圖 1.2-3 之 L9920-02 四極法與梯度法之探測剖面均顯示距測線起點處（西側為起點）18~20 m 處下方為異常高電阻率區域，深度約在地表下 1.5~3 m 內，附近水位初步研判約在地下 4~5 m，推測為淺層較堅硬紅土或粗礫造成。



資料來源：桃園市政府 106 年 3 月 27 日府環水字第 1060062375 號函。

圖1.1-1 桃園市平鎮區鎮安段323地號（部分區域）違反土污法之範圍圖

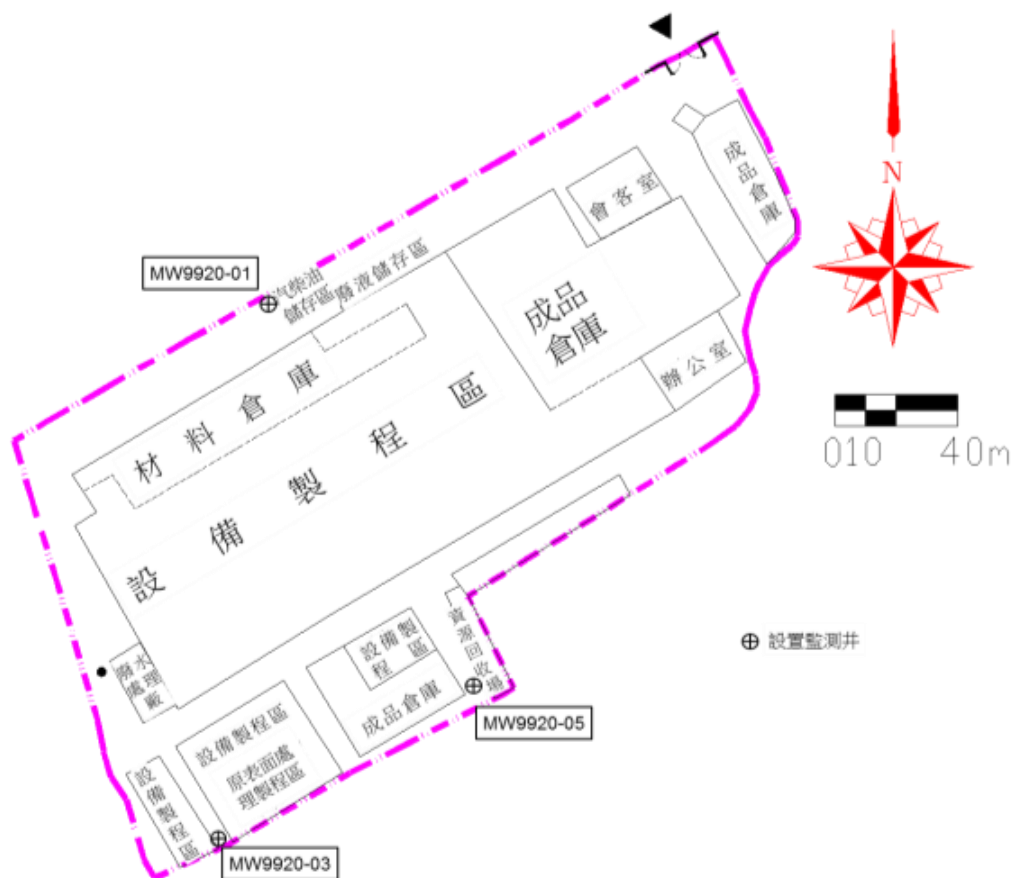


圖 1.2-1 環保署設置監測井位置圖

表 1.2-1 監測井地下水質分析結果表

採樣點位				MW9920-01 ¹ (微洗井)	MW9920-03 (微洗井)	MW9920-05 ¹ (微洗井)	地下水第二類 污染管制標準
採樣座標 ⁵				E : 269,970.749 N : 2,757,991.48	E : 269,951.223 N : 2,757,818.403	E : 270,031.824 N : 2,757,865.015	
檢驗項目	檢驗方法	MDL	單位	PGB015401	PGB015402	PGB015403	
	NIEA W424.52A	-	-	6.0	6.3	5.5	—
水溫	NIEA W217.51A	-	°C	24.8	22.8	23.0	—
導電度	NIEA W203.51B	-	µmho/cm	337	390	304	—
水位	NIEA W103.54B	-	m	4.110	6.332	6.125	—
溶氧量	NIEA W103.54B	-	mg/L	0.6	1.8	2.9	—
氧化還原電位	NIEA W103.54B	-	mv	12.2	141	227	—
1,1,2-三氯乙烷	NIEA W785.54B	0.00074	mg/L	<0.0100	ND ⁴	<0.0100	0.05
1,1-二氯乙烷	NIEA W785.54B	0.00067	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	8.5
1,2-二氯乙烷	NIEA W785.54B	0.00065	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.05
氯甲烷	NIEA W785.54B	0.00060	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.30
二氯甲烷	NIEA W785.54B	0.00085	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.05
氯仿	NIEA W785.54B	0.00083	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	1.0
1,1-二氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00062	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.07
順-1,2-二氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00066	mg/L	0.139	ND	0.103	0.7
反-1,2-二氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00063	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	1.0
氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00069	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.02
三氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00061	mg/L	<u>2.22</u> ³	0.00101	<u>0.714</u>	0.05
四氯乙烯	NIEA W785.54B	0.00075	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.05
苯	NIEA W785.54B	0.00061	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.05
乙苯	NIEA W785.54B	0.00059	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	7.0
甲苯	NIEA W785.54B	0.00068	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	10
二甲苯 ²	NIEA W785.54B	0.00164	mg/L	<0.0300	ND	<0.0300	100
1,4-二氯苯	NIEA W785.54B	0.00064	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.75
氯苯	NIEA W785.54B	0.00062	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	1.0
四氯化碳	NIEA W785.54B	0.00059	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.05
萘	NIEA W785.54B	0.00062	mg/L	<0.0100	ND	<0.0100	0.40

註：1.在 VOC 分析的部份，PGB015401,03，以稀釋倍數 10 倍定量。

2.二甲苯=間二甲苯+對二甲苯+鄰二甲苯。

3.檢測值超過管制標準者以“x.xx”表示。

4.ND (Not Detect)；低於方法偵測極限 (Method Detection Limit,MDL)。

5.座標系統使用內政部公佈之「1997 台灣大地基準 (TWD97) 座標系統」。

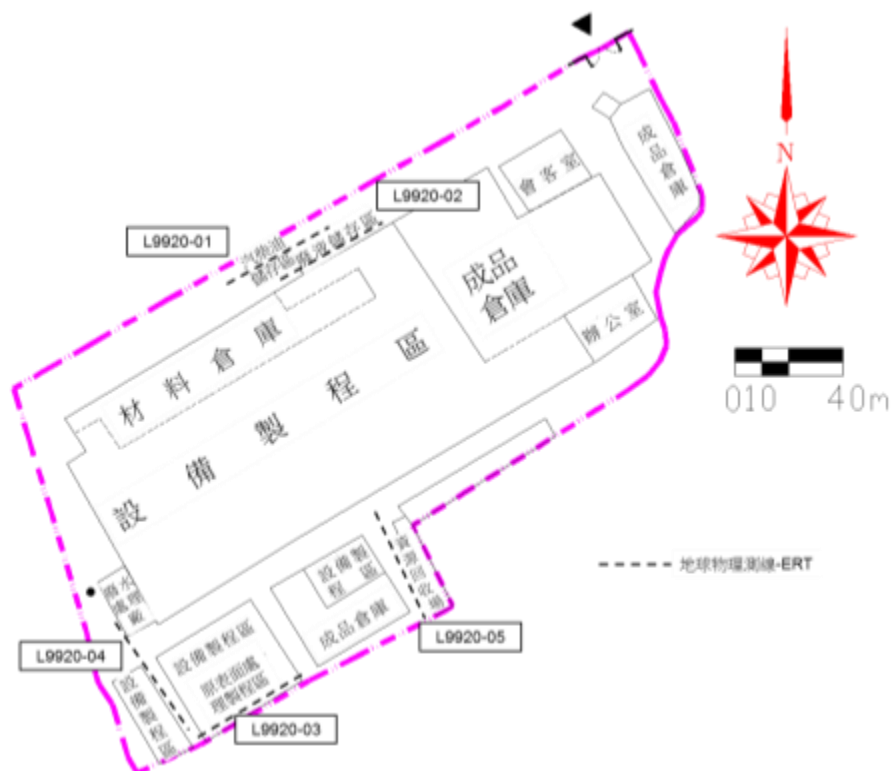


圖 1.2-2 地電阻影像探測布設位置圖

汽柴油儲存區沿線(L9920-01)

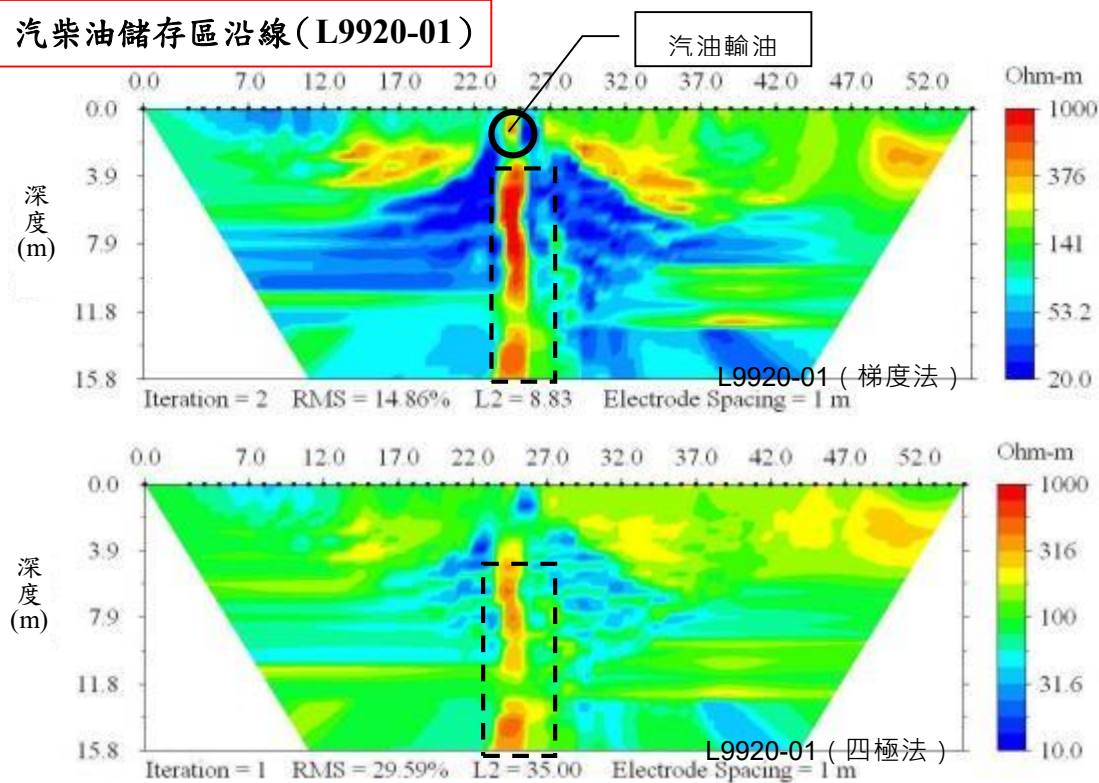
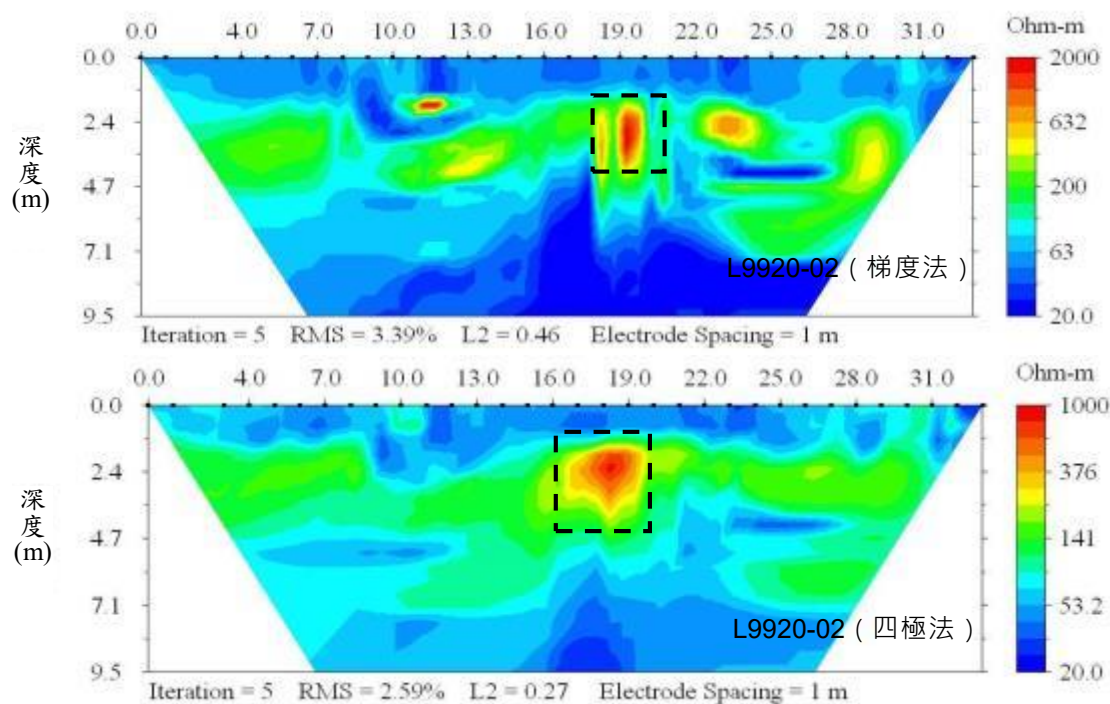


圖 1.2-3 地電阻影像剖面法探測圖 (1/3)



重油儲存區沿線 (L9920-02)



原三氯乙烯使用及儲存區沿線 (L9920-03)

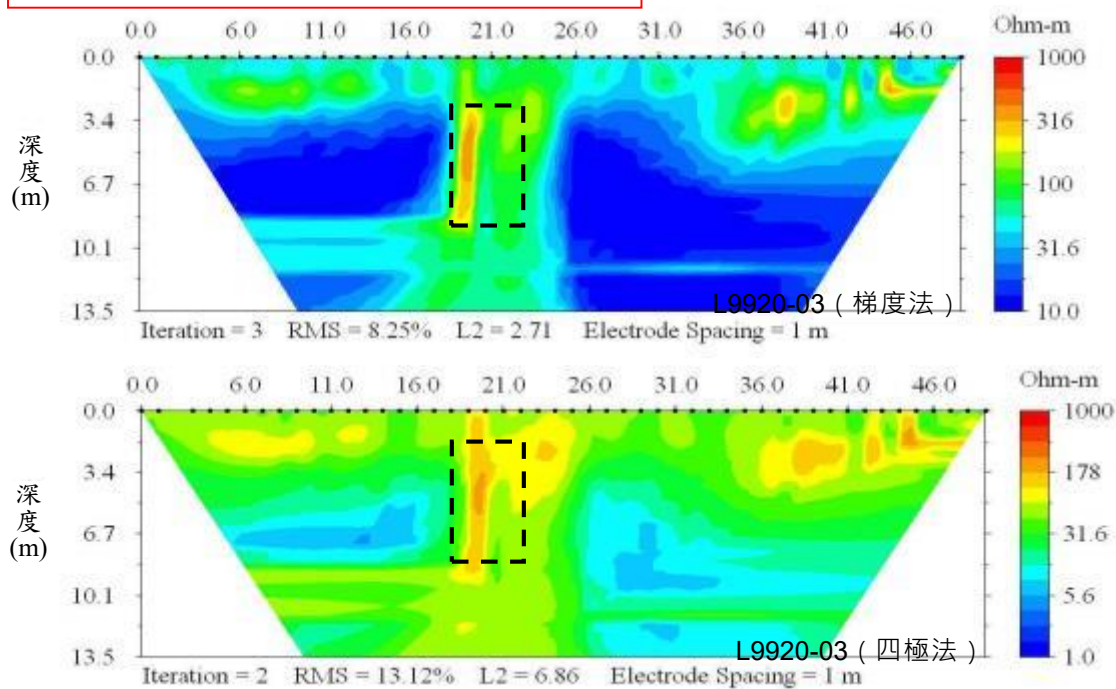
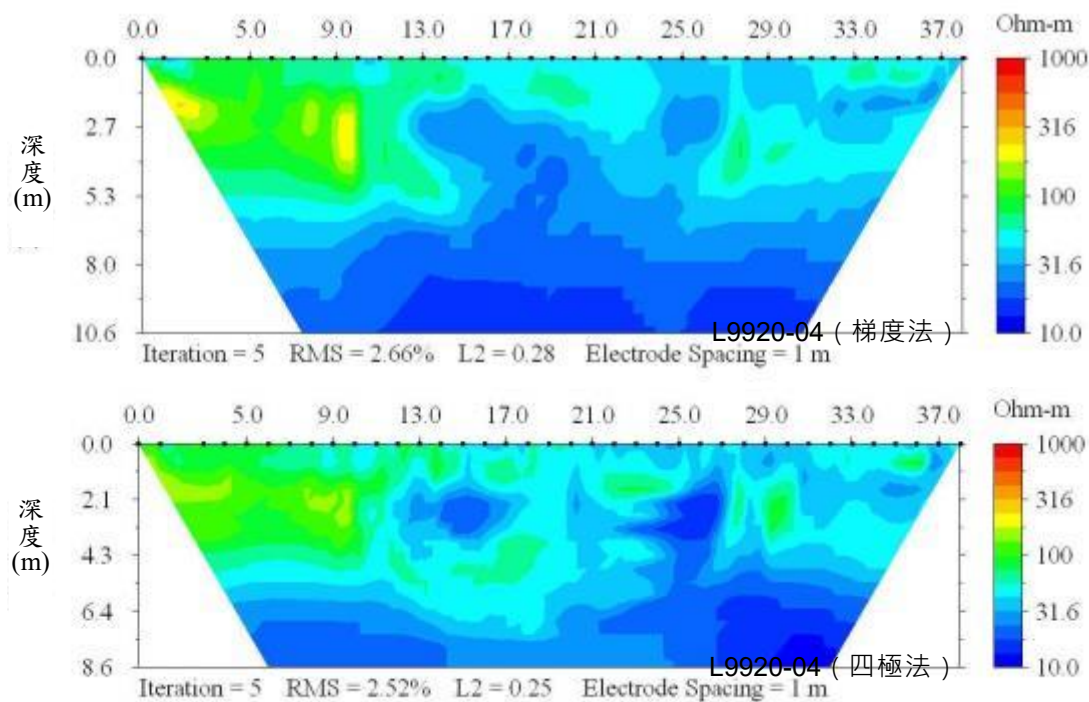


圖 1.2-3 地電阻影像剖面法探測圖 (2/3)



廢水處理廠至原三氯乙烯使用及儲存區沿線 (L9920-



資源回收場沿線(L9920-05)

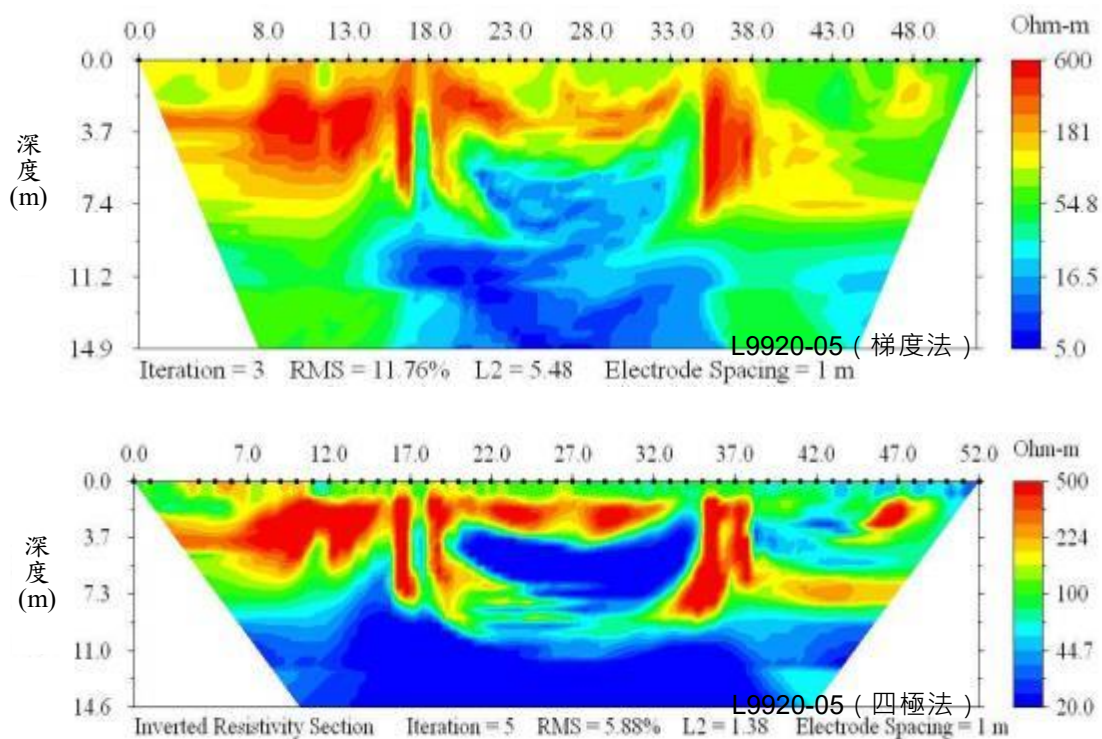


圖 1.2-3 地電阻影像剖面法探測圖 (3/3)



3. 原三氯乙烯使用及儲存區沿線 (L9920-03)：圖 1.2-3 之 L9920-03 四極法與梯度法之探測剖面均顯示距測線起點處（西側為起點）19~21 m 處下方為異常高電阻率區域，呈現向下延伸之相對高電阻率區域，深度約在地表下 2~8 m 內，附近水位初步研判約在地下 6~7 m。不排除為地質較堅硬紅土或粗礫造成，亦不排除有污染物往下延伸。
4. 廢水處理廠至原三氯乙烯使用及儲存區沿線 (L9920-04)：圖 1.2-3 之 L9920-04，本測線位於廢水處理廠至原三氯乙烯使用及儲存區，四極法與梯度法之探測剖面均顯示電性地層分佈接近礫石背景值，電阻率顯示地質滲透性有往下逐漸降低的趨勢，代表砂土或黏土逐漸增多。
5. 資源回收場沿線 (L9920-05)：圖 1.2-3 之 L9920-05 四極法與梯度法之探測剖面均顯示距測線起點處（西側為起點）18、37、48 m 處下方為異常高電阻率區域，顯示超過上百 Ohm-m，呈現向下延伸之相對高電阻率區域，深度約在地表下 1~7 m 內。三處異常區域皆鄰近資源回收場，其中 48 m 鄰近廢溶劑儲存區與雨水溝，淺地層 1~4 m 電阻率多數超過 5 百 Ohm-m，不排除為地質較堅硬紅土或粗礫造成，亦不排除有污染物往下延伸。經考量區域性地下水流方向（大致由北向南），發現 MW9920-05 位於 MW9920-01 下游，含氯有機污染物是否來自上游，導致 MW9920-05 之三氯乙烯超過污染管制標準；但亦不排除此區域曾堆置三氯乙烯空桶或相關廢液洩漏所致。

1.2.2 環保局調查結果

環保局執行「103 年度桃園縣地下水含氯場址污染來源鑑識及公告範圍界定計畫」於台鈴平鎮廠進行 7 口地下水監測井（MW-4、MW-11、MW9920-1、MW9920-5、MW-EX-01、MW-EX-02、TL-1）揮發性有機物檢測及同位素鑑定作業。結果顯示 MW11 及 MW-EX-02 之三氯乙烯濃度超過管制標準，分別為 0.0787 mg/L 及 0.107 mg/L。南、北兩區塊污染團，在三氯乙烯之 $\delta^{13}C$ 出現穩定同位素分餾現象，顯示南、北兩團三氯乙烯為不同來源。

1.2.3 自主調查結果

台鈴公司為瞭解平鎮廠之地下水水質情況，於 100 年開始委託取得環保署認證合格之檢測機構進行地下水中揮發性有機物檢測，針對自行增設 11 口監測井



及環保署既設 3 口監測井每季進行一次採樣分析，採樣期間為 100 年 9 月至 102 年 9 月，共計 7 次採樣分析，採樣監測井位置如圖 1.2-4，分析結果如圖 1.2-5。

圖中顯示原最高污染區域位於廠區北側，形成之污染團包含至本場址範圍，比較歷次污染團分布圖，顯示北側廠區外似乎有污染源持續的流入廠區，而此北側污染團似乎來自間歇性之污染源，因此濃度起伏不定。台鈴平鎮廠曾以為廠內有污染源，而於廠區南側設置水力控制之抽水處理，以防止污染向廠外擴大。推測因而將北側廠區外之污染團加速帶入廠內，並向下游（含本場址區）移動，研判本場址之污染來源可能係與廠外污染團有關。

台鈴公司於應變計畫期間，為防止地下水下游污染有擴散之疑慮，102 年於廠區南面地下水下游區域設置水力控制系統，該系統由 6 口抽水井組成（實際操作 4 口，PT-01、PT-06 抽水區污染物濃度低而未操作），其後於 103 年所提控制計畫中考量污染源於廠區外地下水上游區域，為阻絕污染持續擴散至廠內，於廠區內地下水上游圍牆周界區設置 5 口抽水井，合計共 11 口水力控制抽水井，其配置如圖 1.2-6 所示，運轉者 9 口，其抽水操作如表 1.2-2 所示，每天總抽水量為 122.4 立方公尺（CMD），抽水系統皆由專管導引至污水前處理設備進行化學氧化前處理，待前處理完成後再導入污染處理場進行後續處理。廢水處理廠總處理量為 240 CMD，扣除製程所需 115 CMD，本計畫可用處理量為 125 CMD。

表 1.2-2 廠內水力控制系統運作彙整表

區域	組別	井號	每次運轉時間 (小時)	每天運作 次數	抽水量 (CMD)
南側	第一組	PT-02、PT-04	6	2	21.6
	第二組	PT-03、PT-05	6	2	46.8
北側	第一組	PT-07、PT-09、PT-11	6	2	32.4
	第二組	PT-08、PT-10	6	2	21.6
一天總抽水量					122.4



圖 1.2-4 台鈴平鎮廠地下水監測井設置圖

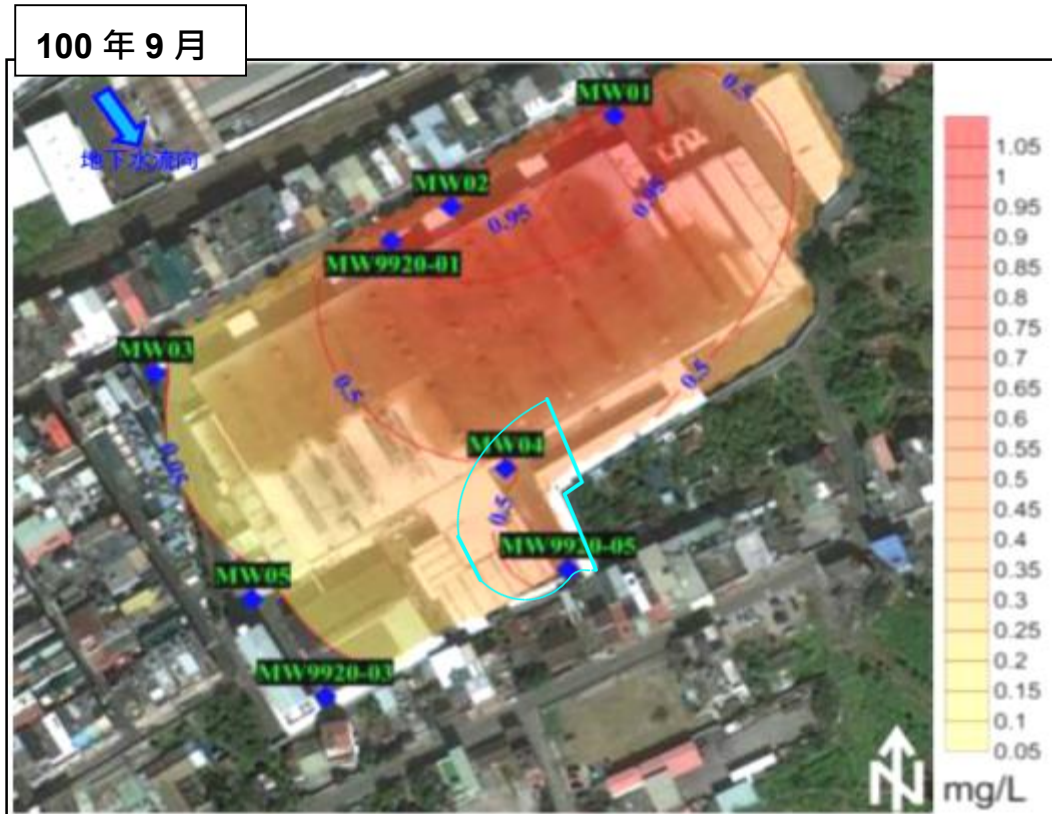


圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (1/7)

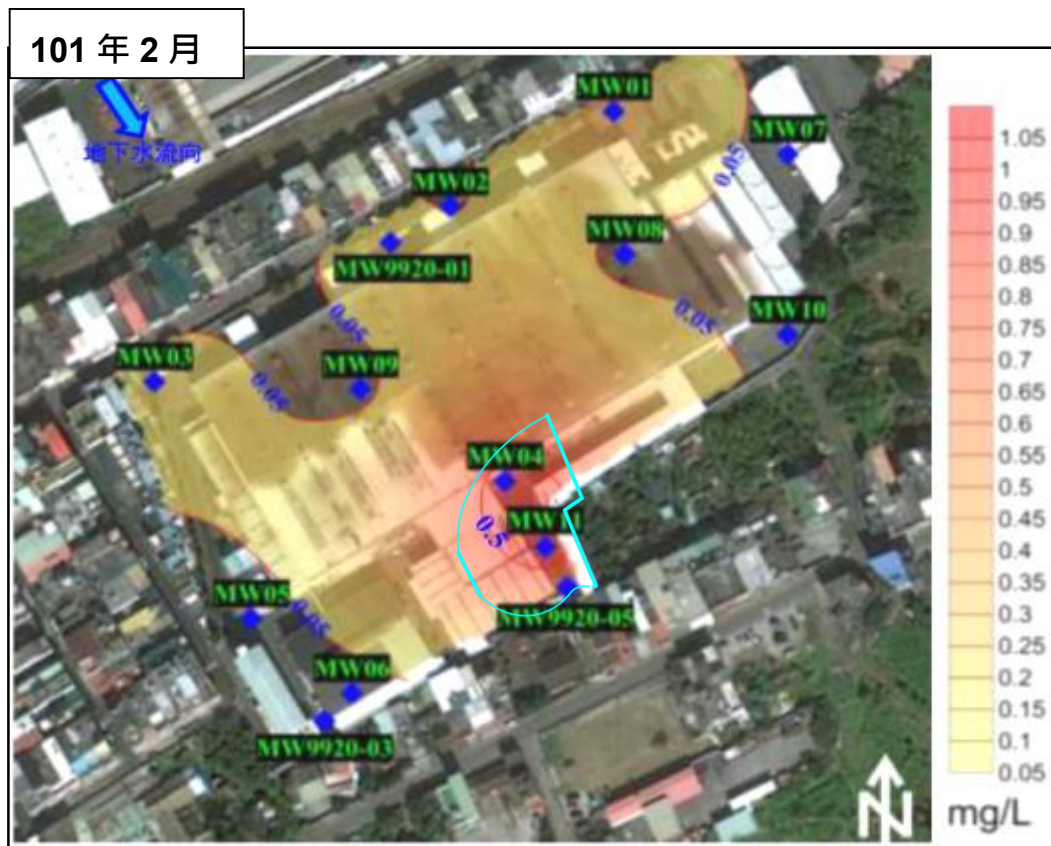


圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (2/7)

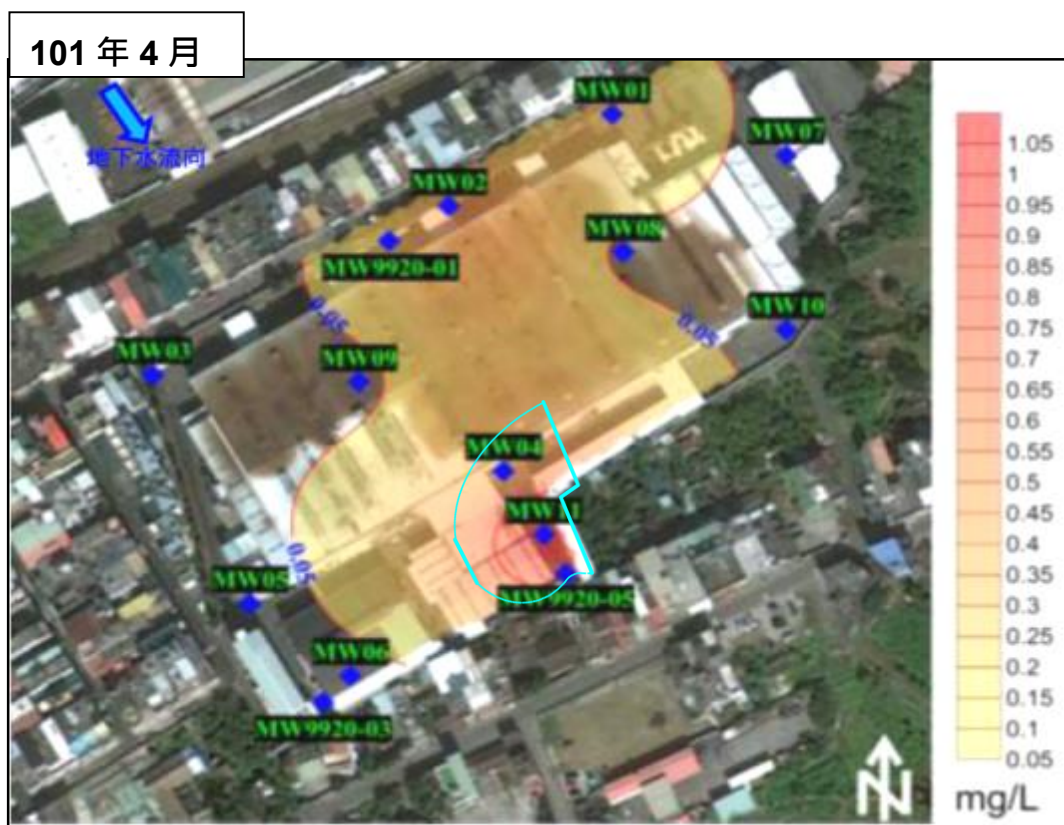


圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (3/7)



圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (4/7)

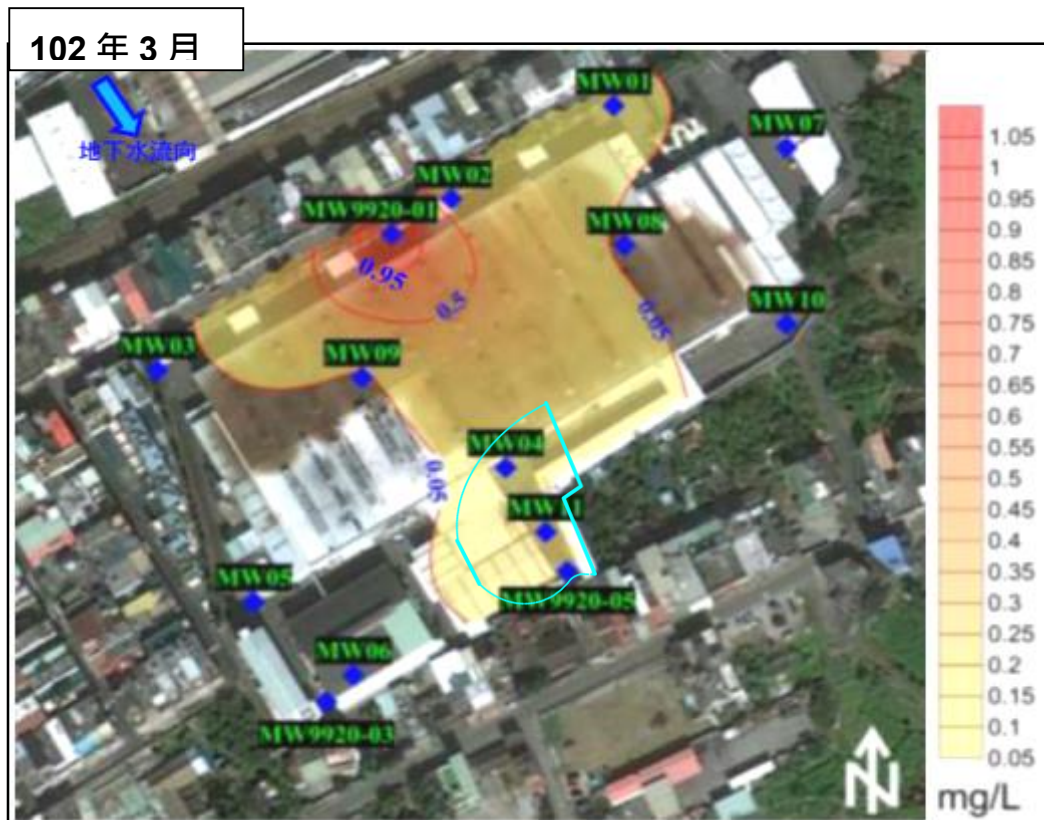


圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (5/7)

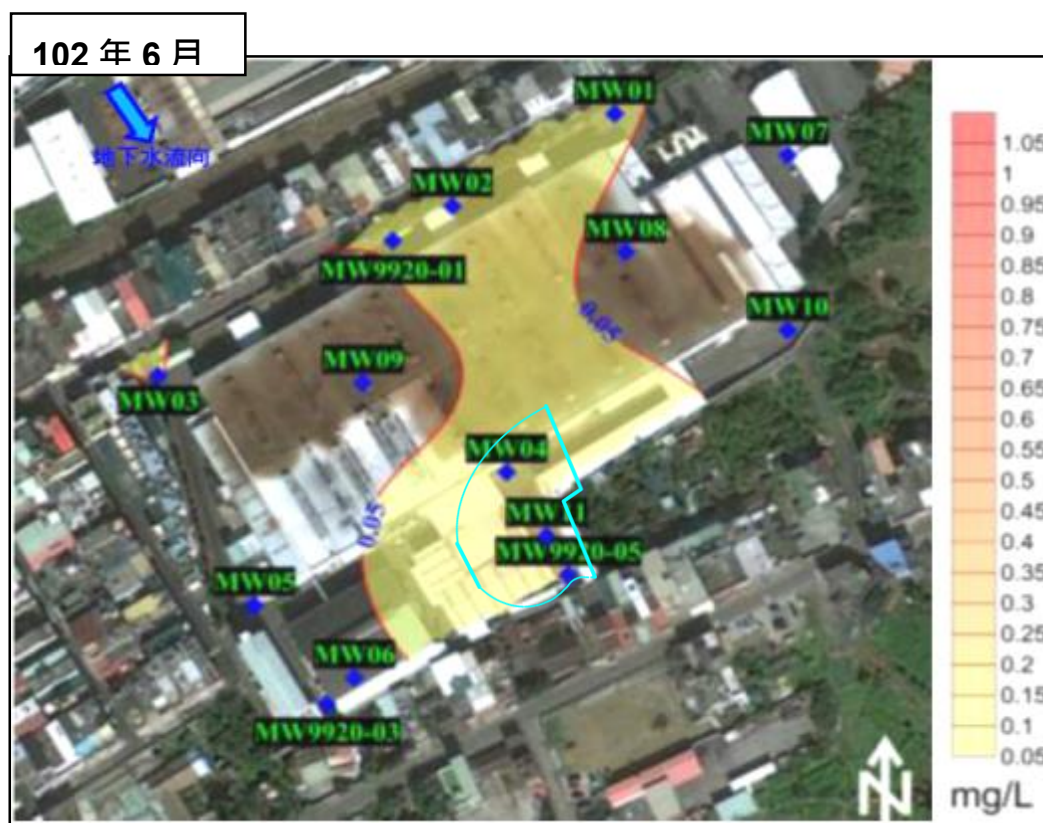


圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (6/7)



圖 1.2-5 台鈴平鎮廠三氯乙烯濃度推估圖 (7/7)



圖 1.2-6 水力控制系統平面配置圖



1.2.4 地下水污染範圍

依據環保局「103 年度桃園縣地下水含氯場址污染來源鑑識及公告範圍界定計畫」調查結果顯示，在一般水質項目上，檢測 7 口監測井均無異常；但在 VOC 檢測上，7 口均有三氯乙烯（TCE）、順-1,2-二氯乙烯檢出，且其中有 3 口（MW-11、MW-EX-01、MW-EX-02）仍達管制標準，本場址內僅有 MW-11 超標，另外超標兩口（MW-EX-01、MW-EX-02）位在廠區北邊之道路上。經 TCE 穩定同位素特徵比較顯示，其為兩不同污染來源且下游南邊污染團非受上游北邊污染團所影響。

惟以歷年台鈴公司之監測井檢測分析，廠區北邊污染團之影響可及本場址之現象，為更瞭解本場址污染團分布，彙整本場址既有監測井（MW04、MW11 及 MW9920-05）歷次調查（99 年度環保署、103 年度環保局、台鈴公司歷年調查），歷年三氯乙烯分析濃度結果如表 1.2-3 所示，濃度隨時間變化如圖 1.2-7 所示。由圖中顯示三氯乙烯濃度有下降趨勢，本場址既有監測井檢測出仍有三氯乙烯濃度但未超出地下水污染管制標準。惟廠區北側污染團能持續流進廠內，而造成三氯乙烯濃度動態性變化。

目前本場址地下水受三氯乙烯污染，地下水污染深度範圍大致在 6~12 m 處，推測造成本場址地下水三氯乙烯污染的原因，可能為北側廠區外污染團擴散至本場址上游處區域，其餘區域較無顯著污染情形。研判北側廠區外地下水檢測出三氯乙烯污染，其受污染團影響造成本場址上游處的監測井三氯乙烯超出地下水污染管制標準。保守評估受污染含水層平均面積至少達 2,372 m² 以上，受污染含水層平均厚度約 8 m，受污染含水層污染體積約 18,976 m³ 以上。

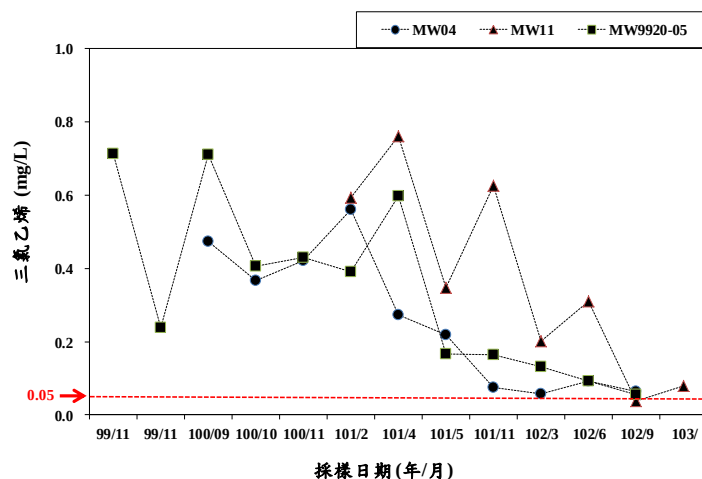




圖 1.2-7 本場址歷年既有監測井三氯乙烯濃度變化趨勢圖

表 1.2-3 歷年三氯乙烯分析結果

執行計畫	99 年環保署 ⁴		台鈴公司（自行調查）										103 年 環保局	補充 調查 ⁵
採樣時間 （年/月）	99/11 _a	99/11 _b	100/09	100/10	100/11	101/2-3	101/4	101/5	101/11	102/3	102/6	102/9	104/8	106/6
MW04	—	—	<u>0.4740</u>	<u>0.3670</u>	<u>0.422</u>	<u>0.5610</u>	<u>0.274</u>	<u>0.219</u>	<u>0.0757</u>	<u>0.0586</u>	<u>0.093</u>	<u>0.0643</u>	0.0375	0.034
MW11	—	—	—	—	—	<u>0.5940</u>	<u>0.762</u>	<u>0.347</u>	<u>0.625</u>	<u>0.201</u>	<u>0.311</u>	0.0371	<u>0.0787</u>	0.0378
MW9920-05	<u>0.714</u>	<u>0.238</u>	<u>0.7100</u>	<u>0.4060</u>	<u>0.43</u>	<u>0.3910</u>	<u>0.598</u>	<u>0.166</u>	<u>0.165</u>	<u>0.131</u>	<u>0.0931</u>	<u>0.0553</u>	ND	0.0064

註：1. 單位：mg/L。

2. “—” 表示無採樣分析或無資料。

3. **粗體底線** 表示超過第二類地下水污染管制標準。

4. 99 年環保署執行運作中工廠土壤及地下水含氯有機溶劑污染潛勢調查及查證計畫，分別以^a微洗井及^b貝勒管採樣分析

5. 106 年 6 月地下水品質調查結果取此監測井該次採樣濃度最高數值。



第八章： 補充資料