



專案基本資料

專案基本資料表

專案性質		☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案類別(單選)		☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型	
研究主題		☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他					
申請機構系所		國立中山大學環境工程研究所					
機構地址		高雄市鼓山區蓮海路 70 號					
專案主持人		張耿峻		職等/職稱		副教授	
協同主持人		簡華逸		職等/職稱		協理	
專案名稱	中文	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能					
	英文	Analysis of the bacterial community structure and function for combining biochar and microbial degradation of trichloroethylene by next-generation sequencing technology					
	關鍵字	生物碳；循環經濟；次世代定序；三氯乙烯；土壤污染；生物整治					
執行期程		自民國 111 年 9 月 1 日起至民國 112 年 8 月 31 日止					
專案主持人		姓名：張耿峻		E-mail：klchang@mail.nsysu.edu.tw		專線：07-5252000#4408 手機：0930828077	
專兼任人員		姓名：謝育倫		E-mail：ouo1738@gmail.com		專線：07-5252000#4416 手機：0976626629	
經費分析總表 (僅模場試驗 專案需填寫兩 年度金額)	專案預估經費		第一年 金額	第二年 金額	編列說明		
	1.	人事費用	267,291	-	(1~6 項相加之 50% 為限)		
	2.	設備使用含維護費	207,055	-	(與計畫實驗相關)		
	3.	耗材與主要費用	277,462	-	(與計畫主體相關)		
	4.	其它研究相關費用	0	-	(含差旅與租賃費用)		
	5.	雜支費用	11,828	-	(1~6 項相加之 5% 為限)		
	6.	行政管理費	76,364	-	(1~6 項相加之 10% 為限)		
	7.	自籌款	0	-	(自行籌備款項)		
	申請補助金額(1~6 項)		840,000	-	總金額：840,000		
	計畫總金額(1~7 項)		840,000	-	總金額：840,000		

專案主持人(簽名及蓋章)：張耿峻



日期：112.08.25





以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

111 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：112 年 07 月 13 日

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質	專案類別	☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型
研究主題	☒ 整治 ☐ 調查 ☐ 其他		
執行機構	國立中山大學環境工程研究所	專案主持人	張耿峻
專案名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
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欄位中。

(一) 學術面

項目		目標達成程度	申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因或 學術產出發表名稱)
A 學術產出及活動	1. 國內投稿 (篇數)	(1) 論文					
		(2) 研討會論文	1	0	1		已投稿至第35屆環境工程年會
	2. 國外投稿 (篇數)	(1) 期刊論文	1	0	0		本研究預計於結案後提出
		(2) 國際研討會論文發表	1	0	1		投稿至 The 35 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2023)
	3. 報告 (篇數)	(1) 技術報告					
		(2) 研究報告					
	4. 專著 (本數)						
	5. 辦理學術會議(場數)	(1) 研討/說明會					
		(2) 成果發表會					
		(3) 論壇					
B	7. 研發人員	(1) 已開發技術					
		(2) 技術平台					



專案基本資料

目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因或 學術產出發表名稱)
項目							
人才 培育	(人數)	(2)博士					
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

(二) 產業面

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



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



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

(三) 政策面

項目		目標達成程度	申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 政策 推動	3.協助政府推動 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
C 技術 效益	4.整治技術提升(%)						
	5.整治成本降低(%)						
	6.提升能源效率(%)						
7.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

三、請依前述學術面、產業面、政策面等預期量化成果，具體敘明研究成果對本署政策推動之助益。(200字為限)

學術面(如國內外研討會、期刊投稿件數、或人才培育碩博士生說明) 1. 投稿國際期刊論文 1 篇、投稿國內與國際研討會論文各 1 篇。 2. 培育 2 名碩士生。
產業面(如合作研發產業、申請專利、洽談技術移轉廠商件數說明) 計畫後續可申請專利推廣，並技轉廠商輔導廠商投入實場生產；在廠商創造產值與收益的同時，可改變台灣生質材料的處置方式，減少生質廢棄物量以及增加生物碳的使用，可達到降低碳排放以及促進環境保護的目標，未來也有機會抵減碳稅。
政策面(如整治費用降低、特定污染物整治效益提升、或提供政府作為監測/管制標準、污染址管理等政策及法規研訂之參考) 結合生物碳與生物整治法預期可降低整治費用，並符合環保署推動之永續韌性整治，屬於綠色永續整治技術。



專案基本資料

四、主要研究人力

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

姓名	服務機構/系所	職稱	在本研究專案內擔任之具體工作性質、項目及範圍	執行期間
張耿峻	國立中山大學/ 環境工程研究所	副教授	計畫規劃、主持、進度之追蹤與督導、期末報告撰寫與整理	111 年 09 月 01 日 至 112 年 08 月 31 日
簡華逸	寰靖綠色科技(股) 公司	協理	現地水文調查、土壤組成成分、污染潛勢調查之追蹤督導	111 年 09 月 01 日 至 112 年 08 月 31 日
謝育倫	國立中山大學/ 環境工程研究所	研究生	協助樣品採集、分析、報告撰寫	111 年 09 月 01 日 至 112 年 08 月 31 日

五、產業界資源投入表

專案執行若有與產業界合作，請執行單位依實際量化成果填寫於欄位中。

投入資源類別	數量	說明
1.自籌款	0 元	
2.人力	12 人月	
3.設備	2 台	薄膜界面探測器 (Membrane interface probe, MIP) 與地質鑽探機(Geoprobe® 7822DT Drill Rig)
4.其他資源 (請自行增列)		



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐構想書 ☐申請計畫書 ☐期中報告
☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他		主持人：張耿峻 NO：C2
計畫名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
審查意見		執行單位回覆	
委員一		1. 感謝委員的建議。目前一年期的計畫中已獲得初步結果與相關資訊，未來會朝實際應用於污染場址之整治為目標。 2. 感謝委員的建議。相關操作參數與條件已補充於期末報告第五章結果與討論中。 3. 感謝委員的建議。未來將針對生物碳吸附污染物後，如何進行脫附或降解進行進一步的研究。 4. 本計畫成果產出績效彙整於期末報告“成果績效自評”中，本計畫已培育兩位碩士研發人員，國內研討會論文已投稿至第 35 屆環境工程年會，國際研討會論文預計投稿至 The 35 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2023)，國際期刊論文仍在撰寫中。	
1. 建議計畫執行仍應以未來能實際應用於污染場址之整治為目標。 2. 建議可以針對未來應用於實場時建立操作參數條件。 3. 建議可以探討以生物碳吸附三氯乙烯後續降解策略。 4. 建議應針對本計畫成果產出績效做說明。			
委員二		1. 感謝委員的肯定。 2. 感謝委員的指教。已將相關資訊補充於期末報告第五章結果與討論中。 3. 感謝委員的指教已將相關資訊補充於期末報告第五章結果與討論中。 4. 感謝委員的肯定。	
1. 期末報告內容豐富，符合原定計畫內容。 2. 建議於第五章結果與討論彙整完整試驗參數，例如時間、應用處理 TCE 濃度範圍、生物碳種類與用量適用條件與應用範圍、控制參數、環境干擾因子，可提供後續擴大實場應用之參考依據。 3. 建議根據研究成果提出配合現地污染整治的操作最佳條件與應用策略。 4. 研究成果具體，條件參數已具有後續應用的基礎。			



審查意見回覆對照表

委員三 1. 本案成果績效自評表中，國內研討會投稿、國外期刊及國際研討會發表目標各 1 篇，惟期末達成數未填寫，若未達成請說明原因。 2. P.27 整治井口配置間距如何擇定，如何評估是否產生相互干擾因素。 3. P.48~50 顯示三口井氯乙烯濃度第 135 天皆較 0 天為高，仍須留意長期威脅性。 4. 本案使用生態工法進行整治有利於整體環境復育，此計畫具有創新性與上位政策關聯性，符合環保署推動之永續韌性整治。 5. 摘要倒數第四行「占有比例非常高」，「。」符號誤植，請修正；P.2 第一段倒數第五行「...有”力”於改善土壤」；P.10 第二段倒數第四行「...”將地”滲透性」；P.47 圖號 29~31 說明內容與圖不符，誤繕請修正；P.71 第一行「文”試”圖」，誤繕請修正。	1. 感謝委員建議，已補填於成果績效自評表中。本計畫已培育兩位碩士研發人員，國內研討會論文已投稿至第 35 屆環境工程年會，國際研討會論文預計投稿至 The 35th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2023)，國際期刊論文仍在撰寫中。 2. 感謝委員指教。本研究選定整治井口有幾個條件：(1)井深度須達 9 m 深，(2)污染土層須為粉土質層，(3)為了不受地下水流向干擾，三個井口水流向皆互不影響(互不為上下游關係)，以減少相互干擾。 3. 感謝委員的提醒，後續將持續追蹤氯乙烯濃度變化。 4. 感謝委員的肯定。 5. 感謝委員指正，已修改完成。
委員四 1. 以 49 公斤污染土壤加 1 公斤生物炭，之後混合再埋入 9 公尺深度，在最小變動之下未加營養鹽，確可視為生物炭所造成之功能。 2. 每次在於該 50 公斤土壤中取樣分析，因土壤不均質性，而又只有一個樣品，數據代表性質疑。 3. 若研究確認生物炭對微生物反應有效降解土壤中含氯的染物，所造成影響區域應僅為混合生物炭位置土壤。若能用反應牆概念來處理地下水，應用可行性會更高。	1. 感謝委員的確認與肯定。 2. 感謝委員指教。土壤樣品不均質性確實難以取得具代表性之樣品，因此本研究在萃取微生物 DNA 時，先從土壤樣品取出不同部分進行混拌，再取出 2 g 之土樣進行基因定序分析，希望盡量取得均勻具代表性的樣品。 3. 感謝委員的建議。未來將嘗試設計生物炭反應牆做進一步的研究比較。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

委員五 1. P47 頁第 5.1.4 節內文圖號有誤，請查證後修正。 2. 請補充說明第 5.1.4 節對於 A、B 及 C 井試驗起始濃度(第 0 天)的差異，對於本試驗所可能造成的影響。例如 cis-1,2DCE 第 0 天井 B 約 2mg/kg 而井 C 約 0mg/kg。 3. 續上，椰子生物炭(井 B 圖 33)與竹子生物炭(井 C 圖 34)，對於 TCE 與 VC 的試驗有不一樣的趨勢，請補充說明可能原因。例如圖 34 之 TCE 第 135 天高達 35mg/kg 大於第 0 天約 20mg/kg。	1. 感謝委員指教。已修改完成。 2. 感謝委員指教。因含氯污染物在土壤中不均質性的特性，不同井口之污染物初始濃度無法控制相同，而造成第 0 天有所差異，本研究透過長時間分析污染物濃度變化趨勢，但因為一年期計畫，實際試驗時間僅約 135 天，對生物整治較不易看出長期整治趨勢。 3. 感謝委員指教。如圖 35 所示，生物碳對 TCE 及 CIS - 1,2 DCE 有極佳的吸附能力，而竹子生物炭對於吸附 VC 效果較佳，可能與生物炭的比表面積與官能基不同有關。
委員六 1. 建議可參考國外文獻及相關研究成果，建立生物碳產生流程，供相關單位執行參考。 2. 計畫結果顯示生物碳有吸附功能，其是否得做為含氯有機物之阻擋牆（侷限污染物擴散範圍），效能為何，可再行評估。	1. 感謝委員的建議。未來將彙整生物碳生產流程，並與本研究進行比較，以供相關單位執行參考。 2. 感謝委員的建議。本研究確實顯示生物碳具有不錯的吸附功能，未來可嘗試設計生物碳反應牆做進一步的實場應用評估。



審查意見回覆對照表

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□構想書 □申請計畫書 ■期中報告
□修正計畫書 □期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他		主持人：張耿峻 NO：C2
計畫名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
審查意見		執行單位回覆	
委員一			
5. 期中報告成果略顯不足，建議應加強後續之進度研究與成果之呈現。		1. 感謝委員的指教。本計畫於期中報告因僅能完成現地地質勘察與取樣部分，其餘生物樣品的統計分析結果將於期末報告中彙整與呈現。	
6. 現地污染物之定性與定量說明應更明確；以及現地之化學環境之相關資訊。		2. 感謝委員的指教。將於第四章節補充說明，並於第五章節將環境資料補上。	
委員二			
5. 請以預定進度及查核點說明期中報告達成狀況。		1. 感謝委員提醒，之後會以查核點說明期中報告達成狀況。	
6. 建議詳細說明研究設計與執行流程，實驗 QAQC。		2. 感謝委員的建議。將補充說明研究設計與執行流程、實驗 QAQC 等資料。	
7. 本研究以製備生物碳技術，結合及 NGS 次世代基因定序技術進行菌群結構分析，試圖應用於現地場址開發整治技術，然而初步結果並未說明的依據。		3. 本計畫於期中報告因僅能完成現地地質勘察與取樣部分，其餘生物樣品的統計分析結果將於期末報告中彙整與呈現。	
8. 建議說明彙整相關試驗參數，時間、應用處理 TCE 濃度範圍、生物碳用量實驗、控制參數、環境干擾因子，如何應證微生物菌群附著生長於生物碳材料？		4. 感謝委員的建議。將把相關資訊補充於期末報告中，並於最後一次採樣時將生物碳取出，以 SEM 影像證實微生物菌群是否附著生長於生物碳材料。	
9. 根據預定進度期中應提出配合現地污染土樣進行實驗室試驗並找出最佳條件。		5. 感謝委員的指教。因難以在實驗室完整模擬現場環境，因此僅在實驗室完成現地污染土壤之物化分析，其餘試驗仍在現地進行。	
10.請彙整說明期中已完成之結果與後續預定執			



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

行工作。	6. 感謝委員的指教。將補充彙整說明期中已完成之結果與後續預定執行工作。
委員三 6. 本專案成果績效自評表，P.II 二成果績效自評未填報，請補充。 7. 表目錄中表格順序跳號，請修正。 8. P.21 第二段倒數第五行「...有”力”於改善土壤」；P.29 第一段倒數第四行「...”將地”滲透性」；P.52 甘特圖之期中查核點「...及”限”地採樣分析」，誤繕請修正。 9. P43 圖 13 建議配置圖井口加註代碼編號，並同步調整內文描述，以利明確判讀井口標的。 10.P.47 第(11)項「...”再加入 wash Buffer(無水乙醇)，在室溫下以 16000xg 離心 1min，丟棄流出液”」全句重複說明，請修正。	6. 感謝委員指教。已補填成果績效自評表。 7. 感謝委員指教。已修改完成。 8. 感謝委員指教。已修改完成。 9. 感謝委員的建議。已對井口加註代碼編號，並同步調整內文描述。 10.感謝委員指教。已修改完成。
委員四 4. 已完成現地土壤及材料分析，正在進行模場整治及 DNA 分析，已達到期中報告之查核目標。	1. 感謝委員的肯定。



審查意見回覆對照表

委員五 4. P.44 頁表 3 各生質材料製備生物碳對銀合歡須達 30 天，然其他 6 項材料最長僅 2 小時即可完成，請補充說明原因。 5. P.58 頁圖 27(e)(d)標題有誤，請修正。 6. P.60 頁表 5 之 EA 數據，「雜木生物碳」其 C% 含量偏低，不符木料常態含碳量分布。 7. 同理，表 6 稻穀與蓮霧生物碳之比表面積偏低，其中稻穀生物碳之比表面積與文獻差異過大，請再補充說明。	1. 感謝委員的提問。製備銀合歡生物碳時希望嘗試以不同且大量的方法進行，所以以土窯進行厭氧悶燒，時間長達 30 天。 2. 感謝委員指教。已修改完成。 3. 感謝委員指教。雜木生物碳之 C% 含量確實偏低，推測這種偏低的碳含量可能是因碳化不完全或混入其他物質所造成。 4. 感謝委員指教。稻穀與蓮霧生物碳之比表面積確實偏低，可能原因為碳化時未達到完全無氧或樣品中混入其他物質所造成。
--	---



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能
 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專
 案」

■申請計畫書 □期中報告
 □修正計畫書 □期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他		主持人：張耿峻副教授 NO：6
計畫名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
審查意見		執行單位回覆	
委員一 1. 經審閱階段成果報告已依申請計畫書定稿本執行，符合預期執行進度。		1. 感謝委員的肯定。	



審查意見回覆對照表

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

□構想書 ■申請計畫書 □期中報告
□修正計畫書 □期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	☐ 先導型 ☒ 研究型 ☐ 模場型
計畫類別	☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他		主持人：張耿峻副教授 NO：6
計畫名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
審查意見		執行單位回覆	
委員一 1. 計畫主持人研究能力佳，具本計畫執行能力。 2. 本計畫以植物碳做為土污整治處理技術研究，具循環經濟與綠色整治功能。		1. 感謝委員的肯定。 2. 感謝委員的肯定。本計畫將結合生物碳與生物整治法，期望完成符合循環經濟與綠色整治功能之技術。	
委員二 1. 本研究分成生物碳整治應用、及次世代定序技術兩類，皆為國際熱門主題。 2. 主持人在此領域持續有論文產出，研究成果具有撰寫期刊文章的潛力。 3. 建議計畫執行過程中，應多考慮，如何在現場應用的可行性，以讓計畫成果更貼近實務應用。		1. 感謝委員的肯定。 2. 感謝委員的肯定。本計畫完成後將針對添加生物碳對土壤中微生物之影響進行探討，期能撰寫論文並投稿至國際期刊。 3. 感謝委員的建議。本計畫將在實場進行試驗，探討生物碳在現場應用之可行性，成果可為實務應用之參考。	



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

委員三 1. 有關專案新穎性，該研究透過生物碳製備技術，以及 NGS 次世代基因定序技術進行菌群結構分析，有效優化整治程序且推動我國達永續韌性之理念。 2. 為提升現地實施可行性，建議後續可針對模場應用相關試驗參數，如處理時程、成效及耗能進行綜合評析，以及考量現場周遭環境干擾等外在影響因子，瞭解實場應用之適切性，作為後續現地整治之參考，進而提升我國永續韌性整治成效。	1. 感謝委員的肯定。本計畫將結合生物碳與生物整治法，期望完成符合循環經濟與綠色整治功能之技術。 2. 感謝委員的建議。本計畫後續將針對處理時間、成效及能耗進行綜合評析，並探討外在環境因子對本技術之影響，以作為現地整治之參考依據。
委員四 1. 研究主題符合土壤及地下水污染整治基金補助精神、探討課題實際、整體研究架構明確方法可行、技術未來應用及推廣性應加強。	1. 感謝委員指教。本計畫將對整治成效與可行性進行探討，以加強未來實場之應用性及推廣性。
委員五 1. 研究規劃詳盡可行。	1. 感謝委員的肯定。
委員六 1. 本研究擬結合次世代定序技術，分析添加生物碳於三氯乙烯降解的菌群。 2. 將農業廢棄物回收再利用製備為生物碳是永續再利用方法。建議補充說明生物碳製備程序對於生物碳特性的影響。 3. 適用之農業廢棄物應加以評估。 4. 生物碳特性對於影響微生物代謝活動的相關機制應建立完整的關聯性，以為後續製備生物碳基材的參考。	1. 感謝委員指教。本計畫將針對添加生物碳對三氯乙烯降解之菌群進行分析。 2. 感謝委員的建議。本計畫將補充進行生物碳製備程序對於生物碳特性之影響研究。 3. 感謝委員指教。本次研究預計使用多種農業廢棄物製備為生物碳，並對這些材料進行比較與評估。 4. 感謝委員指教。本研究將特別針對生物碳特性對於影響微生物代謝活動的相關機制進行分析與探討，以作為製備與應用生物碳之參考。



審查意見回覆對照表

委員七 1. 本計畫對於三氯乙烯之降解反應機制，係受到添加之生物碳影響，以及現地微生物菌群影響，應有規劃與說明；尤其是微生物菌群是否附著生長於生物碳材料，亦須予以釐清。 2. 有關現地整治計畫之內容說明，似乎仍欠缺？未來現地模場試驗之規模為何？應有具體之說明。	1. 感謝委員的建議。本研究將規劃控制組(僅有現地微生物菌群)與實驗組(現地微生物菌群添加生物碳)進行比較，以探討土壤中三氯乙烯之降解反應機制。另外，本計畫最終也會對生物碳材料進行次世代定序分析，以確認微生物菌群是否附著生長於生物碳材料上。 2. 感謝委員的提問。模場試驗規劃已補充於申請計畫書中(詳見附件 11 第 7 部分研究方法與步驟)。 本計劃將以臺南市安南區某處受 TCE 污染之場址進行試驗，總場址面積：6664 m²，預計於污染最為嚴重之區域進行現地模場試驗。
---	---



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

■構想書 □申請計畫書 □期中報告
□修正計畫書 □期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	111 年度	計畫類型	□先導型 ■研究型 □模場型
計畫類別	□調查 ■整治 □其他		主持人：張耿峻副教授 NO：6
計畫名稱	以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能		
審查意見		執行單位回覆	
委員一			
1.研究學理具基礎，架構明確。		1.感謝委員指教。本團隊必全力將技術應用於現地整治場址，期許具有豐碩成果，能給予業者多些整治技術選擇與參考。	
2.控制參數待完整規劃。		2.感謝委員指教。本計畫將於繳交申請計畫書時提供更完整的控制參數。	
3.實用性待評估。		3.感謝委員指教。實用性將藉由本計畫於模場施行後所得之參數(如處理時間、成效及能耗等)進行評估。	
委員二			
1.本研究擬結合次世代定序技術，分析添加生物碳於三氯乙烯降解的菌群，研究主題熱門。		1.感謝委員指教。本團隊期許具有豐碩成果，能給予業者多些整治技術選擇與參考。	
2.本技術研究重點在統計分析技術的開發，以及對於生物與污染物數據間的關聯性解析。		2.感謝委員的建議，統計分析以及生物與污染物間的數據關聯性解析確實為本計畫之重點，本計畫會確實取得生物與污染物相關數據，進行深入的分析討論。	
3.建議獲得之結果，能找出關鍵性的菌群，以及如何掌控其生長的關鍵因素。		3.感謝委員的建議。本計畫將朝著找出關鍵性菌群，以及如何掌控其生長關鍵因素為研究重點。	



審查意見回覆對照表

委員三 1.有關專案新穎性，該研究透過生物碳製備技術，以及 NGS 次世代基因定序技術進行菌群結構分析，有效優化整治程序且推動我國達永續韌性之理念。	1.感謝委員指教。本團隊會以嚴謹態度面對計畫執行，期許具有豐碩成果，能給予業者多些整治技術選擇與參考。
委員四 1.研究主題符合土壤及地下水污染整治基金補助精神、探討課題實際、整體研究架構明確方法可行、技術未來應用及推廣性應加強。	1.感謝委員指教。待本計畫完成後，會依據計畫結果加強本技術之應用性及推廣性。
委員五 1.降解菌群是否會存留在生物碳或其中優勢菌群不屬脫鹵球菌，本計畫可釐清。 2.現地實施的可行性。	1.感謝委員的建議。本計畫會特別針對委員的問題進行分析與釐清。 2.感謝委員指教。現地實施之可行性將藉由本計畫於模場施行後所得之參數(如處理時間、成效及能耗等)進行評估。
委員六 1.請補充說明生物碳製備之材料來源為何？功能或特性指標為何？亦宜列入評估。 2.請具體說明本計畫試驗規劃之處理規模為何？計畫構想提及現地整治系統之設置，然未見模場或現地試驗之規劃，請補充/修正。	1.感謝委員指教。本計畫之生物質材料預計從農業廢棄物(蘑菇培養土、稻草、稻殼、木材及植物等)中收集，製備條件將評估溫度、含水率及反應時間對成品之影響，製備之生物碳將進行 FTIR、BET 與 SEM 分析做為特性指標。相關內容可參考申請計畫書(詳見附件 11 第 7 點部分 7.2 研究方法)。 2.感謝委員的提問。模場試驗規劃已補充於申請計畫書中(詳見附件 11 第 7 部分研究方法與步驟)。 本計劃將以臺南市安南區某處受 TCE 污染之場址進行試驗，過程主要以厭氧生物整治與添加生物碳，探討目標污染物之處理效率。首先



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

進行模場調查及規劃，並進行現地整治系統設置(包括整治井、灌注系統、循環系統、泥漿相反應槽設置等)，再加入生物碳，以提升生物去除和降解污染物之效果，強化現地整治成效。將生物碳投入加強式生物整治法(Enhanced Bioremediation) 提供土壤及地下水環境中生物生長之有利條件，以利加速污染物分解，其常見處理方式可分為生物添加法及生物促進法兩大類。營養源及生物碳添加量及評估方式則依據已施作之厭氧生物工法區域為參考準則。生物基質灌注後土壤及地下水分析項目分為以下項目：污染物分析、及微生物定序分析。本研究鑽探工程之鑽探方法，係採用旋轉式鑽探工法，以 HQ(岩心直徑 63.5 mm)三套管岩心夾取器進行土壤及岩心連續全取樣，以了解地層地質之連續性分佈。並在每階段完成時，採集樣品後將樣品置於 4°C 保冰袋中保存運送回實驗室，微生物樣品以 -20°C 冷凍櫃保存。待提取 DNA 後經由次世代定序分析，並由分析結果進行討論。最後針對生物整治法搭配生物碳進行經濟效益分析，評估利用生物整治法及搭配生物碳針對 TCE 污染整治市場競爭性。



中文摘要

中文摘要

三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)是一種廣泛存在於土壤和地下水的污染物，尤其是在嚴重污染的工業場址中。在受污染的土壤及地下水中，三氯乙烯可以在還原脫氯或有氧共代謝後進行生物降解，生物法具有效率高、成本低、完全降解和無二次污染等優點，成為研究人員積極研究的 TCE 整治技術之一。將農業廢棄物回收再利用製備為生物碳是一種基於循環經濟的永續再利用方法，生物碳具有獨特的性能，如比表面積較大、pH 緩衝能力佳和離子交換能力高，也能改善土壤微生物的生存環境，提高土壤微生物代謝活動的強度、增加菌群豐富度及多樣性與參與微生物的胞外電子傳遞過程。使其成為一種經濟高效且環保的吸附劑及生物載體。因此，本計畫通過 Illumina MiSeq 平台使用次世代測序技術，在添加兩種生物碳後，對土壤中的微生物菌群落進行採樣，分析微生物降解 TCE 過程中對微生物的多樣性以及結構、功能的影響，並採集現地污染土壤樣品，探討 TCE 之處理效率。研究結果顯示，薄膜界面探測器(MIP)搭配 VOC 氣體偵測器可得知污染深度大多在深層污染區約 6.5 m~10.5 m 之間，本研究設井深度為 9 m 之坵土質砂層。並分別添加 2% 的竹子生物碳及椰子殼生物碳作為對照組。FTIR 結果顯示生物碳含有大量羥基、羧基、羰基等含氧官能團，可提升土壤的陽離子交換能力(CEC)，也可能間接影響微生物電子傳遞的效率。ESEM 與 BET 結果顯示椰子殼生物碳及竹子生物碳孔隙較為規則與均勻分布，且椰子殼生物碳比表面積較高，故本研究採用椰子殼生物碳及竹子生物碳兩種生物碳作為添加材料。本研究在添加椰子殼生物碳之井口土壤中，含氯污染物之轉化趨勢較為完整。透過 16S 分析結果得知，微生物群落結構之十大優勢菌屬，分別為 *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Pseudocyanosarcina*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Afipia*, *Stutzerimonas*, *Acinetobacter* and *Massilia*，且 *Cupriavidus* 與 *Sphingomonas* 占有比例非常高。本研究也顯示在菌群已穩定的土壤中添加低比例的生物碳不一定會明顯影響土壤中的細菌多樣性。在本研究的場址中，pH 值對菌群的影響能力高於含水率與電導度，其中也顯示 pH 值和含水率呈現正相關，pH 值、電導度和含水率呈現負相關。

關鍵字：生物碳；循環經濟；次世代定序；三氯乙烯；土壤污染；生物整治



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

英文摘要

Trichloroethylene (TCE) is a pollutant widely present in soil and groundwater, especially in heavily polluted industrial sites. Trichloroethylene can be biodegraded in contaminated soil and groundwater after reductive dechlorination or aerobic co-metabolism. The biological method has the advantages of high efficiency, low cost, complete degradation, and no secondary pollution, and it has become an active research field for researchers. Recycling agricultural waste into biochar is a sustainable reuse method based on a circular economy. Biochar has unique properties such as a large specific surface area, good pH buffering capacity, and high ion exchange capacity, which can also improve the living environment of microorganisms, the intensity of soil microbial metabolic activities, increase the richness and diversity of bacterial flora, and participate in the extracellular electron transfer process of microorganisms. This makes it a cost-effective and environmentally friendly adsorbent and biological carrier. Therefore, this project uses the next-generation sequencing technology through the Illumina MiSeq platform to sample the microbial community in the soil after adding two kinds of biochar and analyze the impact of changes in various operating parameters on the microorganisms in the process of microbial degradation of TCE. To collect on-site contaminated soil samples and discuss the treatment efficiency of the TCE. Preliminary experimental results show that the membrane interface probe (MIP) combined with the VOC gas detector can know that the pollution depth is mostly between 6.5 m and 10.5 m in the deep pollution area. In this study, the depth of the well is 9 m in the earthy sand layer. And add 2% bamboo biochar and coconut shell biochar, respectively, as the control group. FTIR results show that biochar contains many oxygen-containing functional groups such as hydroxyl, carboxyl, and carbonyl, which can improve the cation exchange capacity (CEC) of soil and may also indirectly affect the efficiency of microbial electron transfer. The results of ESEM and BET showed that the pores of coconut shell biochar and bamboo biochar were relatively regular and evenly distributed. The specific surface area of coconut shell biochar was relatively high. Therefore, coconut shell biochar and bamboo biochar were used as additive materials in this study. In this study, the transformation trend of chlorine pollutants in the wellhead soil added with coconut shell biochar is relatively complete. The results of 16S analysis showed that the top 10 dominant genera in the microbial community



英文摘要

structure were *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Pseudocyanosarcina*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Afipia*, *Stutzerimonas*, *Acinetobacter* and *Massilia*. Moreover, *Cupriavidus* and *Sphingomonas* account for a very high proportion. This study also showed that adding a low proportion of biochar to the soil with stabilized bacterial flora does not necessarily significantly affect the bacterial diversity in the soil. In the site of this study, the influence of pH value on the flora is higher than that of water content and electrical conductivity, which also shows that pH value and water content are positively correlated, and pH value, electrical conductivity, and water content are negatively correlated.

Keyword: Biochar, Circular Economy, Next-Generation Sequencing, Trichloroethylene, Soil contamination, Bioremediation



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

目錄

中文摘要	XXI
英文摘要	XXII
目錄	XXIV
圖目錄	XXVII
表目錄	XXX
第一章、前言	1
1.1 研究計畫背景	1
第二章、研究目的	3
第三章、文獻探討	6
3.1 土壤污染來源	6
3.2 含氯污染土壤及地下水之特性與應用	6
3.2.1 三氯乙烯污染之特性與應用	8
3.3 土壤及地下水整治技術發展趨勢	8
3.3.1 現地化學氧化技術介紹	10
3.3.2 綠色整治：生物整治工法	12
3.4 永續再利用材料：生物碳	13
3.5 土壤生態功能的微生物指標	15
第四章、研究方法與過程（含工作進度甘特圖）	18
4.1 研究流程與架構	18
4.2 實驗設備與材料	20
4.2.1 地質鑽探機(Geoprobe® 7822DT Drill Rig)	20
4.2.2 薄膜界面探測器(Membrane Interface Probe, MIP)	21
4.2.3 環境掃描式電子顯微鏡(Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM)及 X 光成份分析系統(Energy Dispersive Spectrometer, 簡稱 EDS)	



.....	22
4.2.4 元素分析儀(Elemental Analyzer, EA).....	23
4.2.5 比表面積與孔隙度分析儀(BET).....	23
4.2.6 傅立葉轉換紅外光譜儀(Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)	24
4.2.7 氣相層析質譜儀(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)	25
4.3.1 現場採樣方法.....	26
4.3.2 土壤樣品與保存.....	27
4.3.3 三氯乙烯濃度.....	28
4.3.4 生物碳製備.....	28
4.3.5 土壤 DNA 提取	30
4.3.6 次世代定序分析.....	32
4.4 工作進度甘特圖.....	37
第五章、 結果與討論（含結論與建議）	38
5.1 TCE 污染現場場址	38
5.1.1 薄膜界面探測器(MIP)探測結果	38
5.1.2 現場設井及添加生物碳情形	39
5.1.3 現地之化學環境相關資訊.....	43
5.1.4 污染物濃度.....	47
5.2 生物碳表徵分析.....	52
5.2.1 傅立葉轉換紅外光譜儀(FTIR).....	52
5.2.2 環境掃描式電子顯微鏡(ESEM).....	53
5.2.3 元素分析儀(EA).....	55
5.2.4 比表面積與孔隙度分析(BET).....	55
5.3 現地土壤樣品採集與 DNA 提取	56
5.4 土壤微生物群落多樣性.....	58



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.4.1 物種豐度圓餅圖	58
5.4.2 物種階層序列豐度	61
5.4.3 物種豐度樹形圖	63
5.4.4 物種相對豐度	65
5.4.5 物種豐度熱點	69
5.4.6 三元相圖	70
5.4.7 文氏圖	71
5.4.8 主成分分析 (PCA)	73
5.5 土壤細菌多樣性分析	74
5.6 環境因子分析	75
5.7 優勢菌種	76
5.8 結論與建議	79
5.8.1 結論	79
5.8.2 建議	81
第六章、參考文獻	82



圖目錄

圖 1 本研究受三氯乙烯污染之場址.....	5
圖 2 污染物在含水層中向下移動之特性及其存在於地下環境中之形態示意圖.....	7
圖 3 生物碳產業走向循環經濟	13
圖 4 生物碳物化特性與改性方法	15
圖 5 16S rRNA 基因測序	17
圖 6 研究架構圖	19
圖 7 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機	20
圖 8 MIP 採樣管示意圖	21
圖 9 FEI Quanta-200 掃描式電子顯微鏡.....	22
圖 10 元素分析儀	23
圖 11 Micromeritics, ASAP2020 比表面積與孔隙度分析儀	24
圖 12 Thermo iS5 傅立葉轉換紅外光譜儀.....	24
圖 13 氣相層析質譜儀	25
圖 14 整治場址設置井口配置圖	27
圖 15 生物碳製備流程與應用	29
圖 16 熱裂解過程.....	29
圖 17 試劑盒提取 DNA 之操作步驟.....	30
圖 18 Spin Columns 濾膜分離原理.....	31
圖 19 CCS read 產出示意圖	33
圖 20 MIP 探測結果.....	38
圖 21 場址地質鑽探結果剖面圖	39
圖 22 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機	
圖 23 取出原始土樣	40
圖 24 原始土樣（左）分別添加兩種生物碳（中）後顏色略微變深（右）	40



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

圖 25 椰子殼生物碳剛添加時（左）與椰子殼生物碳經過 135 天採樣（右）	41
圖 26 竹子生物碳剛添加時（左）與竹子生物碳經過 135 天採樣（右）	41
圖 27 土壤與生物碳混合均勻回填	42
圖 28 採樣時間與位置示意圖	42
圖 29 井 A pH、土壤含水率及導電度之變化曲線	44
圖 30 井 B pH、土壤含水率及導電度之變化曲線	45
圖 31 井 C pH、土壤含水率及導電度之變化曲線	46
圖 32 井 A 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線	48
圖 33 井 B 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線	49
圖 34 井 C 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線	50
圖 35 井 B、C 中心點三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度.....	51
圖 36 兩種生物碳之 FTIR 分析圖	53
圖 37 (a)500 倍率 (b)1000 倍率之原始椰子殼生物碳 SEM 圖像.....	54
圖 38 (a)8000 倍率 (b)12000 倍率之椰子殼生物碳添加至土壤中 135 天後取出之 SEM 圖像	54
圖 39 (a)500 倍率 (b)1000 倍率之原始竹子生物碳 SEM 圖像.....	54
圖 40 (a)、(b)12000 倍率之竹子生物碳添加至土壤中 135 天後取出之 SEM 圖像	54
圖 41 第四次採樣井 A 土樣(OI4)之物種豐度圓餅圖	59
圖 42 第四次採樣井 B 土樣(CSB4)之物種豐度圓餅圖	60
圖 43 第四次採樣井 C 土樣(BCC4)之物種豐度圓餅圖.....	60
圖 44 井 A 物種階層序列豐度	61
圖 45 井 B 物種階層序列豐度.....	62
圖 46 井 C 物種階層序列豐度.....	62
圖 47 物種圓形熱樹	64
圖 48 十大優勢菌屬	66



圖 49 八大優勢菌屬	66
圖 50 八大優勢菌屬於不同樣品之比例.....	66
圖 51 十大優勢菌種	67
圖 52 八大優勢菌種	68
圖 53 八大優勢菌種於不同樣品之比例.....	68
圖 54 物種分佈熱點圖	69
圖 55 不同樣品分組之間優勢菌種三元相圖.....	70
圖 56 各分組之間物種相似性	71
圖 57 不組別之間比較菌種相似度	72
圖 58 不同分組之間之 PCA 分析.....	73
圖 59 Alpha 多樣性指數箱型圖.....	74
圖 60 組間環境因子與物種關聯 RDA 分析圖	75
圖 61 優勢菌種 Spearman 相關係數圖.....	77
圖 62 優勢菌種 Spearman 相關係數圖.....	78



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

表目錄

表 1 本場址控制計畫污染整治基準表..... 9

表 2 氧化劑特性比較表 11

表 3 各生質材料製備生物碳之條件 29

表 4 採樣期間溫度、濕度與降水量 43

表 5 EA 分析數據..... 55

表 6 生物碳之比表面積、孔隙長和孔隙寬之 BET 分析結果 55

表 7 樣品名稱與分組資料 56



第一章、前言

1.1 研究計畫背景

揮發性有機化合物(Volatile organic compounds, VOC)，如醇、醛、酮、烯烴和芳香族化合物，主要來自開採、精煉、儲存、運輸和化石燃料的使用，目前已知對生態和環境具有不利影響(Zhang et al., 2017; Zou et al., 2019)。其中含氯之揮發性有機化合物毒性高、穩定性佳，是一種運用廣泛的溶劑，包括三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)和四氯乙烯(Tetrachloroethylene, PCE)，它是一種常見的環境污染物，在土壤、地下水和污泥中的氯化有機化合物最終會轉移到生物體中，對人類健康構成威脅，最近已成為世界上主要的公共衛生和環境問題。TCE 是應用最廣泛的含氯化合物之一，也是一種鹵素脂肪族之有機化合物(Khan et al., 2009; Russell et al., 1992)，由於其獨特的性能和作為溶劑的作用，它已廣泛用於提取、洗滌、噴塗和製造等工業清潔劑的成分和脫脂溶液應用，這種分子式為 $\text{ClHC}=\text{CCl}_2$ 的鹵化碳在 1960 年代和 70 年代通常用作工業溶劑，主要用途作為溶劑，可以清除金屬零件上的潤滑油脂與清理電路板，其廣泛運用在工業中，它是一種透明、無色、不易燃的液體，具有甜味的含氯有機溶劑，長期接觸易誘變致癌，並被美國環境保護署 (USEPA) 列為人類致癌物(Pierri, 2021)。由於 TCE 常因儲槽不當儲存、管線老舊腐蝕失修、任意棄置及處置不當等原因，使得這些物質成為土壤與地下水中常見之環境污染物，進而導致危害人體健康，而其處理方法也受到廣泛關注。因此，有必要使用具有成本效益且可靠的修復技術來處理被 TCE 污染的土壤與地下水。

目前現地化學氧化法、化學還原法、電化學法、物理吸附法及零價鐵還原法等技術已被應用於去除土壤及地下水中的含氯有機污染物(Dai et al., 2018)，這些技術複雜性高、成本高及容易有二次污染，在實際應上需要經濟成本相對較低及對環境較友善的方法。其中利用生物整治技術(Bioremediation)因其效率高、成本低及較無二次污染對環境友善等優勢，特別是在污染物濃度較低時可以利用微生物來控制污染濃度，所以目前生物整治技術成為研究人員積極研究的 TCE 整治技術之一。其中土壤微生物在調節土壤有機質分解和養分循環中起主要作用(Igalavithana et al., 2019; Palansooriya et al., 2019)。使用生物整治技術來整治受到含氯有機化合物污染之土壤主要是利用微生物受到刺激後，其快速變異和進化來抵抗環境脅迫，使微生物持續催化及物理運輸將污染消化分解成無毒害之副產物。鑒於土壤及地下水中 TCE 污染的嚴重性，TCE 污染整治已成為國內外研究人員



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能廣泛關注的問題。

生物碳(Biochar)因具有碳封存和土壤改良劑的能力，最近成為許多研究的焦點。生物碳是生物質熱解形成的固體產物，還有生物油和氣態產物。由於生物碳可以充當活性碳的廉價類似物，因此人們對它產生了極大的興趣(Huff & Lee, 2016; Mohan et al., 2014)。生物碳是生物質在限氧和一定溫度條件下熱裂解產生的多孔材料。碳化分解部分生物質，但保留其大部分碳含量。對生物碳的進一步興趣源於其作為土壤改良劑的用途，它能夠通過增加陽離子交換能力(CEC)以及土壤的保水性能來提高土壤的農學價值(Lehmann & Joseph, 2015)。生物碳的應用領域非常廣泛，從熱力發電、煙氣淨化、煉金應用、農牧業應用、建築材料到醫療應用等。目前生物碳較常被用於與土壤混和作為土壤改良劑，有利於改善土壤，以提高土壤肥沃度和固碳之效果(Elad et al., 2010; Ventura et al., 2013)。在不同的應用領域有不同的需求和要求，生物碳可減少溫室氣體排放與達成永續韌性之理念，在過去幾年的研究中證明生物碳在土壤中能穩定維持螯合及保留碳元素之能力(Clough et al., 2013)。

添加生物碳也可以為土壤微生物提供代謝可用的不穩定碳源，而這些化合物可以改變土壤微生物活性和群落結構(Anderson et al., 2011; Feng et al., 2015; Zimmerman, 2010)。例如，在生物碳中發現同樣變化的孔隙空間可能增加保水能力，但也會影響土壤中的微生物群。一種增加微生物活性的具體理論在生物碳改良土壤中，這種生物碳孔隙空間為細菌和真菌菌絲提供了一個物理避難所，使其免受捕食(Warnock et al., 2007)。生物碳的孔隙也可以作為真菌菌絲的棲息地，然後可以在微孔內形成孢子，從而導致更高的菌根感染率(Lehmann & Rondon, 2006)。另一個關於生物碳改良土壤中微生物群落變化的理論是，生物碳可以改善特定化合物的存在，例如揮發性有機化合物(VOC)，它們可以抑制和增強微生物過程，例如礦化和繁殖(Elad et al., 2010; Spokas et al., 2011)。因此，本計畫通過Illumina MiSeq 平台使用次世代測序技術，在生物碳添加後，對土壤中的微生物菌群落進行了採樣，分析微生物降解 TCE 過程中各運行參數的變化對微生物的多樣性以及結構、功能的影響，並利用次世代測序技術研究添加生物碳處理 TCE 污染土壤中微生物豐度及菌群結構變化，希望能釐清與解釋生物碳對土壤微生物之影響。



第二章 研究目的

第二章、研究目的

微生物在自然界中無處不在，而且其參與並承擔著重要的生態功能，從碳、氮循環，到礦物形成和風化，無一不與微生物相關。但是，目前自然界約 99% 的微生物因有限的培養基和特殊的生長條件尚未被培養與研究，換言之，應用傳統的培養方法來研究環境微生物的群落結構組成必然會忽視其中大部分的微生物，傳統的微生物培養技術不能全面、準確的對某個環境系統進行微生物多樣性的分析。因此如何準確描述和定量自然環境中的微生物群落及其同環境因素之間的關係是環境微生物學的重要研究課題之一。近年來，在環境微生物群落結構組成的研究領域中，研究人員應用多種微生物分子生物學分析和基因體學分析技術進行綜合分析。微生物分子生物學分析方法是以前微生物的基因體總 DNA 或 RNA 為分析標的，用 DNA 或 RNA 的序列多樣性來反映物種的多樣性，可以較全面地、快速地、客觀地分析微生物的群落結構組成，也可以動態分析微生物群落結構的變化情況。而透過研究和探討微生物的群落結構和動態變化，將有助於提高污染物的去除效率，為進一步優化污染物去除技術提供理論基礎。要全面系統地分析微生物的多樣性，首先要獲取 16S rDNA 基因序列，如何快速準確地獲取大量的序列資訊就顯得很重要。傳統的 Sanger 測序方法操作複雜、通量低，難於解決這個問題。近幾年，隨著分子生物學的高速發展，在 2005 年，美國 454 Life Science 公司首先推出了革命性的基於焦磷酸測序法(pyrosequencing)的次世代測序系統，將第二代測序技術推向了實際應用的市場，該技術可加深了人們對環境微生物功能變化及其與環境因子之間相互關係的認識。

生物碳可有效將廢棄物資源化，成為新興有機資源材料，與現今追求綠色能源與永續發展的策略符合，其目的旨在提升資源使用效率，達成「廢棄物資源化、資源循環再利用、零廢棄物」的願景。生物碳是生物質(如蘑菇培養土、稻草、稻殼、木材及植物等農業廢棄物)，經熱裂解(Pyrolysis)反應後的固體產物，而生物碳的特性是其表面具有許多的微小孔隙，它既能鬆軟土壤，也是能作為適合微生物生長的載體，經熱裂解後的生物碳孔隙能吸附帶電物質，因此還能增加保水性。

因此，本實驗室團隊利用次世代測序技術，分析微生物於環境工程技術中的豐度變化及菌群結構，可釐清微生物的反應機制並進一步提出提高處理效率之建議，將以受三氯乙烯污染之場址(圖1)作為研究試驗模場，土壤中的三氯乙烯污染在 8.5~9 m 的深度，規劃利用現地環境微生物進行現地厭氧生物整治，同時比較有無添加生物碳之整治效率，採用 Illumina Miseq 次世代定序技術研究 TCE 污染生物修復過程中微生物多樣性與菌群結構特徵，再通過生物資訊分析 α 多樣性



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能指數、 β 多樣性指數、相關性分析、基因功能組成差異、顯著差異性等，解析添加生物碳對土壤微生物產生之影響。利用次世代定序技術研究和探討生物整治結合生物碳技術之微生物的群落結構和動態變化，將有助於提高污染物的去除效率，為進一步優化污染物去除技術提供理論基礎，其效益優勢如下：

主要研究內容如下：

- A. 以現地厭氧生物整治 TCE 污染廠址：定期監測土壤中微生物，利用現地環境微生物進行現地厭氧生物整治，定期監測 TCE 濃度以評估本生物工法施作之可行性。
- B. 現地模場整治井及監測井設置，並利用生物整治法進行模場試驗，定期評估 TCE 降解速率以及生物法之整治效益；
- C. 利用生物整治法結合生物碳進行現地模場試驗，定期採樣與定期監測模場 TCE 之降解速率，釐清生物碳對現地微生物造成之影響，並評估其處理效益及生物碳適用性；
- D. 研究試驗廠址添加生物碳對土壤地下水整治之影響：試驗有無添加生物碳進入土壤中，對於 TCE 污染物之降解情形；
- E. 建立生物碳製備技術，生物碳不只可用農業領域，也可以應用於污染整治與減少碳排；
- F. 可得知添加生物碳對生物整治之影響，提供未來相關研究參考；
- G. 生物碳是以廢棄之稻稈、稻殼、蔗渣、蘑菇培養土等生質材料為原料，本技術既可以處理廢棄材料亦可減少碳排放，環保署積極推動永續韌性整治，本技術符合綠色永續整治概念；
- H. 研究添加生物碳對土壤微生物多樣性與菌群結構之影響：採集土壤樣品提取微生物 DNA 進行次世代定序分析，並進行相關生物資訊分析。

(一)目標效益

- (1) 降低 TCE 污染土壤及地下水處理費用；
- (2) 增進處理污染物速度及處理時效；



第二章 研究目的

(3) 減少整治對環境造成之二次污染問題。



圖 1 本研究受三氯乙烯污染之場址(紅色虛線框，總面積：6,664 m²)



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

第三章、文獻探討

3.1 土壤污染來源

土壤污染已逐漸成為繼大氣、水污染之後又一個全球性環境問題。近年來，土壤中的揮發性有機化合物 (Volatile organic compounds, VOC) 污染日漸惡化已成為全球關注的問題(Lin et al., 2018; Xu et al., 2019)，由於農作物受到污染，嚴重影響人類健康之趨勢，使得農業受到很大打擊，目前土壤污染逐漸成為全球性之環境問題。造成現今土壤污染加劇的原因有：工業化的不斷推進、礦產資源的不合理開採、金屬冶煉、排放有害污染物、長期灌溉農作物、人類活動造成的大氣沉降，以及化學肥料和農藥的使用。這些有害污染物可以處理、再利用和回收，但大量有害物質會釋放到大氣、水圈和岩石圈中。許多揮發性有機化合物會透過揮發被釋放到環境中，包括醇、醛、酮、脂肪族、芳香族和鹵素化合物(Zhang et al., 2017; Zou et al., 2019)，直接或間接排放到大氣和水圈（即湖泊、河流和溪流的地表水）中，使有機化合物排放導致污染地表土壤和地下含水層(White & Claxton, 2004)。

3.2 含氯污染土壤及地下水之特性與應用

含氯揮發性有機化合物 (CVOC)，如二氯乙烷 (1,1-Dichloroethane)、1,2-二氯乙烷 (1,2-Dichloroethane)、1,1-二氯乙烯 (1,1-Dichloroethylene, 1,1-DCE)、順-1,2-二氯乙烯 (cis-1,2-Dichloroethylene, cis-1,2-DCE)、反-1,2-二氯乙烯 (trans-1,2-Dichloroethylene, trans-1,2-DCE)、三氯乙烯 (Trichloroethylene, TCE)、四氯乙烯 (Tetrachloroethylene, PCE) 和 氯乙烯 (Vinyl chloride, VC)，其為緻密非水相液體 (DNAPLs) (Chen & Wu, 2017; Perez-de-Mora et al., 2014) 並廣泛應用於清潔、提取、泡沫、噴霧和溶劑製造行業。其特性有助於其通過土壤層遷移到地下水中(Pavlostathis & Jaglal, 1991; Russell et al., 1992)，由於其比重大於水(>1)，水溶性低且密度大於水，且在水中的溶解度與溶解速率低，DNAPLs 污染物是一種在污染場地普遍存在的頑固化合物(Dong et al., 2016; He et al., 2015)，DNAPLs 具有穩定的化學結構，在環境系統中降解非常緩慢(Fu et al., 2014; Hiortdahl & Borden, 2014; Tang et al., 2015)。由於低溶解度和高密度，DNAPLs 會逐漸地向下沉降直至遇到不(或低)透水性的土壤層為止，因此容易污染土壤及地下水資源，會對環境構成嚴重威脅(Flores Orozco et al., 2015; Power et al., 2014)。當 DNAPLs 滲入至地下環境後，在沉降擴散的過程中通常會以四種相態存在，包括揮發性氣態



第三章 文獻回顧

(gaseous vapor)、水相溶解態(dissolved phase)、殘留態(residual)，及自由相(free-phase)形態分佈於土壤及地下水環境中(Brusseau et al., 2001)，其污染概念如圖2所示。而土壤受 DNAPLs 污染問題最為棘手之處，是需要精確定位及評估這些滲入於土壤孔隙或夾層中的 DNAPLs 濃度含量(包括殘留或自由相態 DNAPLs)，因此 DNAPLs 污染場址的整治完成時間經常非常長；這些殘留的污染溶劑在自然的情況下是會經過非常緩慢的過程(數十年甚或百年之久)才能完全溶解轉入地下水溶液相中，也因此 DNAPLs 的存在往往形成地下水環境裡的另一種長久性的「污染源」，它緩慢釋出的量雖不多，但卻極可能危害人體健康。

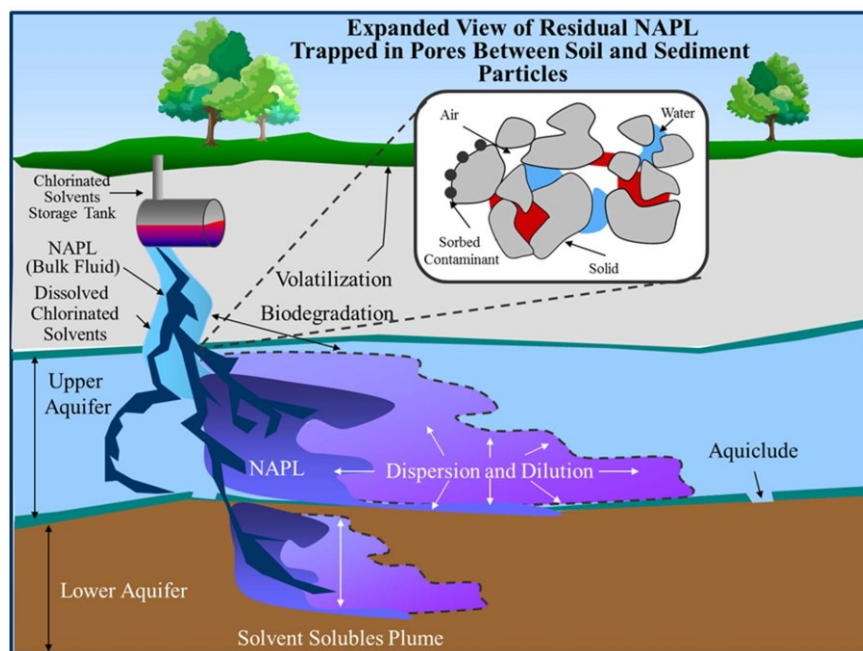


圖 2 污染物在含水層中向下移動之特性及其存在於地下環境中之形態示意圖(Brusseau et al., 2001)



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

3.2.1 三氯乙烯污染之特性與應用

三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)為揮發性有機化合物(VOC)(Pant & Pant, 2010)，是一種廣泛存在易誘變致癌之溶劑，它無色，有毒性、透明、易流動、不燃燒、易揮發，具有芳香味的液體，對神經有麻醉作用。三氯乙烯一旦發生發生意外或不慎洩漏到土地時，由於在長時間重力作用，會滲入土壤並到達地下環境中，而部分三氯乙烯會被截留在土壤中。三氯乙烯在一定條件下很容易被收集，甚至轉化為毒性更大的氯乙烯，對生物系統構成嚴重威脅(Baken et al., 2018)。現有證據顯示，三氯乙烯是全球許多工業區土壤和地下水污染中最廣泛存在的有機化合物之一(Dong et al., 2019)。純三氯乙烯分解緩慢，當有紫外線照射三氯乙烯與氧氣混合物時，可加速三氯乙烯分解。這使得處理受三氯乙烯污染之課題更具挑戰性，因為許多行業將其洩漏已不可避免地導致土壤和地下水受到三氯乙烯污染。三氯乙烯已被證實會引起實驗動物及細胞之毒性，並產生嚴重的毒性作用，將會永久阻礙一些細胞功能，例如：腫瘤和癌症（例如腎癌、肝癌和肺癌）的來源，並被國際癌症研究機構(IARC)和美國環境保護署(US EPA)列為人類致癌物。US EPA 分別為 TCE 設定了 5 ppb 和 0 ppb 的最大污染濃度和污染濃度目標，以保護人類健康(Al-Shamsi & Thomson, 2013; Lash et al., 2014; Watson et al., 2006)。易誘變致癌物 TCE，由於其獨特的性能和作為溶劑的作用，它已廣泛用於提取、洗滌、噴塗和製造等工業清潔劑的成分和脫脂溶液應用，儘管其釋放到環境中並影響岩石、水文和生物圈平衡，但其處理要求卻被忽視了(Aviado et al., 2018; Guha et al., 2012)。TCE 在空氣中會迅速揮發，在土壤及地下水中分解的速度非常緩慢會因無法蒸發而長期殘留於其中，TCE 污染之液體為(DNAPLs)，也可能影響土壤和地下水、微生物群落結構和代謝活動(Nemir et al., 2010)。

3.3 土壤及地下水整治技術發展趨勢

為了讓民眾及下一代子孫能有著舒適健康的生活環境，對於土壤及地下水環境保護及其污染整治已到了刻不容緩的地步。在民國八十九年二月二日「土壤及地下水整治法」的立法公布實施後，明確指出各項土壤、地下水標的污染物及整治基準如表1所示，當土壤及地下水污染濃度到達法規管制標準時，該場址予以列為控制場址，而當控制場址經初步評估後，如有危害人民健康和生活環境之虞者，所在地主管機關應報請中央主管機關審核後公告為整治場址。未來舊有污染廠址不斷的被發現，而新興污染物持續增加的情況下，土壤及地下水整治工作勢必日



第三章 文獻回顧

趨繁重。

表 1 本場址控制計畫污染整治基準表

土壤標的污染物	三氯乙烯		
整治基準	< 60 mg/kg		
地下水標的污染物	三氯乙烯	順1,2-二氯乙烯	氯乙烯
整治基準	<0.05 mg/L	<0.70 mg/L	<0.02 mg/L

目前，土壤污染整治技術主要有生物降解(Lihl et al., 2019; Rong et al., 2021)、氫還原(Luo et al., 2020)、化學氧化(Schaefer et al., 2018)、吸附(Jedynak et al., 2015)和零價鐵還原(Fu et al., 2014)等技術，已應用於處理受到含氯有機污染物之土壤和地下水中。污染場址整治技術可依受污染之土壤或地下水是否取出、整治之機制、污染程度之處理差異及待整治之污染物濃度與種類，可分為現地處理法(In-situ treatment)及離地處理法(Ex-situ treatment)。本研究現地模場場址主要污染物包括三氯乙烯及其衍生產物氯乙烯，而國內外現行處理前述土壤及地下水污染物可使用之整治技術眾多，包括開挖移除(Excavation)、土耕法(Land farming)、生物堆(Biopiles)、植生復育法(Phytoremediation)、土壤氣體抽除法(Soil vapor extraction)、地下水氣提法(Air sparging)、現地化學氧化(In-situ Chemical Oxidation)、現地生物整治(In-situ Bioremediation)、地下水抽除處理(Pump & trap)、雙相抽除處理法(Dual Phase Extraction)、熱處理法(Thermal Remediation)、透水性反應牆(Permeable Reactive Barrier)、開挖移除(Excavation)及監測式自然衰減(Monitoring Natural Attenuation)等。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

3.3.1 現地化學氧化技術介紹

現地化學氧化技術(ISCO)可以在現地，將氧化劑送入土壤及地下含水層中，利用氧化劑將目標污染物破壞並降低其質量、毒性及移動性的方法。氧化劑輸送通常通過垂直直推式注入探頭滲透或垂直地下水井沖洗來完成，也可採用其他輸送方法，如水平井、滲透廊、土壤混合和水力或氣壓壓裂(Siegrist et al., 2011)。目標污染物可在與氧化劑初次接觸時被破壞，然而，化學氧化反應是短暫的，因此限制了每個注入點，由於這個原因，在採用 ISCO 需要多次注入加上每次注入氧化劑之間隔時間不可以過長。除了是短暫的，氧化劑可能對目標污染物沒有選擇性。氧化劑若注入過多還可能留下不希望的副產物或殘留物，這些副產物或殘留物會進一步損害現地微生物降解或干擾土壤中的未來反應(Siegrist et al., 2011; Stroo et al., 2012)。

目前有幾種不同的氧化劑配方可於各種污染場址中應用。目前有幾種常的氧化劑種有高錳酸鹽(MnO_4^-)、Fenton 試劑($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$)或 Fenton-like 試劑($\text{H}_2\text{O}_2 +$ 現地土壤鐵礦)、臭氧(O_3)及過硫酸鹽($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$)等4種，其特性比較如表2。其中臭氧則是在常溫常壓下為氣態，對水的溶解度有限，較不適合地下水污染處理。Fenton 氧化反應後之三價鐵錯合物亦可能造成井篩或土壤孔隙間之阻塞。ISCO 技術缺點：在某些土壤及含水層中，天然氧化物質之氧化劑消耗量可能相對偏高；氧化劑在土壤及地下水環境反應速率快，但持久性較差，過一段時間濃度易恢復高濃度；運作強氧化劑所衍生的工業安全衛生問題，溶劑可能造成灼傷或易因化學品不穩定引起爆炸或火災；滲透性反應阻牆法，容易造成土壤孔隙阻塞問題。因此，利用生物整治技術其效率高、成本低及較無二次污染對環境友善等優勢，特別是在污染物濃度較低時可以利用微生物來控制污染濃度，成為研究人員積極研究的 TCE 整治技術之一。



第三章 文獻回顧

表 2 氧化劑特性比較表(Huling & Pivetz, 2006)

氧化劑	反應物	反應物 型態	藥劑持久 性	可能限制
高錳酸鉀	MnO_4^-	粉末、液 態	>3 個月	氧化過程中產生二氧化錳副產物 沉澱，可能造成土壤孔隙阻塞而 使孔隙率降低影響氧化劑傳輸。
Fenton 試劑	$\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 $\cdot\text{HO}_2$ 、 HO_2^-	液態	數min至 數小時	過氧化氫需維持酸性環境，且影 響半徑較小。
臭氧	O_3 、 $\cdot\text{OH}$	氣態	數min至 數小時	臭氧活性及腐蝕性強，且反應速 率快，影響半徑小，對水的溶解 性有限，較不適合地下水污染處 理。
過硫酸鹽	$\cdot\text{SO}_4^-$	粉末、液 態	數小時至 數週	過硫酸鹽以自由基氧化方式為反 應作用機制，可以二價鐵予以活 化產生自由基，然其活化程序控 制條件較為複雜，為過硫酸鹽成 功應用關鍵影響因素。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

3.3.2 綠色整治：生物整治工法

微生物在自然界無處不在，而且其參與並承擔著重要的生態功能，從碳、氮循環，到礦物形成和風化，無一不與微生物相關。但是，目前自然界約99%的微生物因有限的培養基和特殊的生長條件尚未被培養與研究(Kellenberger, 2001; Ward et al., 1990)，微生物通過三個主要代謝過程被指定為 TCE 的生物降解劑，包括還原二氯化、共代謝和直接氧化(Pant & Pant, 2010)。換言之，應用傳統的培養方法來研究環境微生物的群落結構組成必然會忽視其中大部分的微生物，傳統的微生物培養技術不能全面、準確的對某個環境系統進行微生物多樣性的分析。因此如何準確描述和定量自然環境中的微生物群落及其同環境因素之間的關係是環境微生物學的重要研究課題之一。

近年來，生物修復已被研究用於處理許多污染物，例如石油和碳氫化合物、重金屬、含氯化合物或不同類別的農藥。現地生物整治技術促進了污染場地污染物的降解，使生態系統完好無損，是一種非侵入性、對生態友好的技術(Perelo, 2010)。其中包括生物刺激、生物強化和植物修復。生物刺激的特點是改變影響天然微生物群的因素，例如添加營養物或電子受體，以提高其降解能力(Tyagi et al., 2011)。生物刺激技術還可用於對被其他污染物(例如柴油化合物)污染的場地進行生物修復，其中添加大量營養素會增加生物柴油相對於自然衰減的生物降解(Meyer et al., 2018)，另一個例子是使用強制曝氣和添加不同的基質和生物質(Alvim & Pontes, 2018; Decesaro et al., 2017)；此外，這種生物修復技術可以與生物強化一起使用，以提高本土微生物群對感興趣的化合物進行生物降解的能力，從而優化過程的效率(de Souza Pohren et al., 2016)。加強式生物整治(Enhanced Bioremediation)乃是提供地下環境中生物生長之有利條件，以加速污染物分解，其常見處理方式可分為生物添加法(Bioaugmentation)及生物促進法(Biostimulation)兩大類。生物添加法係添加外來具有特殊分解能力之微生物進入地下環境，以加速污染物之分解作用，為此法由於添加外來菌種，添加於地下後與現地菌種之競爭能力較難掌握，實際操作有其困難度。而生物促進法係以人為添加營養源(無機物或有機物)於地下環境中，促進污染物之分解作用，以達到污染整治之成效，其操作容易對地下環境影響低。加強式生物整治是污染環境生物修復研究最多的策略之一，它包括在污染地點接種適應微生物，適用於所需化合物的降解(Cycon et al., 2017)。此技術的困難之一是污染物的生物利用度，它需要易於被當地微生物群或接種微生物降解(Gonçalves & Delabona, 2022)



第三章 文獻回顧

3.4永續再利用材料：生物碳

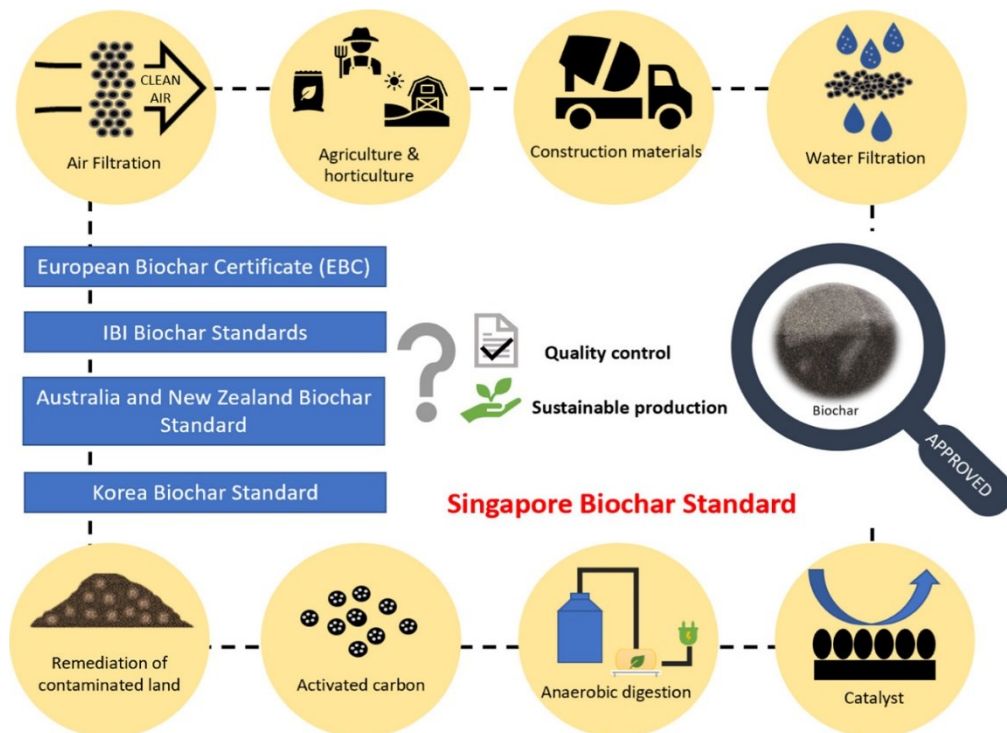


圖 3 生物碳產業走向循環經濟(Hu et al., 2021)

根據國際生物碳倡議組織(International Biochar Initiative, IBI)所採用的定義中，生物碳(Biochar, BC)是一種在限氧環境中通過生物質(Biomass)經過高溫熱裂解轉化獲得的多孔富含碳的固體有機物熱穩定產品，用於在土壤中安全和潛在有益的儲存。它與熱化學轉化與其他固體產品的不同之處在於，長期碳儲存是主要目標，而不是為加工工業或燃料(如木炭、焦炭和活性炭)創造原料。由於這種獨特的功能，並且通常是幾種功能的組合，例如土壤改良或修復，對生物碳的要求不同於固體碳質殘渣的其他用途。特別是有必要確保通過任何特定技術從特定原料生產的生物碳至少對環境無害，甚至具有積極影響(例如，對植物生長、土壤結構、地下水文等)(Sohi et al., 2009)。熱解過程中生產的生物油具有良好的發電原料，因為它含有高能量，在某些情況下可與升級後的化石燃料相媲美(Park et al., 2008)。熱解中產生的生物碳也確實含有高能量，在某些情況下，它與工業中用作燃料原料的煤相當(Fu et al., 2012; Mohanty et al., 2014)。生物碳的微孔結構和高碳含量使其可用於多種工業應用。在農業中，可用作在土壤中封存碳以抵消溫室氣體 (GHG) 排放的工具，也可用作土壤改良劑，其增加土壤中的固碳速率，也減緩了土壤中養分的分解速度，從而提高了土壤質量(Khare & Goyal, 2013; Malghani et al., 2013; McHenry, 2009)。在發電中，生物碳可以用作燃料，因為生物碳中的碳含量很高，



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

可以用作燃料(Tripathi et al., 2016)。生物碳是一種相當古老的技術，大約1000年前亞馬遜印第安人使用生物碳改良土壤來提高土壤肥力；這些土壤通常被稱為 Terra Preta (de Indio)(Lehmann & Joseph, 2015)。在過去的幾年裡，生物碳因其儲存碳的潛力而備受關注，否則這些碳會礦化為 CO₂，從而影響地球氣候(Kuzyakov et al., 2014)。

近年來，生物碳已被推廣為一種在應用於土壤時可以提供多種環境效益的技術，包括長期固存土壤中的碳(Woolf et al., 2010)，在農業及環境領域的應用受到廣泛關注，不僅能夠增強土壤肥沃度，還能固定與降解土壤污染物，從而降低污染物對土壤生態系統的毒性效應。由不同生物質材料製成的生物碳具有不同的形態和化學性質，而且根據不同的熱解條件（即最終熱解溫度或峰值溫度、炭化速率或升溫速率以及炭化時間持續時間）而具有不同的特徵(Mukherjee & Lal, 2013; Mukherjee et al., 2011)。生物碳具有較大比表面積、pH 緩衝能力強、離子交換能力強等獨特性能，被認為是一種經濟高效、環保高效的多功能吸附劑(Huang et al., 2020)。此外，生物碳已被證明通過改善離子交換特性、增加土壤 pH 值和增強保水能力對許多物理化學和生物土壤特性產生積極影響(Ye et al., 2020)。作為土壤改良劑，生物碳可用作肥料來結合有毒污染物，例如重金屬(Song et al., 2020)，並刺激土壤微生物活動(El-Naggar et al., 2018)。研究也顯示，生物質的類型、預處理方法和熱解條件(溫度、持續時間和載流氣體種類)會影響生物碳的理化性質(Cao et al., 2013)。

土壤微生物的生長代謝活動是驅動土壤元素循環和有機污染物降解的主要動力，也是反映土壤健康狀況的重要指標。相關研究指出，生物碳不僅能夠改善土壤微生物的生存環境，提高土壤微生物代謝活動的強度(Zhu et al., 2017)、增加菌群豐富度及多樣性(Siedt et al., 2021)，還能參與微生物的胞外電子傳遞過程(Kappler et al., 2014)。目前，大部分學者認為，生物碳能夠提高微生物豐度的重要原因之一為其多孔隙結構和豐富的比表面積，為土壤微生物提供了適宜的棲息地(Zhu et al., 2017; 饶霜 et al., 2016)。同時，生物碳本身(Ippolito et al., 2020)富集了許多營養元素，可作為養分來源為微生物提供氮、磷、鉀等以及生物質原材料中具有微量元素(Ippolito et al., 2020)。生物碳還含有大量陰離子和羥基、羧基、羰基等含氧官能基，使其表現出較大的陽離子交換能力(CEC)，CEC 的提升可增加土壤對養分的保有能力以支持微生物的活動(Kong et al., 2014)。然而，工程生物碳或生物碳複合材料可以很好地替代原始生物碳，因為這些生物碳具有在土壤中的各種應用潛力(如原始生物碳)，但更重要的是，它們可能含有營養物質並從基質中緩



第三章 文獻回顧

慢釋放，從而改善他們的功能。工程生物碳或生物碳複合材料是用金屬、奈米材料、微生物和氫氧化物等材料改性的原始生物碳的形式(圖4)(Wang et al., 2021)。

綜上，生物碳不僅能通過其豐富的孔隙結構為土壤微生物提供良好的生存空間，還能直接或間接地為土壤微生物提供氮、磷、鉀等營養物質(Palansooriya et al., 2020)。生物碳的上述正面作用可能是通過促進微生物生長代謝活動來達成的。而目前對生物碳影響微生物代謝活動的相關機制並不明確，不利於生物碳的永續發展應用。因此，本計畫研究生物碳的添加對土壤生物整治的影響顯得十分重要。

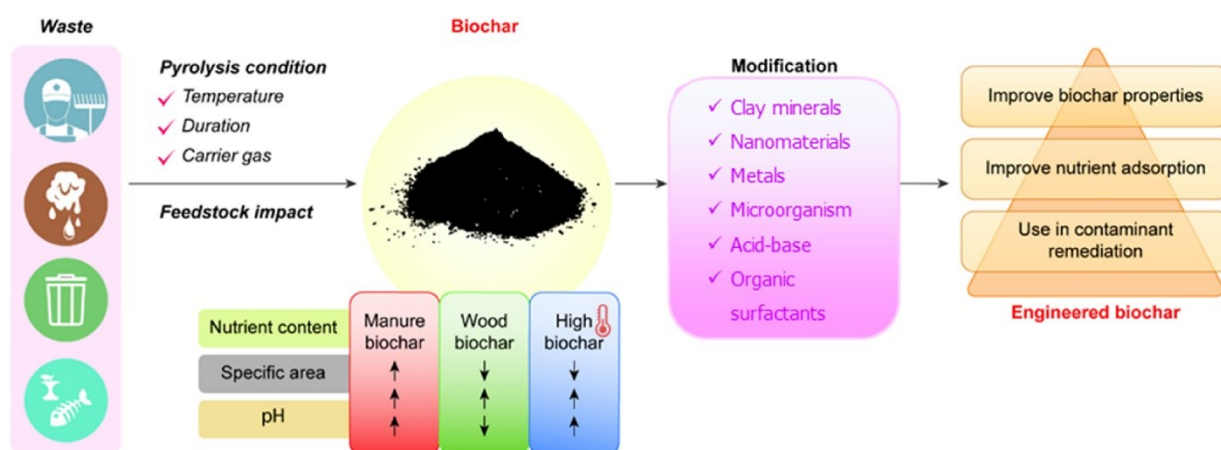


圖 4 生物碳物化特性與改性方法

3.5 土壤生態功能的微生物指標

土壤中生物多樣性比陸地上生物多樣性還高(Thiele-Bruhn et al., 2012)。土壤是生物多樣性最重要的儲存庫之一(Gardi & Jeffery, 2009)。土壤生物多樣性的生物群落在生態系統中扮演重要的角色，例如有機化合物的分解、養分循環和生物擾動(Birkhofer et al., 2011; Thiele-Bruhn et al., 2012)。土壤中與生態功能指標最相關的可以觀察微生物特徵：生物資源、植物檢疫以及碳轉化和植物營養的功能(Nikitin et al., 2022)。生物多樣性是生物體及其所屬生態複合體之間的變異性，包括物種內(遺傳多樣性)、物種間和生態系統的多樣性。土壤生物多樣性涵蓋生活在土壤中的所有生物體，無論是單細胞生物體還是多細胞動物或植物，可以使用傳統分類技術或通過獨特的 DNA 或 RNA 進行遺傳分類(Nielsen et al., 2015; Wardle, 2006)。計算微生物群落的多樣性和分類結構指數以及某些微生物類群的豐度來表徵土壤的生物資源功能。在環境微生物群落結構組成的研究領域中，研究人員應用多種微生物分子生物學分析和基因體學分析技術進行綜合分析。微生物分子生物學分析



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

方法是以微生物的基因體總 DNA 或 RNA 為分析標的，用 DNA 或 RNA 的序列多樣性來反映物種的多樣性，可以較全面地、快速地、客觀地分析微生物的群落結構組成，也可以動態分析微生物群落結構的變化情況(Furrie, 2006)。而透過研究和探討微生物的群落結構和動態變化，將有助於提高污染物的去除效率，為進一步優化污染物去除技術提供理論基礎。要全面系統地分析微生物的多樣性，首先要獲取 16S rDNA 基因序列，如何快速準確地獲取大量的序列資訊就顯得很重要。微生物體研究最常使用微生物的 16S 核糖體基因（16S rRNA gene）作為研究標的，16S 核糖體基因擁有 9 個高度變異區域(Caporaso et al., 2011; Segata et al., 2011; Youssef et al., 2009)，在次世代定序時代（Next Generation Sequencing, NGS）由於序列讀長的關係，研究通常只能被迫選擇 1 至 2 個變異區段進行微生物的物種群落分析，但只取核糖體基因的部分變異區片段將失去其他變異區所能提供的重要的研究資訊，加上 16S 核糖體基因的變異相對保守，有時很難僅由部分區段的差異有效的區分微生物的不同。傳統的 Sanger 測序方法操作複雜、通量低，難於解決這個問題。近幾年，隨著分子生物學的高速發展，在2005年，美國454 Life Science 公司首先推出了革命性的基於焦磷酸測序法(Pyrosequencing)的次世代測序系統，將第二代測序技術推向了實際應用的市場，該技術可加深了人們對環境微生物功能變化及其與環境因子之間相互關係的認識。而最近第三代長讀長定序技術可以有效的將完整的微生物體 16S 核糖體基因全部解序，可以同時利用所有的變異區資訊進行微生物的物種分析，完整的 16S 基因提供更好的分類分辨率約 1500 bp 的 16S rRNA 基因包含九個可變區(圖 5 所示)(Johnson et al., 2019)。因此，本計畫應用第三代次世代測序技術，分析微生物降解 TCE 過程中各運行參數的變化對微生物的多樣性以及結構、功能的影響，並利用次世代測序技術研究添加生物碳處理 TCE 污染土壤中微生物豐度及菌群結構變化。



第三章 文獻回顧

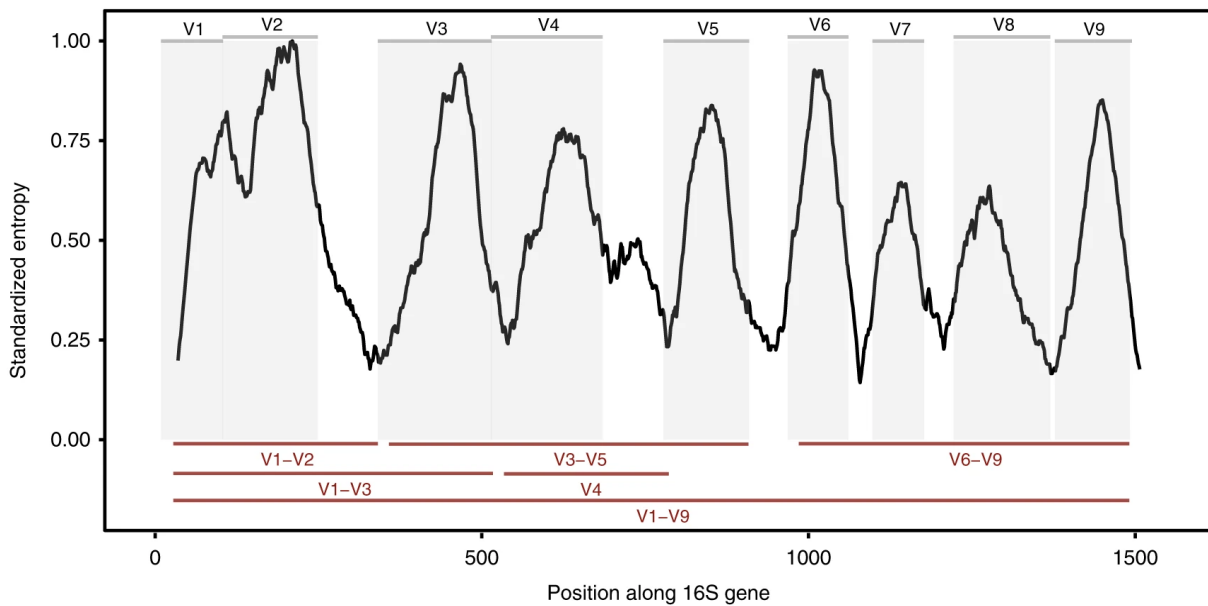


圖 5 16S rRNA 基因測序(Johnson et al., 2019)

如上述可得，生物碳對加強微生物降解目標污染物具有很大的前景，微生物結合生物碳的條件下，這種加強作用不單單只有生物碳的吸附作用，可以進一步觀察菌群群落之間的變化解析促進降解污染物的機制。此外，生物碳在構建微生物空間分佈中的多重和動態作用值得深入探索。在本研究中，我們通過次世代定序技術分析附著在生物碳表面的微生物，以全面了解生物碳對混合培養微生物群落中 TCE 生物降解、生物多樣性及結構功能的影響。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

第四章、研究方法與過程（含工作進度甘特圖）

4.1 研究流程與架構

本計畫研究架構圖如圖 6 所示。本計劃針對模場試驗，並採集現地污染土壤土樣，以生物整治結合生物碳進行處理設計與試驗，以臺南市某處受 TCE 污染之場址進行試驗，過程主要以厭氧生物整治與添加生物碳，探討目標污染物之處理效率。首先進行模場現地調查及規劃，並進行現地整治系統設置(包括整治井、灌注系統、循環系統、泥漿相反應槽設置等)，再以生物整治法利用現地環境微生物加入生物碳及在必要時添加生物基質，以提升生物去除和降解污染物之效果，強化現地整治成效。將生物碳投入加強式生物整治法(Enhanced Bioremediation)提供土壤及地下水環境中生物生長之有利條件，以利加速污染物分解，其常見處理方式可分為生物添加法及生物促進法兩大類。營養源及生物碳添加量及評估方式則依據已施作之厭氧生物工法區域為參考準則。生物基質灌注後土壤及地下水分析項目分為以下項目：污染物濃度分析、生物碳材料分析及微生物定序分析。本研究鑽探工程之鑽探方法，係採用旋轉式鑽探工法，以 HQ(岩心直徑 63.5 mm)三套管岩心夾取器進行土壤及岩心連續全取樣，以了解地層地質之連續性分佈。並在每階段完成時，採集樣品後將樣品置於 4°C 保冰袋中保存運送回實驗室，微生物樣品以 -20°C 冷凍櫃保存。待提取 DNA 後以次世代定序分析，並由分析結果進行討論。



第四章 研究方法與過程

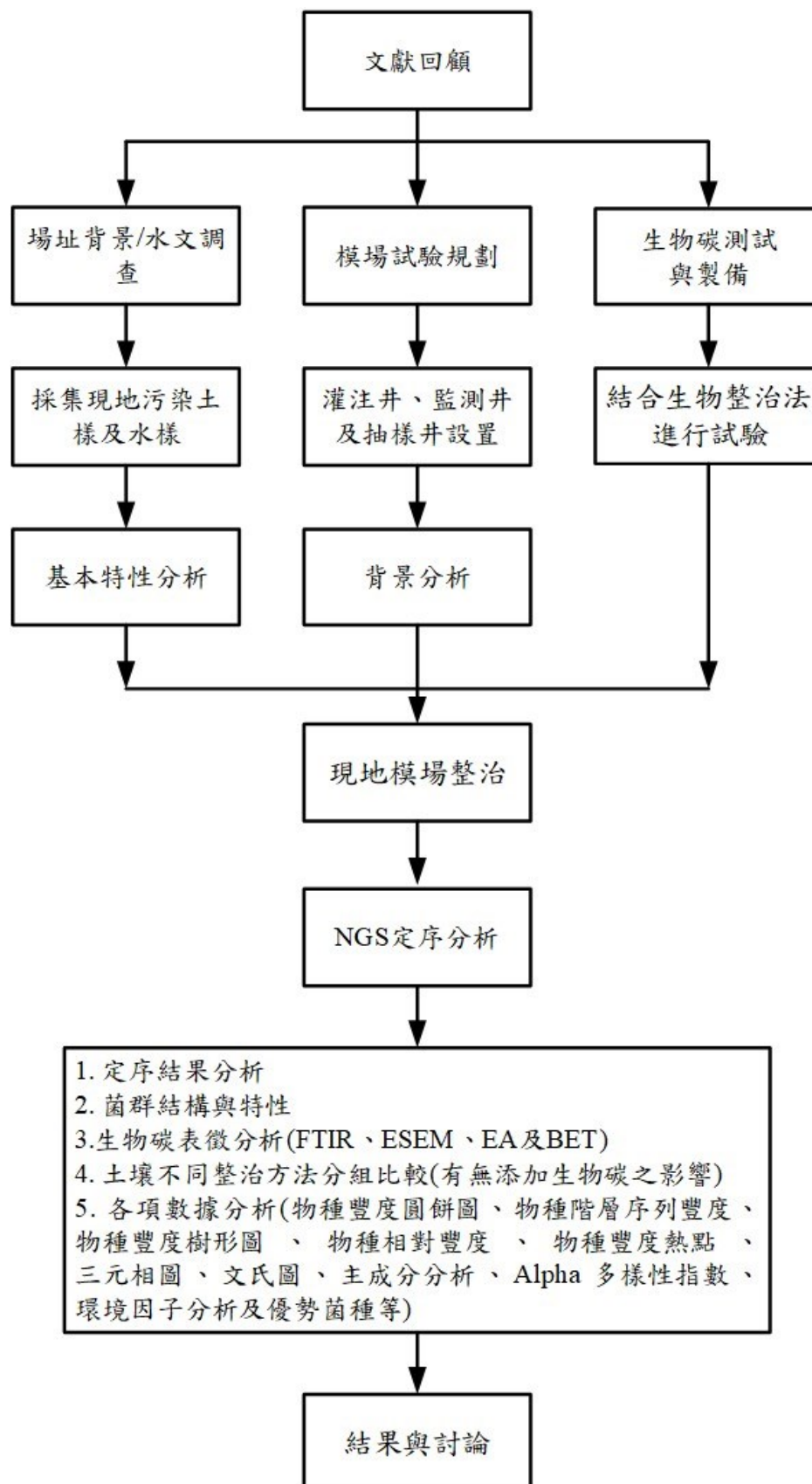


圖 6 研究架構圖



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

4.2 實驗設備與材料

4.2.1 地質鑽探機(Geoprobe® 7822DT Drill Rig)

本研究使用 Geoprobe® 7822DT(如圖 7)地質鑽探機進行現地採樣、鑽井及相關探測等，7822DT 利用機、液、電三方共同運作和控制，使用直推鑽具或套管鑽具完成無排渣土壤污染調查和修復工作，配備衝擊動力頭，高轉速完成堅硬場地的研磨開孔施工和岩芯取樣，配備螺旋動力頭，能夠只使用一台機器就可以處理各種環境、岩石土層工程和勘探應用，減少了每次需要調動多個功能有限的儀器，從而節省了時間和金錢。7822DT 的設計和製造與傳統鑽機一樣，不同的是相較於傳統鑽探機 7822DT 更易於運輸，且它可以收成很小的體積佔地面積更小，這使得它可以很順利地通過狹窄的空間進行現地採樣、鑽井及相關探測等。7822DT 具有穩定的履帶底座，非常適合遇到崎嶇地形和傾斜表面的越野條件，可用於傾斜探測、直推土壤取芯、標準貫入試驗、直推地下水取樣、直推/螺桿鑽監測井設置、地下存儲罐調查、土壤取樣和地下水取樣、監測井建設、平整土地或者場地內鑽桿運輸等，能完成各種口徑的監測井設置等施工，實現不用取出土壤樣品，直接監測地下土層性質(Geoprobe®, 2020)。



圖 7 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機(Geoprobe®, 2020)

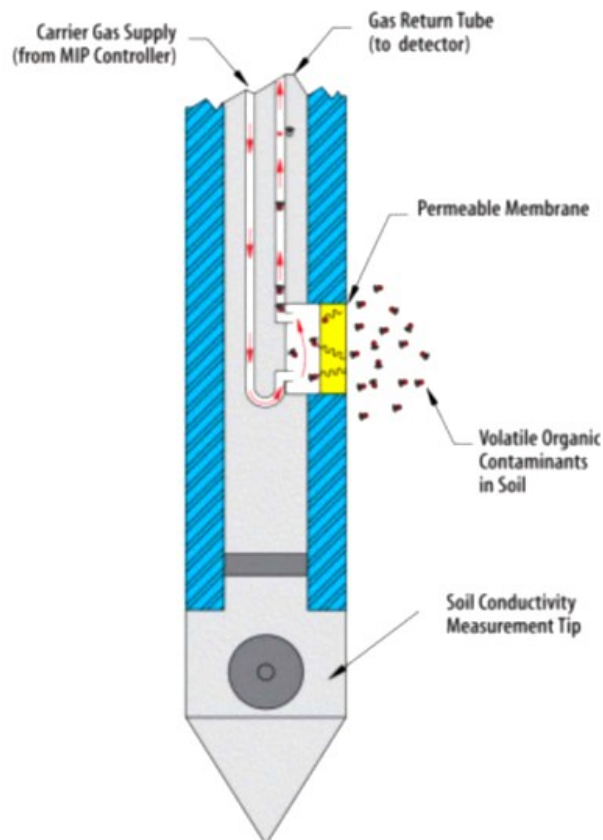


第四章 研究方法與過程

4.2.2 薄膜界面探測器(Membrane Interface Probe, MIP)

本研究使用薄膜界面探測器(MIP)是一種快速、高分辨率的即時 VOC 篩查技術，由直接注入錐形裝置、連接傳感器的保護套管和大型鑽孔機組成。當探頭被驅動到地下時，液壓剖面分析工具(Hydraulic profiling tool, HPT)以高壓向相鄰材料噴灑流體，並通過檢測材料內液壓的釋放來確定水力傳導率。可提供有關 VOC 相對濃度和土壤岩性以及離子污染物或鹽水入侵的存在的實時數據，MIP 技術已成功用於許多地點，例如用於 DNAPLS 描繪和表徵。該技術展示了與分析結果的良好相關性，並通過提供用於優化地下水採樣程序的實時信息可節省成本。MIP 由兩個主要部分組成：地面儀器和井下探頭，如圖 8 所示 MIP 可以從地下收集氣態樣本，並將採樣的蒸汽傳輸到地面氣相色譜儀(GC)上配備的檢測器，並提供隨深度增加的 VOC 實時分佈圖。有一個滲透膜作為檢測器管路的接口，透過載氣(例如氮氣)將污染物轉移到 GC 檢測器。兩個檢測器——光離子化檢測器(PID)和火焰離子化檢測器(FID)——安裝在 GC 中，用於檢測有機化合物的存在(Mousavi et al., 2021)。

圖 8 MIP 採樣管示意圖(Christy, 1998)





以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

4.2.3 環境掃描式電子顯微鏡(Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM)及 X 光成份分析系統(Energy Dispersive Spectrometer, 簡稱 EDS)

本研究使用 FEI Quanta-200 環境掃描式電子顯微鏡(如圖 9 所示)，主要是利用微小聚焦的電子束(Electron Beam)進行樣品表面掃描，能控制試件艙之真空度從高真空到接近大氣壓變化，試件艙可在極低氣壓環境下運作的 ESEM，加裝能量分散式光譜儀(EDS)，可針對樣品進行微區元素定性及半定量分析、元素分佈等分析。此電子顯微鏡除具有一般場發式超高解析及快速分析的功能外，有三個真空操作模式可選擇(high-vacuum, low-vacuum and ESEM)，可在具有濕度環境下，對於不便進行乾燥、導電等前處理之濕樣品，用 ESEM mode 直接觀察，是目前最先進之複合型電子顯微鏡之一，在應用上極為廣泛(中山大學貴重及共用儀器中心, 2021)。此電子束(Electron Beam)與樣品間的交互作用會激發出各種訊號，如：二次電子、背向散射電子及特性 X 光等，SEM 主要就是收集二次電子的訊號來成像。X 光成份分析系統是一種用於元素分析和化學表徵的分析方法，其通過收集 X 射線機或其他 X 射線源產生的 X 射線和樣品交互作用時發出的 X 射線進行分析。由於不同元素因原子結構不同而發射譜各異，所以可以通過分析 X 射線譜分辨樣品所含的不同成分。



圖 9 FEI Quanta-200 掃描式電子顯微鏡(中山大學貴重及共用儀器中心, 2021)



第四章 研究方法與過程

4.2.4 元素分析儀(Elemental Analyzer, EA)

本研究使用 Elementar UNICUBE 元素分析儀(如圖 10 所示),儀器分析方法是利用垂直式燃燒管,將欲分析之物質盛於錫/銀金屬容器內,置於樣品自動供給器上,利用重力原理,定期加入 1150°C 左右燃燒管,在錫/銀之助燃下使樣品瞬間燃燒溫度高達 1800°C,促使樣品足以完全燃燒,再經過銅還原處理後,生成之 N_2 、 CO_2 、 H_2O 混合物經過特殊之分離管分離後,可利用熱傳導偵檢器(TCD)分別測定其含量,再經資料處理機運算,即可自動列計碳、氫、氮及硫之重量百分比(Elementar, 2020)。



圖 10 元素分析儀(Elementar, 2020)

4.2.5 比表面積與孔隙度分析儀(BET)

本研究使用 Micromeritics, ASAP2020 比表面積與孔隙度分析儀(如圖 11 所示),透過氣體吸附法測定比表面積原理,是依據氣體在固體表面吸附特性,在一定的壓力下,被測樣品顆粒表面在超低溫下對氣體分子具有可逆物理吸附作用並對應一定壓力存在之確定吸附量。透過平衡吸附量,再利用理論模型來求出被測樣品之比表面積。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能



圖 11 Micromeritics, ASAP2020 比表面積與孔隙度分析儀

4.2.6 傅立葉轉換紅外光譜儀(Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)

本研究使用 Thermo iS5，利用化合物分子中的官能基(Functional Group)吸收特定波長的紅外光作用引起振動和轉動能階的遷移所產生的紅外線吸收光譜，經過傅立葉轉換之運算而形成樣品之紅外光吸收頻譜，藉以得知樣品對紅外線之反應及其光電與生物特性，大多用於官能基的鑑定。



圖 12 Thermo iS5 傅立葉轉換紅外光譜儀



第四章 研究方法與過程

4.2.7 氣相層析質譜儀(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

GC(Gas chromatography，氣相色譜法)是使用溫度控制的毛細管柱，將混合物分離成單獨的成分。低沸點的小分子會比高沸點的大分子更快地通過管柱。MS(Mass spectrometry，質譜法)用來辨別質譜中不同的成分。每個化合物都具有一個唯一或接近的獨特質譜，可與質譜數據庫進行比較，進而鑑定。通過使用標準品，也是可以定量的。GC-MS 可用於研究液體、氣體或固體樣品。分析會從氣相層析開始，樣品在這裡會有效揮發至氣相，並利用以固定相(液體或固體)塗布的毛細管柱分離至其自身各種成分。溶析的時間被稱為化合物的滯留時間。GC 具解析複雜混合物或包含上百種化合物之樣品萃取物的能力，分析條件與方法列於 4.3.3 節。



圖 13 氣相層析質譜儀



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

4.3 研究方法

4.3.1 現場採樣方法

本研究現地場址總面積：6,664 m²，於受 TCE 污染濃度最高之地區進行井口設置，使用 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機進行現地採樣及鑽井，搭配場址調查結果，挑選 3 個井口進行實驗，每個井井深為 9 m 深，相對位置如圖 14 所示，左邊之井口為空白對照組（編號：井 A）、中間井口為添加椰子殼生物碳（編號：井 B）及右邊井口為添加竹子生物碳（編號：井 C），分別以 49 kg : 1 kg（土壤：生物碳）進行混合，添加生物碳比例為 2%，並於研究期間採集 4 次土樣，採樣頻率為 1.5 個月採樣 1 次，採集樣品後將樣品置於 4°C 保冰袋中保存運送回實驗室，微生物樣品以 -20°C 冷凍櫃保存。待提取 DNA 後以次世代定序分析。



第四章 研究方法與過程



圖 14 整治場址設置井口配置圖

(井 A 為控制組，井 B 與井 C 為添加不同種類生物碳之井口)

4.3.2 土壤樣品與保存

1. 樣品採集

採樣前，先將採樣襯管透過酒精擦拭及使用紫外線消毒燈消毒，紫外線波長於 240-280 nm 具有殺菌作用（以 260 nm 最強）。紫外線可透過改變細菌 DNA 之分子構型，干擾細菌 DNA 的複製與轉錄，造成細菌的死亡或變異，進而達到殺菌的效果。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

2. 樣品保存

採集樣品後將樣品置於 4°C 保冰袋中保存運送回實驗室，微生物樣品以 -20°C 冷凍櫃保存。以防止樣品中目標微生物因其他條件的干擾而發生變化，於採樣後 24 小時內完成 DNA 萃取。

4.3.3 三氯乙烯濃度

本研究根據環保署之土壤、底泥及事業廢棄物中揮發性有機物檢測之樣品製備與萃取方法—密閉式吹氣捕捉法(NIEA M155.02C)及揮發性有機物檢測方法—氣相層析質譜儀(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) (NIEA M711.04C)做檢測，選用管柱：60 m × 0.32 mm 內徑，膜厚 1.8 μm 之 DB-624 毛细管，管柱加熱使有機污染物透過沸點不同而使污染物被分離。

氣相層析儀條件：

傳輸管溫度：250°C 至 300°C

載流氣體：氮氣

載流氣體流速：1.5 mL/min 初始溫度：35°C，維持 2 分鐘

溫控程式：每分鐘 4°C 至 50°C，每分鐘 10°C 至 220°C

最終溫度：220°C，維持至所有成分流洗出為止 分流比：100：1

注射器溫度：125°C

4.3.4 生物碳製備

本次研究之生物質材料從 2 種農業廢棄物（分別為椰子殼與竹子）中收集，以作為永續再利用材料。首先，將農業廢棄物收集至實驗室後，先以逆滲透水（RO 水）洗滌數次，以除去灰塵和一些無機雜質。之後將清潔過的廢棄物原料放置於烘箱內以 60°C 下乾燥 24 小時，至含水率小於 10%，在往後欲使用前將其水份含量降至最低。接著，將完成上述過程之材料放至管式電爐內，以高溫燒製生質材料（椰子殼及竹子）之條件如表 3 所示，並於管式電爐內填充氮氣使管柱內狀態到缺氧或無氧的條件（圖 15），進行熱裂解（圖 16）碳化步驟持續一段時間，以形成碳化材料，即為生物碳。



第四章 研究方法與過程

依批次不同生物質材料經由上述步驟(圖 15)，對不同材料維持厭氧加熱，再挑選其中兩種材料進行不同熱裂解時間的比較，期望合成多種不同階層式的規則孔洞結構，再利用掃描電子顯微鏡(SEM)、元素分析儀(EA)、比表面積與孔隙度分析儀(BET)及傅立葉轉換紅外光譜儀(FTIR)進行材料表面的官能基分析，評估碳化後之結構形貌。

表 3 各生質材料製備生物碳之條件

	溫度(°C)	時間
椰子殼	860~920	20 分鐘
竹子	800~900	2 小時

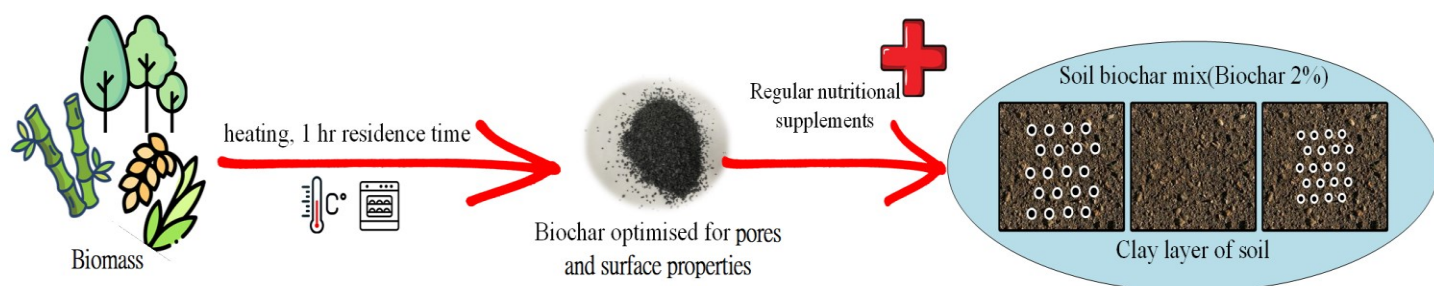


圖 15 生物碳製備流程與應用

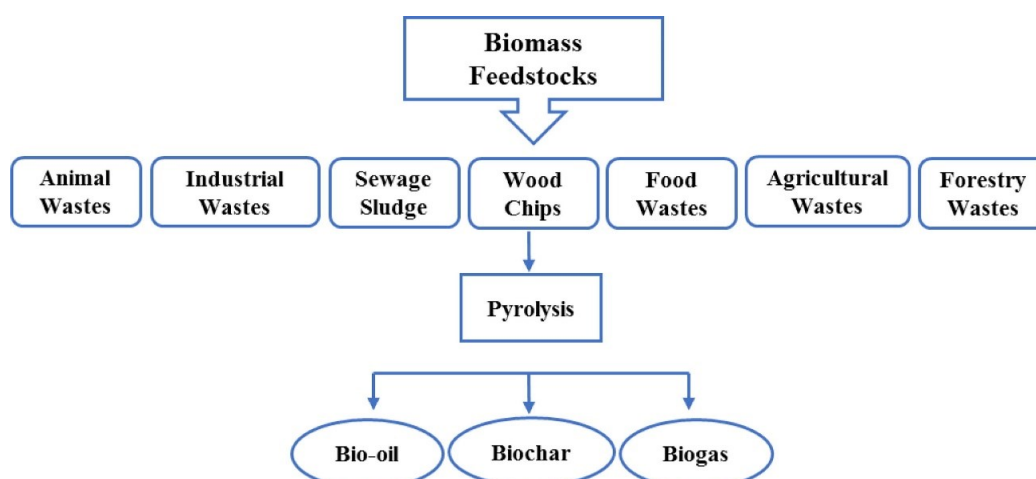


圖 16 熱裂解過程(Amalina et al., 2022)



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

4.3.5 土壤 DNA 提取

本研究使用 FavorPrep Soil DNA Isolation Mini Kit 試劑盒提取土壤微生物樣品 DNA，DNA 提取操作程序如圖 17 所示，每次使用 1 g 土壤樣品進行微生物 DNA 提取，提取後將 DNA 冰於 -80°C 下保存。

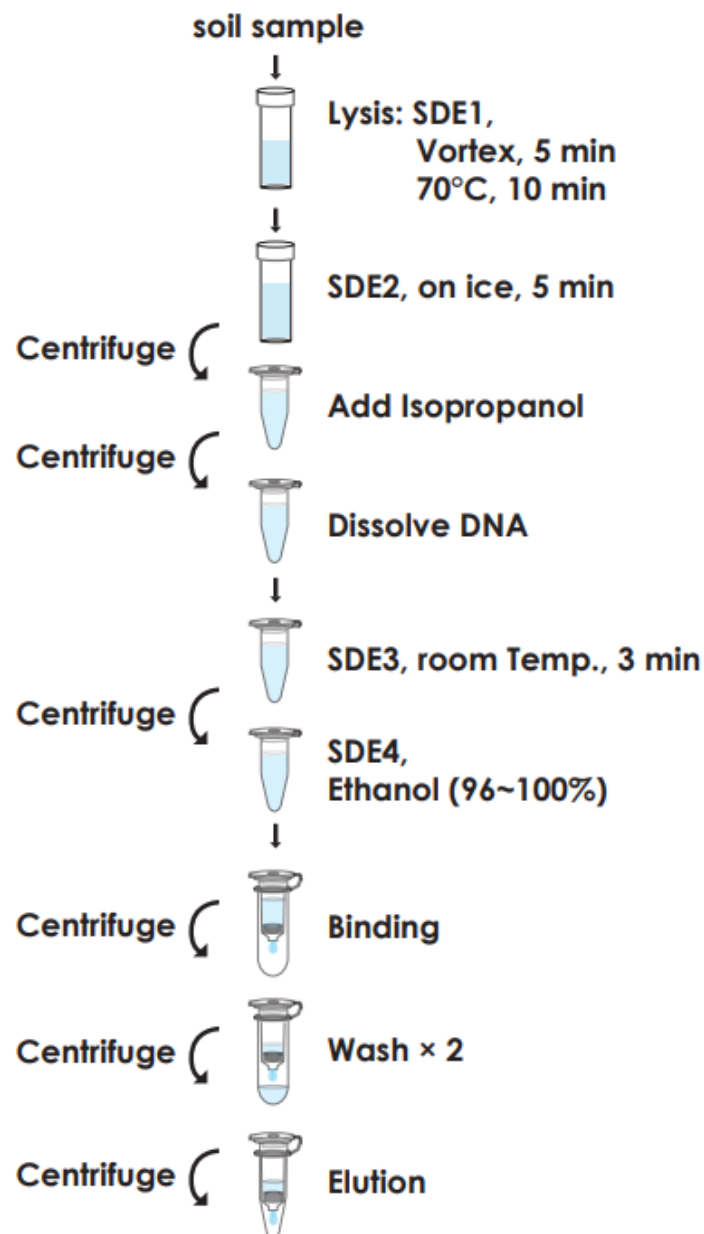


圖 17 試劑盒提取 DNA 之操作步驟



第四章 研究方法與過程

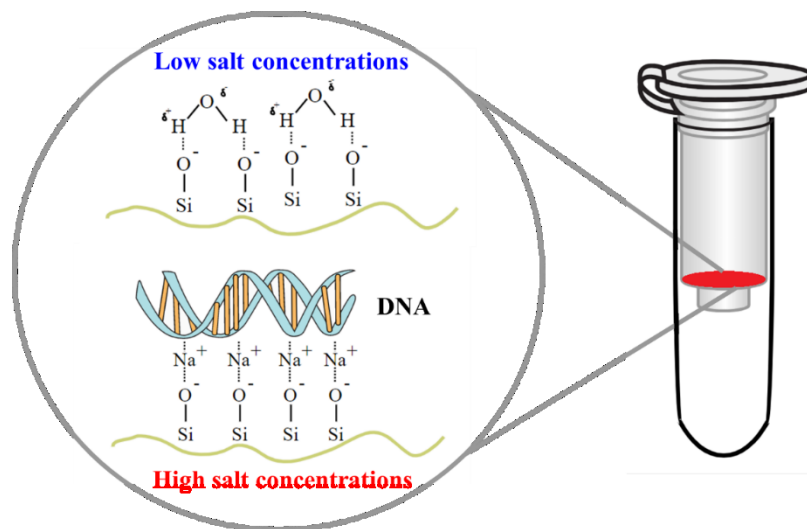


圖 18 Spin Columns 濾膜分離原理



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

4.3.6 次世代定序分析

微生物擴增子測序分析是生物學和生物醫學研究的重要工具。本研究以全長 16S 核糖體基因進行分析可以了解許多微生物棲息的生態系統結構，實驗流程首先使用帶有標記的 16S 通用引子(27F + 1492R)進行聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)將樣本中的 16S 基因放大。帶有標記的 DNA 經過品質控管與樣本混和 (optional) 後進行 SMRTbell 樣本建庫，建庫樣本以 AMPure PB Bead 純化後接著進行 DNA 修復並接上接合序列，最後送入儀器進行定序。

生物資訊分析使用定序結果進行，定序的原始序列 (polymerase Read) 首先進行品質控管，將重複序列 (subreads) 互相重疊，重疊數量大於 3 的原始序列才可以被用來產生共有序列 (Consensus Read)。當眾多的 subreads 互相堆疊，單一 subread 上的隨機定序錯誤就可以藉由同一位置上其他 subread 的序列進行修正提升正確率，並且統計序列品質分數 (Read Quality, RQ)。以這些步驟產生的共有序列又稱為 CCS 序列 (Circular Consensus Sequencing, CCS) (如圖 19 所示)，當同時具有高品質及高長度 ($RQ > 20$) 的定序序列則可稱為 HiFi read。為了更正確的物種解析度，全長微生物體 16S 核糖體基因分析使用更高規格的 HiFi read ($RQ > 30$) 進行一連串的微生物體 16S 核糖體基因生物資訊分析流程，定序序列中鹼基的準確率可達 99.9%。



第四章 研究方法與過程

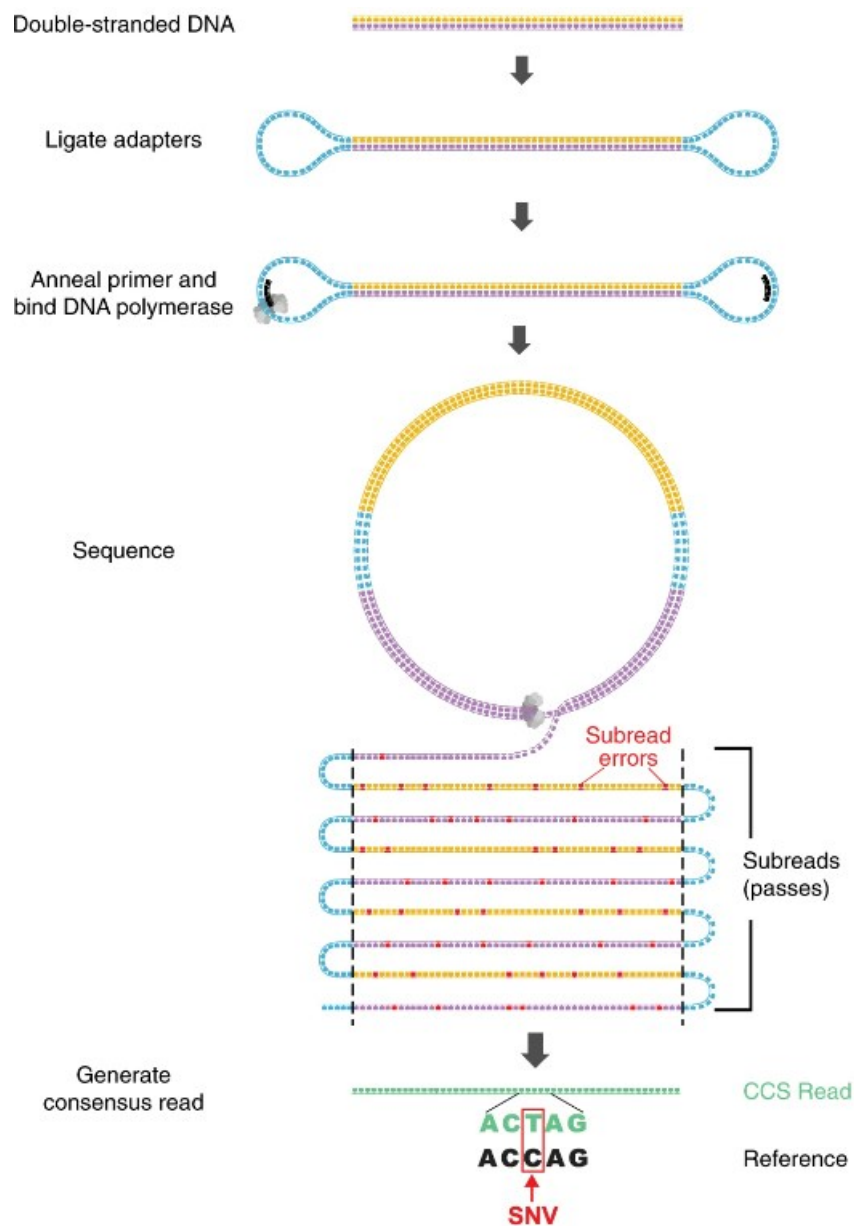


圖 19 CCS read 產出示意圖(Wenger et al., 2019)

HiFi 序列會先經過 DADA2 分析產生 ASVs (Amplicon Sequence Variants, ASVs)，步驟包含序列的品質控管、去冗餘與嵌合體、序列聚合等，產生的 ASVs 再與資料庫 (NCBI、GreenGenes、SILVA、eHOMD、UNITE) 進行比對得到物種資訊，產出物種豐度表 (ASVs Table)。以物種豐度表出發可以衍伸出幾個主要的分析項目，包括生物多樣性分析、物種組成分析、相關性分析、環境因子分析、統計檢驗分析與其他進階分析。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

本實驗以 Illumina Miseq 平台做微生物定序分析，其定序流程主要可分為樣品庫製備(library preparation)、樣本庫擴增(library amplification)、定序反應(sequencing reaction)及數據分析(data analysis)四個步驟，其詳述如下。

(1)樣本庫製備(library preparation)

採集之待測樣品經萃取 DNA 後，透過基因工程方法將待測樣品之基因隨機切割成大小不均的短片段，此步驟稱為 DNA 片段化(fragmentation)，於片段化之基因序列末端接上轉接引子(adapter)，及完成樣本庫的製備步驟。

(2)樣本庫擴增(library amplification)

將接有轉接引子之待測基因片段，進行聚合酶連鎖反應(PCR)、乳化聚合酶連鎖反應(emulsion PCR)或橋式聚合酶連鎖反應(bridgePCR)等，以擴增目標基因片段。乳化聚合酶連鎖反應是將每一個模板 DNA 均勻分散於油滴中，利用引子、油滴內之酵素與藥劑進行 PCR 放大反應，最後將帶有大量擴增之磁珠放入微孔盤中進行定序；而橋式聚合酶連鎖反應則是於晶片表面產生叢集(cluster)，可快速增幅單一 DNA 片段。

(3)定序反應(sequencing reaction)

市面上以有許多不同的定序平台，其所使用的定序原理皆不同。例如焦磷酸定序(pyro-sequencing)將帶有不同鹼基的去氧核苷酸材料，於聚合酶進行核苷酸接合時，釋放出焦磷酸根離子(pyrophosphate)，透過檢測焦磷酸根離子，識別鹼基以進行定序；而 Reversible terminator 定序原理則與 Sanger 法類似。

(4)數據分析(data analysis)

定序後資訊以生物資訊軟體分析，將所有小片段基因進行重組排列，藉由比對資料庫中已知序列，以鑑定物種及其相關資訊。

基因組 DNA 的提取

使用 FavorPrep Soil DNA Isolation Mini Kit 試劑盒從樣品中提取總基因組 DNA。DNA 濃度通過 Qubit 4.0 螢光計 (Thermo Scientific) 測定，並調整至 1 ng/ul，用於以下程序。

PCR 擴增

16S rRNA 具有 10 個保留區及 9 個變異區(V1~V9)，保留區序列於不同菌種中無明顯差異，可用於辨認生物物種間的親緣關係；變異區則隨著微生物的不



第四章 研究方法與過程

同而有所差異，序列組成具有多樣性的特點。

基於上述兩種特性，本實驗針對核糖體基因的全長進行分析，以聚合酶連鎖反應(PCR)進行擴增，擴增片段涵蓋一部分的高度變異區及保留區，做為定序後菌種鑑定和分析的根據。其 PCR 擴增條件如下。

(1)PCR 擴增之添加物質

- a. Microbial DNA：2.5 μ L
- b. Amplicon PCR Forward Primer 1 μ M：5 μ L
- c. Amplicon PCR Reverse Primer 1 μ M：5 μ L
- d. 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix：12.5 μ L

(2)正向引子(Forward Primer)：

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

(3)反向引子(Reverse overhang)：

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

(4)PCR 擴增之操作參數：

- a. 95°C 維持 3 min
- b. 循環 25 次：
 - 95°C (30 秒)
 - 55°C (30 秒)
 - 72°C (30 秒)
- c. 72°C (5 min)

PCR 產物定量及鑑定

經擴增後之 PCR 產物與 1X TAE buffer 混合，於 1 %瓊脂凝膠上，以 100 volt 進行電泳 30 分鐘，確認其濃度及擴增長度介於 1500 bp 後，進行後續純化 PCR 產物之步驟。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

建立樣品資料庫及定序

純化後的 PCR 產物使用 SMRTbell 資料庫是通過使用用於多重 SMRTbell 資料庫製備和測序程序的條形碼引物擴增全長 16S 基因 (PacBio) 來製備的。簡而言之，將等摩爾量的每個帶條形碼的 PCR 產物合併，並使用 500-1,000 ng 合併的擴增子樣品進行 DNA 損傷修復，然後進行末端修復/A 加尾和連接步驟，以引入通用髮夾接頭以獲得 dsDNA 斷裂。使用 AMPure PB 珠純化以去除接頭二聚體後，將 SMRTbell 資料庫與 Sequel II Primer 3.1 和 Sequel II Binding Kit 3.1 一起孵育，以進行引物退火和聚合酶結合。最後，在 PacBio Sequel II 儀器上以循環共有序列 (CCS) 模式進行測序，生成預測精度 (Phred Scale) = 30 的 HiFi 讀數。

生物資訊統計及分析

經過以上流程產生的 HiFi 序列會先依照預期的長度大小進行篩選，去掉過短或過長的序列，通過長度過濾的序列接著使用 DADA2 進行降噪分析，DADA2 使用 Divisive Amplicon Denoising Algorithm 演算法進行序列校正，與一般常見的聚類方法必須給定固定的相似度不同，DADA2 是將序列中可能因定序錯誤、PCR 放大或是嵌合體導致的序列差異移除，因此更能呈現出真實的序列差異，再利用真實的序列差異進行物種注釋及分析。

ASV (為擴增子序列) 是基因組研究中用於分析和分類基因序列的一種方法，特別可以用來觀察微生物群落變化。與傳統的操作分類單位 (OTU) 相比，根據 ASV 與參考數據庫的相似性或使用機器學習方法，為 ASV 分配分類標籤。這種分類學分類提供了有關樣本或群落內不同微生物類群的身份和豐度的信息。ASV 提供了一種更高分辨率的方法來表徵和理解微生物種群的多樣性。



第四章 研究方法與過程

4.4 工作進度甘特圖

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
文獻蒐集													
場址背景調查及現地採樣分析													
模場試驗規劃													
灌注井、監測井與抽水井設置													
生物碳製備與特性分析													
生物碳結合生物整治法進行現地模場整治													
DNA 提取													
次世代定序分析													
期末報告撰寫													
工作進度估計百分比 (累積數)	5%	10%	20%	30%	40%	45%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
預定查核點	期中		完成現地模場背景調查與試驗規劃以及現地採樣分析，並配合現地污染土樣進行實驗室試驗並找出最佳條件。 待試驗完成後將生物碳結合生物整治法進行現地模場整治。										
	期末		生物碳結合生物整治法進行現地模場整治效益評估及生物碳之適用性評估，並撰寫期末報告。										



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

第五章、結果與討論（含結論與建議）

5.1 TCE 污染現場場址

5.1.1 薄膜界面探測器(MIP)探測結果

土壤調查作業透過薄膜界面探測器(MIP)搭配 VOC 氣體偵測器(PID 及 FID)進行，探測結果顯示污染深度大多在深層區約 6.5 m~10.5 m 之間，如圖 20 所示，且經場址地質鑽探結果顯示 3.5 m~8 m 為黏土層，8 m~10 m 為粉土質砂層，如圖 21 所示，經判斷黏土層太過黏稠不適合與生物碳做混拌，因此本研究設井深度為 9 m 之粉土質砂層。



圖 20 MIP 探測結果

第五章 結果與討論

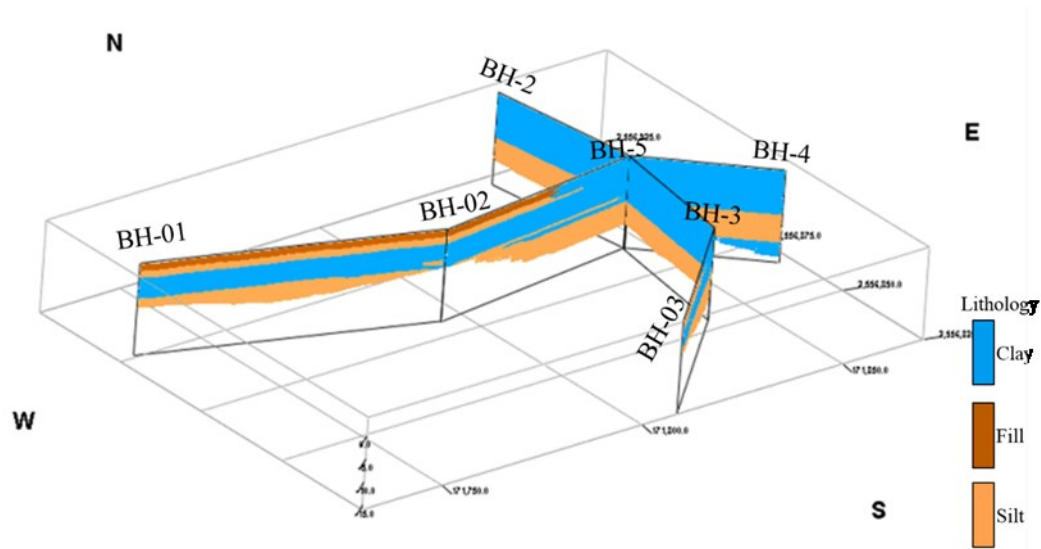


圖 21 場址地質鑽探結果剖面圖

5.1.2 現場設井及添加生物碳情形

本研究使用 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機（如圖 22 所示）設置 3 個井口，首先，使用採樣襯管（直徑約 2.5 cm）採集原始土樣，採樣深度為 9 m。接著，選擇兩個井口分別取出 49 kg 原始土樣（圖 23），再分別添加 1 kg 竹子生物碳 (BCC) 及 1 kg 椰子殼生物碳 (CSB)，混合均勻（如圖 24 所示），再回填至 9 m 深（圖 27），為了避免其他土層污染物有垂直移動之情形，回填完成後填入皂土，並於研究期間共採集 4 次土樣（時間與順序如圖 28 所示），採樣頻率為 1.5 個月。圖 25 及 26 為比對椰子殼生物碳、竹子生物碳剛混入土壤與 135 天後之差異，結果顯示生物碳經過 135 天的混埋，顆粒尺寸會變小與均勻。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能



圖 22 Geoprobe® 7822DT 地質鑽探機



圖 23 取出原始土樣



圖 24 原始土樣（左）分別添加兩種生物碳（中）後顏色略微變深（右）



第五章 結果與討論



圖 25 椰子殼生物碳剛添加時（左）與椰子殼生物碳經過 135 天採樣（右）



圖 26 竹子生物碳剛添加時（左）與竹子生物碳經過 135 天採樣（右）



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能



圖 27 土壤與生物碳混合均勻回填

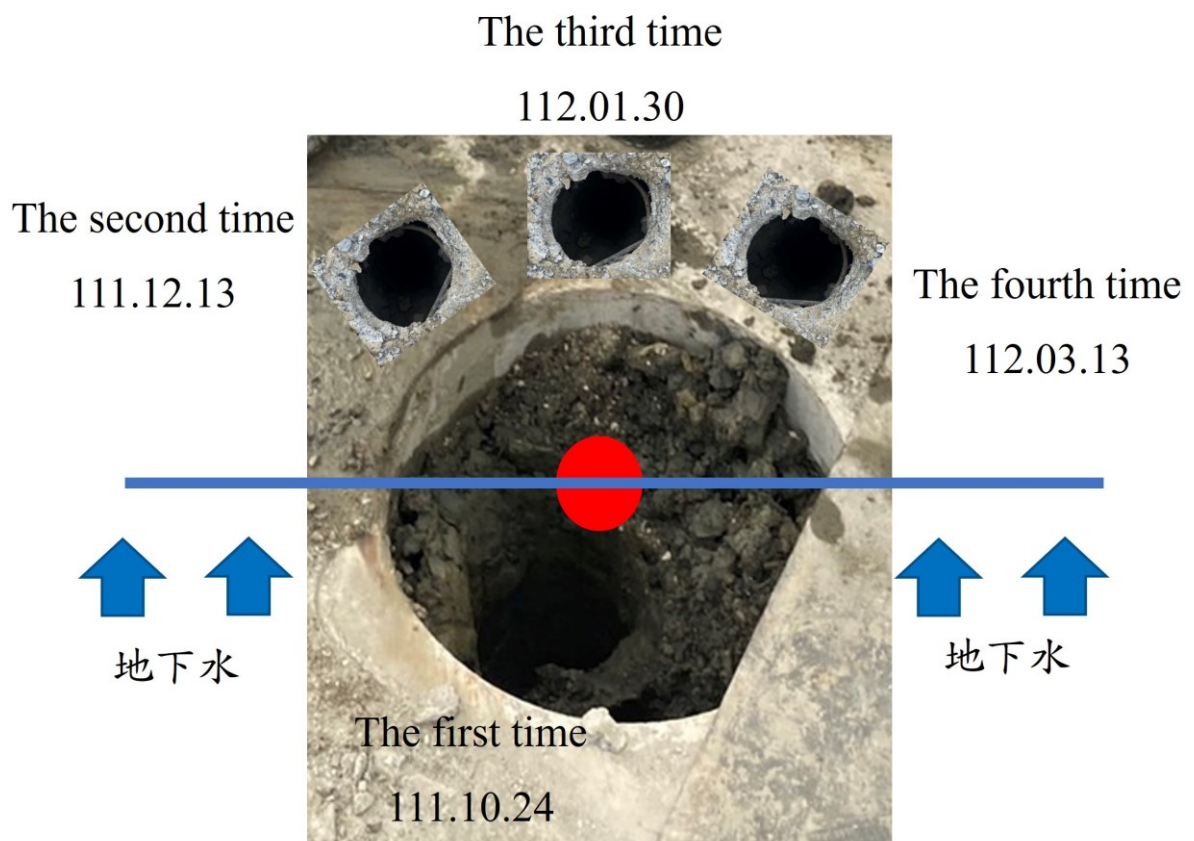


圖 28 採樣時間與位置示意圖



第五章 結果與討論

5.1.3 現地之化學環境相關資訊

研究期間共採集 4 次土樣，在添加生物碳後的採樣日期選擇前 4 天都未降雨進行採樣，其採樣溫度、濕度與降水量如表 4 所示。從圖 29 可看出 pH、土壤含水率及導電度之變化曲線。圖 29 為不含生物碳之原始土樣作為空白組井 A (縮寫 OI 作為代表)，圖 30 為添加椰子殼生物碳之土樣作為井 B (縮寫 CSB 作為代表)，圖 31 為添加竹子生物碳之土樣作為井 C (縮寫 BCC 作為代表)。可以看到在添加生物碳後土壤 pH 及導電度有明顯上升，在最後中心點直接接觸生物碳之土壤也與生物碳周圍有所差異。

表 4 採樣期間溫度、濕度與降水量

	採樣日期	平均氣溫 (°C)	最高氣溫 (°C)	濕度 (%)	降水量 (mm)
第一次	2022.10.24	24.2	28.5	73	0
第二次	2022.12.10	20.4	25.5	84	0
	2022.12.11	20.0	25.3	80	0
	2022.12.12	19.1	20.8	79	0
	2022.12.13	18.6	23.2	80	0
第三次	2023.01.27	14.4	19.0	73	0
	2023.01.28	11.4	16.3	62	0
	2023.01.29	12.7	19.0	74	0
	2023.01.30	14.7	22.2	77	0
第四次	2023.03.10	21.7	26.5	69	0
	2023.03.11	22.3	27.0	72	0
	2023.03.12	21.4	27.0	75	0
	2023.03.13	18.5	23.0	72	0

資料來源：中央氣象局 CODiS 氣候資料服務系統 安南測站 (C00950)



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

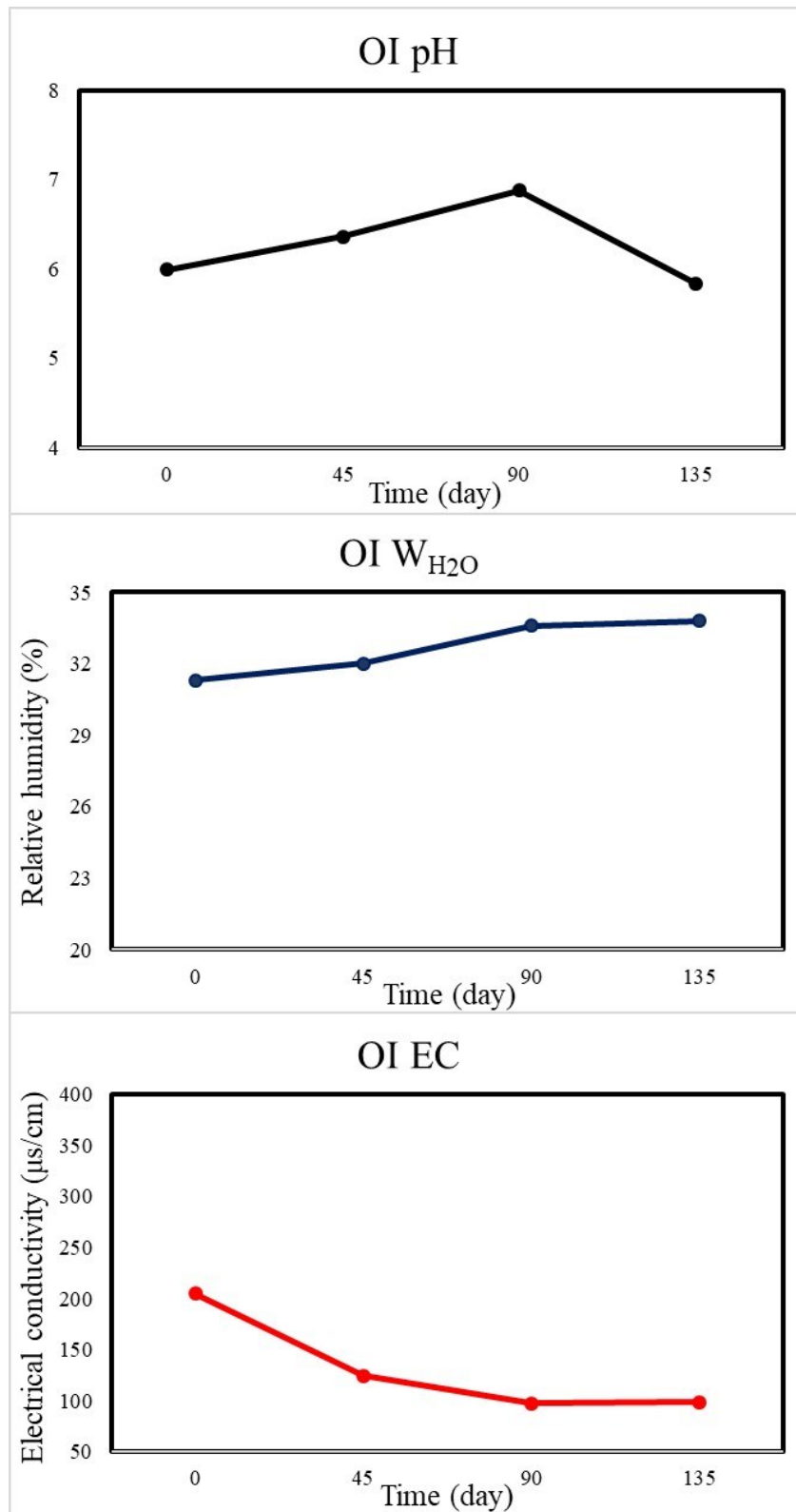


圖 29 井 A pH、土壤含水率及導電度之變化曲線



第五章 結果與討論

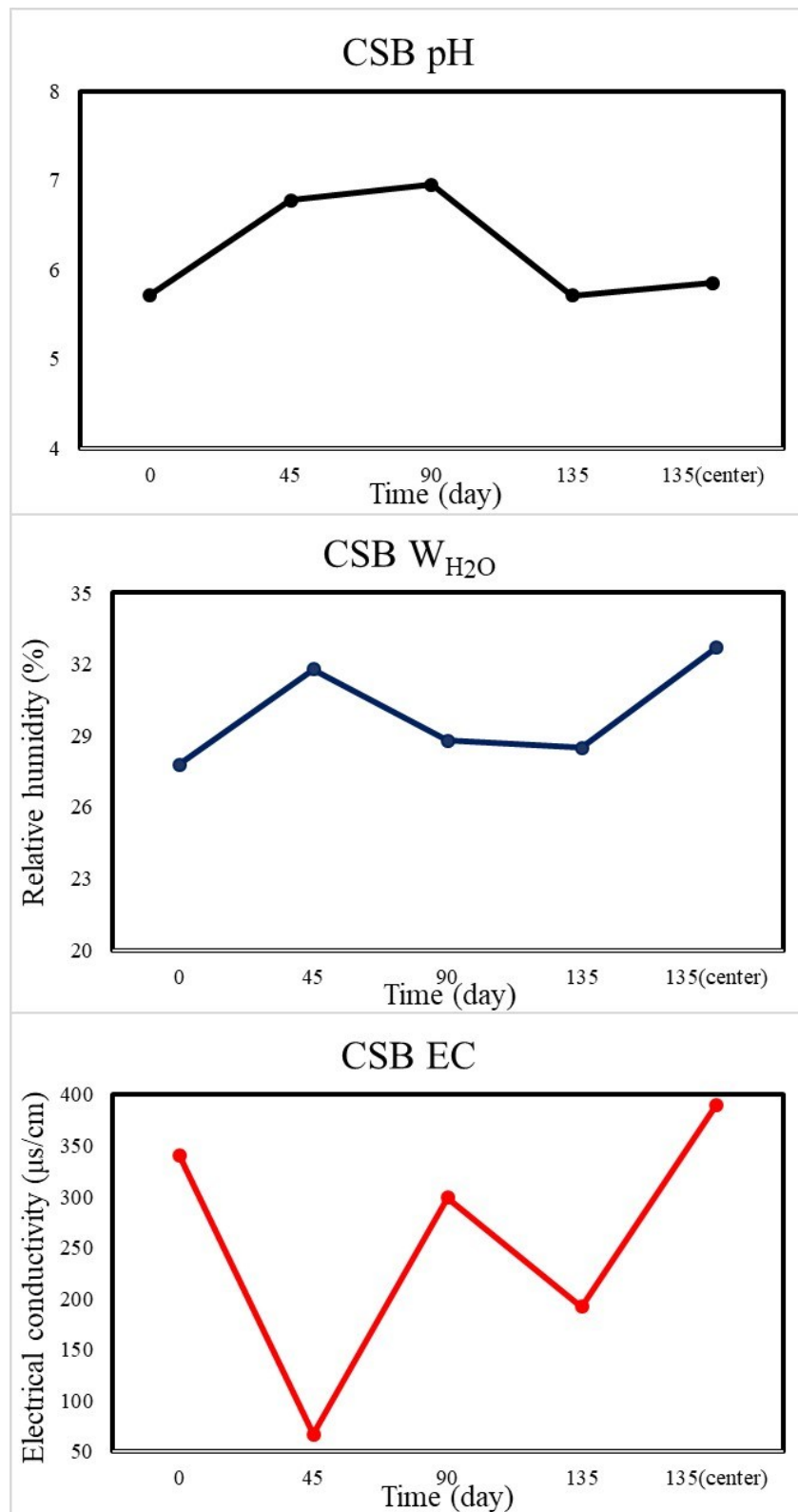


圖 30 井 B pH、土壤含水率及導電度之變化曲線



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

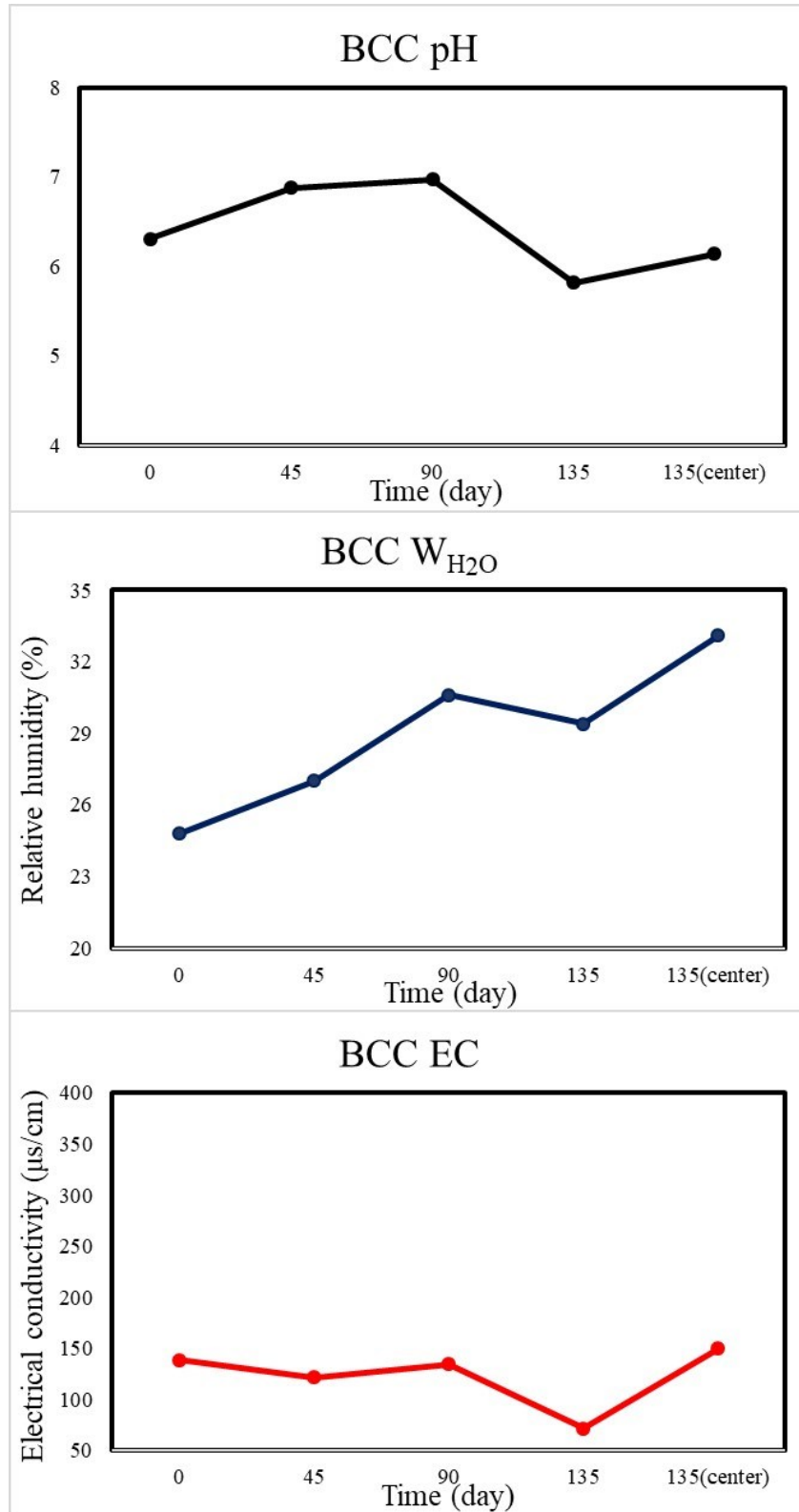


圖 31 井 C pH、土壤含水率及導電度之變化曲線



第五章 結果與討論

5.1.4 污染物濃度

從圖 32 ~ 34 為三口井三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)及其降解時產生的中間產物順-1,2 二氯乙烯(CIS - 1,2-Dichloroethene, CIS - 1,2 DCE)與氯乙烯(Vinyl chloride, VC)之濃度變化曲線，其中圖 32 為不含生物碳之原始土樣作為空白組井 A (縮寫 OI 作為代表)，圖 33 為添加椰子殼生物碳之土樣作為井 B (縮寫 CSB 作為代表)，圖 34 為添加竹子生物碳之土樣作為井 C (縮寫 BCC 作為代表)。如圖 33a 所示，TCE 濃度的下降呈現出幾個階段：初始停滯階段、快速下降階段、指數生物降解階段和短暫的緩慢下降階段。與竹子生物碳和不含生物碳的對照相比，椰子殼生物碳的改良顯著增強了 TCE 的去除，縮短了停滯期並延長了指數降解期。在椰子殼生物碳系統中可以觀察到第 45 天後，TCE 之濃度快速下降，並轉化成 CIS - 1,2 DCE，而 CIS - 1,2 DCE 與 VC 達到轉化平衡。圖 35 為最後一次採集中心點的樣品，因此包含生物碳於樣品中。結果顯示此樣品有較高的污染物濃度，以此推斷生物碳對 TCE 及 CIS - 1,2 DCE 有極佳的吸附能力，特別是椰子殼生物碳的吸附效果更優於竹子生物碳；而竹子生物碳對於吸附 VC 效果較佳。TCE 對生物碳的吸附和生物脫氯以及中間產物的吸附同時或交替發生，而吸附的有機分子也可能被生物碳上/內的微生物降解。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

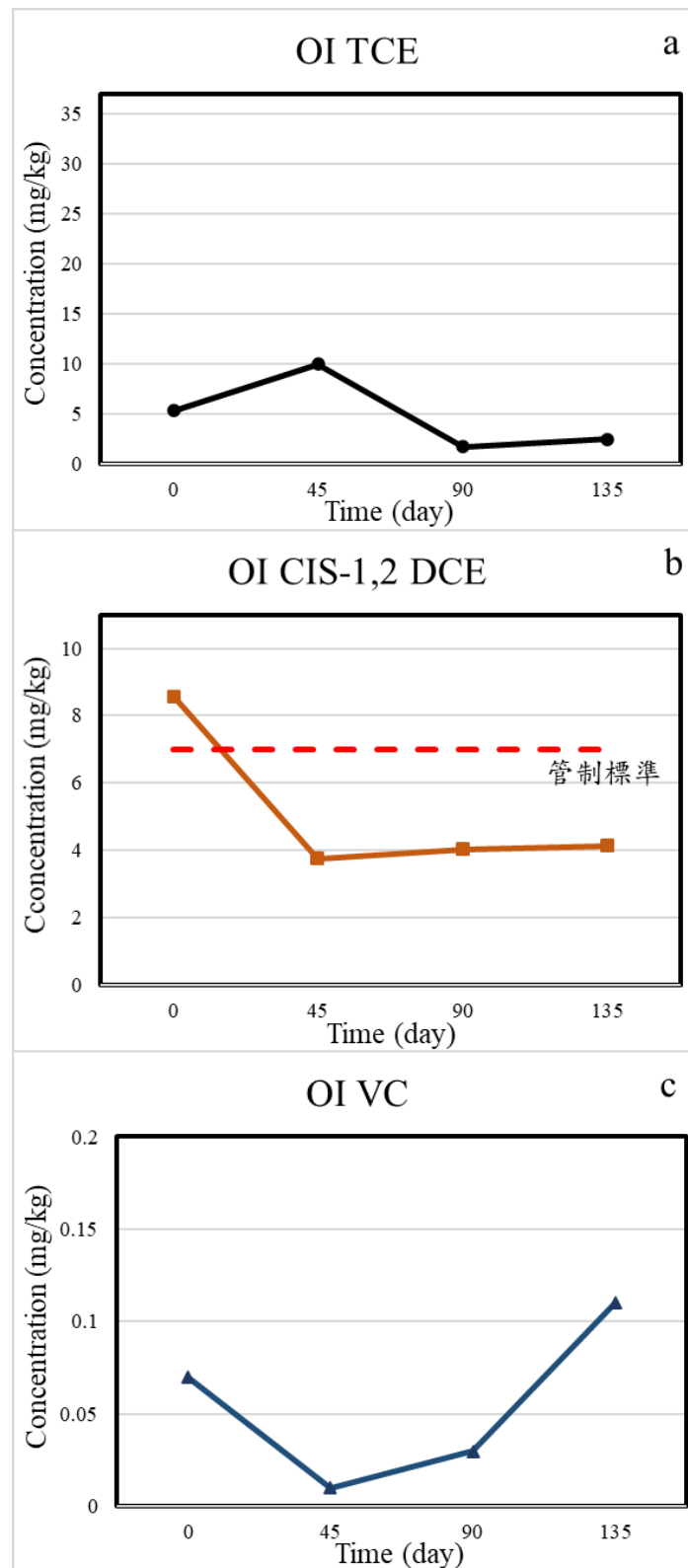


圖 32 井 A 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線



第五章 結果與討論

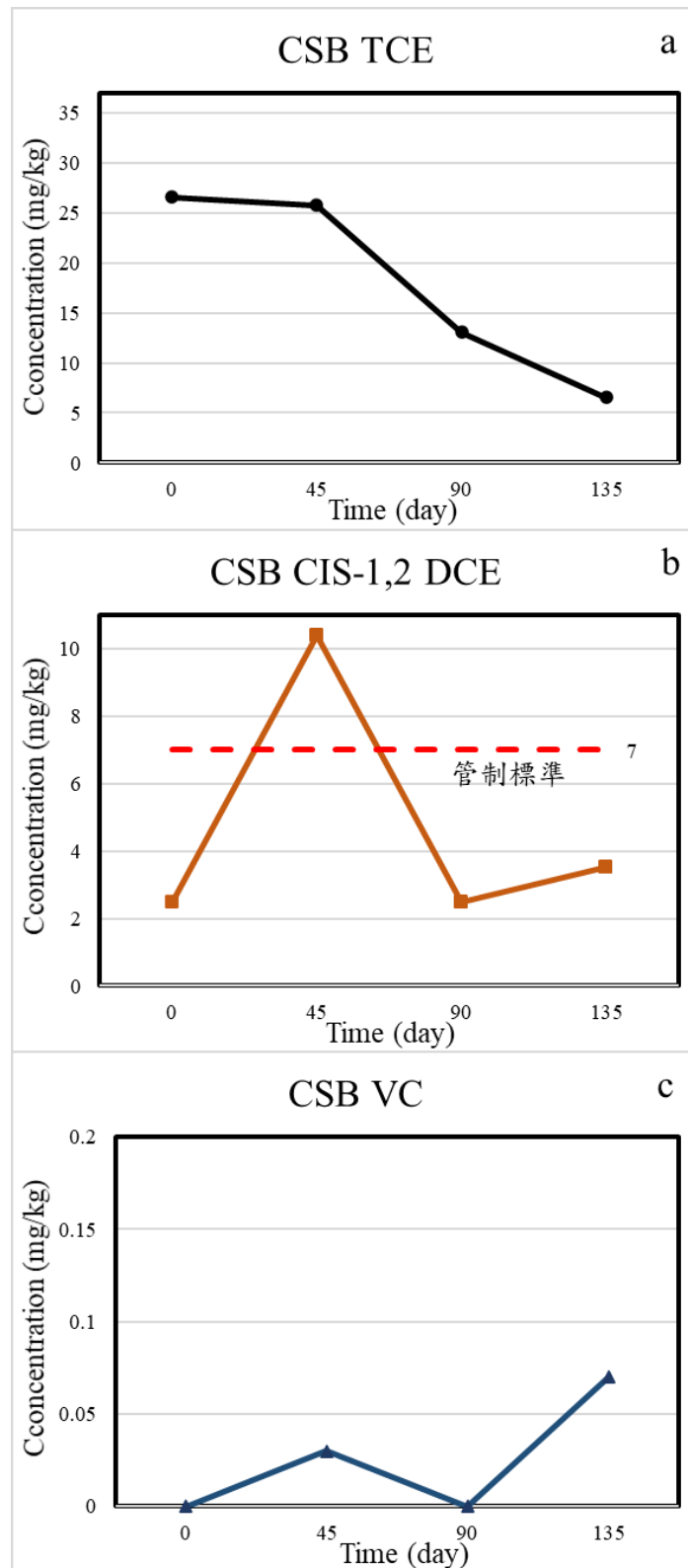


圖 33 井 B 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

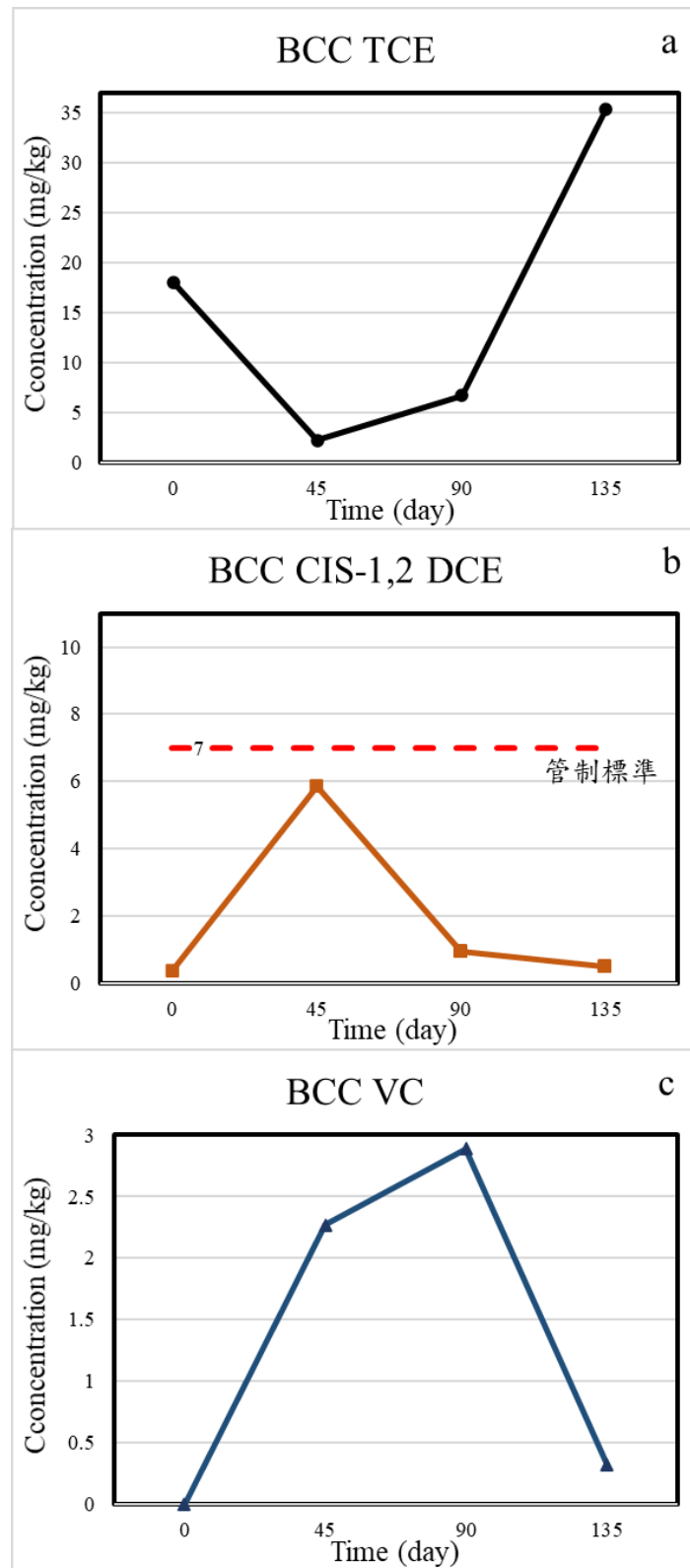


圖 34 井 C 三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度變化曲線



第五章 結果與討論

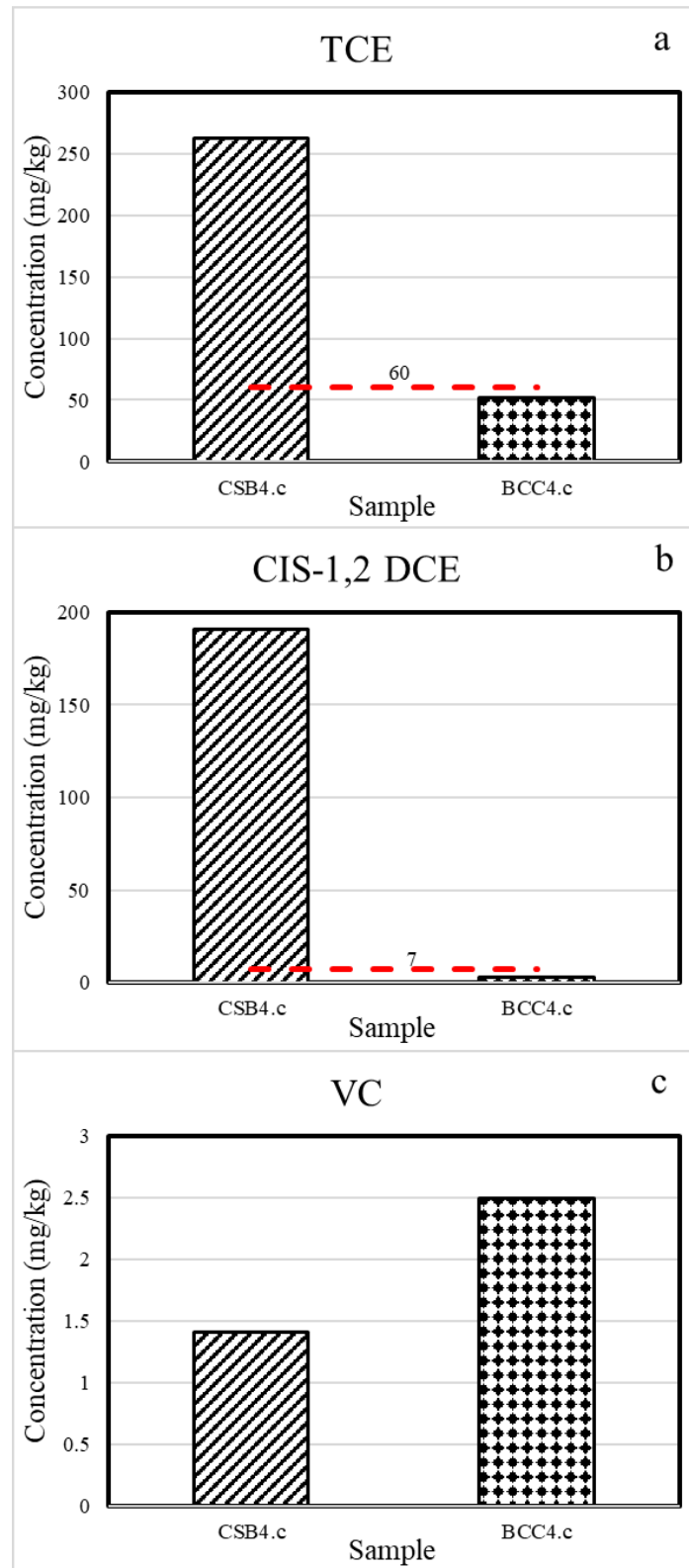


圖 35 井 B、C 中心點三氯乙烯、順-1,2 二氯乙烯及氯乙烯濃度



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.2 生物碳表徵分析

本研究利用掃描電子顯微鏡(ESEM)、元素分析儀(EA)、比表面積與孔隙度分析儀(BET)及傅立葉轉換紅外光譜儀(FTIR)等儀器對椰子殼生物碳與竹子生物碳進行表面官能基與微觀結構分析，分析結果如下。

5.2.1 傅立葉轉換紅外光譜儀(FTIR)

FTIR 在研究材料中常被用於識別很多類型的有機和無機材料或是化學組成特性，以及聚合物和溶液中分子取向的測定常用的振動光譜技術(Liu et al., 2017)。生物碳在裂解中會形成灰分，其主要成分是无機鹼鹽和鹼金屬離子等無機物，溶於水後呈鹼性，使生物碳 pH 值一般都大於 7，另外有機陰離子官能團(如—COOH)也會影響 pH 值。生物碳表面有大量的官能團，依據官能團的特徵吸收光譜，可以分析生物碳中含氧官能團及其相對含量。圖 33 為本研究使用兩種生物碳的 FTIR 光譜分析結果。在 3400 cm^{-1} 處的寬而突出的峰是典型的—OH 官能基團伸縮振動引起的(酸或醇)(Chen et al., 2022; Xu et al., 2011)。約在 1600 cm^{-1} 處和 1420 cm^{-1} 處的兩個峰被描述為 C=O 和—COOH 官能基團(Jia et al., 2013; Xu et al., 2013)。約在 1019 cm^{-1} 處可能主要歸因於 C—O 官能基團(Dong et al., 2011)。約在 1150 cm^{-1} 處附近的峰被指定為酚醛—OH、CH—和 C—O 彎曲變形分別出現在約 895 cm^{-1} 處(Cao & Harris, 2010; Jia et al., 2013; Zeng et al., 2016)。生物碳含有大量羥基、羧基、羰基等含氧官能團，使其表現出較大的陽離子交換能力(CEC)，因此添加生物碳可增加土壤的 CEC，也可能間接影響微生物電子傳遞的效率。



第五章 結果與討論

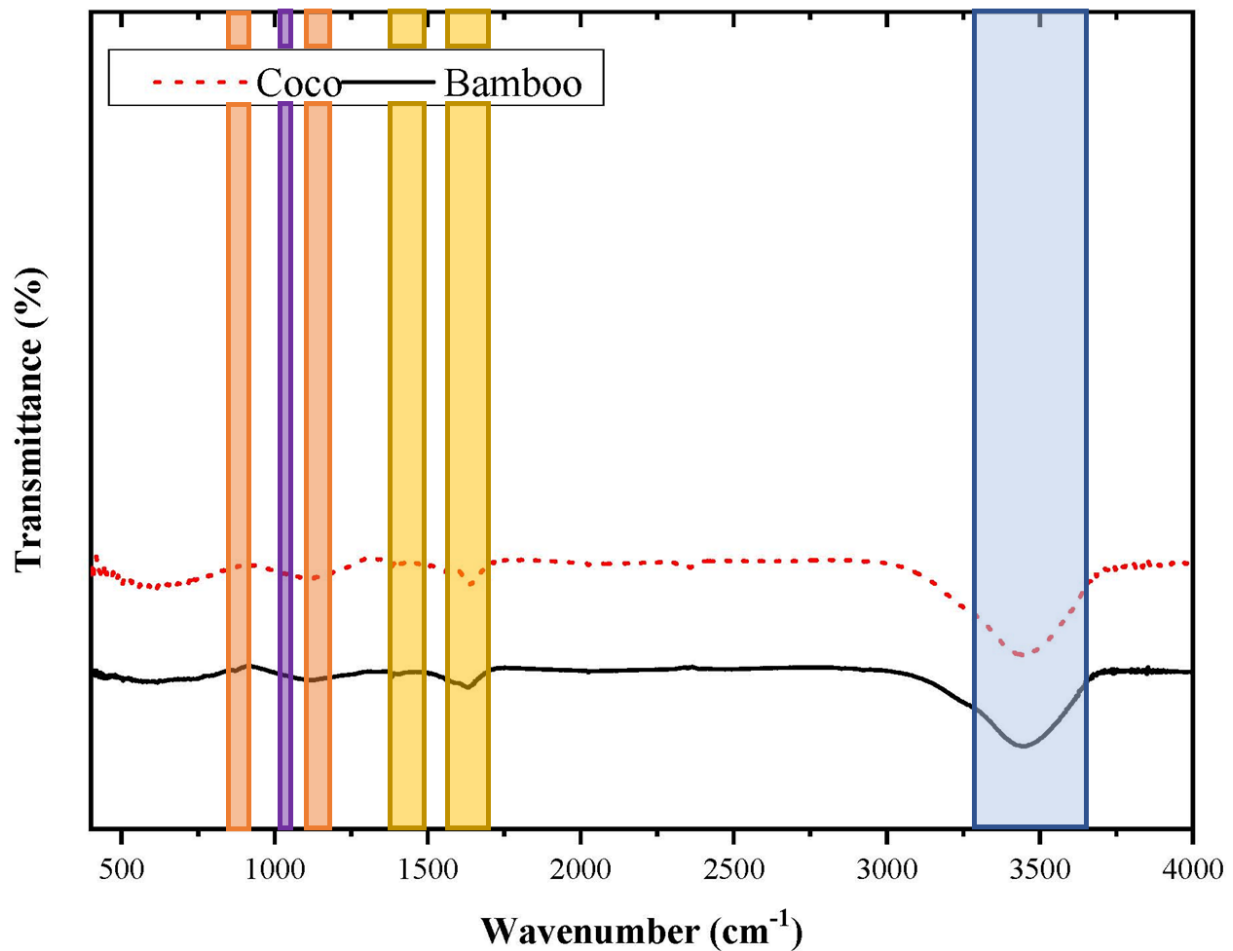


圖 36 兩種生物碳之 FTIR 分析圖

5.2.2 環境掃描式電子顯微鏡(ESEM)

本研究利用 ESEM 鑑定生物碳表面的結構。本研究製作之 2 種生物碳的原始形貌和表面可通過 ESEM 顯微照片獲得，如圖 37、39 所示。椰子殼生物碳（圖 37a、37b）可以看出剛燒製完成之生物碳表面布滿非常細小之孔洞，且由 BET 分析得出比表面積高達 $777 \text{ m}^2/\text{g}$ ，這種特性賦予生物碳良好的吸附性能。竹子生物碳（圖 39a、39b）可看出剛燒製完成之生物碳表面具有較均勻分布的孔洞。圖 38、39 分別為椰子殼生物碳與竹子生物碳添加至土壤中 135 天後取出之高倍率圖像，顯示生物碳的多孔結構可為微生物提供適當的棲息地或載體。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

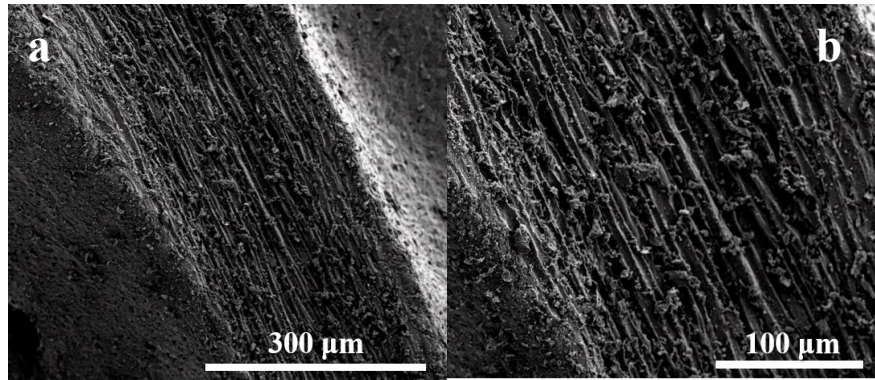


圖 37 (a)500 倍率 (b)1000 倍率之原始椰子殼生物碳 SEM 圖像

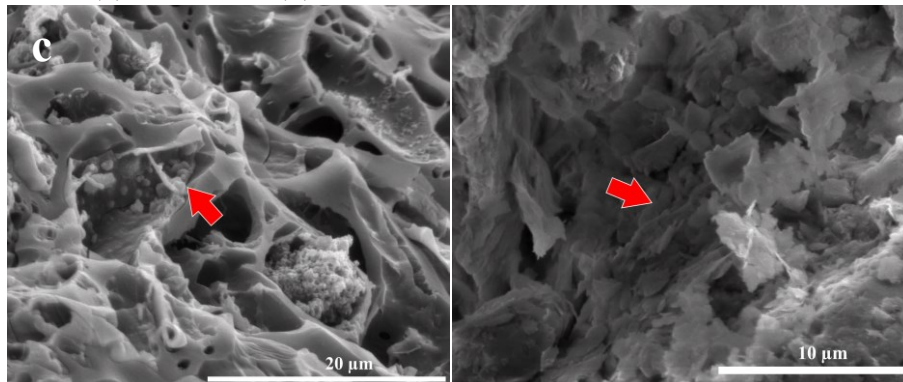


圖 38 (a)8000 倍率 (b)12000 倍率之椰子殼生物碳添加至土壤中 135 天後取出之 SEM 圖像

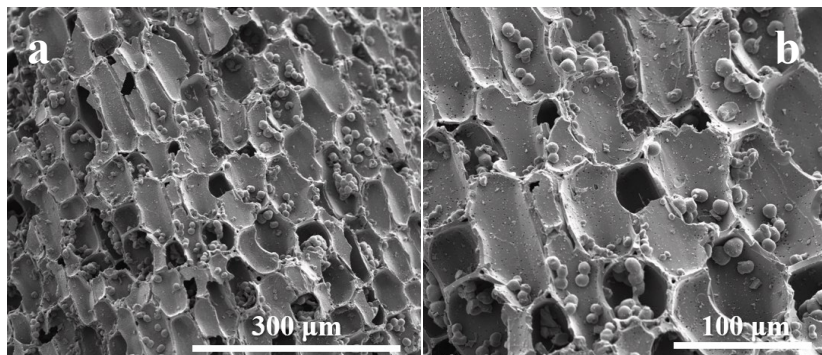


圖 39 (a)500 倍率 (b)1000 倍率之原始竹子生物碳 SEM 圖像

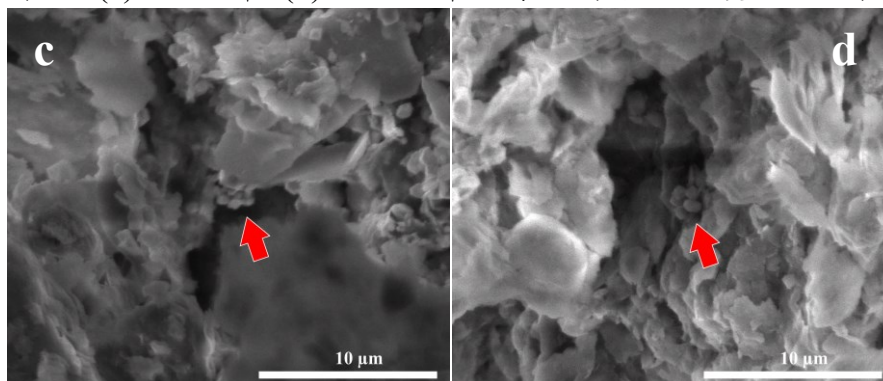


圖 40 (a)、(b)12000 倍率之竹子生物碳添加至土壤中 135 天後取出之 SEM 圖像



第五章 結果與討論

5.2.3 元素分析儀(EA)

本研究利用 EA 來分析 2 種生物碳樣品的元素成分與比例，結果如表 5 所示，兩種生物碳的碳含量可高達 67.51%與 72.56%。生物碳原料包括含有大量礦物質的木材、竹子、堆肥和農業廢棄物等，這些礦物質在熱解後仍存在於生物碳中。C、N、S、P 和 K 這些營養物質會慢慢擴散到土壤中並被微生物利用，其中 C 和 N 是微生物生長生物重要基礎物質，C/N 比與微生物生長密切相關。因此具有一定灰分的生物碳可以作為生物促進劑，通過增加微生物豐度來達到修復污染土壤的目的。

表 5 EA 分析數據

	N(%)	C(%)	H(%)	S(%)
椰子殼生物碳	0.25	72.56	1.13	0.23
竹子生物碳	0.45	67.51	1.59	NA

5.2.4 比表面積與孔隙度分析(BET)

利用 BET 對 2 種生物碳進行比表面積與孔隙度分析，結果如表 6 所示。結果顯示椰子殼生物碳比表面積高達 777.26 m²/g，竹子生物碳比表面積僅 167.3 m²/g。生物碳相關文獻較常使用比表面積約為 100 m²/g 之材料進行實驗，故本研究選擇一個較高比表面積與一個常見比表面積之材料作為本研究實驗材料進行比較。

表 6 生物碳之比表面積、孔隙長和孔隙寬之 BET 分析結果

	Surface area (m ² /g)	Pore size width (nm)	Pore size diameter (nm)
椰子殼生物碳	777.26	2.190	3.850
竹子生物碳	167.30	2.200	4.850



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.3 現地土壤樣品採集與 DNA 提取

經比較多種 DNA 提取試劑盒，FavorPrep™ 土壤 DNA 提取試劑盒（Favorgen Biotech Corp.，台灣）提取的 DNA 樣本質量較佳（A260/280 約為 1.7-2.0），再經過 PCR 擴增後，以 100V 將 DNA 樣品進行電泳分析，14 個樣品於 1500 bp 皆可顯示擴增條帶結果。樣品於 -80°C 冷凍保存，待送樣至生技公司進行 Next-Generation Sequencing(NGS)分析，樣品名稱與分組資料如表 7 所示。

表 7 樣品名稱與分組資料

項目	樣品	樣本分析名稱	分析組別名稱
第一次採樣	1 原始土樣 (採井 A 中心點)	OI1	A
	2 土樣加椰子殼生物碳 (採井 B 中心點)	CSB1	B
	3 土樣加竹子生物碳 (採井 C 中心點)	BCC1	C
第二次採樣	4 原始土樣 (採井 A 周邊)	OI2	A
	5 土樣加椰子殼生物碳 (採井 B 周邊)	CSB2	B
	6 土樣加竹子生物碳 (採井 C 周邊)	BCC2	C



第五章 結果與討論

第三次採樣	7	原始土樣 (採井 A 周邊)	OI3	A
	8	土樣加椰子殼生物碳 (採井 B 周邊)	CSB3	B
	9	土樣加竹子生物碳 (採井 C 周邊)	BCC3	C
第四次採樣	10	原始土樣 (採井 A 周邊)	OI4	A
	11	土樣加椰子殼生物碳 (採井 B 周邊)	CSB4	B
	12	土樣加竹子生物碳 (採井 C 周邊)	BCC4	C
	13	土樣加椰子殼生物碳 (採井 B 中心點)	CSB4.c	--
	14	土樣加竹子生物碳 (採井中心點)	BCC4.c	--



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.4 土壤微生物群落多樣性

物種分類階層由上而下可分為界、門、綱、目、科、屬、種共七層，擁有相同階層的物種在演化上也較為相近，相同階層下的物種有可能會有相似的代謝功能，因此階層分析對於了解微生物組成有很大的幫助。

5.4.1 物種豐度圓餅圖

物種注釋圓餅圖使用 Krona 進行分析並繪製，圓餅圖上標註物種不同階層的分類名稱及分佈比例，依 ASVs Table 中各樣本內的物種名稱與豐度，分別以階層進行統計後繪製圓餅圖。如圖 41、42、43 所示，其中有 6 種菌種為 3 個井都有，分別為 *Cupriavidus_metallidurans* , *Sphingomonas_leidy* , *Microbacterium_ginsengisoli* , *Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58 , *Bradyrhizobium_embrapense* , and *Bradyrhizobium_denitrificans* , 而其中在三個井中 *Cupriavidus_metallidurans* 為三個井口土壤中大量含有的菌種，*Sphingomonas_leidy* 此菌種在含有竹子生物碳之井中較多。如圖 41 所示，有 6 菌屬只出現在不含生物碳之土壤中，分別為 *Brevibacillus* , *Cutibacterium* , *Arthrobacter* , *Stutzerimonas* , *Acidibacter* , and *Herbaspirillum* , 其中最多為 *Arthrobacter* 此菌屬，推測這些菌屬較不適合在有添加生物碳之土壤中。如圖 42 所示，有 6 菌屬只出現在添加椰子殼生物碳之土壤中，分別為 *Anaerococcus*, *Mycolicibacterium*, *Ardenticatena*, *Amaricoccus*, *Terriglobus*, and *Massilia* , 其中最多為 *Massilia* , 推測此菌屬只適合在有添加椰子殼生物碳之土壤中生長。如圖 43 所示，有 7 菌屬只出現在添加竹子生物碳之土壤中，分別為 *Clostridium*, *Metabacillus*, *Paracoccus*, *Shigella*, *Aromatoleum*, *Curvibacter*, and *Ralstonia* , 推測這 7 種菌屬只適合在有添加竹子生物碳之土壤中生長。



第五章 結果與討論

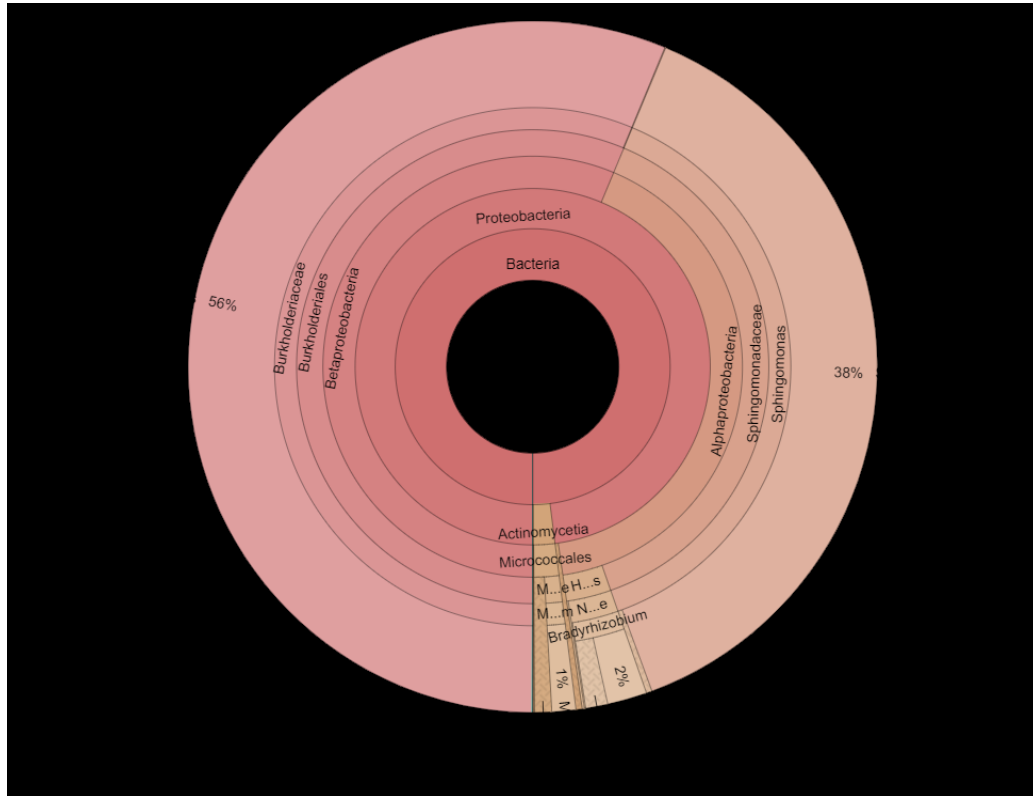


圖 41 第四次採樣井 A 土樣(OI4)之物種豐度圓餅圖



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

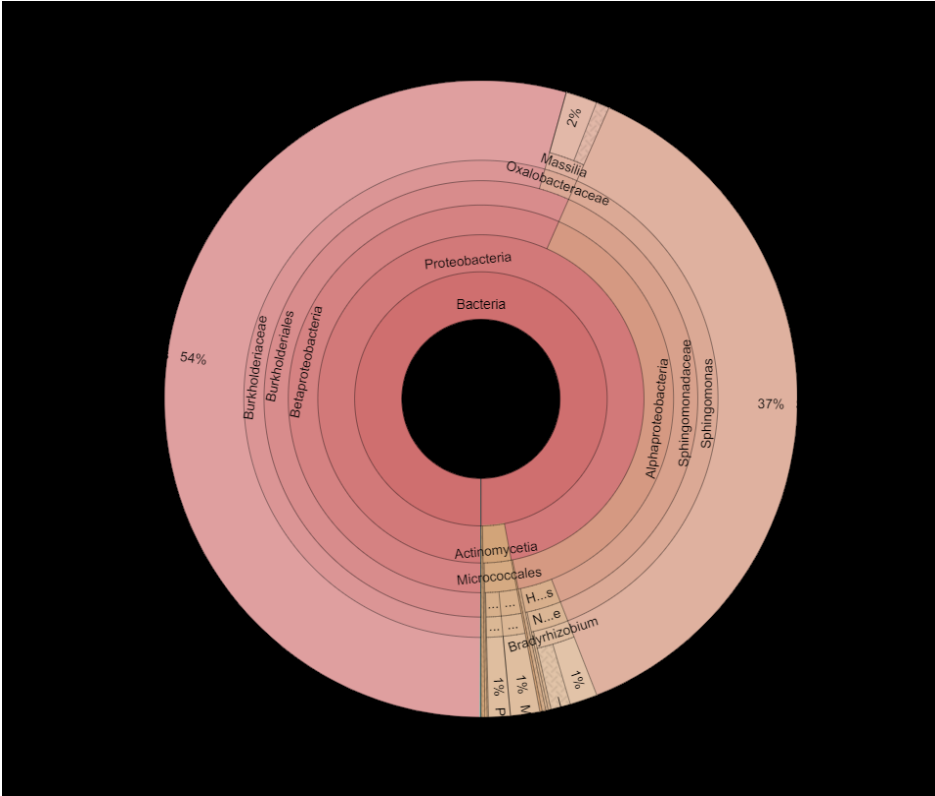


圖 42 第四次採樣井 B 土樣(CSB4)之物種豐度圓餅圖

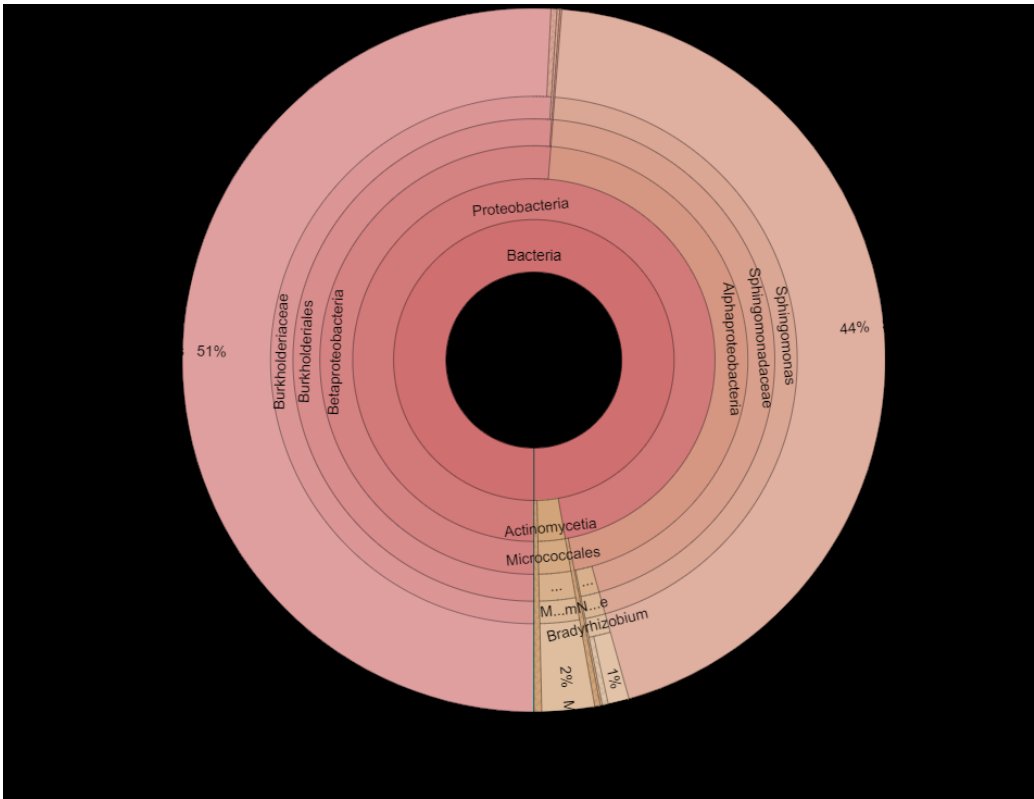


圖 43 第四次採樣井 C 土樣(BCC4)之物種豐度圓餅圖



第五章 結果與討論

5.4.2 物種階層序列豐度

物種階層序列豐度統計表可以根據物種注釋統計每一樣本中的讀取序列，依照所注釋到的不同階層統計。由此可看出每一樣本中的物種組成注釋到各階層的狀況。長片段定序資料因包含有更長的序列鹼基資料，因此在分類注釋上可以得到更詳細且準確的結果。通常短片段對於物種分類的鑑別力只能到屬（Genus），但長片段的鑑別力可以到種（Species）的層級。圖 44~46 為三個井在這段時間裡物種階層序列豐度，其中添加竹子生物碳的土壤微生物在物種階層序列豐度上是有明顯持續上升，但其他井中的土壤微生物則沒有明顯趨勢。

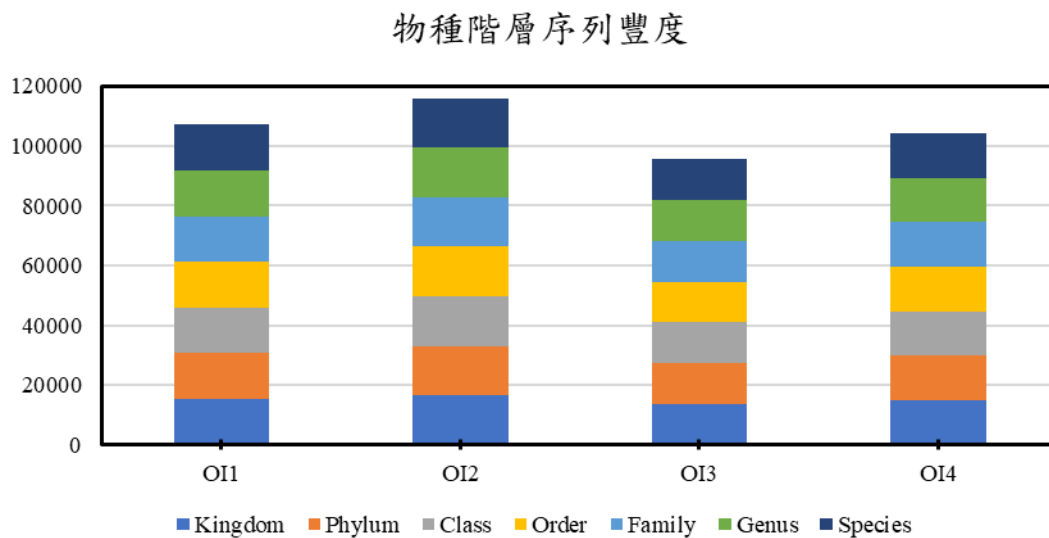


圖 44 井 A 物種階層序列豐度



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

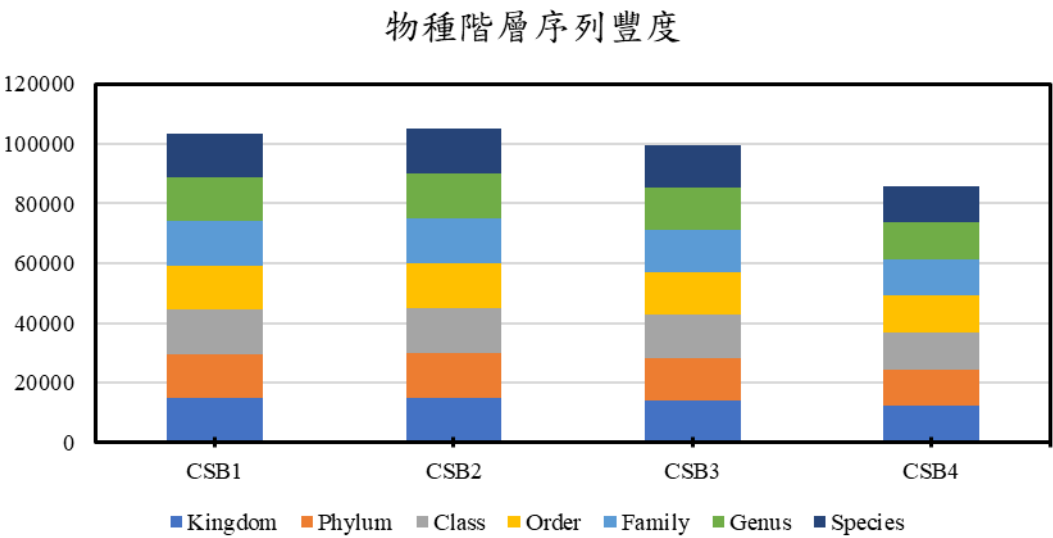


圖 45 井 B 物種階層序列豐度

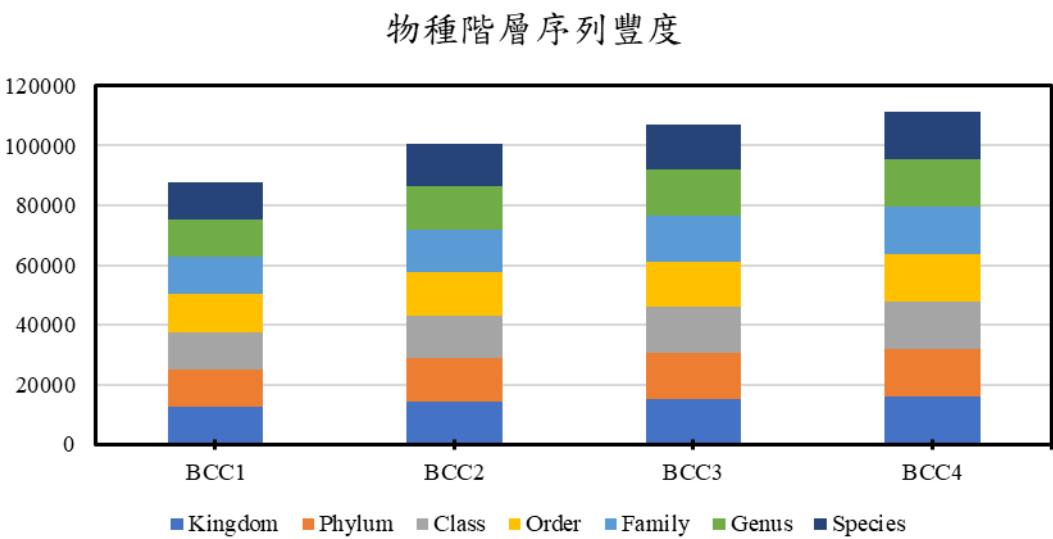


圖 46 井 C 物種階層序列豐度



第五章 結果與討論

5.4.3 物種豐度樹形圖

在 16S 微生物體的分析應用中，根據物種注釋結果及分組相對豐度資訊，利用資料視覺化技術樹形圖(Treemap) 展示，提供多種 Treemap 呈現方式。圖 47 分別為分組 A (控制組)、分組 B (添加椰子殼生物碳)、分組 C (添加竹子生物碳)之物種豐度樹形圖。根據種階層(Species level)及分組，區塊大小代表相對豐度所對應的比例，以顏色區分該物種所屬的門階層，並將相同門階層的物種以顏色深淺做區分，以利直覺式辨別。每個區塊亦顯示完整物種名稱及相對豐度大小以方便閱讀。樹形圖分析的優勢可直觀分辨不同分組間菌種組成的差異，以及組內各物種相對豐度比例與屬於門階層物種數量關係。

在圖 47 可以看到組 A 中 *Cupriavidus_metallidurans* 佔 61.15%，*Sphingomonas_leidy* 佔 31.2%，*Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58 佔 2.26%，*Bradyrhizobium_denitrificans* 佔 0.9%；而 *Cyanobacteria* 在不含生物碳之土壤含量最高，推測該菌種不適合生長在含有椰子殼生物碳及竹子生物碳之土壤中。組 B 中 *Cupriavidus_metallidurans* 佔 59.37%，*Sphingomonas_leidy* 佔 33.15%，*Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58 佔 1.91%，*Bradyrhizobium_denitrificans* 佔 0.97%，*Bradyrhizobium_embra*pense 佔 0.7%；而 *Actinobacteria* 及 *Chloroflexi* 在添加椰子殼生物碳之土壤含量最多，推測椰子殼生物碳較可以幫助 *Actinobacteria* 及 *Chloroflexi* 該菌種生長，其中 *Chloroflexi* 該菌種可以有效將三氯乙烯(TCE)脫氯轉化為二氯乙烯(DCE)(Kittelman & Friedrich, 2008; Krzmarzick et al., 2012)。組 C 中 *Cupriavidus_metallidurans* 佔 59.44%，*Sphingomonas_leidy* 佔 34.58%，*Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58 佔 2%；而 *Firmicutes* 及 *Bacteroidota* 在添加竹子生物碳之土壤含量最高，推測竹子生物碳可以幫助 *Firmicutes* 及 *Bacteroidota* 該菌種生長。

以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

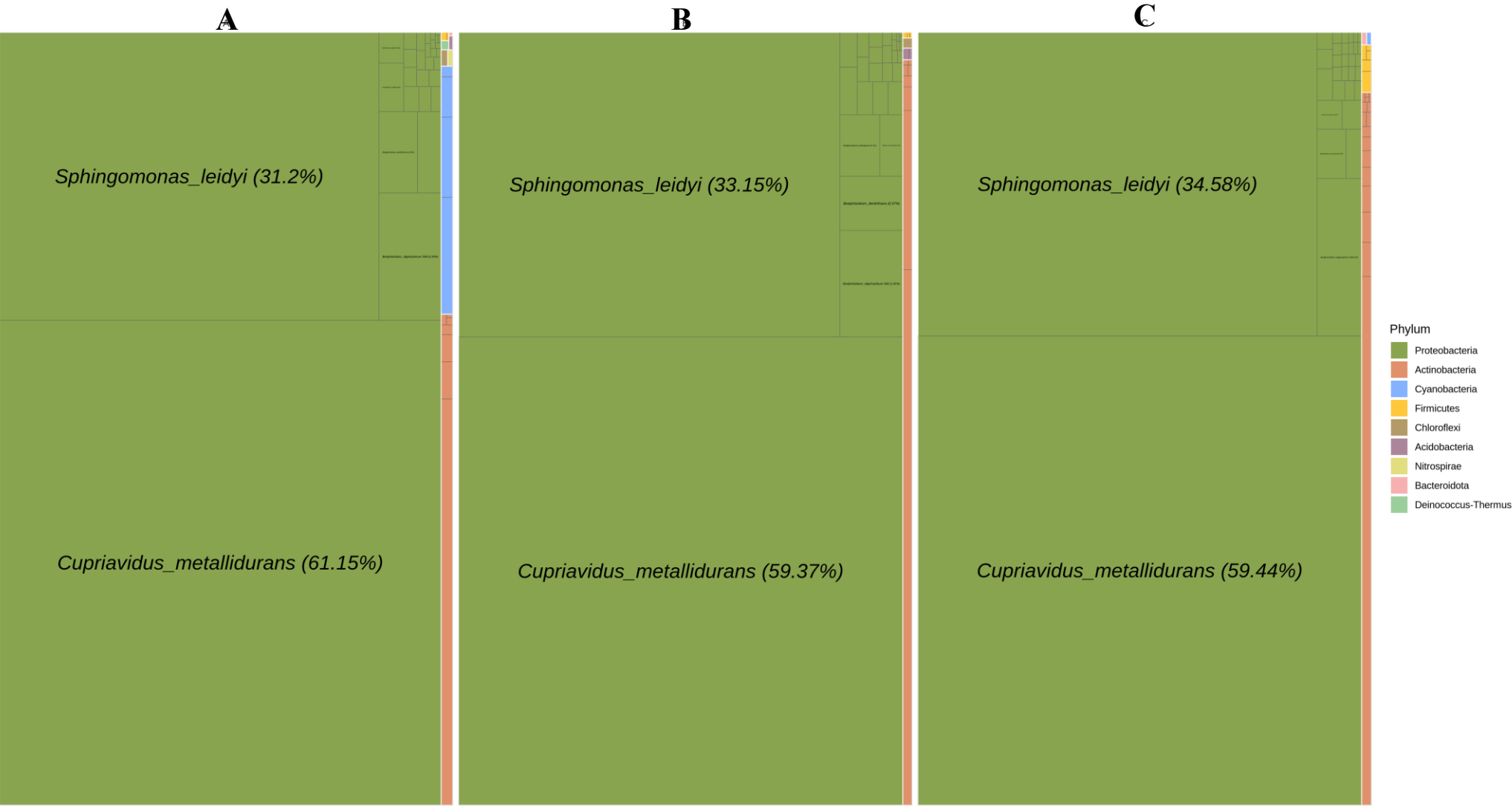


圖 47 物種圓形熱樹



第五章 結果與討論

5.4.4 物種相對豐度

根據物種統計結果，每個樣品或菌群在各族（門、綱、目、科、屬）中相對豐度排名前 10 名的物種，產生物種相對豐度柱狀圖，便於仔細查看各樣品在不同分類種群中相對豐度對應的物種比例。菌群整體平均豐度由高到低，每個直條中物種對應排序由下到上排序展示。相對豐度柱狀圖為例展示如下：

圖 48 顯示了微生物群落結構之十大優勢菌屬，分別為 *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Pseudocyanosarcina*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Afipia*, *Stutzerimonas*, *Acinetobacter* and *Massilia*。其中 *Cupriavidus* 與 *Sphingomonas* 佔的比例極高，為當地明顯的優勢菌株，但也使的其他八種優勢菌株難以辨識與比較。因此將 *Cupriavidus* 與 *Sphingomonas* 移除後重新繪圖如圖 49、50 所示，可較明顯比較其餘八種優勢菌株，結果顯示其中四種菌屬是在每個樣品都可以觀察到的，分別為 *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, and *Microbacterium*。 *Cupriavidus* 這種物種能夠降解有毒化合物或在重金屬存在下生長，能夠在含有苯酚或三氯乙烯(TCE)的培養基上生長，並且可以利用不同的氯酚作為唯一碳源，並共代謝氯化乙烯，例如三氯乙烯(TCE)、順式二氯乙烯和反式二氯乙烯(DCE)(Armond, 2021; Estrada-De Los Santos et al., 2012; Yonezuka et al., 2016)。 *Sphingomonas* 這種物種可以降解三氯乙烯及各種化學物質，其為極穩定的細菌(Chang et al., 2004; Mera & Iwasaki, 2007)。 *Bradyrhizobium* 這種菌屬為眾所周知的固氮菌，微生物體內的化學反應幾乎都需要“酵素”的參與，根瘤菌可過轉化將大氣中的氮氣轉化成氨此為固氮作用(Kaneko et al., 2002)。 *Microbacterium* 這種菌會分泌幾丁聚糖，這是一種天然的表面活性劑可以增加含氯有機物在微生物的利用率，有了這個菌屬它的外部表面活性劑可以增加還原脫氯的效果(Wan et al., 2018; Wan et al., 2019)。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

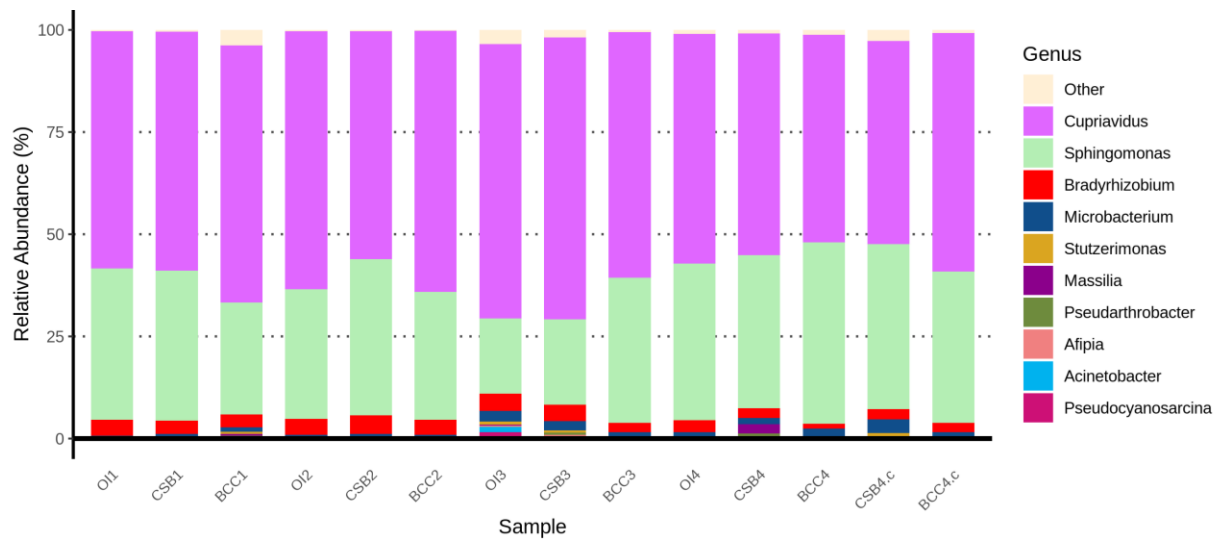


圖 48 十大優勢菌屬

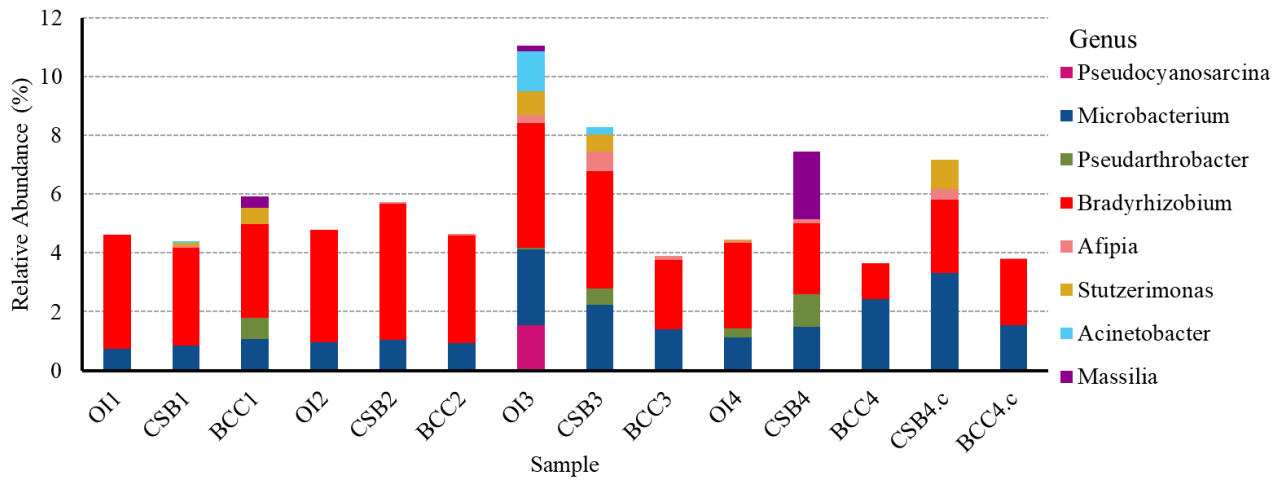


圖 49 八大優勢菌屬

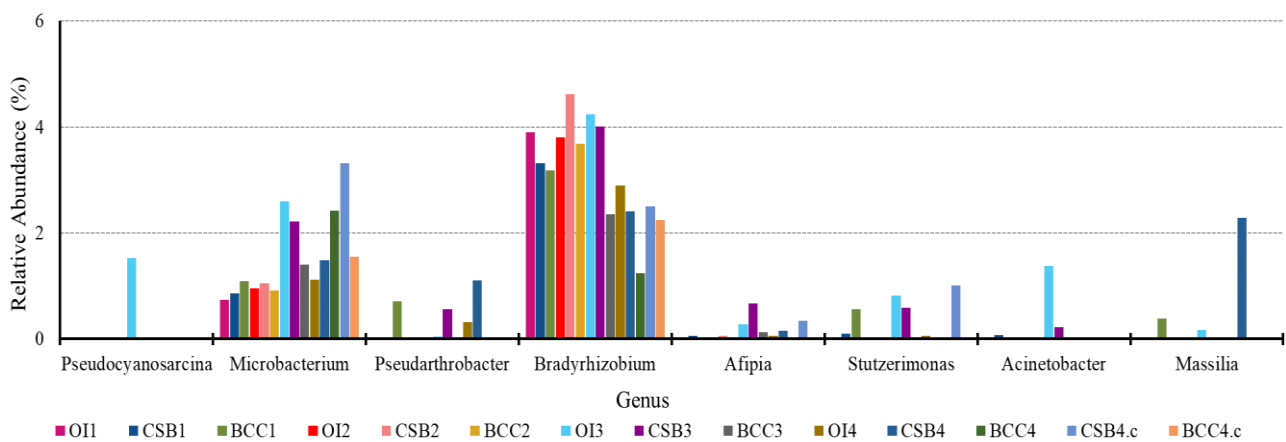


圖 50 八大優勢菌屬於不同樣品之比例



第五章 結果與討論

圖 51 顯示了微生物群落結構之十大優勢菌種，分別為 *Cupriavidus_metallidurans*, *Sphingomonas_leidy*, *Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58, *Microbacterium_ginsengisoli*, *Bradyrhizobium_denitrificans*, *Bradyrhizobium_embra*pense, *Stutzerimonas stutzeri*, *Pseudarthrobacter_phenanthrenivorans* Sphe3, *Afipia_broomeae*, and *Massilia_haematophila*。其中 *Cupriavidus_metallidurans* 與 *Sphingomonas_leidy* 佔的比例極高，為當地明顯的優勢菌株，但也使的其他八種優勢菌株難以辨識與比較。因此將 *Cupriavidus_metallidurans* 與 *Sphingomonas_leidy* 移除後重新繪圖如圖 52、53 所示，可較明顯比較其餘八種優勢菌株，結果顯示其中四種菌種是在每個樣品都可以觀察到的，分別為 *Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58, *Microbacterium_ginsengisoli*, *Bradyrhizobium_denitrificans*, and *Bradyrhizobium_embra*pense。較特別的是 *Stutzerimonas stutzeri*, *Pseudarthrobacter_phenanthrenivorans* Sphe3, *Afipia_broomeae*, and *Massilia_haematophila* 這些菌種在添加椰子殼生物碳之土壤較適合生長，其菌群較不同於添加竹子生物碳及不添加生物碳之土壤。

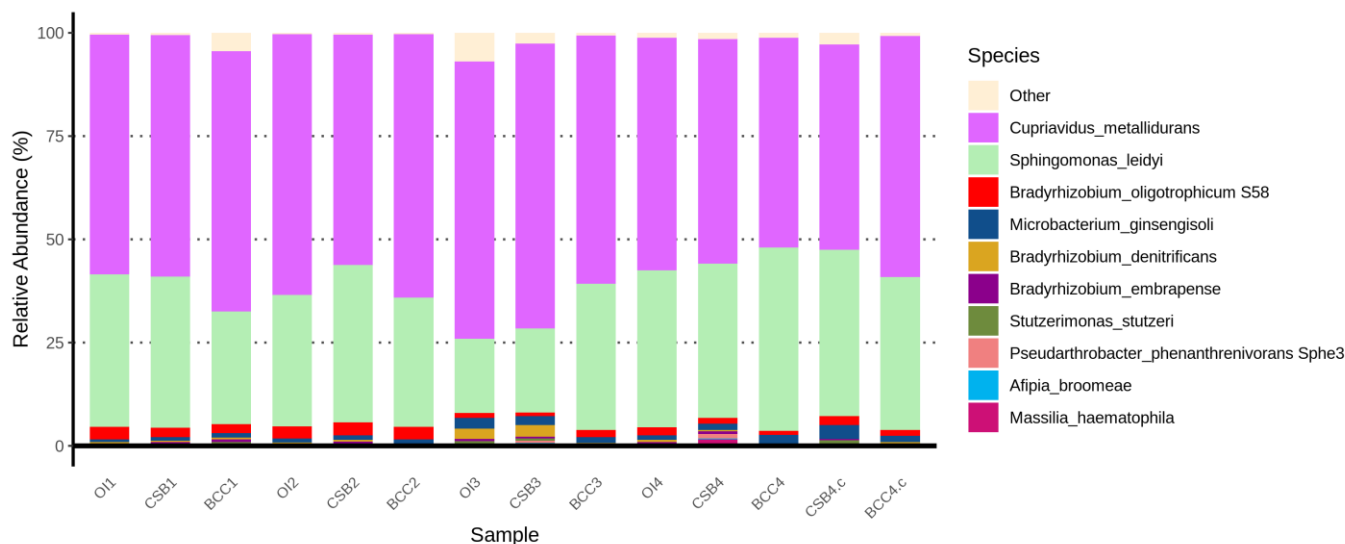


圖 51 十大優勢菌種

以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

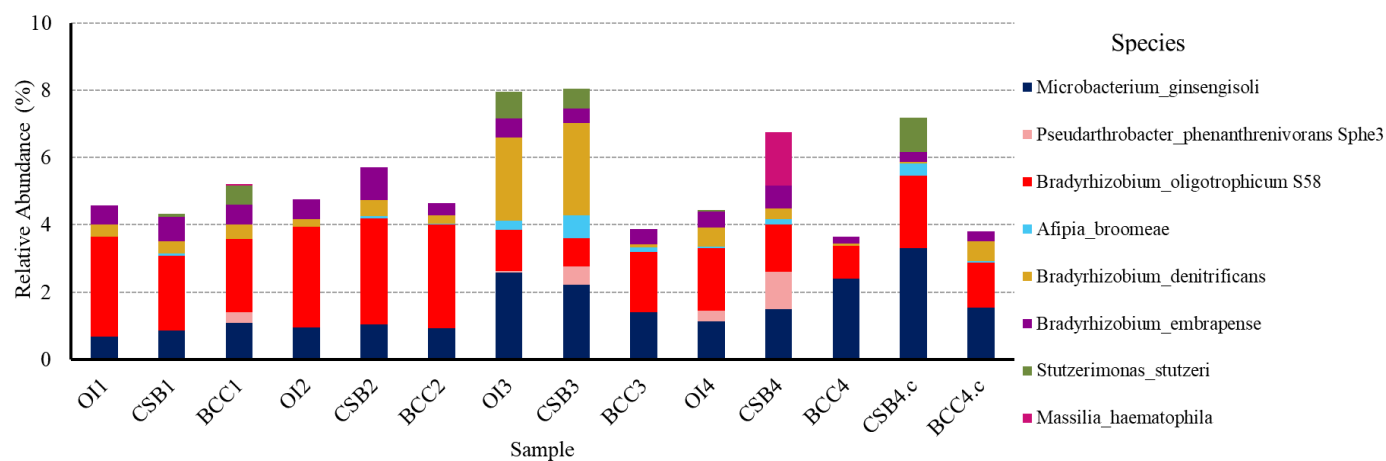


圖 52 八大優勢菌種

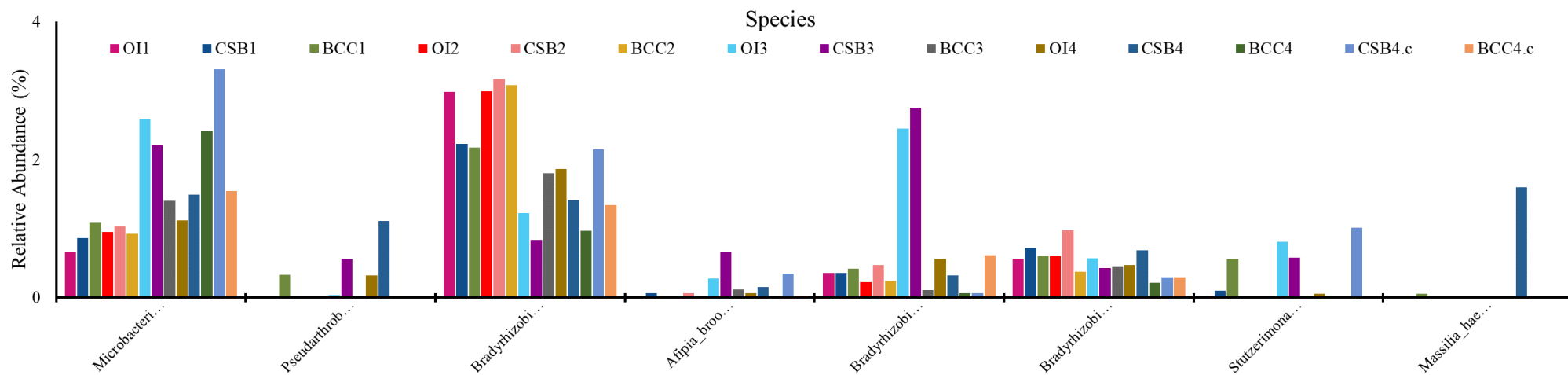


圖 53 八大優勢菌種於不同樣品之比例



第五章 結果與討論

5.4.5 物種豐度熱點

根據所有樣品在各等級中的物種信息及豐度信息（以物種為例），以豐度排名前 35 名的菌種（未滿 35 個則全部顯示），分組的豐度為組內所有樣品的平均豐度，從物種分佈進行了熱圖分析，以便於發現哪些物種在哪些樣品中含量較高或較低(Jami et al., 2013)。由圖 54 上的 OI4、CSB4、BCC4 中，可看出在有無添加生物碳之土壤樣品中物種豐度有明顯之區別。

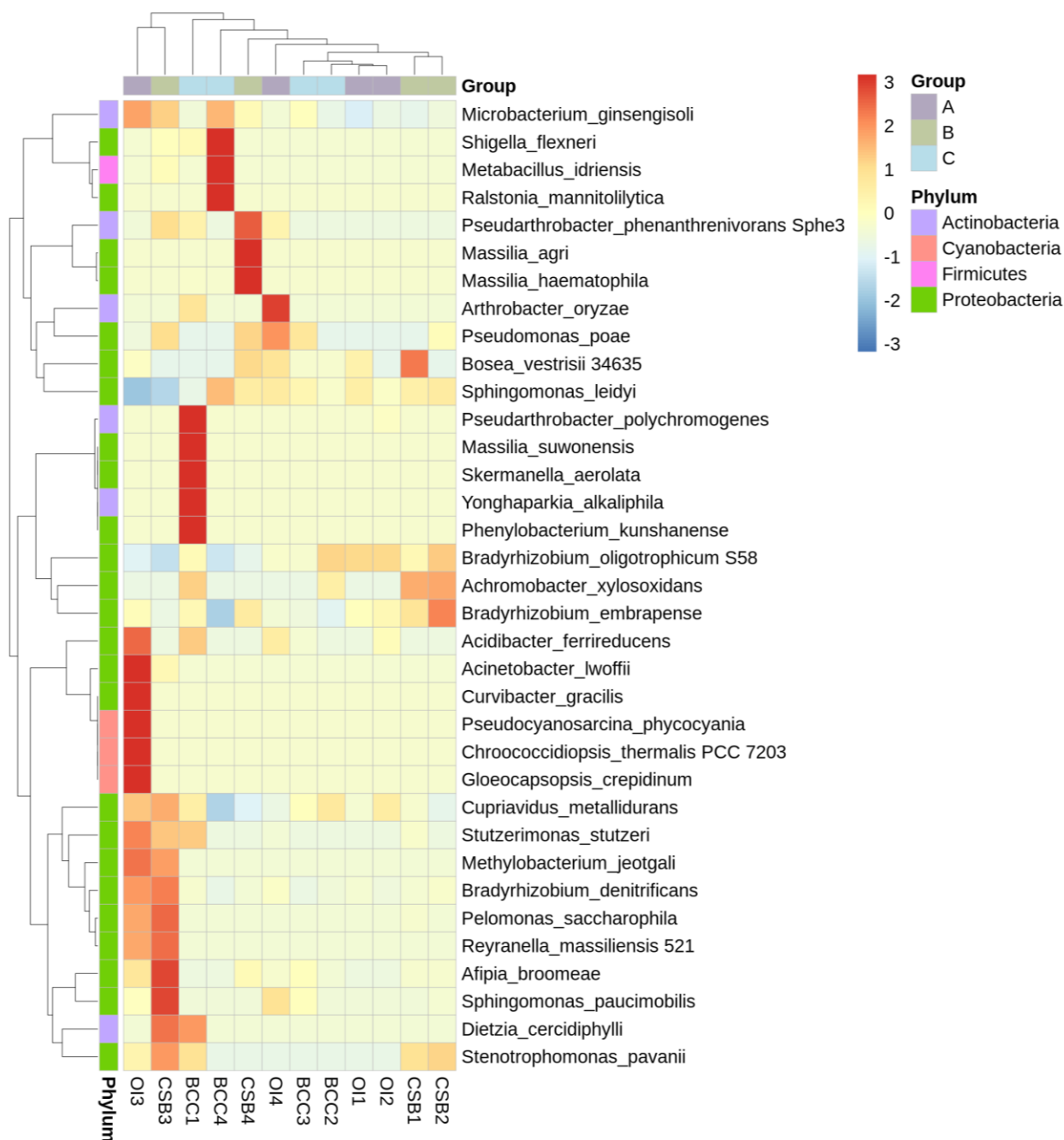


圖 54 物種分佈熱點圖



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.4.6 三元相圖

三元相圖(Ternary Plot)選取三組樣品可以看到在物種分類階層“種”上平均豐度排名前 10 之間優勢物種差異，依照各組的相對豐度繪製三元相圖 (Ternary plot)，如圖 48 所示三組樣品在不同分類階層上，優勢菌種在各組別的含量差異 (Bulgarelli et al., 2015)。圖 55 中三個頂點代表三個樣品分組，分別為井 A 不含生物碳(A)、井 B 添加椰子殼生物碳(B)及井 C 添加竹子生物碳(C)；三角形中圓圈顏色代表不同物種，圓圈的大小和所有樣本中的平均相對豐度成正比。圓圈離分組頂點越接近，表示該物種在這個分組中含量越高（較其他兩個分組高）。結果顯示大部分菌種皆位於中心點附近，表示大部分菌種於三個分組中含量相近，唯有 *Massilia_haematophila* 較為特殊，高比例存在於分組 B 中，顯示添加椰子殼生物碳可幫助該菌種生長。

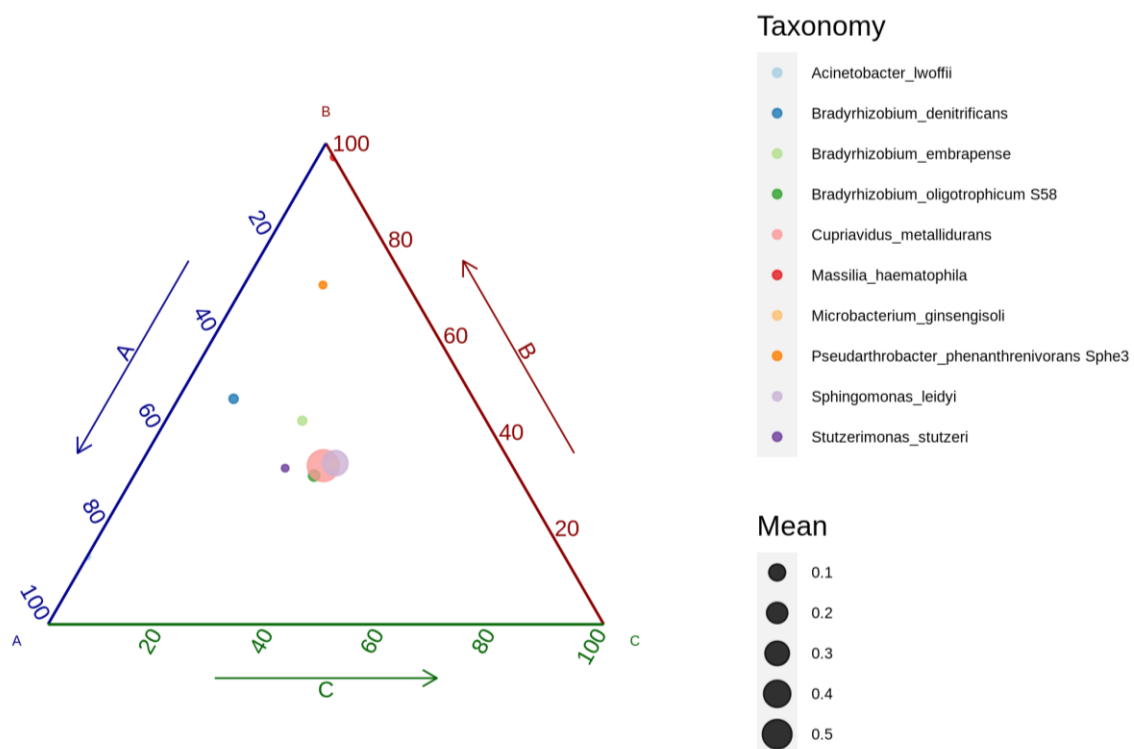


圖 55 不同樣品分組之間優勢菌種三元相圖



第五章 結果與討論

5.4.7 文氏圖

文氏圖(Venn diagram)繪製是對所有樣品進行標準化處理之後進行繪製，每個分組以一種色系區塊顯示，區塊與區塊間的交集則為分組間的菌種交集，數字表示交集的菌種數量，沒有互相重疊的區塊則為該分組獨有的菌種。圖 56 中每個圈代表一個分組，分別為分組 A 不含生物碳(A)、分組 B 添加椰子殼生物碳(B)及分組 C 添加竹子生物碳(C)，重疊部分表示共有的 ASVs 個數，沒有重疊部分表特有的 ASVs 個數。三口井約有 11.2% 之微生物菌種相同，井 A 約有 19.4% 獨有菌種，井 B 約有 23.9% 獨有菌種，井 C 約有 31.1% 獨有菌種，顯示添加生物碳後會增加獨有菌種比例，這可能是因為生物碳改善了土壤物理結構和微環境，為不同種類細菌生長提供了更多的生存空間和資源，從而促進了不同種類細菌的生長發育。另外由圖 57 也可顯示分組 A 與分組 B 之菌種較為相似，而分組 B 與分組 C 之菌種有較大的差異性。

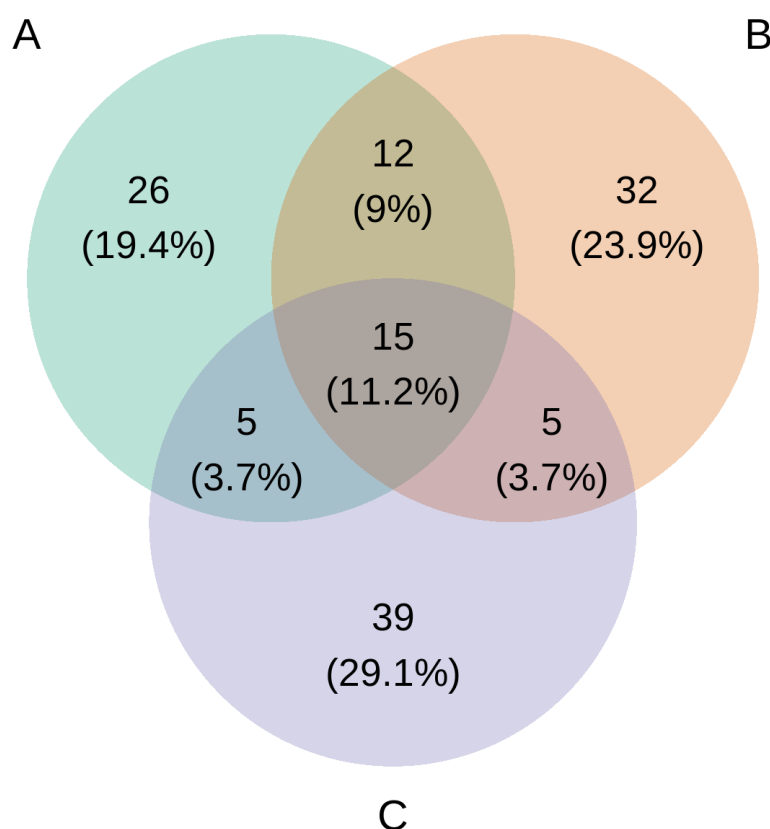


圖 56 各分組之間物種相似性



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

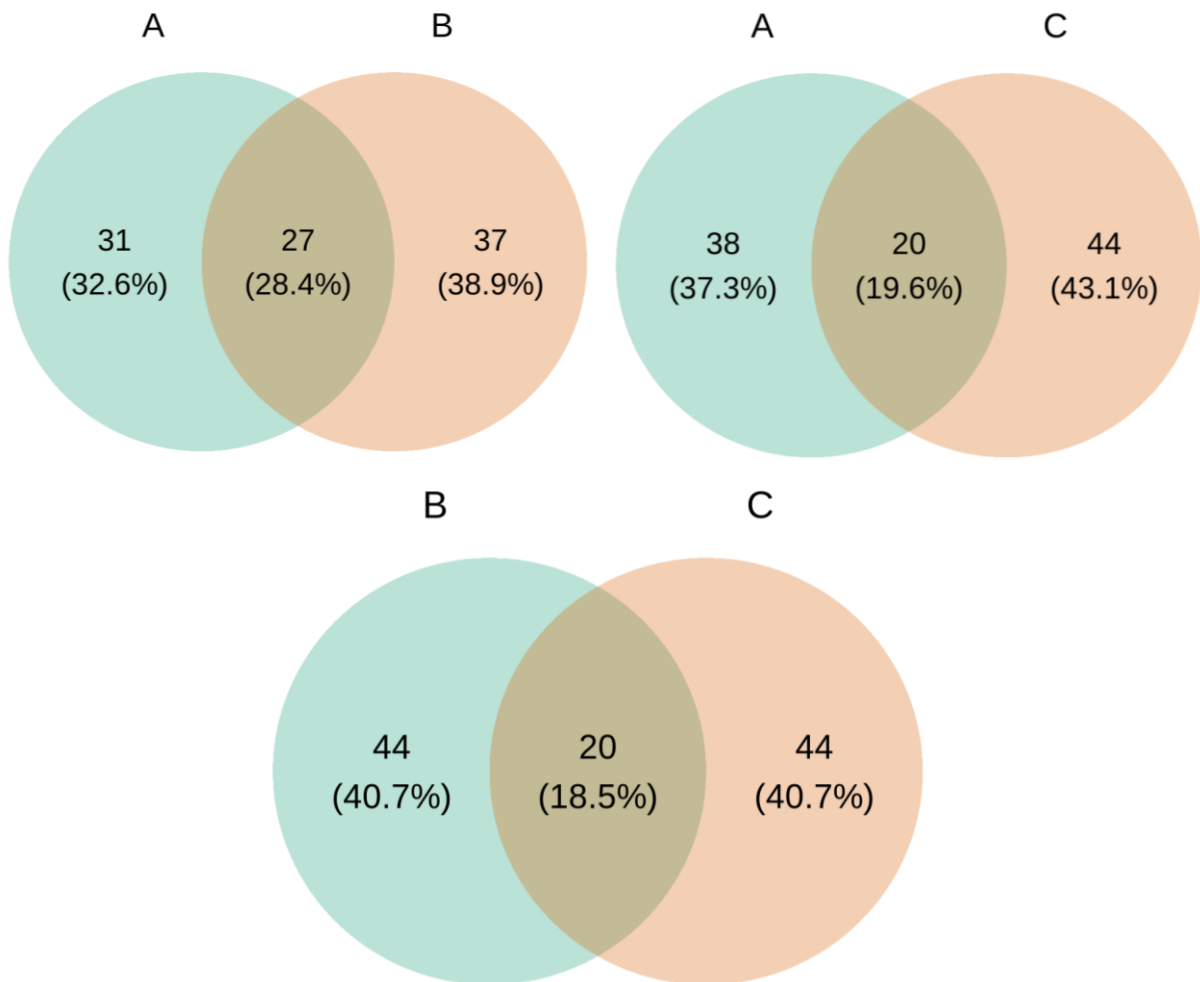


圖 57 不組別之間比較菌種相似度



第五章 結果與討論

5.4.8 主成分分析 (PCA)

主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 是一種用來識別不同維度數據統計分析方法，通過正交變換將一組可能存在相關性的變數轉換為一組線性不相關的變數，轉換後的這組變數叫主成分。通過對樣本（包括質控樣品）進行主成分分析，可以初步了解各組樣本之間的總體代謝差異和組內樣本之間的變異度大小。如圖 58 所示，不添加生物碳的樣品為 Blank 作為空白對照組(group A)與添加椰子殼生物碳(CSB) (group B)及竹子生物碳(BCC) (group C)之樣品進行比較。結果顯示第一主成分(PC1)可解釋變異的 23.46%，PC1 將 Blank 1 與 CSB3 明顯區分開來，其餘樣品較無顯著差異。第二主成分(PC2)解釋變異的 21.42%，不僅將添加竹子生物碳(BCC)的樣品區分開來，也將 CSB 1 的樣品與其他樣品區分開來。PC1 和 PC2 累計解釋了代謝 9 個樣品變異的 44.88%，可解釋近一半的變異資訊。

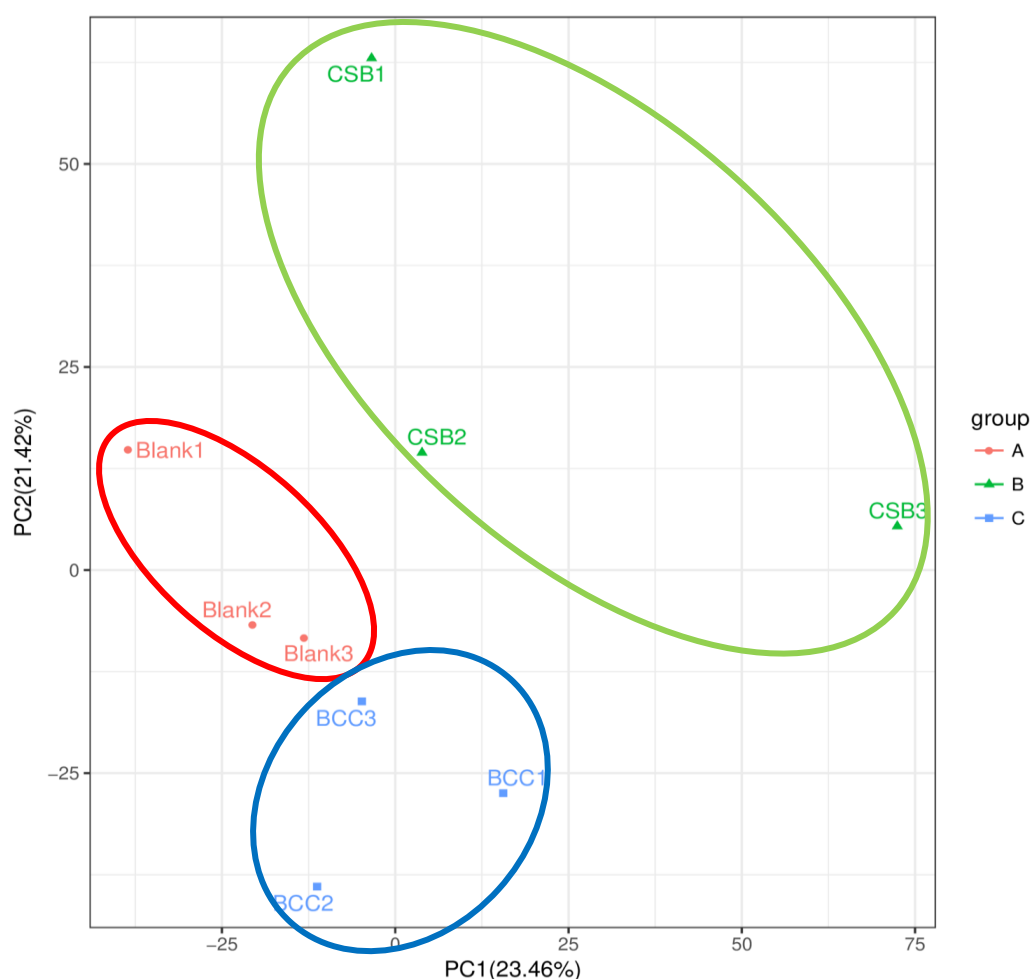


圖 58 不同分組之間之 PCA 分析



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.5 土壤細菌多樣性分析

Alpha 多樣性指數組間差異分析中，能以箱型圖直觀呈現出每組內的 Alpha 多樣性指數結果的中位數、離散程度、最大值、最小值、異常值。如下，以Shannon指數箱型圖為例，可藉由 Kruskal-Wallis 檢驗分析多組間的物種多樣性差異是否顯著。由圖 54 可得知，與對照組(Group A)相比，添加椰子殼生物碳 (group B) 及竹子生物碳 (group C)之樣品的Shannon指數無顯著變化，各組之間的差異均未達到顯著水準。因此，在菌群已穩定的土壤中添加低比例的生物碳不一定會明顯影響土壤中的細菌多樣性。

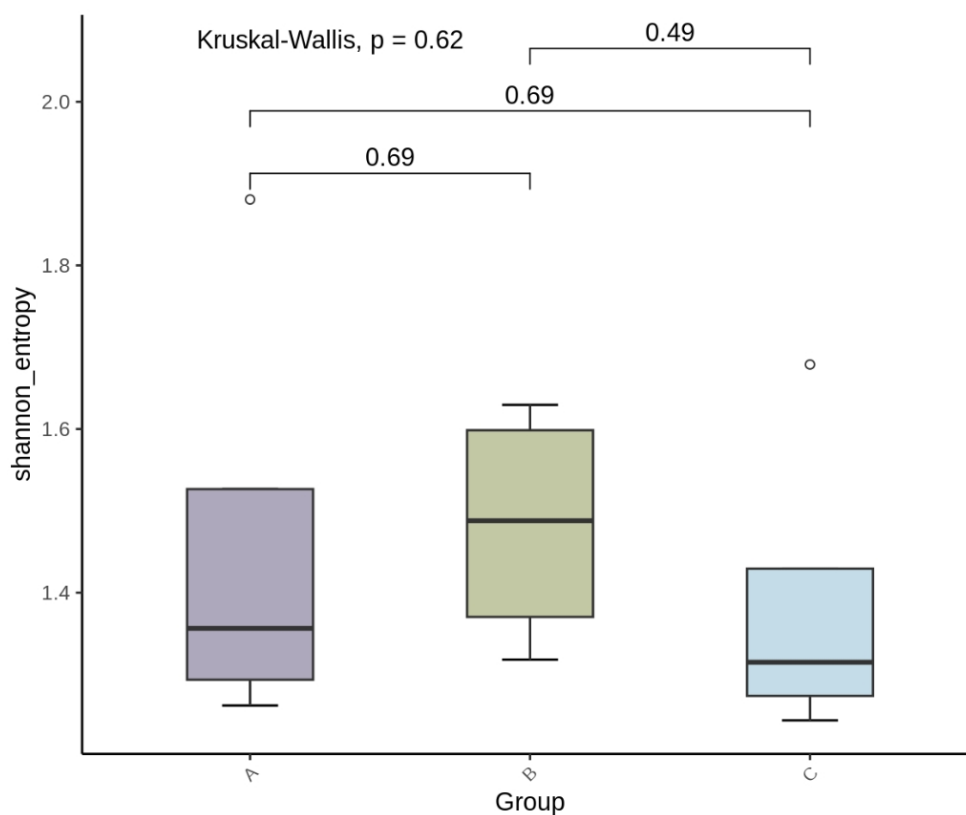


圖 59 Alpha 多樣性指數箱型圖



第五章 結果與討論

5.6 環境因子分析

環境因數(含水率、電導度、pH值)、優勢菌群和不同樣品間的關係如圖 60 所示，pH值對菌群的影響能力高於含水率與電導度，其中也顯示pH值和含水率呈現正相關，pH值、電導度和含水率呈現負相關。而十大菌屬大部分與環境因子相關性不大，皆集中於中心點，唯有*Sphingomonas leidy*及*Cupriavidus metallidurans*分別與pH值呈現負相關與正相關。污染物與環境因子之間也顯示TCE與VC去除率與pH值呈現正相關，TCE去除率與含水率與電導度關係不顯著，VC去除率與含水率呈現正相關，但與電導度呈現負相關。

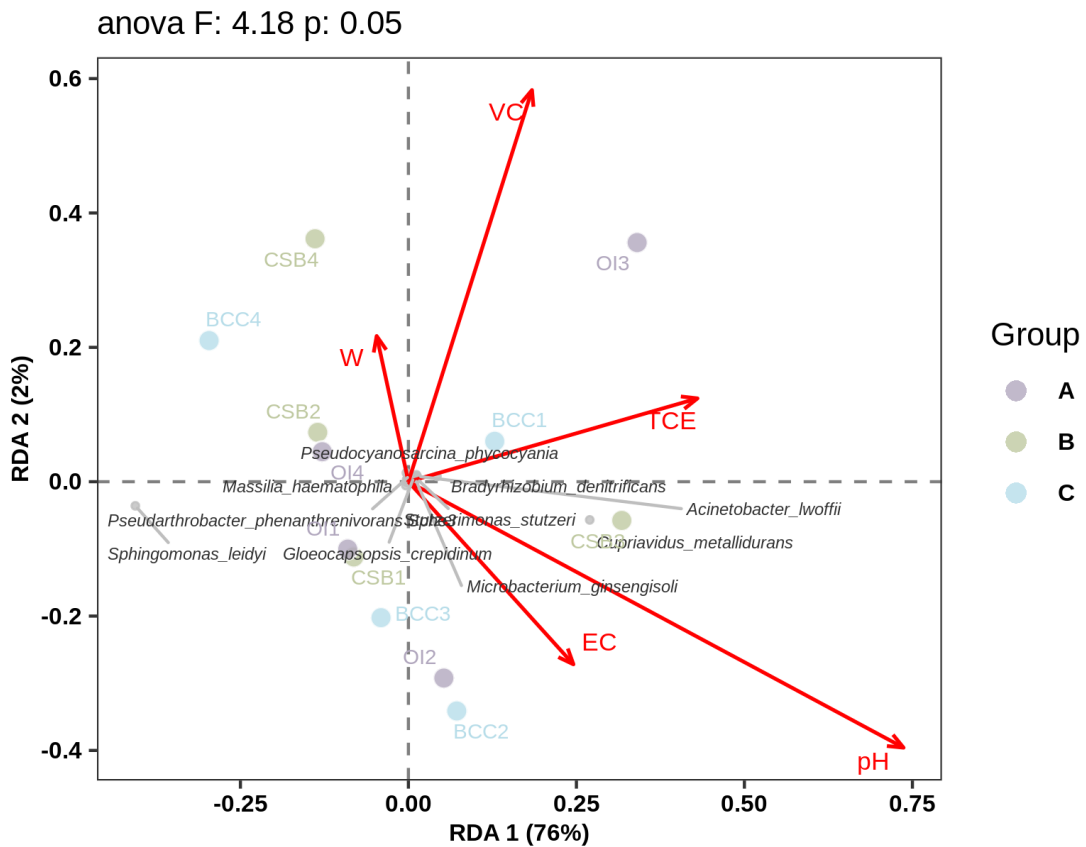


圖 60 組間環境因子與物種關聯 RDA 分析圖



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

5.7 優勢菌種

在微生物研究中，研究對象通常包括樣本、菌種、基因、環境因子或代謝通路等，為了獲得有用的資訊本研究使用 Spearman 檢驗相關分析對其中隱含的資訊進行探查，對成對物種進行相關性係數的計算和檢驗。在 ASVs 菌種豐度表格中選取豐度前 30 名的菌種，以種階層為繪圖菌種名稱，繪製優勢菌種之間 Spearman 相關係數分析圖，藉此圖可發現優勢菌種之間的重要模式與關係（依存或拮抗關係）。藍色表示正相關，紅色表示負相關。顏色越深物種之間的正或負相關性越強。

可由圖 61、62 看出 *Microbacterium_ginsengisoli* 與 *Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58、*Acinetobacter_lwoffii* 與 *Sphingomonas_leidy*、*Massilia_haematophila* 與 *Cupriavidus_metallidurans* 及 *Methylobacterium_jeotgali* 與 *Sphingomonas_leidy*，分別有著拮抗關係，相關係數依序為-0.73、-0.65、-0.65、-0.65，具有高度拮抗關係。這些具有高度拮抗關係之菌種都來自不同的菌屬，上述之關係可從圖 43、46 的優勢菌株於不同樣品之比例圖中觀察到，當一種菌株在豐度上有優勢時另一菌株就會隨之減少豐度，代表菌株間之相對豐度會因為依存或拮抗而影響。



第五章 結果與討論

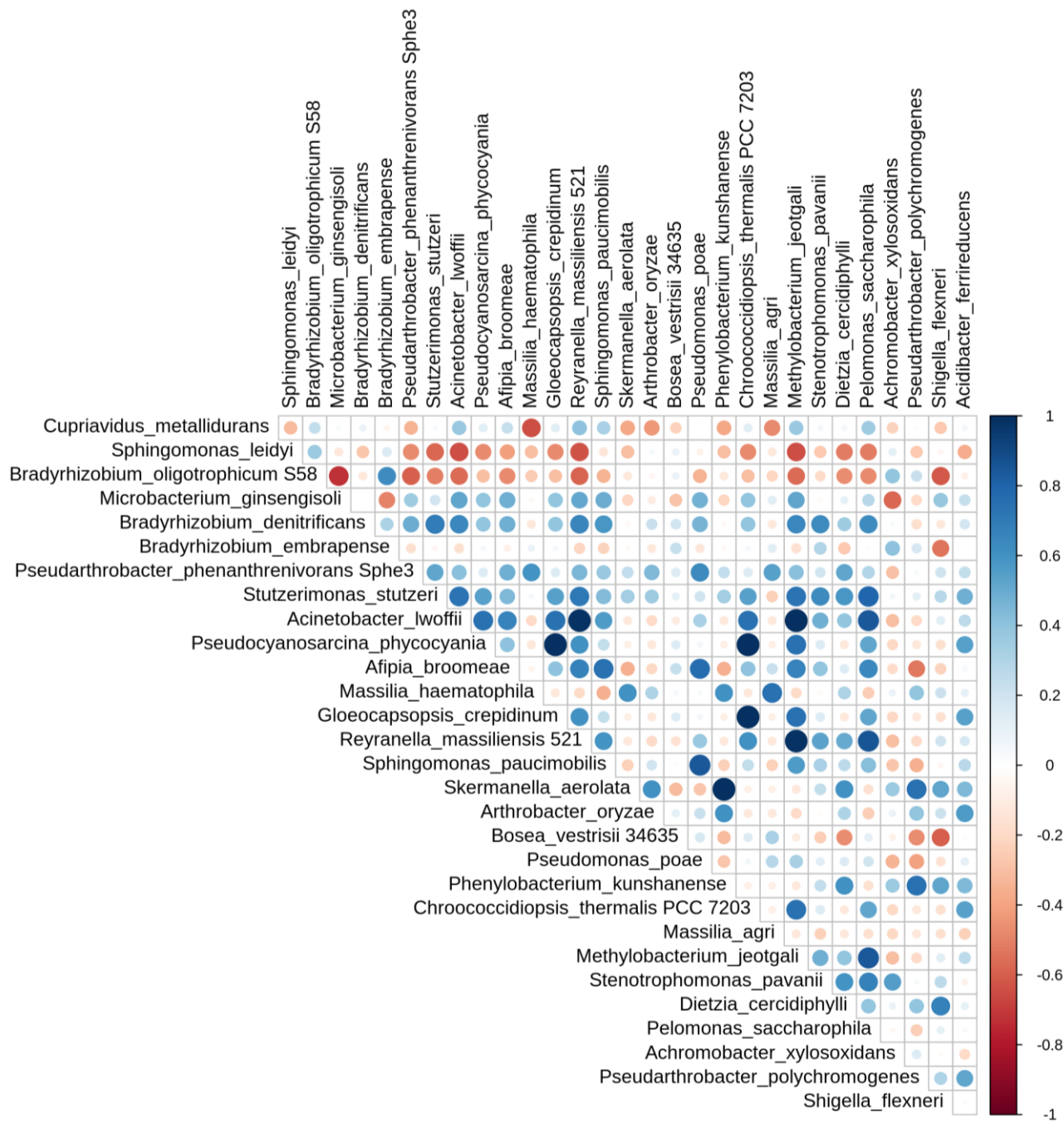


圖 61 優勢菌種 Spearman 相關係數圖



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

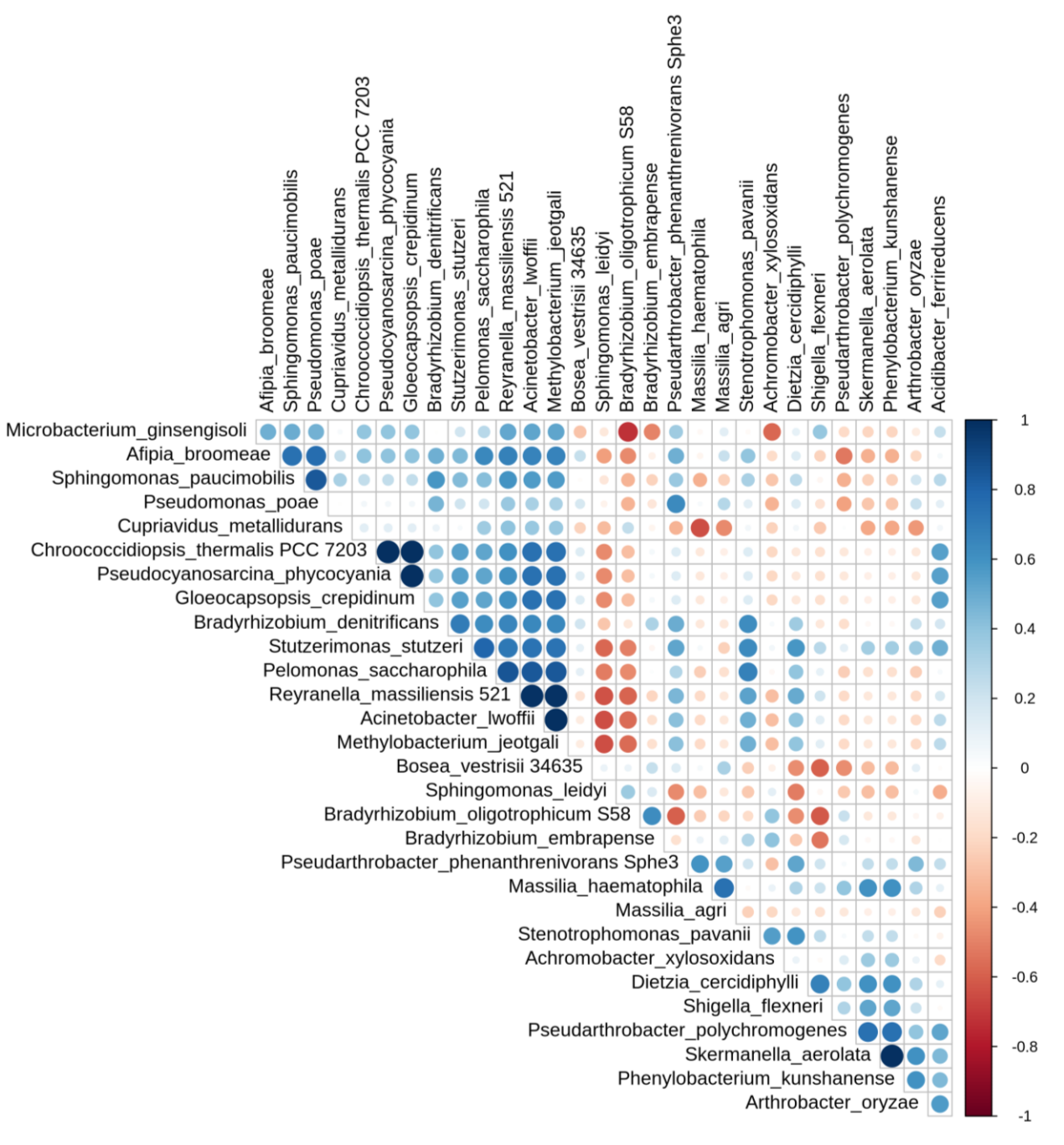


圖 62 優勢菌種 Spearman 相關係數圖



第五章 結果與討論

5.8 結論與建議

5.8.1 結論

1. 研究結果顯示，黏土層較不適合結合生物碳進行生物整治法，建議於坵土質砂層結合生物碳進行生物整治法可以提高土壤微生物代謝活動的強度、增加菌群豐富度及多樣性與參與微生物的胞外電子傳遞過程。以坵土質砂土壤與生物碳比例為 2% 來進行添加生物碳可以有效提高生物整治法效果。
2. 研究結果顯示，土壤 pH 值在 pH 6.9 時，土壤中微生物豐富度會較高，在未來現地應用上 pH 值維持在 pH 6.9，將有助於土壤中微生物生長及生物多樣性。
3. 利用 ESEM 鑑定生物碳表面的結構，椰子殼生物碳表面布滿非常細小之孔洞。竹子生物碳可看出表面具有較均勻分布的孔洞。經過 135 天後將生物碳取出觀察可看出添加的兩種生物碳多孔結構可為微生物提供適當的棲息地或載體。
4. 研究結果顯示，椰子殼生物碳的改良顯著增強了 TCE 的去除，縮短了停滯期並延長了指數降解期。在椰子殼生物碳系統中可以觀察到第 45 天後，TCE 之濃度快速下降，並轉化成 CIS - 1,2 DCE，而 CIS - 1,2 DCE 與 VC 達到轉化平衡。
5. 生物碳對 TCE 及 CIS - 1,2 DCE 有極佳的吸附能力，特別是椰子殼生物碳的吸附效果更優於竹子生物碳；而竹子生物碳對於吸附 VC 效果較佳。TCE 對生物碳的吸附和生物脫氯以及中間產物的吸附同時或交替發生，而吸附的有機分子也可能被生物碳上/內的微生物降解。
6. 在 16S 全長分析結果顯示在微生物群落結構中十大優勢菌屬，分別為 *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Pseudocyanosarcina*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Afipia*, *Stutzerimonas*, *Acinetobacter* and *Massilia*。其中四種菌屬是在每個樣品都可以觀察到的，分別為 *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, and *Microbacterium*。
7. 在 16S 全長分析結果顯示在微生物群落結構中有 6 種菌種為 3 個井都有，分別為 *Cupriavidus_metalldurans*，*Sphingomonas_leidyi*，*Microbacterium_ginsengisoli*，*Bradyrhizobium_oligotrophicum* S58，



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

Bradyrhizobium_embrapense , and *Bradyrhizobium_denitrificans* , 而 *Cupriavidus_metallidurans* 與 *Sphingomonas_leidyi* 為現地非常優勢的菌種，占有比例非常高，*Sphingomonas_leidyi* 此菌種在含有竹子生物碳之井中較多。

8. 在菌群已穩定的土壤中添加低比例的生物碳不一定會明顯影響土壤中的細菌多樣性。
9. 由上述可知，在已知土壤中已含有有效降解含氯污染物之之優勢菌種下，可在 TCE 濃度較高時可以先投入椰子殼生物碳，在 45 至 90 天後，TCE 之濃度快速下降，並轉化成 CIS - 1,2 DCE 及 VC ，在 90 天後，再投入竹子生物碳，針對 VC 進行污染濃度之降解，透過兩種生物碳之結合整治，可以有效針對不同污染物進行吸附降解研究。
10. 在本研究的場址中，pH 值對菌群的影響能力高於含水率與電導度，其中也顯示 pH 值和含水率呈現正相關，pH 值、電導度和含水率呈現負相關。



第五章 結果與討論

5.8.2 建議

生物碳以其獨特的環境功能和巨大的應用潛力在固碳、土壤改良和污染修復領域得到了廣泛關注，但其固定化微生物技術在污染土壤修復中的研究則剛剛起步。本文以椰子殼與竹子為原料製備生物碳，對現場添加生物碳去除三氯乙烯污染土壤的作用機制進行了探索，但由於生物碳原材料及熱解條件等差異，生物碳在結構、粒徑分佈、比表面積、pH 等理化性質上，表現出非常廣泛的多樣性。因此，未來還需要選擇更多的生物碳原材料，在更寬的熱解製備溫度範圍內進行系統性的研究。另外，由於土壤環境的複雜性及其微生物的多樣性，還需要針對生物碳對不同污染土壤中生物修復作進一步的研究比較，特別是對土壤微生物數量、酵素活性等方面的影響變化，還需作深入系統研究。



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

第六章、參考文獻

- Al-Shamsi, M. A., & Thomson, N. R. (2013). Treatment of organic compounds by activated persulfate using nanoscale zerovalent iron. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(38), 13564-13571.
- Alvim, G. M., & Pontes, P. P. (2018). Aeration and sawdust application effects as structural material in the bioremediation of clayey acid soils contaminated with diesel oil. *International Soil and Water Conservation Research*, 6(3), 253-260.
- Amalina, F., Razak, A. S. A., Krishnan, S., Zularisam, A. W., & Nasrullah, M. (2022). A comprehensive assessment of the method for producing biochar, its characterization, stability, and potential applications in regenerative economic sustainability – A review. *Cleaner Materials*, 3, 100045.
- Anderson, C. R., Condron, L. M., Clough, T. J., Fiers, M., Stewart, A., Hill, R. A., & Sherlock, R. R. (2011). Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*, 54(5-6), 309-320.
- Armond, M. H. M. (2021). *Trichloroethylene Remediation by Engineered Soil Bacteria* [Brigham Young University].
- Aviado, D. M., Zakhari, S., Simaan, J. A., Ulsamer, A. G., & Golberg, L. (2018). *Methyl chloroform and trichloroethylene in the environment*. CRC Press.
- Baken, K. A., Sjerps, R. M., Schriks, M., & van Wezel, A. P. (2018). Toxicological risk assessment and prioritization of drinking water relevant contaminants of emerging concern. *Environment international*, 118, 293-303.
- Birkhofer, K., Diekötter, T., Boch, S., Fischer, M., Müller, J., Socher, S., & Wolters, V. (2011). Soil fauna feeding activity in temperate grassland soils increases with legume and grass species richness. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2200-2207.
- Brusseau, M. L., Arnold, R. G., Ela, W., & Field, J. (2001). Overview of innovative remediation approaches for chlorinated solvents. *Rapport technique, University of Arizona*.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy,



第六章 參考文獻

- A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell host & microbe*, 17(3), 392-403.
- Cao, X., & Harris, W. (2010). Properties of dairy-manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. *Bioresource technology*, 101(14), 5222-5228.
- Cao, X., Ro, K. S., Libra, J. A., Kammann, C. I., Lima, I., Berge, N., Li, L., Li, Y., Chen, N., & Yang, J. (2013). Effects of biomass types and carbonization conditions on the chemical characteristics of hydrochars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(39), 9401-9411.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522.
- Chang, B., Yang, C., Cheng, C., & Yuan, S. (2004). Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. *Chemosphere*, 55(4), 533-538.
- Chen, H.-M., & Wu, M.-T. (2017). Residential exposure to chlorinated hydrocarbons from groundwater contamination and the impairment of renal function-An ecological study. *Scientific reports*, 7(1), 40283.
- Chen, H., Gao, Y., El-Naggar, A., Niazi, N. K., Sun, C., Shaheen, S. M., Hou, D., Yang, X., Tang, Z., & Liu, Z. (2022). Enhanced sorption of trivalent antimony by chitosan-loaded biochar in aqueous solutions: Characterization, performance and mechanisms. *Journal of hazardous materials*, 425, 127971.
- Christy, T. M. (1998). A permeable membrane sensor for the detection of volatile compounds in soil. 11th EEGS Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems,
- Clough, T. J., Condon, L. M., Kammann, C., & Müller, C. (2013). A review of biochar and soil nitrogen dynamics. *Agronomy*, 3(2), 275-293.
- Cycoń, M., Mroziński, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52-71.
- Dai, C., Zhou, Y., Peng, H., Huang, S., Qin, P., Zhang, J., Yang, Y., Luo, L., & Zhang, X.



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

- (2018). Current progress in remediation of chlorinated volatile organic compounds: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 62, 106-119.
- de Souza Pohren, R., de Oliveira Leite, D. A. N., de Franceschi de Angelis, D., & Vargas, V. M. F. (2016). Performance of simulated bioremediation in real samples of soils contaminated with PAHs. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(9), 1-14.
- Decesaro, A., Rampel, A., Machado, T. S., Thomé, A., Reddy, K., Margarites, A. C., & Colla, L. M. (2017). Bioremediation of soil contaminated with diesel and biodiesel fuel using biostimulation with microalgae biomass. *Journal of Environmental Engineering*, 143(4), 04016091.
- Dong, H., Hou, K., Qiao, W., Cheng, Y., Zhang, L., Wang, B., Li, L., Wang, Y., Ning, Q., & Zeng, G. (2019). Insights into enhanced removal of TCE utilizing sulfide-modified nanoscale zero-valent iron activated persulfate. *Chemical Engineering Journal*, 359, 1046-1055.
- Dong, H., Zhao, F., Zeng, G., Tang, L., Fan, C., Zhang, L., Zeng, Y., He, Q., Xie, Y., & Wu, Y. (2016). Aging study on carboxymethyl cellulose-coated zero-valent iron nanoparticles in water: Chemical transformation and structural evolution. *Journal of hazardous materials*, 312, 234-242.
- Dong, X., Ma, L. Q., & Li, Y. (2011). Characteristics and mechanisms of hexavalent chromium removal by biochar from sugar beet tailing. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), 909-915.
- El-Naggar, A., Lee, S. S., Awad, Y. M., Yang, X., Ryu, C., Rizwan, M., Rinklebe, J., Tsang, D. C. W., & Ok, Y. S. (2018). Influence of soil properties and feedstocks on biochar potential for carbon mineralization and improvement of infertile soils. *Geoderma*, 332, 100-108.
- Elad, Y., David, D. R., Harel, Y. M., Borenshtein, M., Kalifa, H. B., Silber, A., & Graber, E. R. (2010). Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology*, 100(9), 913-921.
- Elementar. (2020). UNICUBE trace. <https://www.elementar.com/en/products/organic-elemental-analyzers/unicube-trace>



第六章 參考文獻

- Estrada-De Los Santos, P., Martínez-Aguilar, L., López-Lara, I. M., & Caballero-Mellado, J. (2012). *Cupriavidus alkaliphilus* sp. nov., a new species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. *Systematic and applied microbiology*, 35(5), 310-314.
- Feng, Y., Chen, R., Hu, J., Zhao, F., Wang, J., Chu, H., Zhang, J., Dolfing, J., & Lin, X. (2015). *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 186-194.
- Flores Orozco, A., Velimirovic, M., Tosco, T., Kemna, A., Sapion, H., Klaas, N., Sethi, R., & Bastiaens, L. (2015). Monitoring the injection of microscale zerovalent iron particles for groundwater remediation by means of complex electrical conductivity imaging. *Environmental science & technology*, 49(9), 5593-5600.
- Fu, F., Dionysiou, D. D., & Liu, H. (2014). The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: a review. *Journal of hazardous materials*, 267, 194-205.
- Fu, P., Hu, S., Xiang, J., Sun, L., Su, S., & Wang, J. (2012). Evaluation of the porous structure development of chars from pyrolysis of rice straw: Effects of pyrolysis temperature and heating rate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 98, 177-183.
- Furrie, E. (2006). A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, 55(2), 141-143.
- Gardi, C., & Jeffery, S. (2009). *Soil biodiversity*. Citeseer.
- Geoprobe®. (2020). 7822DT Drill Rig. <https://geoprobe.com/drilling-rigs/7822dt-drill-rig>
- Gonçalves, C. R., & Delabona, P. d. S. (2022). Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. *Environmental Advances*, 8, 100220.
- Guha, N., Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Mattock, H., & Straif, K. (2012). Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites. In: Elsevier.
- He, Y., Wilson, J., Su, C., & Wilkin, R. (2015). Review of abiotic degradation of



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

- chlorinated solvents by reactive iron minerals in aquifers. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 35(3), 57-75.
- Hiortdahl, K. M., & Borden, R. C. (2014). Enhanced reductive dechlorination of tetrachloroethene dense nonaqueous phase liquid with EVO and Mg (OH) 2. *Environmental science & technology*, 48(1), 624-631.
- Hu, Q., Jung, J., Chen, D., Leong, K., Song, S., Li, F., Mohan, B. C., Yao, Z., Prabhakar, A. K., Lin, X. H., Lim, E. Y., Zhang, L., Souradeep, G., Ok, Y. S., Kua, H. W., Li, S. F. Y., Tan, H. T. W., Dai, Y., Tong, Y. W., . . . Wang, C.-H. (2021). Biochar industry to circular economy. *Science of the Total Environment*, 757, 143820.
- Huang, Y., Lee, X., Grattieri, M., Yuan, M., Cai, R., Macazo, F. C., & Minteer, S. D. (2020). Modified biochar for phosphate adsorption in environmentally relevant conditions. *Chemical Engineering Journal*, 380, 122375.
- Huff, M. D., & Lee, J. W. (2016). Biochar-surface oxygenation with hydrogen peroxide. *Journal of environmental management*, 165, 17-21.
- Huling, S. G., & Pivetz, B. E. (2006). *In-situ chemical oxidation*.
- Igalavithana, A. D., Kim, K.-H., Jung, J.-M., Heo, H.-S., Kwon, E. E., Tack, F. M., Tsang, D. C., Jeon, Y. J., & Ok, Y. S. (2019). Effect of biochars pyrolyzed in N₂ and CO₂, and feedstock on microbial community in metal (loid) s contaminated soils. *Environment international*, 126, 791-801.
- Ippolito, J. A., Cui, L., Kammann, C., Wrage-Mönnig, N., Estavillo, J. M., Fuertes-Mendizabal, T., Cayuela, M. L., Sigua, G., Novak, J., & Spokas, K. (2020). Feedstock choice, pyrolysis temperature and type influence biochar characteristics: a comprehensive meta-data analysis review. *Biochar*, 2(4), 421-438.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal*, 7(6), 1069-1079.
- Jedynak, K., Zdenkowski, J., Swiecicka, A., & Choma, J. (2015). Adsorption Properties Characterization of Ordered Mesoporous Carbons by Inverse Gas Chromatography. *OCHRONA SRODOWISKA*, 37(2), 3-10.
- Jia, M., Wang, F., Bian, Y., Jin, X., Song, Y., Kengara, F. O., Xu, R., & Jiang, X. (2013).



第六章 參考文獻

- Effects of pH and metal ions on oxytetracycline sorption to maize-straw-derived biochar. *Bioresource technology*, 136, 87-93.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., & Gerstein, M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, 10(1), 5029.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., & Kawashima, K. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA research*, 9(6), 189-197.
- Kappler, A., Wuestner, M. L., Ruecker, A., Harter, J., Halama, M., & Behrens, S. (2014). Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe (III) minerals. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(8), 339-344.
- Kellenberger, E. (2001). Exploring the unknown. *EMBO reports*, 2(1), 5-7.
- Khan, S., Priyamvada, S., Khan, S. A., Khan, W., Farooq, N., Khan, F., & Yusufi, A. (2009). Effect of trichloroethylene (TCE) toxicity on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in kidney and other rat tissues. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1562-1568.
- Khare, P., & Goyal, D. K. (2013). Effect of high and low rank char on soil quality and carbon sequestration. *Ecological engineering*, 52, 161-166.
- Kittelmann, S., & Friedrich, M. W. (2008). Novel uncultured Chloroflexi dechlorinate perchloroethene to trans-dichloroethene in tidal flat sediments. *Environmental microbiology*, 10(6), 1557-1570.
- Kong, L.-L., Liu, W.-T., & Zhou, Q.-X. (2014). Biochar: an effective amendment for remediating contaminated soil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 228*, 83-99.
- Krzmarzick, M. J., Crary, B. B., Harding, J. J., Oyerinde, O. O., Leri, A. C., Myneni, S. C., & Novak, P. J. (2012). Natural niche for organohalide-respiring Chloroflexi. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 393-401.
- Kuzyakov, Y., Bogomolova, I., & Glaser, B. (2014). Biochar stability in soil: decomposition during eight years and transformation as assessed by



- 以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能
compound-specific ^{14}C analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 229-236.
- Lash, L. H., Chiu, W. A., Guyton, K. Z., & Rusyn, I. (2014). Trichloroethylene biotransformation and its role in mutagenicity, carcinogenicity and target organ toxicity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 762, 22-36.
- Lehmann, J., & Joseph, S. (2015). *Biochar for environmental management: science, technology and implementation*. Routledge.
- Lehmann, J., & Rondon, M. (2006). Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid tropics. *Biological approaches to sustainable soil systems*, 113(517), e530.
- Lihl, C., Douglas, L. M., Franke, S., Pérez-de-Mora, A., Meyer, A. H., Daubmeier, M., Edwards, E. A., Nijenhuis, I., Sherwood Lollar, B., & Elsner, M. (2019). Mechanistic dichotomy in bacterial trichloroethene dechlorination revealed by carbon and chlorine isotope effects. *Environmental science & technology*, 53(8), 4245-4254.
- Lin, K.-S., Mdlovu, N. V., Chen, C.-Y., Chiang, C.-L., & Dehvari, K. (2018). Degradation of TCE, PCE, and 1, 2-DCE DNAPLs in contaminated groundwater using polyethylenimine-modified zero-valent iron nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, 175, 456-466.
- Liu, S., Xu, W.-h., Liu, Y.-g., Tan, X.-f., Zeng, G.-m., Li, X., Liang, J., Zhou, Z., Yan, Z.-l., & Cai, X.-x. (2017). Facile synthesis of Cu (II) impregnated biochar with enhanced adsorption activity for the removal of doxycycline hydrochloride from water. *Science of the Total Environment*, 592, 546-553.
- Luo, Y.-H., Zhou, C., Bi, Y., Long, X., Wang, B., Tang, Y., Krajmalnik-Brown, R., & Rittmann, B. E. (2020). Long-term continuous co-reduction of 1, 1, 1-trichloroethane and trichloroethene over palladium nanoparticles spontaneously deposited on H_2 -transfer membranes. *Environmental science & technology*, 55(3), 2057-2066.
- Malghani, S., Gleixner, G., & Trumbore, S. E. (2013). Chars produced by slow pyrolysis and hydrothermal carbonization vary in carbon sequestration potential and greenhouse gases emissions. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 137-146.
- McHenry, M. P. (2009). Agricultural bio-char production, renewable energy generation



第六章 參考文獻

- and farm carbon sequestration in Western Australia: Certainty, uncertainty and risk. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129(1-3), 1-7.
- Mera, N., & Iwasaki, K. (2007). Use of plate-wash samples to monitor the fates of culturable bacteria in mercury-and trichloroethylene-contaminated soils. *Applied microbiology and biotechnology*, 77, 437-445.
- Meyer, D. D., Beker, S. A., Heck, K., Peralba, M., Do Carmo, R., & Bento, F. M. (2018). Simulation of a surface spill of different diesel/biodiesel mixtures in an ultisol, using natural attenuation and bioaugmentation/biostimulation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 2741-2752.
- Mohan, D., Sarswat, A., Ok, Y. S., & Pittman Jr, C. U. (2014). Organic and inorganic contaminants removal from water with biochar, a renewable, low cost and sustainable adsorbent—a critical review. *Bioresource technology*, 160, 191-202.
- Mohanty, P., Pant, K. K., Naik, S. N., Parikh, J., Hornung, A., & Sahu, J. N. (2014). Synthesis of green fuels from biogenic waste through thermochemical route—The role of heterogeneous catalyst: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 131-153.
- Mousavi, M. S., Feng, Y., McCann, J., & Eun, J. (2021). In Situ Characterization of Municipal Solid Waste Using Membrane Interface Probe (MIP) and Hydraulic Profiling Tool (HPT) in an Active and Closed Landfill. *Infrastructures*, 6(3), 33.
- Mukherjee, A., & Lal, R. (2013). Biochar impacts on soil physical properties and greenhouse gas emissions. *Agronomy*, 3(2), 313-339.
- Mukherjee, A., Zimmerman, A., & Harris, W. (2011). Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. *Geoderma*, 163(3-4), 247-255.
- Nemir, A., David, M. M., Perrussel, R., Sapkota, A., Simonet, P., Monier, J.-M., & Vogel, T. M. (2010). Comparative phylogenetic microarray analysis of microbial communities in TCE-contaminated soils. *Chemosphere*, 80(5), 600-607.
- Nielsen, U. N., Wall, D. H., & Six, J. (2015). Soil biodiversity and the environment. *Annual review of environment and resources*, 40, 63-90.
- Nikitin, D., Semenov, M., Chernov, T., Ksenofontova, N., Zhelezova, A., Ivanova, E., Khitrov, N., & Stepanov, A. (2022). Microbiological indicators of soil ecological functions: a review. *Eurasian Soil Science*, 55(2), 221-234.



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

- Palansooriya, K. N., Shaheen, S. M., Chen, S. S., Tsang, D. C. W., Hashimoto, Y., Hou, D., Bolan, N. S., Rinklebe, J., & Ok, Y. S. (2020). Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. *Environment international*, 134, 105046.
- Palansooriya, K. N., Wong, J. T. F., Hashimoto, Y., Huang, L., Rinklebe, J., Chang, S. X., Bolan, N., Wang, H., & Ok, Y. S. (2019). Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar*, 1(1), 3-22.
- Pant, P., & Pant, S. (2010). A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences*, 22(1), 116-126.
- Park, H. J., Dong, J.-I., Jeon, J.-K., Park, Y.-K., Yoo, K.-S., Kim, S.-S., Kim, J., & Kim, S. (2008). Effects of the operating parameters on the production of bio-oil in the fast pyrolysis of Japanese larch. *Chemical Engineering Journal*, 143(1-3), 124-132.
- Pavlostathis, S. G., & Jaglal, K. (1991). Desorptive behavior of trichloroethylene in contaminated soil. *Environmental science & technology*, 25(2), 274-279.
- Perele, L. W. (2010). In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 81-89.
- Perez-de-Mora, A., Zila, A., McMaster, M. L., & Edwards, E. A. (2014). Bioremediation of chlorinated ethenes in fractured bedrock and associated changes in dechlorinating and nondechlorinating microbial populations. *Environmental science & technology*, 48(10), 5770-5779.
- Pierri, D. (2021). Actual decay of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in a highly contaminated shallow groundwater system. *Environmental Advances*, 5, 100090.
- Power, C., Gerhard, J. I., Karaoulis, M., Tsourlos, P., & Giannopoulos, A. (2014). Evaluating four-dimensional time-lapse electrical resistivity tomography for monitoring DNAPL source zone remediation. *Journal of contaminant hydrology*, 162, 27-46.
- Rong, L., Zheng, X., Oba, B. T., Shen, C., Wang, X., Wang, H., Luo, Q., & Sun, L. (2021). Activating soil microbial community using bacillus and rhamnolipid to remediate TPH contaminated soil. *Chemosphere*, 275, 130062.



第六章 參考文獻

- Russell, H. H., Matthews, J. E., & Guy, W. S. (1992). TCE removal from contaminated soil and groundwater. *EPA environmental engineering sourcebook*, 87-100.
- Schaefer, C. E., Ho, P., Berns, E., & Werth, C. (2018). Mechanisms for abiotic dechlorination of trichloroethene by ferrous minerals under oxic and anoxic conditions in natural sediments. *Environmental science & technology*, 52(23), 13747-13755.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12, 1-18.
- Siedt, M., Schäffer, A., Smith, K. E., Nabel, M., Roß-Nickoll, M., & van Dongen, J. T. (2021). Comparing straw, compost, and biochar regarding their suitability as agricultural soil amendments to affect soil structure, nutrient leaching, microbial communities, and the fate of pesticides. *Science of The Total Environment*, 751, 141607.
- Siegrist, R. L., Crimi, M., & Simpkin, T. J. (2011). *In situ chemical oxidation for groundwater remediation* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Sohi, S., Lopez-Capel, E., Krull, E., & Bol, R. (2009). Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. *CSIRO Land and Water Science Report*, 5(09), 17-31.
- Song, S., Arora, S., Laserna, A. K. C., Shen, Y., Thian, B. W. Y., Cheong, J. C., Tan, J. K. N., Chiam, Z., Fong, S. L., & Ghosh, S. (2020). Biochar for urban agriculture: Impacts on soil chemical characteristics and on Brassica rapa growth, nutrient content and metabolism over multiple growth cycles. *Science of the Total Environment*, 727, 138742.
- Spokas, K. A., Novak, J. M., Stewart, C. E., Cantrell, K. B., Uchimiya, M., DuSaire, M. G., & Ro, K. S. (2011). Qualitative analysis of volatile organic compounds on biochar. *Chemosphere*, 85(5), 869-882.
- Stroo, H. F., Leeson, A., Marqusee, J. A., Johnson, P. C., Ward, C. H., Kavanaugh, M. C., Sale, T. C., Newell, C. J., Pennell, K. D., & Lebrón, C. A. (2012). Chlorinated ethene source remediation: lessons learned. In: ACS Publications.
- Tang, S., Wang, X.-m., Mao, Y.-q., Zhao, Y., Yang, H.-w., & Xie, Y. F. (2015). Effect of



以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能

- dissolved oxygen concentration on iron efficiency: removal of three chloroacetic acids. *water research*, 73, 342-352.
- Thiele-Bruhn, S., Bloem, J., de Vries, F. T., Kalbitz, K., & Wagg, C. (2012). Linking soil biodiversity and agricultural soil management. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 4(5), 523-528.
- Tripathi, M., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 467-481.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
- Ventura, M., Sorrenti, G., Panzacchi, P., George, E., & Tonon, G. (2013). Biochar reduces short-term nitrate leaching from a horizon in an apple orchard. *Journal of environmental quality*, 42(1), 76-82.
- Wan, H., Yi, X., Liu, X., Feng, C., Dang, Z., & Wei, C. (2018). Time-dependent bacterial community and electrochemical characterizations of cathodic biofilms in the surfactant-amended sediment-based bioelectrochemical reactor with enhanced 2, 3, 4, 5-tetrachlorobiphenyl dechlorination. *Environmental pollution*, 236, 343-354.
- Wan, J., Chen, C., Chen, J., Miao, Q., Liu, Y., Ye, J., Chen, K., Jin, Y., Tang, X., & Shen, C. (2019). Acceleration of perchloroethylene dechlorination by extracellular secretions from *Microbacterium* in a mixed culture containing *Desulfitobacterium*. *Environmental pollution*, 245, 651-657.
- Wang, B., Ma, Y., Lee, X., Wu, P., Liu, F., Zhang, X., Li, L., & Chen, M. (2021). Environmental-friendly coal gangue-biochar composites reclaiming phosphate from water as a slow-release fertilizer. *Science of the Total Environment*, 758, 143664.
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345(6270), 63-65.
- Wardle, D. A. (2006). The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology*



第六章 參考文獻

- letters*, 9(7), 870-886.
- Warnock, D. D., Lehmann, J., Kuyper, T. W., & Rillig, M. C. (2007). Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. *Plant and soil*, 300(1), 9-20.
- Watson, R. E., Jacobson, C. F., Williams, A. L., Howard, W. B., & DeSesso, J. M. (2006). Trichloroethylene-contaminated drinking water and congenital heart defects: a critical analysis of the literature. *Reproductive Toxicology*, 21(2), 117-147.
- Wenger, A. M., Peluso, P., Rowell, W. J., Chang, P.-C., Hall, R. J., Concepcion, G. T., Ebler, J., Fungtammasan, A., Kolesnikov, A., & Olson, N. D. (2019). Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nature biotechnology*, 37(10), 1155-1162.
- White, P. A., & Claxton, L. D. (2004). Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2-3), 227-345.
- Woolf, D., Amonette, J. E., Street-Perrott, F. A., Lehmann, J., & Joseph, S. (2010). Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nature communications*, 1(1), 1-9.
- Xu, C., Lin, X., Yin, S., Liu, K., & Liu, W. (2019). Spatio-vertical characterization of the BTEXS group of VOCs in Chinese agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 694, 133631.
- Xu, R.-k., Xiao, S.-c., Yuan, J.-h., & Zhao, A.-z. (2011). Adsorption of methyl violet from aqueous solutions by the biochars derived from crop residues. *Bioresource technology*, 102(22), 10293-10298.
- Xu, X., Cao, X., & Zhao, L. (2013). Comparison of rice husk-and dairy manure-derived biochars for simultaneously removing heavy metals from aqueous solutions: role of mineral components in biochars. *Chemosphere*, 92(8), 955-961.
- Ye, L., Camps-Arbestain, M., Shen, Q., Lehmann, J., Singh, B., & Sabir, M. (2020). Biochar effects on crop yields with and without fertilizer: A meta-analysis of field studies using separate controls. *Soil Use and Management*, 36(1), 2-18.
- Yonezuka, K., Shimodaira, J., Tabata, M., Nagase, S., Kasai, D., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Fujita, N., & Fukuda, M. (2016). Draft genome sequence of a



- 以次世代定序技術分析結合生物碳與微生物降解三氯乙烯之菌群結構與功能
chlorinated-ethene degrader, *Cupriavidus necator* strain PHE3-6 (NBRC 110655).
Genome Announcements, 4(2), 10.1128/genomea.01743-01715.
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najjar, F. Z., Roe, B. A., & Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5227-5236.
- Zeng, W., Liu, Y.-g., Hu, X.-j., Liu, S.-b., Zeng, G.-m., Zheng, B.-h., Jiang, L.-h., Guo, F.-y., Ding, Y., & Xu, Y. (2016). Decontamination of methylene blue from aqueous solution by magnetic chitosan lignosulfonate grafted with graphene oxide: effects of environmental conditions and surfactant. *RSC advances*, 6(23), 19298-19307.
- Zhang, X., Gao, B., Creamer, A. E., Cao, C., & Li, Y. (2017). Adsorption of VOCs onto engineered carbon materials: A review. *Journal of hazardous materials*, 338, 102-123.
- Zhu, X., Chen, B., Zhu, L., & Xing, B. (2017). Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: a review. *Environmental Pollution*, 227, 98-115.
- Zimmerman, A. R. (2010). Abiotic and microbial oxidation of laboratory-produced black carbon (biochar). *Environmental science & technology*, 44(4), 1295-1301.
- Zou, W., Gao, B., Ok, Y. S., & Dong, L. (2019). Integrated adsorption and photocatalytic degradation of volatile organic compounds (VOCs) using carbon-based nanocomposites: A critical review. *Chemosphere*, 218, 845-859.
- 國立中山大學貴重及共用儀器中心。(2021) 環境掃描式電子顯微鏡。
<http://khvic.nsysu.edu.tw/khvic/JL/ESEM.htm>
- 饒霜，盧陽，黃飛，蔡一霞，蔡昆爭。(2016)生物碳對土壤微生物的影響研究進展。生態與農村環境學報，32(1)，53-59。