



行政院環境保護署

107 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

地層多氯乙烯污染精準生物復育技術： 建立脫氯菌生態網絡

期末報告（定稿）

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：國立成功大學／環境工程學系所
專案主持人：吳哲宏 副教授
專案執行期間：107 年 01 月 10 日起至
107 年 11 月 30 日止

中 華 民 國 107 年 12 月 印製



107 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案申請書

一、專案基本資料表

申請編號：

專案性質		☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案類別(單選)		☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
研究主題		☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他					
申請機構系所		國立成功大學環境工程學系					
機構地址		台南市東區大學路 1 號					
專案主持人		吳哲宏		職等 / 職稱		副教授	
專案名稱	中文	地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡					
	英文	Precision bioremediation of trichloroethylene in groundwater: Build up microbial ecological network					
	關鍵字	三氯乙烯、精準生物復育、脫氯菌、生態網絡					
執行期程		自 民國 1 0 7 年 0 1 月 1 0 日 起 至 民國 1 0 7 年 1 1 月 3 0 日 止					
專案主持人		姓名：吳哲宏		E-mail： enewujh@mail.ncku.edu.tw		專線：06-2757575#65839 手機：0910385159	
專任助理		姓名：劉筱君		E-mail： antony910912@gmail.com		專線：06-2757575#65850 #39 手機：0963108899	
經費分析總表	專 案 預 估 總 經 費			金額		編列說明	
	1.	人事費用		490,250		(1~5 項相加之 50%為限)	
	2.	貴重儀器使用含維護費		0		(與計畫實驗相關)	
	3.	消耗性器材與主要費用		449,250		(與計畫主體相關)	
	4.	其它研究相關費用		0		(差旅與租賃費用)	
	5.	雜項費用		41,500		(1~6 項相加之 5%為限)	
	6.	行政管理費		39,000		(1~5 項相加之 10%為限)	
專案計畫申請總金額			1,020,000				

說明：

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

專案主持人：_____ (簽名及蓋章) 日期：_____

(請蓋上申請單位大小章)



二、計畫摘要(請分別以中、英文就本專案作一概述，以 1000 字為限)

(一)中文部分：

三氯乙烯厭氧還原脫氯的去毒化過程常發生毒性更高之二氯乙烯或氯乙烯代謝物累積。為發展三氯乙烯完全脫氯的生態控制技術，本研究建立實驗室規模厭氧還原脫氯反應系統，探討添加不同藥劑化合物(糖蜜、乳化油與乙酸) 的條件下對三氯乙烯還原脫氯反應及微生物體結構的影響。本研究操作三個添加不同藥劑的反應槽，利用含碳量、酸類、乙烯及多氯乙烯濃度變化來評估三個反應槽 TCE 還原脫氯之功能表現，結果顯示添加的三種藥劑碳源均能促進 TCE 完全脫氯成乙烯，但是在高 TCE 負荷的條件下，乙酸作為碳源的反應槽中乙酸降解菌群活性受到抑制，使得完全脫氯效率低於其他反應槽，並累積較高濃度的二氯乙烯。高通量定序分析菌相的結果顯示，添加不同複雜程度的碳源均導致整體的菌群結構改變，尤其在添加糖蜜的情況下，微生物多樣性最為豐富，但不同的碳源並不會明顯地改變脫氯菌的種類及豐富度，也因此三個使用不同碳源的反應槽其 TCE 還原脫氯速率不相上下。另一方面，分析脫氯菌群與其他微生物網絡關係發現結構簡單的碳源，如乳化油與乙酸，其物種互動關係是相當複雜的，且菌群結構隨時間變動劇烈。相對地，使用結構較複雜的糖蜜作為碳源，微生物菌群結構較穩定，脫氯菌群與其他微生物的網絡關係也較為簡單。本研究建立了藥劑對脫氯微生物體與 TCE 脫氯表現的關聯性，相關成果有助於發展本土地下水 TCE 污染精準生物整治技術。



(二)英文部分：

Under anaerobic conditions, the detoxification process of trichlorethylene often results in the accumulation of dichloroethylene or vinyl chloride metabolites, which are more toxic than trichlorethylene. In order to develop an ecological control technology for the complete dechlorination of trichlorethylene to ethylene, this study is aimed to establish the laboratory-scale anaerobic reductive dechlorination systems to investigate effects of the three hydrogen-releasing agents (i.e., molasses (MS), emulsified oil (EOS) and acetate (AS)) on the performance of reductive trichlorethylene dechlorination, and the corresponding microbiome structure. In this study, the dechlorination performance of three reactors was evaluated by analyzing concentrations of organic carbon, volatile acids, and chlorinated ethylene. The results showed that all of the reagents can stimulate the complete dechlorination of TCE. However, under the condition of high TCE loading rate (26.4 mg TCE/L/day), the acetate-degrading microbial populations in the acetate-fed reactor was inhibited, leading to a greater accumulation of cDCE and lower efficiency of complete dechlorination, as compared with the MS and EOS reactors. The results of high-throughput sequencing analysis of 16S rRNA gene showed that although the reagents possess different carbon complexity, the overall microbiome structures of the reactors varied differently. In the case of adding molasses, the microbial diversity was the most abundant. However, different carbon sources would not significantly change the type and richness of dechlorinating bacterial populations, which is consistent with the performance of TCE reduction and complete dechlorination among three reactors. In addition, the analysis of the interactive relationship between dechlorinating bacterial groups and other microbial populations reveals that simple carbon sources, such as emulsified oil and acetic acid, have a complex interaction network with species, and the structure of the flora changes drastically with time. In contrast, with the use of more complex carbon source such as molasses, the structure of the microbial flora is relatively stable, and the ecological network of the dechlorinating groups is relatively simple. This study established the associations of different agents, their complete dechlorination capability, and the resulting microbiomes. The overall results provide useful information to facilitate the development of precision bioremediation technology for groundwater TCE pollution in Taiwan.



目次

目次	I
圖次	III
表次	V
(一) 前言	1
(二) 研究目的	5
(三) 文獻探討	6
3.1 地下水微生物調查	6
3.2 厭氧脫氯菌群多樣性	7
3.3 多氯乙烯生物整治	11
3.3.1 地層環境之物理化學影響生物整治效率	11
3.3.2 微生物之間交互作用	16
3.3.3 生物復育之菌相監測	18
(四) 研究方法與過程	24
4.1 架設連續厭氧反應槽	24
4.2 反應槽採樣與水質分析	26
4.2.1 含氯乙烯含量分析	26
4.2.2 乙烯含量分析	26
4.2.3 氣體組成分析	26
4.2.4 揮發酸含量分析	27
4.2.5 有機碳含量分析	27
4.2.6 懸浮固體變化量分析	27
4.3 工作進度甘特圖	28
(五) 結果與討論	29
5.1 連續厭氧反應槽操作與線上監測	29
5.1.1 反應槽操作參數	29
5.1.2 反應槽線上監測數值	31
5.2 反應槽採樣與水質分析	33
5.2.1 含氯乙烯含量分析結果	33



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.2.2 乙烯含量分析結果.....	35
5.2.3 氣體組成分析結果.....	37
5.2.4 揮發酸含量分析結果.....	39
5.2.5 有機碳含量分析結果.....	41
5.2.6 懸浮固體變化量結果.....	43
5.3 反應槽脫氯效果評估.....	44
5.3.1 反應槽脫氯速率.....	44
5.4 微生物高通量定序分析結果.....	46
5.4.1 微生物多樣性 (Alpha diversity).....	46
5.4.2 微生物組成結構.....	49
5.4.2.1 細菌組成結構.....	51
5.4.2.2 古菌組成結構.....	54
5.4.3 微生物菌相動態變化.....	57
5.4.4 關鍵菌群分析.....	61
5.4.5 微生物菌群交互作用.....	64
5.4.6 微生物菌量分析結果 (QPCR 法).....	66
5.4.6.1 總細菌 16S rRNA 基因 QPCR.....	66
5.4.6.2 Dehalococcoides 16S rRNA 基因 QPCR.....	68
5.4.6.3 Archaea QPCR.....	70
5.4.6.4 反應槽脫氯情形比較.....	71
5.4.6.5 反應槽於各試程內之細菌與古菌比例.....	73
5.4.7 微生物高通量定序分析 (NGS) 與微生物菌量分析 (QPCR) 之比較.....	75
5.5 結果討論.....	77
5.6 結論.....	80
5.7 建議.....	80
期中審查意見回覆對照表.....	81
期末審查意見回覆對照表.....	84
(六) 參考文獻.....	89
107 年度專案成果績效自評表.....	97



圖次

圖 1.1 多氯乙烯厭氧生物復育技術演變	2
圖 1.2 厭氧還原脫氯微生物生態假說 (本團隊整理)	2
圖 3.1 基因分析技術提供微生物在污染環境中功能表現的模式	6
圖 3.2 絕對/兼性厭氧脫氯菌親源樹及其電子提供者示意圖	8
圖 3.3 <i>Dehalococcoides</i> 屬 (genus) 中, 19 株 <i>Dehalococcoides</i> 菌株分布在 Pinellas、Victoria 和 Cornell sungroup	9
圖 3.4 利用多源基因體 (metagenomic) 技術探討添加不同碳源降解 PCE, 微生 物功能參與的代謝路徑	12
圖 3.5 硫酸鹽及硫化物對 195 (<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195)、DvH (<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough) 及 <i>S.wolfei</i> (<i>Syntrophomonas wolfei</i>) 的相互 影響	15
圖 3.6 在多氯乙烯降解過程微生物間的交互作用	17
圖 3.7 (A)利用 <i>Dehalogenimonas</i> (Dhg) 和 <i>Dehalococcoides</i> (Dhc) 共培養將 1,1,2,2-TeCA 和 1,1,2-TCA 轉換至乙烯 (B) 有機物發酵提供電子	17
圖 3.8 以 T-RFLP 進行多氯乙烯污染場址微生物多樣性分析	20
圖 3.9 利用 HOPE 法偵測地下水脫氯菌- <i>Dehalobacter</i> 、 <i>Desulfitobacterium</i> 、 <i>Dehalococcoides</i> 和 <i>Geobacter</i> ; <i>Dehalococcoides</i> 次要族群 Cornell、Victoria 和 Pinellas	21
圖 3.10 土水樣本不同前處理方法的微生物族群分布	22
圖 3.11 TT 場址中分別代表低 (無)、中和高濃度多氯乙烯污染樣本的微生物族 群分布	23
圖 4.1 厭氧脫氯反應系統構造圖	25
圖 5.1 反應槽環境變化	32
圖 5.2 反應槽採樣與分析項目	33
圖 5.3 反應槽含氯乙烯含量變化	34
圖 5.4 反應槽乙烯含量變化	36
圖 5.5 反應槽氣體組成變化	38
圖 5.6 反應槽揮發酸變化	40
圖 5.7 反應槽內碳源的變化	42
圖 5.8 懸浮固體變化量	43



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

圖 5.9 反應槽脫氯速率比較	45
圖 5.10 反應槽樣本微生物多樣性	47
圖 5.11 反應槽各採樣點樣本微生物多樣性(時序性的變化).....	48
圖 5.12 反應槽古菌與細菌豐富度	50
圖 5.13 以 Phylum 階層分析反應槽之細菌族群分佈	52
圖 5.14 以 Class 階層分析反應槽之細菌族群分佈	53
圖 5.15 以 Phylum 階層分析反應槽之古菌族群分佈	55
圖 5.16 以 Class 階層分析反應槽之古菌族群分佈	56
圖 5.17 微生物主座標分析	58
圖 5.18 微生物群集分析	59
圖 5.19 微生物典型相關性分析	60
圖 5.20 脫氯菌群於操作試程的變化	63
圖 5.21 微生物交互作用網絡圖	65
圖 5.22 總細菌 16S rRNA 基因 QPCR 結果.....	67
圖 5.23 <i>Dehalococcoides</i> 16S rRNA 基因 QPCR 結果	69
圖 5.24 Archaea QPCR 結果.....	70
圖 5.25 <i>Dehalococcoides</i> 豐富度與脫氯情形比較.....	72
圖 5.26 細菌與古菌豐富度比較	74
圖 5.27 微生物高通量定序分析結果換算 <i>Dehalococcoides</i> 絕對菌數.....	76

**表次**

表 3.1 <i>Dehalococcoides</i> 屬分為三大次要族群.....	10
表 3.2 脫氯菌最佳適合生長的 pH 值	13
表 3.3 利用高通量定序觀察不同 pH 值環境下微生物菌群結構	14
表 4.1 反應槽設計參數	24
表 5.1 反應槽操作參數	30
表 5.2 反應槽 pH 與 ORP 平均值.....	32



(一) 前言

(一) 前言

多氯乙烯 (tetrachloroethylene, PCE; trichloroethylene, TCE) 是具有致畸胎及致癌性的毒性物質，對人體健康及生態環境有極大的危害。由於不當的使用、排放與處置，使得此類化合物大量進入土壤及地下水中。依據 2017 年台灣土壤及地下水污染整治網，公告含氯化合物污染地下水共有 171 個場址，其中多氯乙烯污染有高達 109 個污染場址，顯示多氯乙烯為最常見的地下水污染物。基於多氯乙烯污染場址為數眾多，龐大的整治經費已達經濟規模，但是國內多氯乙烯污染整治技術未臻成熟，相關知識、經驗及人才相當缺乏，軟體與技術自主能力仍不足。因此，多氯乙烯污染的整治技術被列為台灣土水工程領域急需發展的技術項目之一。

生物復育是利用現地或外源微生物的活性，將有毒污染物分解轉換成為無毒物質，被認為是一種環境友善的綠色整治技術，許多研究證實特殊厭氧菌群可進行脫氯呼吸反應，使多氯乙烯轉換成乙烯而去毒化。世界各國及台灣土水界對於以生物整治多氯乙烯污染地下水，大部分也採用厭氧生物技術。多氯乙烯污染的厭氧生物整治技術發展可分為三個階段，如圖 1.1 所示，早期的「傳統生物復育」是將藥劑灌入地層後，定期監測地下水中污染物濃度，以評估脫氯反應效率；之後，發展出「監控式生物復育(Monitored Bioremediation)」，除藥劑灌注與定期觀察污染物濃度之外，並分析地下水中關鍵脫氯菌的數量，希望水質分析結果結合脫氯菌生物指標，加強研判脫氯反應趨勢與整治成效。儘管如此，還是面臨到無論添加多少藥劑，脫氯菌數量無法快速增加與污染物濃度無法降低的困擾，甚至多氯乙烯經微生物脫氯產生毒性更高的二氯乙烯 (dichloroethene, DCE) 及氯乙烯 (vinyl chloride, VC) 累積的現象。「精準生物復育(Precision Bioremediation)」是多氯乙烯污染厭氧生物整治技術的最新發展。其主要技術內涵是在監控式生物復育的基礎上，研究地下水微生物體學 (Microbiomics) 的 Know-how 與 Know-why。微生物體學是探討全菌群組成、功能以及菌群互動關係的一門新興的學科，掌握這些重要的資訊，得以精確操控厭氧脫氯反應之進行。三氯乙烯污染“精準復育”的現地整治技術精義在於將藥劑(電子提供者)注入至污染區域，並能快速培養出關鍵脫氯菌群，使三氯乙烯完全轉換至乙烯。相對於藥劑灌注已有成熟的工程技術，微生物體相關知識則較缺乏。事實上，一般地層中還原脫氯菌的數量並不豐富，如何偵測低豐富度的脫氯菌是一項挑戰，而且不同性質或不同區域的地層微生物多樣性不同，因此應根據該場址實際微生物分析的資訊，擬定或調整藥劑配方使用。由於多氯乙烯去毒化機制是逐步還原脫氯的過程，在不同階段需要對症下藥 (微調藥劑成分與地層環境條件)，以促進各階段關鍵菌群生長，並營造出完



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

整的脫氯菌群生態系，提供”有效且穩定的完全脫氯”功能，最終達成完全降解污染物。

本計畫選擇地層中常見的 TCE 污染為主要研究對象，在現有監控式生物復育技術之基礎上，導入最尖端的次世代高通量定序平台，結合生物資訊大數據分析技術，探討 TCE 厭氧還原脫氯過程之微生物體動態 (Microbiome Dynamic)，建立脫氯菌群與其他菌群互動關係之生態網絡，研發多氯乙烯精準生物整治技術。研究結果將提供發展 TCE 完全脫氯至乙烯之生態控制技術所需的環境微生物學知識，希望提升台灣本土生物整治技術專業水平與競爭力。

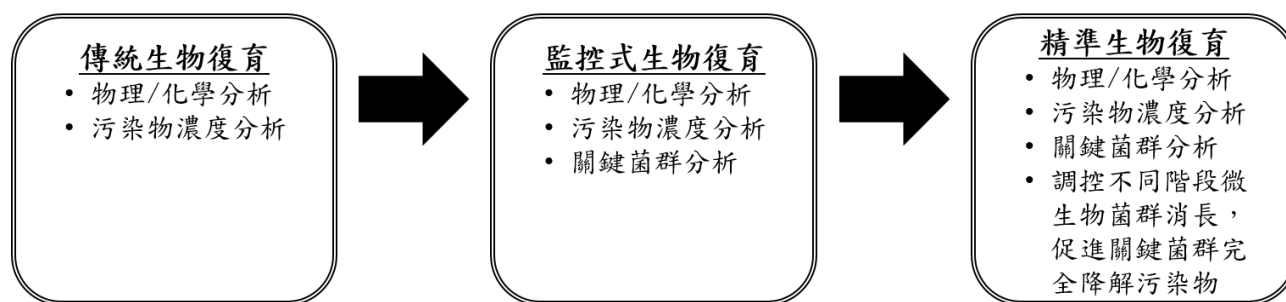


圖 1.1 多氯乙烯厭氧生物復育技術演變

根據微生物學理論，在厭氧環境下地下水中的還原脫氯菌以氫氣、小分子有機物為電子供給者，多氯乙烯為最終電子接受者，進行還原脫氯呼吸反應，多氯乙烯逐步脫氯成為乙烯 (圖 1.2)。工程上，對於多氯乙烯污染的現地生物整治技術多半注入糖蜜、食用油或乳酸鹽為基底的藥劑至地下水體中，藥劑被地下水微生物分解產生乙酸與氫氣，這些代謝產物才被脫氯菌利用，進行還原性脫氯反應。厭氧脫氯菌需仰賴產氫微生物族群提供氫氣進行鹵素呼吸，而脫氯菌消耗氫氣則有助於產氫微生物代謝基質。因此，多氯乙烯進行還原脫氯的效率受到脫氯菌與產氫菌間共營現象 (Syntrophy) 的調控。

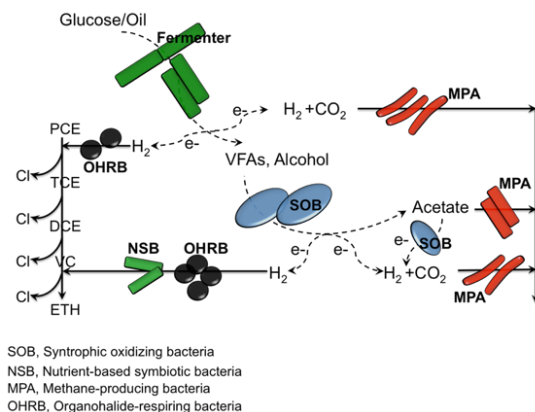


圖 1.2 厭氧還原脫氯微生物生態假說 (本團隊整理)



(一) 前言

文獻報導已知具有還原脫氯能力的厭氧脫氯菌約有 40 株，多樣性非常豐富，大部分的脫氯乙烯還原脫氯研究仍是以 *Chloroflexi* 門的 *Dehalococcoides* 為主，目前至少已分離出 19 株 *Dehalococcoides* 菌群，依照 *Dehalococcoides* 菌群的 16S rRNA 基因序列差異可細分為三大次要 (subgroup) 族群，分別命名為 Pinellas、Victoria 和 Cornell，其生長與環境條件(含氯污染物、pH、氫分壓)息息相關。厭氧脫氯菌之脫氯能力不盡相同，僅有非常少數，例如 strain 195 具有將 PCE/TCE 完全脫氯至乙烯的能力，大部分厭氧脫氯菌株可以從高氯數乙烯 (PCE/TCE) 脫氯至 DCE。但是分析 strain 195 的基因體結果與實場研究經驗，顯示 strain 195 通常不易在整治過程成為優勢脫氯菌群。脫氯菌群中僅 *Dehalococcoides* 屬的成員具有能將 DCE 脫氯至 ETH 的能力，因此常與其他脫氯菌共生完成 TCE 完全脫氯之任務。

或許對於脫氯菌群多樣性及生理特性不甚瞭解或是地層環境變異性高，多氯乙烯整治場址經常發生 DCE 及 VC 累積的現象且無法持續降解的瓶頸。此現象可能是還原脫氯動力學與脫氯生態失衡，導致 DCE 及 VC 降解速率低於高氯數乙烯降解速率；或者是降解 DCE/VC 的脫氯菌活性受到抑制等。

在整治工程上，過去的認知是只要添加碳源 (藥劑) 就能讓產氫菌產生氫氣供給脫氯菌生長並進行還原脫氯反應。事實上，厭氧脫氯菌不僅需仰賴產氫菌群進行厭氧還原脫氯反應，亦需其他共生菌 (如：*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Syntrophomonas*, *Sedimentibacter*) 提供維生素 B12、必需胺基酸等生長因子促進脫氯菌生長與脫氯呼吸反應。此外，在厭氧地層中常常有豐富的鐵細菌、甲烷菌及硫酸還原菌等，會與厭氧脫氯菌競爭氫氣。因脫氯菌生長緩慢，通常極少量的氫氣被脫氯菌利用；一旦脫氯菌無法獲取足夠的氫氣當作電子提供者，其脫氯菌生長就會減緩，導致多氯乙烯降解效率降低。因此，多氯乙烯厭氧還原脫氯反應受到脫氯菌、產氫菌及共生菌間共營現象的調控，並深深受地層微生物生態系之其他菌群互動關係影響。由上述可知，多氯乙烯污染地下水生物復育的成功關鍵策略是如何操控厭氧還原脫氯菌種類/數量、產氫菌及共生菌，形成一個平衡的共生生態系統，以達到多氯乙烯脫氯至最終產物-乙烯。有鑑於此，操控不同脫氯階段脫氯菌群的結構與數量、以及脫氯菌群與其他菌群的交互作用 (包含共生、競爭、寄生及捕食) 關係等是精準生物整治技術的核心，然而這方面的知識與技術仍相當有限。

過去探討地下水微生物菌群結構、分佈與動態，主要使用的分子生物技術為分子選殖 (molecular cloning)、變性明膠電泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、端點限制片段長度多型性 (Terminal Restriction Fragment



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

Length Polymorphism, TRFLP) 等。但是，地下水微生物多樣性複雜，利用過去傳統分子生物技術由於分析通量的限制，只能觀察環境中主要的優勢菌群，卻無法瞭解菌群結構的全貌，導致生物復育常面臨成效不彰的窘境。近年來，次世代高通量定序技術 (Next-Generation Sequencing, NGS) 迅速發展，針對 DNA 序列樣品進行高通量、高精準度和再現性佳的定序且一次定序分析可獲得百萬條 DNA 序列資訊，運用 NGS 技術可對環境中微生物菌群進行全面性的解構，預估定序深度 (sequencing depth) 足夠偵測到樣本中豐富度低至 0.001% 的菌群。NGS 獲得的數據進一步結合多變量分析方法，如叢集分析、主成分分析、主座標分析、多維度法等，可瞭解樣本間的差異。次世代高通量定序技術主要針對微生物族群進行定性及半定量分析，若要達到定量分析的目的，可設計專一性寡核苷酸引子並結合即時定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技術定量微生物菌群 16S rRNA 基因濃度。為瞭解微生物菌群間的交互作用，將不同降解時期 (PCE/TCE→DCE/VC/ETH) 微生物菌群豐富度結合類神經網路 (neural network)，建立的菌群間的生態關係網絡，將提供調控關鍵微生物消長的關鍵資訊。



(二) 研究目的

(二) 研究目的

探討不同釋氮藥劑 (醣類、油類與酸類) 對 TCE 脫氯的差異性，再進一步運用次世代高通量定序技術與定量分子生物技術，深入瞭解 TCE 在厭氧還原脫氯過程，生態系統中微生物菌群種類及數量的盛衰。

本計畫結合次世代高通量定序技術、即時定量 PCR 及微生物類神經網絡，針對添加不同碳源多氯乙烯地下水污染系統，建立整合性的微生物分析平台。本計畫微生物體分析策略及流程。受反應槽汙泥樣本經過 DNA 萃取回收微生物群的總 DNA，接著以 PCR 結合細菌專一性的引子，複製 16S rRNA 基因 V3-V4 片段、純化並定量，之後以 Illumina Miseq workflow 次世代定序技術進行高通量定序分析，估計每個樣本可獲得 30,000 條以上的有效 DNA 序列資訊，估計定序深度足夠偵測樣本中低於豐富度 0.001% 的微生物菌種。獲得大量的定序資料後，再經由生物資訊軟體分析後，可鑑定 DNA 序列至屬 (genus) 階層及觀察不同樣本微生物多樣性的差異性。

由於次世代高通量定序技術主要針對微生物族群進行定性及半定量分析，本計畫再搭配即時定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技術定量微生物菌群 16S rRNA 基因濃度，即可得知關鍵菌群在環境中的絕對豐富度。最後，結合微生物類神經網絡分析觀察脫氯菌、產氮菌及共生菌的共生與競爭相互關係。

本計畫研究分成三個階段目標。

1. 建立三組 (醣類、油類與酸類) 連續流厭氧 TCE 還原脫氯反應槽系統
2. 三組 (醣類、油類與酸類) 反應槽脫氯微生物組成分析
3. 三組 (醣類、油類與酸類) 反應槽微生物菌群網絡分析



(三) 文獻探討

3.1 地下水微生物調查

過去進行土壤地下水整治工作前皆須調查地下水文、污染物種類，依照調查結果選擇較佳的整治方法與技術。在整治技術中分成物化和生物方法。物化方法雖然能夠快速清除污染物，但整治後剩餘低濃度污染物還需花費龐大金額處理且對於環境不友善，因此生物整治在此階段將具重要地位。生物整治對於微生物的掌握決定污染物是否能去除的關鍵因素，過去缺乏微生物生長和代謝資訊，現地生物整治較難進行。近二十年來分子生物技術快速發展，逐漸瞭解生物復育過程中需多種微生物參與，而微生物於現地的物種將能左右未來場址整治的策略與方向。

過去針對污染場址的微生物調查偏向個別分析單一菌株所扮演的角色，但 Lovley 於 2003 年在發表文章中提到導入基因概念將生物復育與分子生物技術結合，如下圖 3.1 所示。Lovley 認為在環境中僅少部分微生物能夠被分離出來，這些可以被分離的微生物可以進行較為深入的生理生化特性分析；而不能被分離的微生物也能以其他方式取得基因組成的資訊進而分析 mRNA 和蛋白質，這些 mRNA 和蛋白質能夠提供在不同環境條件下基因的表現。將分離菌種與混和微生物族群提供的資訊整合後將能夠發展出微生物在環境中功能表現的模式¹。污染場址整體微生物調查並個別分析 DNA、RNA 和蛋白質後統整將能瞭解微生物共營系統，有助於場址整治。

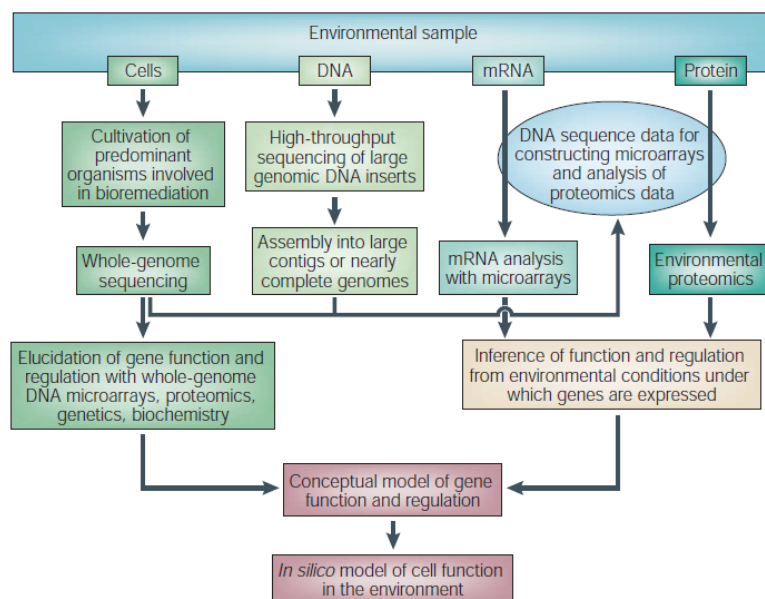


圖 3.1 基因分析技術提供微生物在污染環境中功能表現的模式¹



(三) 文獻探討

3.2 厭氧脫氯菌群多樣性

近 20 年來，利用還原脫鹵反應 (reductive dehalogenation) 分離出的絕對/兼性厭氧脫氯菌 (亦稱：脫鹵呼吸菌 (organohalide-respiring bacteria, ORB))。絕對厭氧脫氯菌屬於高棲位專一性 (highly niche-specialized) 之微生物，只接受氫氣當作電子提供者進行的還原脫鹵反應；兼性厭氧脫氯菌可接受較多元的電子提供者 (丙酮酸 (pyruvate)、乳酸 (lactate)、複雜有機 (如：酵母萃取物 (yeast extract))) 所提供之電子²。

圖 3.2 為整理目前已知的兼性厭氧脫氯菌群，包括 *Firmicute* 門的 *Desulfitobacterium*³；*Proteobacteria* 門的 *Sulfurspirillum*⁴、*Geobacter*⁵、*Desulfomonile*⁶、*Desulfovibrio*⁷、*Shewanella*⁸、*Comamonas*⁹ 及 *Anaeromyxobacter*¹⁰，並可接受較多元的電子接受者 (如：三價鐵、二甲基亞砷、硫酸鹽、硝酸鹽)。*Desulfitobacterium* 是這類還原脫氯菌之代表。*Desulfitobacterium* 為硫酸還原菌，其特性與 *Dehalococcoides* 及 *Dehalobacter* 差異較大。*Desulfitobacterium* 能利用上述多元的電子提供者 (如：氫、乳酸鹽、醋酸鹽、丙酮酸鹽)，在厭氧呼吸過程中將硫酸根還原成亞硫酸根、硫代硫酸根，或還原成元素硫後再轉變為硫化氫。在此屬的分類下目前被證實有脫氯能力的種有 *Desulfitobacterium dehalogenans*、*Desulfitobacterium chlororespirans*、*Desulfitobacterium hafniense* 和 *Desulfitobacterium* strain PCE¹¹。

另外，2006 年 *Geobacter lovleyi* strain SZ 也發現具有脫氯的能力。此株微生物分離自無污染的河川底泥，但卻能利用乙酸當作碳源，將四氯乙烯 (tetrachloroethene, PCE) 脫氯至順-二氯乙烯 (cis-1,2-DCE)。*Geobacter lovleyi* strain SZ 也可利用氫氣、丙酮酸當作電子提供者，而將 PCE、TCE、硝酸鹽、延胡索酸 (fumaric acid)、三價鐵、蘋果酸、四價錳、六價鈾、元素硫當作電子接受者⁵。

相反地，除了 *Dehalobacter* 屬於 *Firmicutes* 門之外，其餘的絕對厭氧脫氯菌全都屬於 *Chloroflexi* 門^{12, 13}，且只以有機鹵化合物 (organohalides) 當作電子接受者。雖然厭氧脫氯菌多樣性豐富，但目前大部分的多氯乙烯還原脫氯研究仍是以 *Chloroflexi* 門的 *Dehalococcoides* 為主。目前從含氯化合物污染之土壤、底泥、河川或污泥消化槽已分離出 19 株絕對厭氧菌 *Dehalococcoides* 菌群¹⁴⁻²³ (圖 3.3)。依照 *Dehalococcoides* 菌群的 16S rRNA 基因序列差異可分為三大次要 (subgroup) 族群，分別命名為 Pinellas、Victoria 和 Cornell²⁴，而這三個次要族群對於脫氯場址整治扮演很重要的角色 (表 3.1)。因此，Nikolaus 研究團隊將三個次要族群設



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

計專一性引子，搭配單一核苷酸引子延伸技術 (single nucleotide primer extension)，可同時偵測環境中是否有存在 *Pinellas*、*Victoria* 和 *Cornell* 菌群²⁵。

另一絕對厭氧還原脫氯菌 *Dehalobacter* 亦常見於含氯化合物污染的場址中。1993 年，*Dehalobacter* 從處理四氯乙烯的厭氧填充床中被分離出來，可利用氯乙烯當作電子接受者，氫氣作為電子提供者進行還原脫鹵呼吸²⁶。有趣的是，*Dehalobacter* 喜好和其他發酵微生物或以酸化菌共生，像是 *Sedimentibacter*、*Clostridium*、*Acetobacterium* 等²⁷。

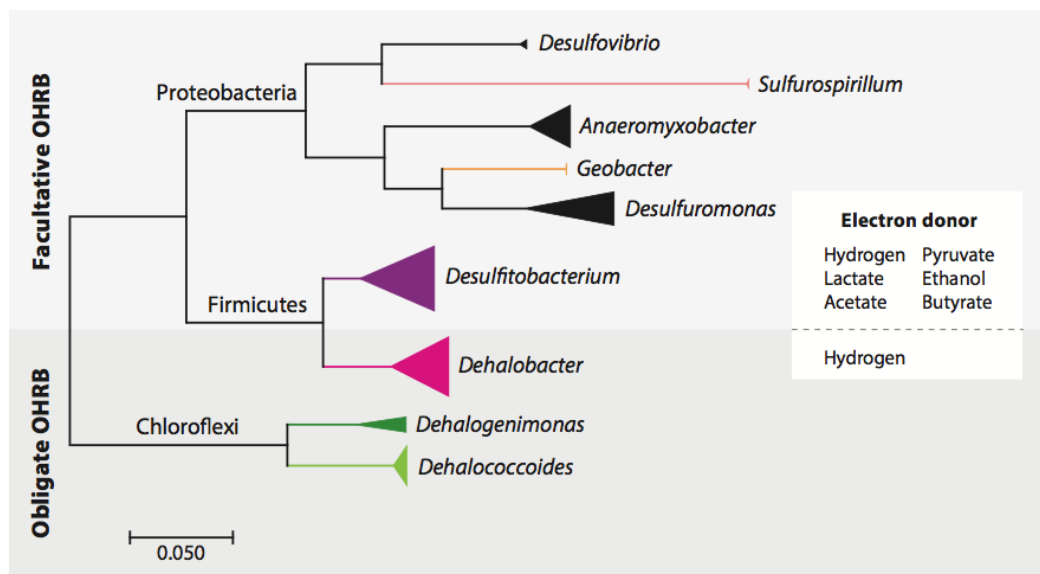


圖 3.2 絕對/兼性厭氧脫氯菌親源樹及其電子提供者示意圖²



(三) 文獻探討

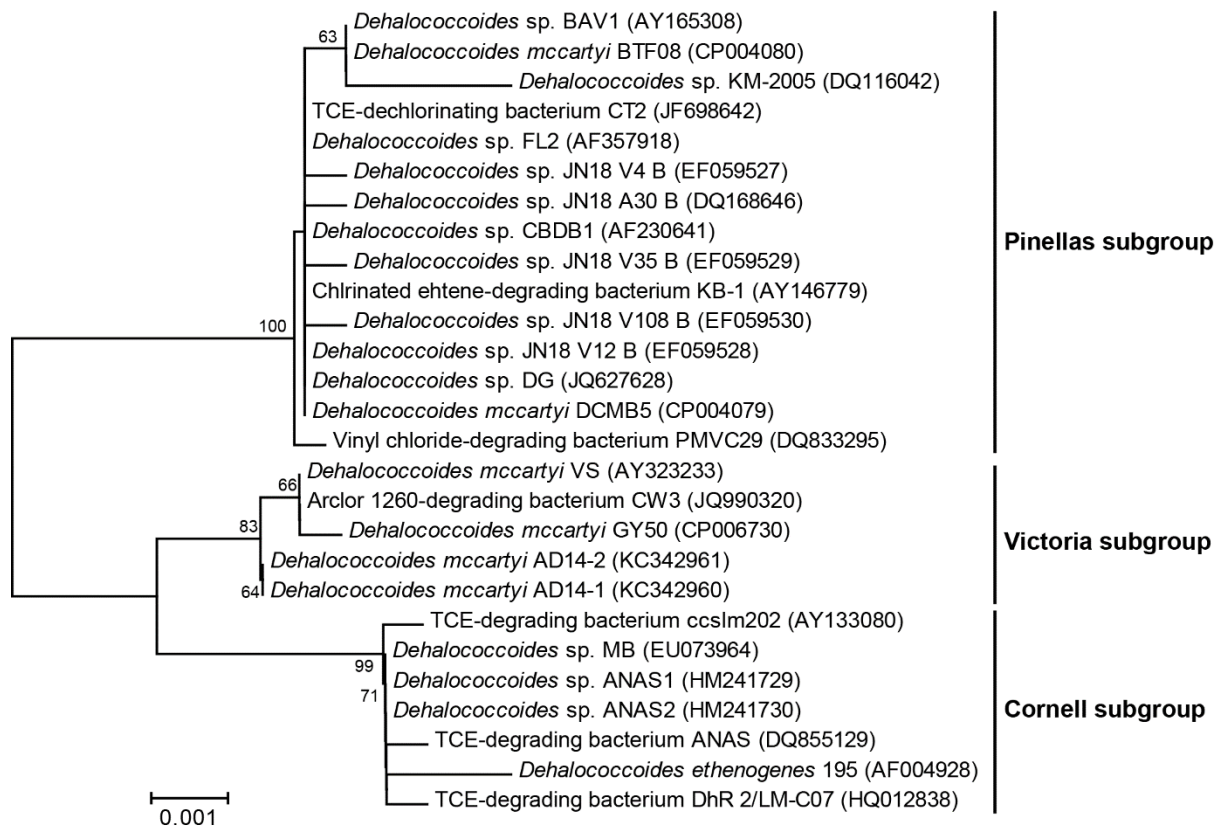


圖 3. 3*Dehalococcoides* 屬 (genus) 中，19 株 *Dehalococcoides* 菌株分布在 Pinellas、Victoria 和 Cornell subgroup

表 3. 1 *Dehalococcoides* 屬分為三大次要族群

Group	Pure culture	uncultured	Reference
Pinellas	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1 (AF230641)	Uncultured <i>Dehalococcoides</i> sp. KB- 1/VC (AY146779)	11, 14-17, 28-32
	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1 (AY165308)	<i>Dehalococcoides</i> sp. enrichment culture clone CT2	
	<i>Dehalococcoides</i> sp. KM-2005 (DQ116042)	(JF698642)	
	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BTF08 (NR102515)	<i>Dehalococcoides</i> sp. DG (JQ627628)	
	<i>Dehalococcoides</i> sp. FL2 (AF357918)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. JN18_V12_B (EF059528)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. JN18_V108_B (EF059530)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. JN18_V4_B (EF059527)		
Victoria	<i>Dehalococcoides</i> sp. JN18_A30_B (DQ168646)		19
	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS (NR_074326)		
Cornell	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> AD14-2 (KC342961)	<i>Dehalococcoides</i> sp. clone DhR ² /LM-C07 (HQ012838)	18, 20, 22, 23, 33, 34
	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> AD14-1 (KC342960)	<i>Dehalococcoides</i> sp. clone ANAS (DQ855129)	
	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195 (NR_074116)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. ANAS1 (HM241729)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. ANAS2 (HM241730)		
	<i>Dehalococcoides</i> sp. MB (EU073964)		



(三) 文獻探討

3.3 多氯乙烯生物整治

地下水污染之生物整治需考慮許多因素，要有成功的生物整治關鍵步驟是在污染場址評估及監測整治程序的化學（如：污染物/代謝產物鑑定、污染物特性、選擇電子接受者、現地養分（碳源）、氧化還原電位、pH 或抑制還原脫氯反應的物質）及微生物（微生物菌群結構、微生物活性）資料³⁵。

3.3.1 地層環境之物理化學影響生物整治效率

添加不同碳源及能量來源可促進不同的微生物菌群生長。David 研究團隊發現添加乳酸 (lactate)、糖蜜 (molasses)、黃豆 (soybean) 與不添加的控制組在降解 PCE 過程中，微生物參與的代謝路徑有明顯的不同（圖 3.4）。McLean 研究團隊設計反應槽利用三種不同碳源（分別為乳清 (whey)、不含界面活性劑的乳化油、含界面活性劑的乳化油）進行生物刺激，評估 TCE 降解效率。結果發現添加乳清碳源的反應槽可達到完全脫氯產生乙烯，添加不含界面活性劑的乳化油的反應槽只有部分脫氯（累積至 c-DCE 與 VC），添加含界面活性劑的乳化油的反應槽則只有少部分脫氯（產生 <5% c-DCE；95% TCE）³⁶。產生累積 c-DCE 的反應槽發現與三價鐵有關³⁷，而添加乳清的反應槽有很強的還原環境而產生二價鐵、硫化物、甲烷和氫^{37, 38}。微生物方面，每一反應槽都有偵測到 *Dehalococcoides* subgroup Pinellas，但只有添加乳清的反應槽有偵測到 *Dehalococcoides* subgroup Cornell。特別的是，利用即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, QPCR) 偵測 tceA 基因、vcrA 基因及 bvcA 基因，發現 tceA 基因和 bvcA 基因與 TCE 降解沒有關連性，TCE 降解只與 vcrA 基因呈正相關性³⁷。由於觀察到添加乳清的反應槽會產生甲烷，同時在槽中偵測到甲烷菌 *Methanospirillum*、*Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanobacterium*。過去文獻證實甲烷菌在還原脫氯反應的環境中扮演的角色相當多元，不僅可與脫氯菌相互競爭，甲烷菌亦能在脫氯反應中扮演重要角色並可提供維他命及生長因子給脫氯菌³⁹⁻⁴²。另外，所有反應槽 *Dehalococcoides* 菌群的豐富度是差不多的，但降解效率卻有明顯的不同，發現添加乳清反應槽中存在 *Clostridium* 菌群，*Clostridium* 菌群是屬於脫氯菌的好夥伴，進行有機物發酵產生乙酸及氫氣供給脫氯菌使用⁴²⁻⁴⁴。另一方面，添加乳清的反應槽環境較為優渥，可提供更多元的微生物生存，這也驗證很多文獻提到脫氯菌與其他微生物互惠降解效率遠比單一株純菌好²⁷。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

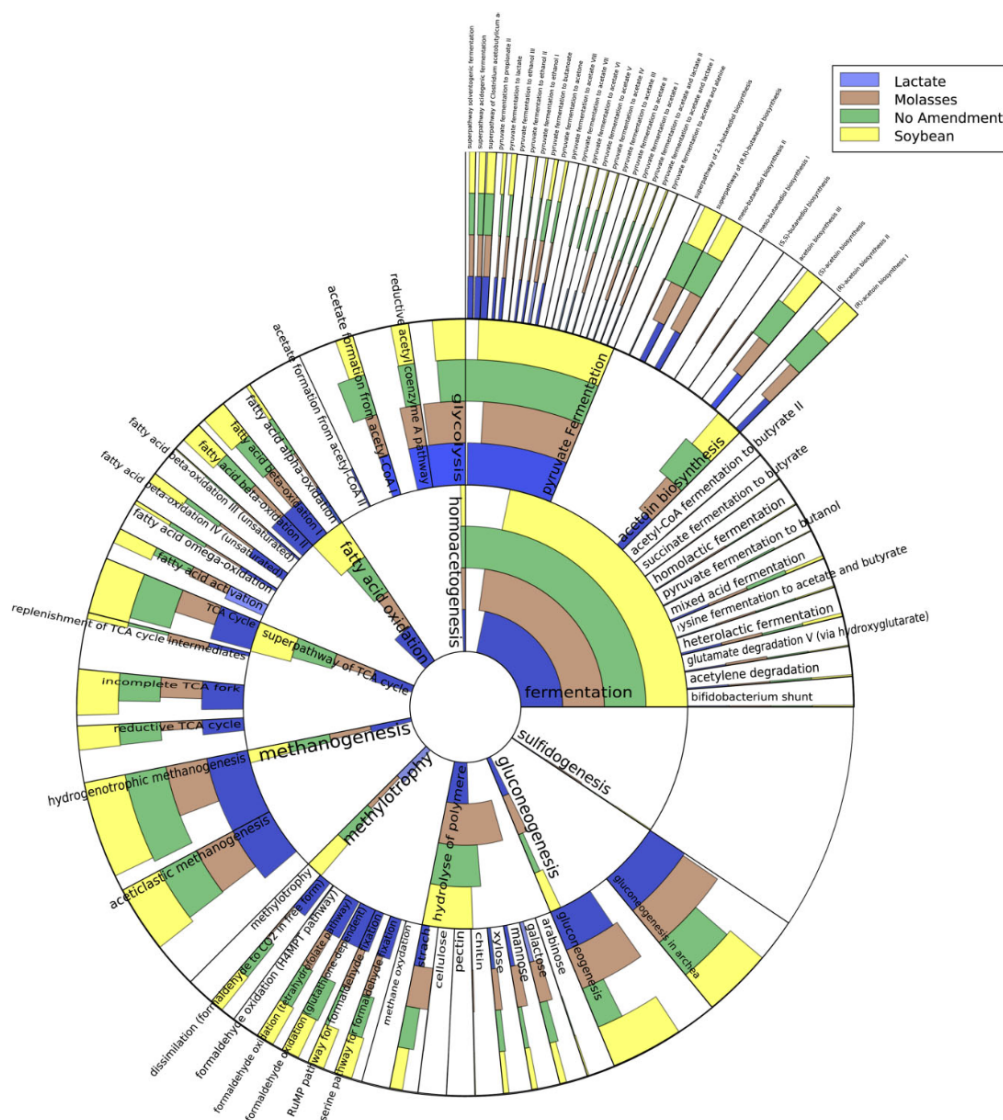


圖 3.4 利用多源基因體 (metagenomic) 技術探討添加不同碳源降解 PCE，微生物功能參與的代謝路徑

表 3.2 為不同脫氯微生物最佳生長的 pH 值，*Geobacter lovleyi* SZ、*Desulfotobacterium* sp. Y51、*Desulfuromonas chloroethenica* TT4B 適合生長在中性偏酸的环境 (pH 6.5~7.5)，*Sulfurospirillum multivorans* 適合生長在中性偏鹼 (pH 7~7.5)，而 pH6.8~8/6~8 之間都適合 *Desulfuromonas michiganensis* BB1/*Dehalococcoides mccartyi* 生長。Zhang 研究團隊利用上流式厭氧污泥床 (anaerobic sludge blanket, UASB) 處理 TCE 廢水，當 pH<7.0 就會影響 TCE 的處理效能。利用 illumina 高通量定序研究觀察不同 pH 試程 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 對去除 TCE 效能的影響之結果顯示，pH6.0 時沒有偵測到脫氯菌 *Dehalobacter* 且 TCE 去除率只達 80.73% (其他時程，TCE 去除率>85%以上)⁴⁵。另一研究發現，pH5.5 和 pH7.2 環境下的微生物菌群結構有很大的不同 (表 3.3)，



(三) 文獻探討

pH5.5 時主要是靠 *Sulfurospirillum multivorans* 可將 PCE 脫氯至 c-DCE；在 pH7.2 環境下，*Dehalococcoides* 為優勢的脫氯菌，並且將 PCE 完全脫氯產生 Ethene⁴⁶。因此，pH 值的改變就會影響環境中微生物的組成，進而影響 TCE 的完全脫氯效率。

表 3.2 脫氯菌最佳適合生長的 pH 值

Bacteria	pH range	Reference
<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	6.5~7.5	5
<i>Desulfitobacterium</i> sp. Y51	6.5~7.5	47
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> TT4B	6.5~7.4	48
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> BB1	6.8~8	48
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	7~7.5	4
<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	6~8	12

經由上述可瞭解將 TCE 進行還原脫氯反應的微生物大部分為兼性厭氧微生物或絕對厭氧微生物，氧氣是不利於這些厭氧微生物生長/生存的。有研究評估含 *Dehalococcoides mccartyi* 菌群在不同氧濃度 (0~7.2 mg/L) 下對 TCE 降解效率，結果顯示當氧濃度提高時，氧氣會延緩 TCE 脫氯速率。利用 QPCR 觀察發現 *tceA* 基因表現對氧氣有較高的容忍力，相反地，*vcrA* 基因表現較容易受到氧氣濃度影響，氧氣濃度越高，*vcrA* 基因表現量越低⁴⁹。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

表 3.3 利用高通量定序觀察不同 pH 值環境下微生物菌群結構⁴⁶

Genus	% of sequence	
	pH 7.2	pH 5.5
<i>Dehalococcoides</i>	22.6	0.0
<i>Acetobacterium</i>	57.6	0.0
<i>Spirochaetaceae</i> uncultured	4.6	0.1
<i>Caldisericum</i>	4.2	0.1
<i>Desulfuromonadales</i> BAV18	2.6	0.0
vadinBC27	1.1	0.0
<i>Desulfovibrio</i>	0.1	33.0
<i>Sulfurospirillum</i>	0.2	25.2
<i>Megasphaera</i>	0.0	19.9
<i>Propionibacterium</i>	0.0	1.5
<i>Pelosinus</i>	0.0	1.00
Others	7.0	19.2
Total	100	100

地下水的污染化合物很常伴隨著硫酸鹽 (濃度 0.2~30 mM)^{50,51}。許多研究證實硫酸鹽 (sulfate) 會影響抑制脫氯反應或是導致化合物脫氯不完全^{52,53}。最近有研究測試發現硫酸鹽濃度提高到 5 mM 不會抑制脫氯菌 *Dehalococcoides mccartyi* 195、硫酸還原菌 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 及共營菌 *Syntrophomonas wolfei* 生長或代謝。但硫化物 (sulfide) 卻會影響 *Dehalococcoides mccartyi* 195、*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 及 *Syntrophomonas wolfei* 生長 (圖 3.5)。當電子提供者有限時，在一定程度的硫酸鹽濃度下 (2 mM 及 5 mM)，*Dehalococcoides mccartyi* 195 和 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 菌量比例分別為 1:1 與 1:3，不會影響還原脫氯反應。然而，當電子接受者 (如：TCE) 為限制因子時，放入 5 mM 的硫酸鹽就會影響到 *Dehalococcoides mccartyi* 195、*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 及 *Syntrophomonas wolfei* 生長⁵⁴。



(三) 文獻探討

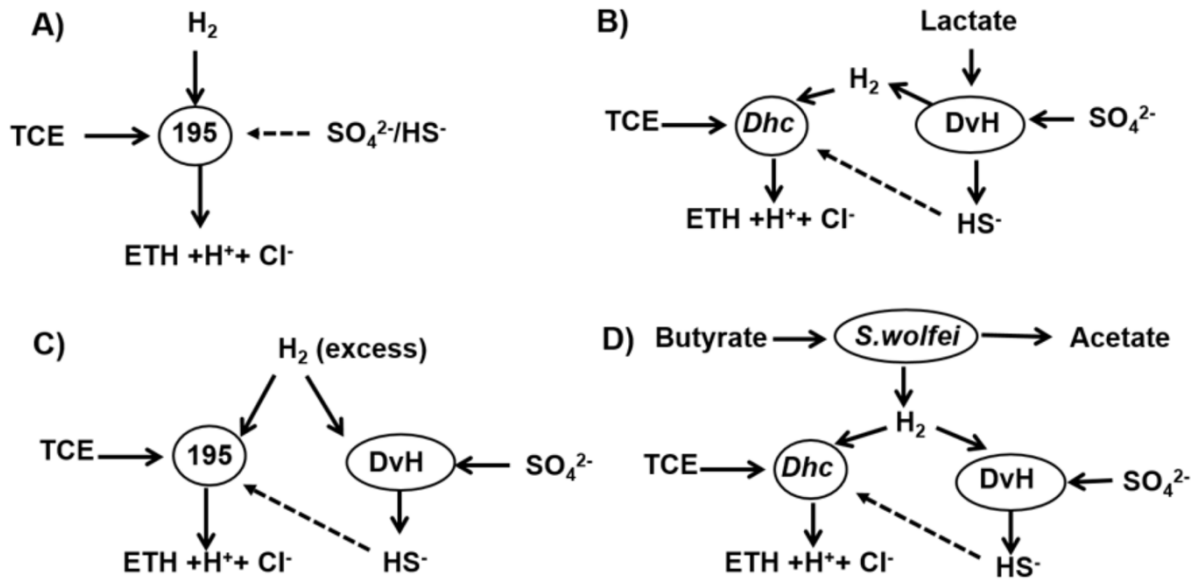


圖 3.5 硫酸鹽及硫化物對 195 (*Dehalococcoides mccartyi* 195)、DvH (*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough) 及 *S.wolfei* (*Syntrophomonas wolfei*) 的相互影響⁵⁴



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

3.3.2 微生物之間交互作用

先前章節就有提到面對複雜的化合物要達到良好的脫氯成效需要多元的微生物菌群參與。以多氯乙烯而言，至少需要有三類菌群進行分工合作，第一類菌群-脫氯菌（如：*Dehalococcoides*）主要進行還原脫鹵作用，將多氯乙烯的氯取代成氫；第二類菌群-發酵菌（如：*Clostridium*）將有機物發酵產生氫氣及乙酸，氫氣提供給脫氯菌代謝生長；第三類菌群-養分供給菌（如：*Sedimentibacter*、*Veillonellaceae*）可提供維他命 B12 給不能合成 B12 的脫氯菌。圖 3.6 為在硫酸還原或甲烷發酵狀況下，含氯化合物需要多元微生物進行降解示意圖。Men 研究團隊利用 metagenomic 及 metatranscriptomic 技術觀察不添加人工維他命 B12 並以乳酸當作電子提供者，TCE 降解的微生物菌群結構，發現一開始 *Sedimentibacter*、*Veillonellaceae* 有較高的豐富度，兩天後，*Sedimentibacter*、*Veillonellaceae* 菌群的豐富度逐漸下降，隨後，*Dehalococcoides* 菌群豐富度才開始逐漸增加，顯示 *Sedimentibacter*、*Veillonellaceae* 菌群可能扮演提供維他命 B12 的角色⁵⁵。Mirza 研究團隊提供乳清當作電子提供者，讓 *Chlostridium* 菌群進行發酵產生氫氣跟乙酸，氫氣再讓 *Dehalococcoides* 菌群利用³⁸。另一方面，在多氯乙烯降解途徑中，可發現有些脫氯菌是負責高氯數的氯乙烯（如：PCE、TCE），有些負責低氯數的氯乙烯（c-DCE、VC）的脫氯反應（圖 3.7）。因此，多元的微生物對於多氯乙烯的生物整治是有幫助的。



(三) 文獻探討

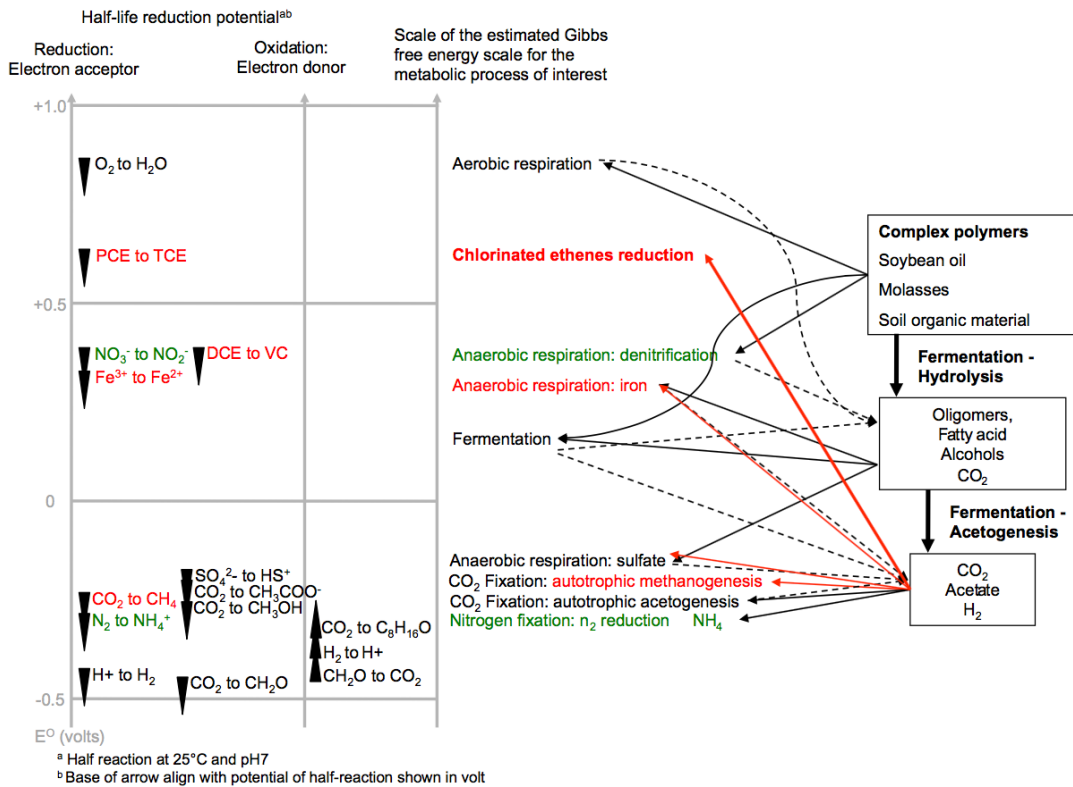


圖 3.6 在多氯乙烯降解過程微生物間的交互作用³⁵

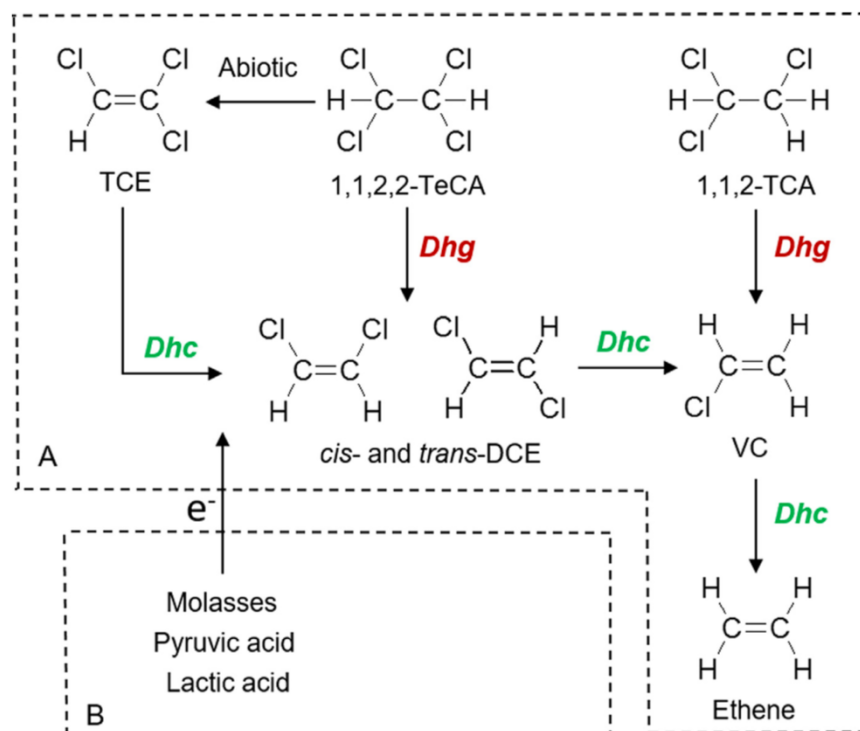


圖 3.7 (A) 利用 *Dehalogenimonas* (Dhg) 和 *Dehalococcoides* (Dhc) 共培養將 1,1,2,2-TeCA 和 1,1,2-TCA 轉換至乙烯 (B) 有機物發酵提供電子



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

3.3.3 生物復育之菌相監測

自然土壤環境中存在功能多樣化的微生物族群，其種類與數量隨環境條件及有機物系列與濃度而呈現獨特的社群結構 (community structure)。當土水受有機污染時，造成某類菌群因可分解利用該污染物而大量生長或因污染物毒性、環境變異導致抑制而消失，使得社群結構改變。因此，現地微生物的社群結構或多樣性可以作為污染特性指標之一，解析微生物多樣性可以瞭解污染場址是否適合採用生物復育技術，評估復育各階段進行、及復育過程是否完成。

現地生物復育技術即是利用環境中存在可分解污染物的菌群，以自然或加強增生的菌群作為環境自然淨化的手段，亦可於污染物熱點補充大量外源活性菌群或建築現地生物牆，達到快速去除污染的目的。因此，現地生物復育技術是隨場址特性不同而有不同的施做方式，除了地下水場址污染源與場址特性必須已清楚地掌握、瞭解，然後分析污染場址已發生的生物分解程序種類。在造成對人體健康、環境不可接受的風險值或超出法規標準之前，現地生物復育技術最重要地是掌握”誰”是關鍵指標菌群及監測關鍵菌群的活性、數量與分佈，以清楚地展示現地生物分解可減低污染物濃度。因此，現地生物整治並不是只有建立目標污染物的動態變化和降解程度，也要針對相關的微生物進行偵測和監控，如此才能明確瞭解污染物與降解微生物之間的關係，評估生物復育方案是否有效。

監測環境中微生物多樣性和社會結構功能的方法，可分成以培養為主 (culture-dependent) 和不需培養 (culture-independent) 兩類。培養為主的分析方法主要是分析微生物的不同型態、代謝和生理特徵，它包含利用固態培養基分離和培養⁵⁶、most probable-number (MPN)-style liquid assays⁵⁷ 和生理鑑定法 (Biolog substrate utilization plates)⁵⁸ 等。不需培養的菌相分析方法則是以微生物的蛋白質、磷脂酸和核酸 (DNA和RNA) 等分子標記為目標來分析。相對於傳統微生物培養、分離、鑑定，以分子生物技術分析土水菌群結構，不僅縮短實驗時程，減少培養基對菌群選擇性的誤差，更能真正深入檢視微生物社會結構，提供生物復育操作、管理及生物診斷的訊息。最常分析的分子標記 (molecular marker) 是核糖體核糖核酸基因 (Ribosomal RNA gene or rRNA gene)。利用rRNA gene當作分子標記，許多分子生物技術可以用於診斷自然環境中微生物菌群結構、分佈、數量、功能及動態。環境菌群樣本如土壤菌群或地下水菌群經過適當細胞濃縮後以物理或化學方法萃取，得到所有菌群的總RNA 或總DNA。以16S rRNA基因為分子標記，經聚合酵素連鎖反應 (PCR) 與專一性引子大量複製16S rRNA基因片段，利用分子選殖 (Molecular Cloning) 的方式，將插入16S rRNA基因片段的載體轉殖到勝任



(三) 文獻探討

細胞中，再以DNA自動定序儀 (DNA auto-sequencer) 讀出16S rRNA基因的序列。得到的序列資訊進一步與基因庫進行相似性比對後，建構親源關係樹形圖。樹形圖中相似的參考序列資料，提供微生物鑑定、微生物生態功能及菌群組成的訊息。

根據 16S rRNA 基因序列資料庫，分析端點限制片段長度多型性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 是快速菌相分析的最新利器⁵⁹。T-RFLP 法是利用帶有螢光性染料的引子，經 PCR 複製樣品中的目標基因片段後，PCR 產物被限制酵素分解成許多微小的片段，最後利用毛細管電泳型之自動定序儀測量帶有螢光染料基因片段的長度及螢光強度。因為基因序列組成不同，不同菌群會有不同末端限制片段 (terminal restriction fragment, t-RF)，電泳圖上的末端限制片段分佈，形成菌群結構獨特的指紋譜。以 T-RFLP 法分析菌群結構，技術上相當容易、快速且實驗結果再現性高，因此可準確地監測菌群結構的變動。

文獻中也有不少研究是針對多氯乙烯的污染場址進行微生物族群調查。Alameda Naval Air Station 是美國相當著名的多氯乙烯污染場址，此處使用乳酸最為電子提供者進行整治，並發現三氯乙烯穩定進行脫氯反應生成二氯乙烯和氯乙烯。經過多年調查，此場址微生物族群在整治加藥前後並無顯著差異，代表此處微生物生態相當穩定，以 T-RFLP 分析結果主要看到 *Dehalococcoides*、*Desulfovibrio* 和 *Clostridiaceae* 族群 (圖 3.8)；FISH 分析結果則為 *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* (CFB) 族群和 High G+C Gram-positives 微生物為主。另外，作者在研究中推論二氯乙烯分解至乙烯可能還有 *Dehalococcoides* 以外的微生物直接或間接進行脫氯反應⁶⁰。另外，過去多國研究人員不斷針對脫氯菌開發專一性的偵測技術，其中以來自瑞士由 Holliger 領導的團隊在 real-time PCR 的方法開發最為著名。Holliger 團隊以土壤中常見的三株脫氯族群 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter* 和 *Desulfotobacterium* 為主開發定量分生技術。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

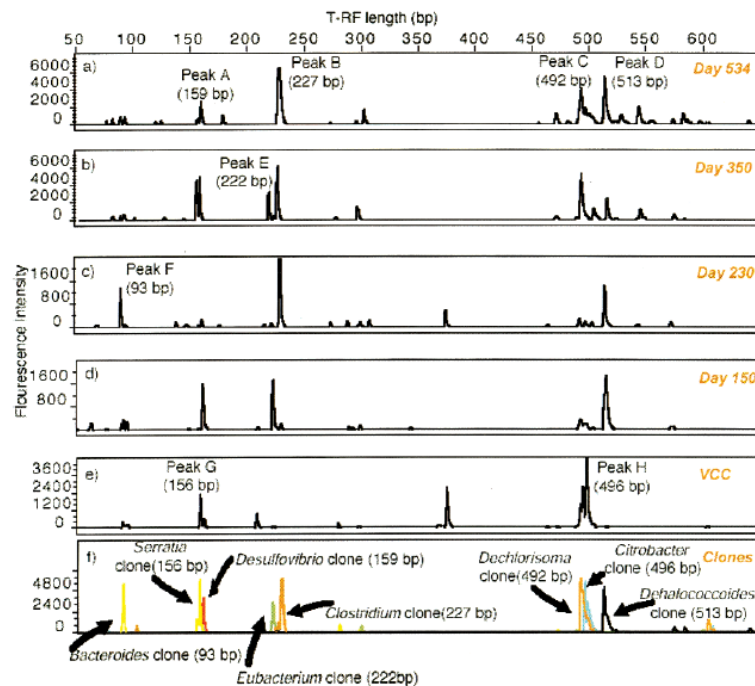


圖 3.8 以 T-RFLP 進行多氯乙烯污染場址微生物多樣性分析⁶⁰

2007 年本團隊發展出一項快速偵測微生物相對豐度的定量分生技術，稱為階層式寡核苷酸引子延伸技術（簡稱 HOPE）。在這個技術中我們設計多種不同長度且分別具有不同階層專一性的寡核苷酸引子，在反應溶液中加入螢光性的 ddNTP，然後利用 DNA 聚合酶活性使這些未標記的引子在 3' 端端點位置延伸出一個帶有螢光的標記鹼基，經過三階段的熱循環使這些帶有螢光標記的專一性引子數量增加，最後以毛細管電泳雷射誘導螢光儀分離這些不同長度的標定引子並偵測其螢光種類與螢光強度，以同時分析樣本中多種目標菌群的親緣身分與其相對豐度。HOPE 方法操作簡單，一次完整的流程只需花費不到 90 分鐘，同具有高專一性、敏感度、以及單一鹼基錯配對的鑑別力。本團隊設計 HOPE 的脫氯菌專一性引子包含 *Dehalobacter*、*Desulfotomaculum*、*Dehalococcoides* 和 *Geobacter*；*Dehalococcoides* 次要族群 (Subgroup) Cornell、Victoria 和 Pinellas (圖 3.9)，偵測受多氯乙烯污染地下水中脫氯菌的豐富度。



(三) 文獻探討

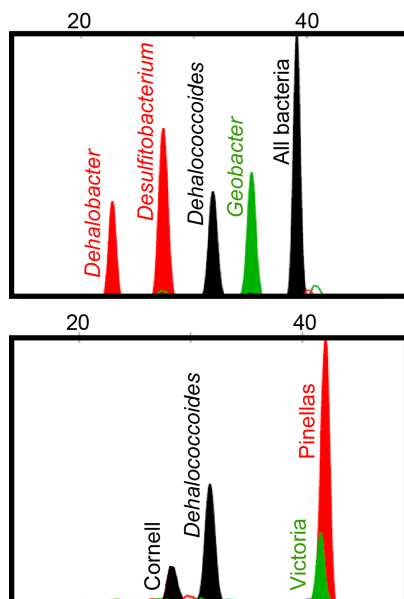


圖 3.9 利用 HOPE 法偵測地下水脫氯菌-*Dehalobacter*、*Desulfotobacterium*、*Dehalococcoides* 和 *Geobacter*；*Dehalococcoides* 次要族群 Cornell、Victoria 和 Pinellas

細菌 DNA 序列中 16S rRNA 基因具有一定的基因保守性且長度適中 (約 1500 bp)，適合運用於菌種的鑑定，利用分子技術分析菌種的 DNA 序列將可提供更準確的鑑定結果。傳統 Sanger 定序的限制是操作較為繁瑣，且無法同時處理大量樣品。次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 具有高通量定序的優點，其優勢是能同時獲得大量的定序資料 (約 10 萬~1000 萬筆資料)。常見的次世代定序平台有 Illumina (Miseq/Hiseq) 及 ABI (Ion Torrent)，目前以 Illumina 使用最廣泛。根據 2007 年 Wang 團隊研究指出，經由次世代定序得到約 400 的序列長度於門 (phylum)、綱 (class)、目 (order)、科 (family)、屬 (genus) 下，鑑別率分別為 99.8%、99.2%、97.7%、94.6% 與 88.7%⁶¹。

現今，有許多研究者廣泛地利用次世代定序技術探討各種環境，例如：土壤 (soil)、礦山 (mine)、海綿皂 (sponges)、人/動物腸道菌 (gut)、海洋 (ocean)、自來水處理廠 (drinking water treatment plant)、廢水處理廠 (wastewater treatment plant)、根圈 (root)、活性污泥 (activated sludge)、溫泉 (hot spring)、底泥 (sediment)、成人口腔 (oral) 中真菌、細菌及古細菌的微生物多樣性⁶²⁻⁷⁰。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

目前國外已有許多配合次世代定序技術監測環境污染物對環境微生物多樣性影響的研究。含氯化合物污染方面，偵測長期受多氯聯苯 (polychlorinated biphenyl, PCB) 污染土壤發現已孕育出具有降解能力的微生物 (如 *Rhodanobacter*、*Burkholderia*、*Pandoraea*、*Dyella*、*Pseudomonas*)⁷¹。另外，額外添加柚苷 (naringin)、咖啡酸 (caffeic acid)、檸檬烯 (limonene) 有助於生物刺激，使降解菌株-*Hydrogenophaga*、*Burkholderia*、*Pseudoxanthomonas* 可顯著地生長⁷²。2013 年，Kotik 等人在四氯乙烯 (tetrachloroethene) 污染場址可偵測可偵測豐富度 1% 以上的微生物並找出二氯乙烯 (cis-1,2-dichloroethene, cDCE) 消化菌-*Polaromonas*，厭氧鹵素呼吸菌-*Geobacteria* 及參與共代謝機制的 *Burkholderia* 與 *Methylobacter*⁷³。上述結果更凸顯利用次世代定序技術達高通量與環境微生物監測的優點。

本團隊過去利用次世代定序技術比較土水樣本微生物分布的差異性，結果顯示土水樣本的前處理方法，或是土壤顆粒的濃度將對次世代定序結果造成很顯著的影響 (圖3.10)，顯示採樣前處理的差異會明顯影響分子生物分析的結果。

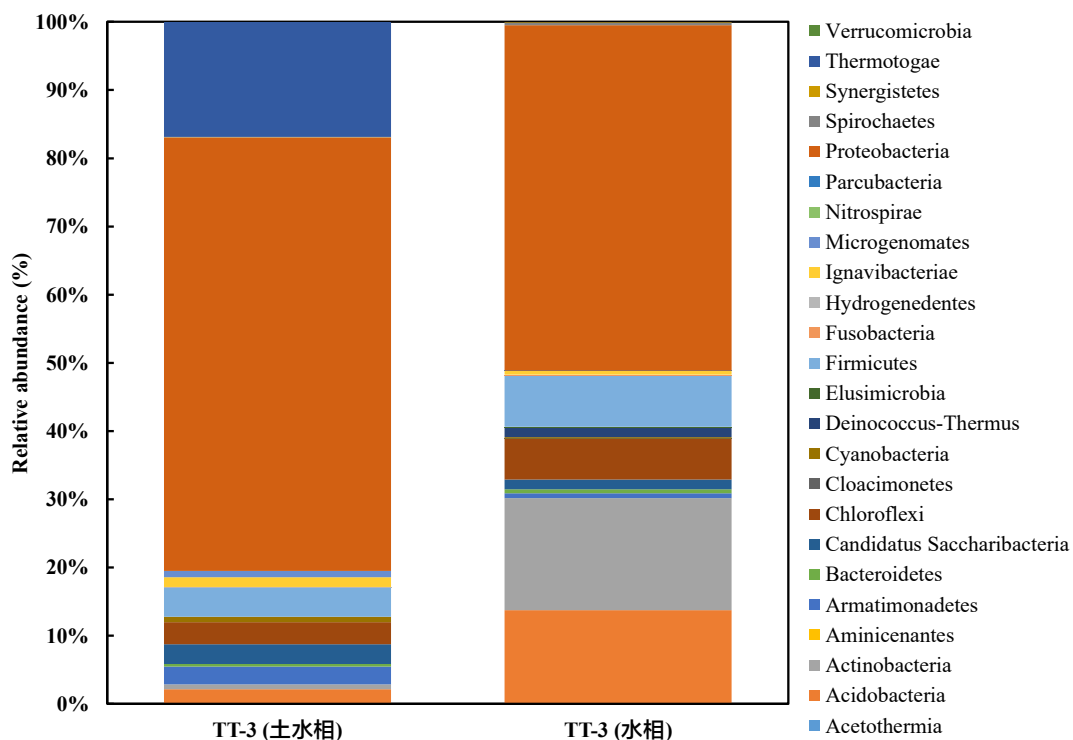


圖 3.10 土水樣本不同前處理方法的微生物族群分布



(三) 文獻探討

過去本團隊利用次世代定序技術探討多氯乙烯地下水污染場址菌群結構與還原脫氯豐富度，進一步建立多氯乙烯污染的微生物指紋譜與污染指標菌群資料庫，結果發現只要場址有三氯乙烯污染，無論污染程度，其微生物的組成將會比較相似 (圖 3.11)，此分析結果顯示微生物族群結構可以作為土水健康 (有/無污染) 的指標。

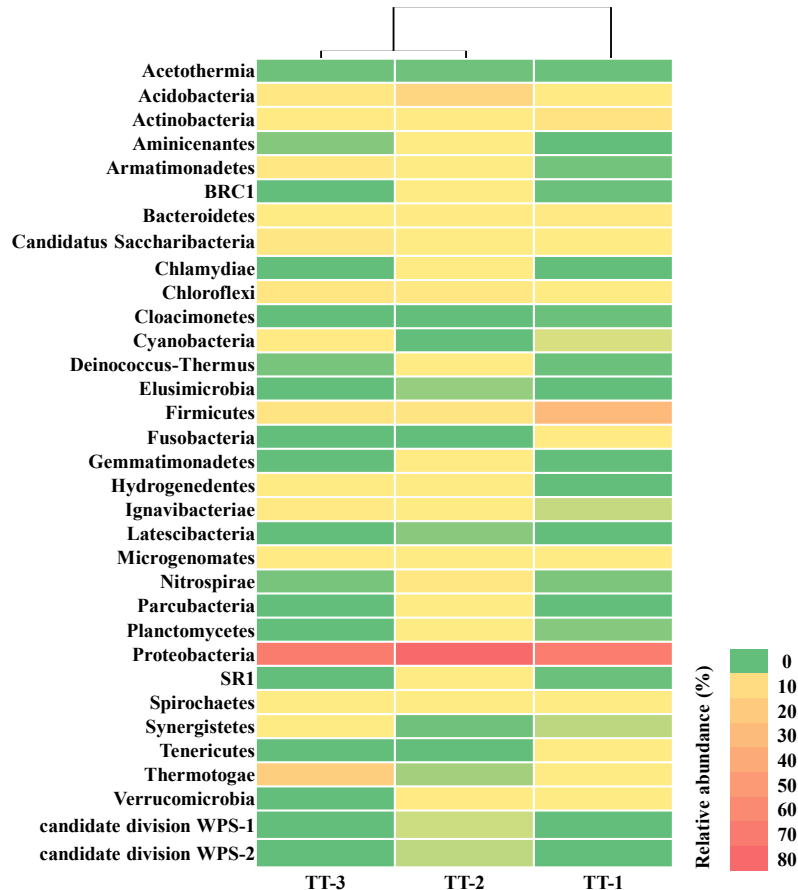


圖 3.11 TT 場址中分別代表低 (無)、中和高濃度多氯乙烯污染樣本的微生物族群分布

這些分子生物技術已成為現行鑑定、診斷、監測環境菌群之”標準”方法，例如活性污泥的菌群結構的分析⁷⁴、絲狀菌的鑑定^{75, 76}以及環境中致病性微生物的檢測⁷⁷。運用此技術可對微生物菌群結構進行更全面性的分析結果，已引起環境微生物學研究典範移轉 (Paradigm shift)。許多生物科技公司，例如Roche、Illumina和Applied Biosystems等研發出不同形式的HTS技術推出市場之後，HTS定序技術已大量地應用在各研究領域不同環境樣本的菌相分析，逐漸取代傳統的轉殖定序、DGGE、TRFLP等分析技術。



(四) 研究方法與過程

4.1 架設連續厭氧反應槽

本計畫針對三氯乙烯存在於土壤中的特性，模擬遭受三氯乙烯污染的整治場址，營造出三氯乙烯於厭氧條件下與微生物之間環境，希望呈現出現地生物還原脫氯在添加藥劑的過程中對於多氯乙烯的降解情境，並考慮藥劑的質傳、水質分析與微生物分析等因素，架設三組厭氧脫氯反應系統，探討添加不同碳源，還原性脫氯菌群變化及降解三氯乙烯的關聯性，以及反應槽內全菌相動態與三氯乙烯完全脫氯效率之關係，反應槽設計以微生物馴養、反應、監測、採樣分析、調整、收集等功能為出發點。

圖 4.1 為厭氧脫氯反應系統，三座反應槽分別是 EOS、AS 與 MS，添加的碳源依序對應為乳化油、乙酸與糖蜜，控制反應槽內 pH 值保持在 6.2-6.5 的範圍中，每組反應槽配備一個 2 公升基質桶、6 公升反應槽（工作體積 5 公升）（表 4.1）、2 公升廢液桶、蠕動馬達（MasterFlex C/L）、攪拌器、產氣量收集系統，並有另外一組蠕動馬達同時負責三個反應槽進流三氯乙烯飽和溶液（1100 ppm）的工作。

表 4.1 反應槽設計參數

反應槽代號	總體積 (L)	工作體積 (L)	瓶頂空間 (L)	碳源
EOS	6.0	5	1	乳化油
AS	6.0	5	1	乙酸
MS	6.0	5	1	糖蜜



(四) 研究方法與過程

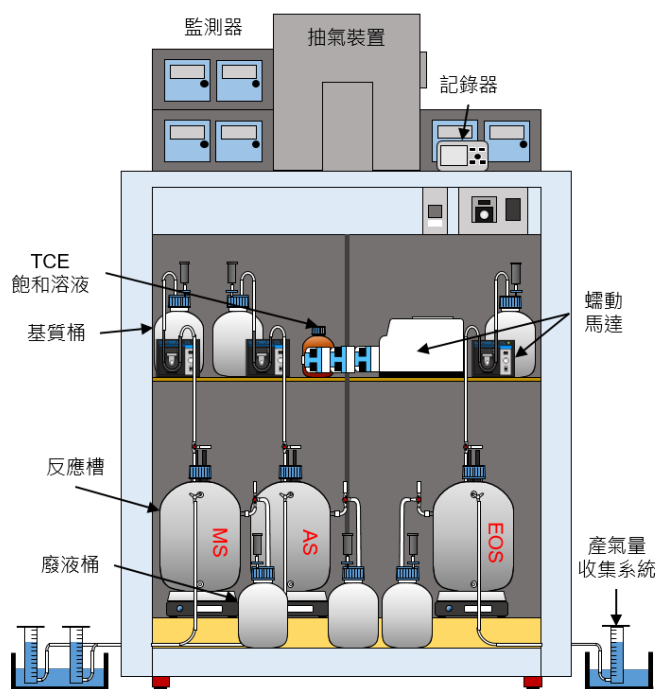


圖 4.1 厭氧脫氯反應系統構造圖

本計畫菌種來源為地下水污染場址混合後的污泥，先前已確認在這污泥中有脫氯菌的存在，以此作為反應槽的植種源。厭氧脫氯反應系統模擬遭受三氯乙烯污染的場址環境，採用三氯乙烯飽和溶液 (1100 ppm) 作為三氯乙烯的污染來源，並於反應槽內添加基質，促進微生物進行脫氯反應，基質配方包含了 200 mg C/L 碳源 (EOS：乳化油；AS：乙酸；MS：糖蜜)、基礎培養基 (NaCl 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 KCl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、強還原劑 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、微量元素、厭氧指示劑 ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$)、緩衝溶液 (K_2HPO_4 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 等數十種藥劑，基質中添加的磷酸緩衝溶液 (K_2HPO_4 與 NaH_2PO_4) 用以控制各個反應槽內 pH 值的穩定，必要時手動添加 NaOH (4N) 與 HCl (5%) 調整至目標數值。

反應槽的運作模式以連續進流的方式進行實驗，在進流時反應槽停止攪拌，以避免污泥流失。進流可分為基質與 TCE 飽和溶液，基質進流時間約 2 小時左右，進流體積為 200 mL；TCE 飽和溶液與基質同時進流，進流體積依據各階段而有所不同。

為確認與調整反應槽是否維持在厭氧以及控制的 pH 值的環境下，各配備一組 pH sensor、ORP sensor 與監測器 (SUNTEX pH ORP Controller PC-310)，並使用記錄器進行記錄，連續監測 pH、ORP 數值變化。設計原理為利用 sensor 進行偵測，將讀取的數值呈現在監測器上，再將數值傳送至記錄器上記錄，每一小時記錄一次反應槽的變化，確認反應槽內部呈現之氧化還原狀態與維持在穩定之 pH 環境。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

4.2 反應槽採樣與水質分析

厭氧反應槽操作過程，例行採樣用以分析氣體、水質，以及微生物體分析，採樣頻率每隔 3~4 天採樣一次；考量到微生物利用基質進行降解的時間，其採樣時段設定為基質進流後 15 小時採樣。採樣的步驟如下：開啟攪拌器均勻攪拌 15 min 後，水質分析與微生物體分析總共採集 30 mL 水樣。

本計畫氣體分析項目包含含氯乙烯含量分析、乙烯含量分析與氣體組成，水質分析項目包含揮發酸含量分析、有機碳含量分析與懸浮固體變化量分析。

水質與微生物體分析前處理步驟如下：將採集後的水樣以 8000 rpm 離心 10 min，上層液以 0.22 μm 過濾頭進行過濾，以高效液相層析-光敏二級管陣列偵測器 (HPLC-photodiode array) 分析揮發酸進行揮發酸含量分析與 TOC (GE Sievers InnovOx On-Line TOC Analyzer 10020161) 進行有機碳含量分析。之後抽乾液體，加入 RNA letter，使用封口膜密封並保存污泥於-20°C 冰箱中。

4.2.1 含氯乙烯含量分析

含氯乙烯含量分析目的為得知各反應槽脫氯、降解、累積的情形。分析含氯乙烯所使用的儀器為 GC-ECD (Agilent 7820A GC system)，可分析 VC、t-DCE、c-DCE、TCE 等四種含氯乙烯濃度，分離管柱為 DB-624，載流氣體為超高純氮氣 (注射口溫度為 180°C；壓力為 11.1 psi；流量為 1 mL/min；烘箱溫度為 40°C，10 分鐘，每分鐘升高 30°C，直至 180°C，停留 4 分鐘；偵測器溫度為 320°C；輔助流量為 30 mL/min)。取 500 μL 充分混合的氣體注入 GC-ECD 儀器中分析，觀察特定 RT 值位置是否出現波峰，將面積代入檢量線回推各項含氯乙烯濃度。

4.2.2 乙烯含量分析

乙烯含量分析目的為確認反應槽內三氯乙烯的降解過程，是否有進一步降解至乙烯。分析乙烯使用的儀器為 GC-FID (SHIMADZU GAS CHROMATOGRAPH GC-2014)，用來分析乙烯濃度，分離管柱為 porapak Q，載流氣體為高純氮氣 (注射口溫度為 120°C；偵測器溫度為 120°C；管柱烘箱溫度為 80°C，6 min；總流量：25 mL/min)。取 100 μL 充分混合的氣體注入 GC-FID 儀器中分析，觀察特定 RT 值位置是否出現波峰，將面積代入檢量線回推乙烯濃度。

4.2.3 氣體組成分析

分析氣體組成使用的儀器為 GC-TCD (CHINA CHROMATOGRAPHY 2000)，用來分析氫氣、氮氣、甲烷、二氧化碳等四種氣體，分離管柱為 Carboxen-1000，載流氣體為高純氮氣 (注射口溫度：70°C；烘箱溫度：100°C；TCD 溫度：60°C；



(四) 研究方法與過程

電流：60 mA；氣體流速 20 mL/min)。取 500 μ L 充分混合的氣體注入 GC-TCD 儀器中分析，觀察特定 RT 值位置是否出現波峰，將波峰的面積代入檢量線回推各項氣體所佔的比例。

4.2.4 揮發酸含量分析

分析揮發酸使用的儀器為 HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity)，用來分析甲酸、乙酸、丙酸、異丁酸、丁酸、戊酸等六種揮發酸濃度，分離管柱為 BIO-Aminex HPX-87H Column 300x7.8 mm，分離溶劑 (移動相) 為 0.08 N H_2SO_4 (烘箱溫度：60°C，流速：0.6 mL/min)。取 2 mL 充分混合的水樣，使用 0.22 μ m 過濾頭過濾，將處理後的水樣注射至 HPLC 儀器進行分析，在波長 210 nm 觀察特定 RT 值位置是否有出現波峰，將波峰面積代入檢量線回推各項揮發酸濃度。

4.2.5 有機碳含量分析

分析有機碳使用的儀器為 TOC (GE Sievers InnovOx On-Line TOC Analyzer 10020161)，用來分析總碳、無機碳與有機碳。取 10 mL 充分混合的水樣，使用 0.22 μ m 濾膜過濾，稀釋 5 倍，總體積達到 50 mL，將處理後的水樣以 TOC 儀器進行分析，可得知總碳、無機碳與有機碳的濃度。

4.2.6 懸浮固體變化量分析

分析懸浮固體變化量使用的儀器為抽氣馬達、四位數天平與烘箱。將玻璃纖維濾紙以二次水進行清洗後並抽乾液體，放於鋁盤上，放入烘箱以 105°C 烘乾，移入乾燥箱 30 分鐘，取出後放於四位數天平秤重，得知濾紙重量，在玻璃纖維濾紙依序加入 2 mL 水樣與二次水，將含有水樣的玻璃纖維濾紙，置於烘箱以 105°C 烘乾，再次移入乾燥箱 30 分鐘，取出後放於四位數天平秤重，得知濾紙重量與懸浮固體重，即可得知懸浮固體濃度 (mg/L)。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

4.3 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
文獻蒐集分析													
建立厭氧脫氯反應系統													
穩定操作厭氧脫氯反應系統													
水質監測													
萃取微生物菌群 DNA													
qPCR 定量													
NGS 定序與大數據分析													
微生物菌群網絡分析													
期中報告													
期末報告													
工作進度估計百分比 (累 積 數)	10%	20%	30%	35%	40%	50%	60%	70%	75%	80%	90%	100%	
預定查核點	期中		完成文獻蒐集 50 篇。建立並穩定操作厭氧脫氯反應系統，同時進行水質監測觀察反應系統是否穩定並完成期中報告。										
	期末		完成 3 組反應槽 DNA 萃取、qPCR 定量、高通量定序、大數據分析及微生物菌群網絡分析與期末報告。										
說明：													
工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。													
「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1)工作天數，(2)經費之分配，(3)工作量之比重，(4)擬達成目標之具體數字。													
「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。													



(五) 結果與討論

(五) 結果與討論

5.1 連續厭氧反應槽操作與線上監測

5.1.1 反應槽操作參數

本計劃菌種來源為地下水污染場址混合後的污泥，先前已確認在這些污泥中有脫氯菌的存在，因此作為反應槽的植種源。在實驗開始之前，三座反應槽以乳化油為主要供給碳源，並且讓反應槽的氧化還原電位維持在-400 mV 上下，三座反應槽的 pH 值則皆維持在 pH 6.2~6.5。在操作的第-14 到第 0 天訂為植種菌群適應期，每日進流 400 mL 基質供給微生物生長所需的碳源與微量元素，並僅在第-10 天添加 60 mL TCE 飽和水溶液 (1100 mg/L)，一方面維持厭氧發酵菌與還原脫氯菌之活性，另一方面讓污泥中的微生物適應反應槽的環境。從第 0 天之後，三座反應槽個別添加含不同碳源之基質，我們將添加乳化油的反應槽命名為 EOS 反應槽、添加乙酸之反應槽命名為 AS 反應槽、添加糖蜜之反應槽命名為 MS 反應槽；每日除了進流 400 mL 基質供給微生物生長所需的碳源與微量元素以外，同時會以微量幫浦精準地進流一定體積的 TCE 飽和水溶液到反應槽之中。依照反應槽添加不同體積的三氯乙烯共可分為四個試程，第一試程為第 0 至 13 天，每日進流 15 mL 的飽和三氯乙烯水溶液；第二試程為第 14 至 33 天，每日進流 30 mL 的飽和三氯乙烯水溶液；第三試程為 34 到 41 天，每日進流 60 mL 的飽和三氯乙烯水溶液；第四試程為第 42 到 50 天，每日進流 120 mL 的飽和三氯乙烯水溶液。除各試程規劃之採樣日以外，每日觀察各反應槽之 pH 值與氧化還原電位，若反應槽之 pH 值降到 6.2 以下則以 NaHCO_3 (42 g/L) 將 pH 值調整為 6.2-6.5 區間。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

表 5.1 反應槽操作參數

試程階段	操作天數*	TCE (mg/L.day)	進流 TCE 體積 (mL/day)	碳源 (mg C/L.day)			進流基質體積 (mL/day)	HRT (days)
				EOS	AS	MS		
馴養期	-14	批次進流	60 mL	7.12 (進流 EOS 基質)			200	25
第一試程	0	3.3	15	7.12	4.68	6.08	200	23.2
第二試程	14	6.6	30	7.12	4.68	6.08	200	21.7
第三試程	34	13.2	60	7.12	4.68	6.08	200	19.2
第四試程	42	26.4	120	7.12	4.68	6.08	200	15.6

*備註：此操作天數僅列出各試程的第一天；反應槽改變碳源起訂為第 0 天。



(五) 結果與討論

5.1.2 反應槽線上監測數值

由圖 5.1 (A) 顯示各槽的 pH 隨操作時序的變化。EOS 與 MS 槽的 pH 值在整個實驗期間呈現緩慢下降的趨勢，整體較趨近於 pH6.2 (表 5.2)；相對來講，AS 槽的 pH 值則穩定地在 6.5 上下 (表 5.2)。為使反應槽維持在 pH6.2~6.5 區間，根據監測器數值在第 14 天與第 46 天使用 NaHCO_3 (42 g/L) 微調 EOS 槽之 pH 值，使其從 6.1 回到 6.2；MS 槽也根據監測器數值在第 23 天、第 34 天與第 46 天使用 NaHCO_3 (42 g/L) 微調其 pH 值，使其從 6.1 回到 6.2。而對於 EOS 槽與 MS 槽其緩衝溶液無法控制 pH 值在 6.2~6.5 區間，推測認為是受到反應槽微生物代謝後產生的揮發酸所導致，使得 pH 值呈現降低的趨勢。不同於乙酸，乳化油與糖蜜是較為複雜的碳源，其代謝路徑也較為複雜，微生物將這些複雜大分子有機物裂解成較小分子後，由酸化菌接著降解這些代謝產物，產生醇類與揮發酸，部分電子會以氫氣的形式釋出，進而影響反應槽之 pH 值；另一方面，也反映我們在反應槽基質當中所添加的緩衝液可能是不太足夠的，因此無法持續維持 pH 值在 6.2~6.5 區間。

由圖 5.1 (B) 顯示各反應槽其 ORP 值隨操作時序的變化。三個反應槽的 ORP 數值皆維持在 -350 到 -450 區間 (表 5.2)，表示反應槽內的環境呈現厭氧狀態。由於水中氫離子與氫氧離子的濃度會影響 ORP 的數值，因此在較偏酸性的 EOS 槽與 MS 槽其 ORP 數值分別為 -413.9 ± 33.6 與 -412.4 ± 12.5 ，而 pH 值維持在 6.5 上下的 AS 槽其 ORP 數值則是 -440.0 ± 6.8 ，此結果說明各槽 ORP 的差值主要是由不同 pH 值所造成。

在操作天數第 24 天時，EOS 反應槽由於不可預測之因素導致監測器壞掉，所以我們更換了新的監測器，也重新校正反應槽中的 pH meter 與 ORP sensor，而由於校正時會使反應槽體內液體接觸到空氣中的氧氣，使得 EOS 槽 ORP 有較大的變動，所以沒有納入當天的數值做計算 (表 5.2)。

在執行實驗期間，共歷經 50 天，其溫度的變化大約落在 26 度到 33 度區間，平均溫度為 30 度。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

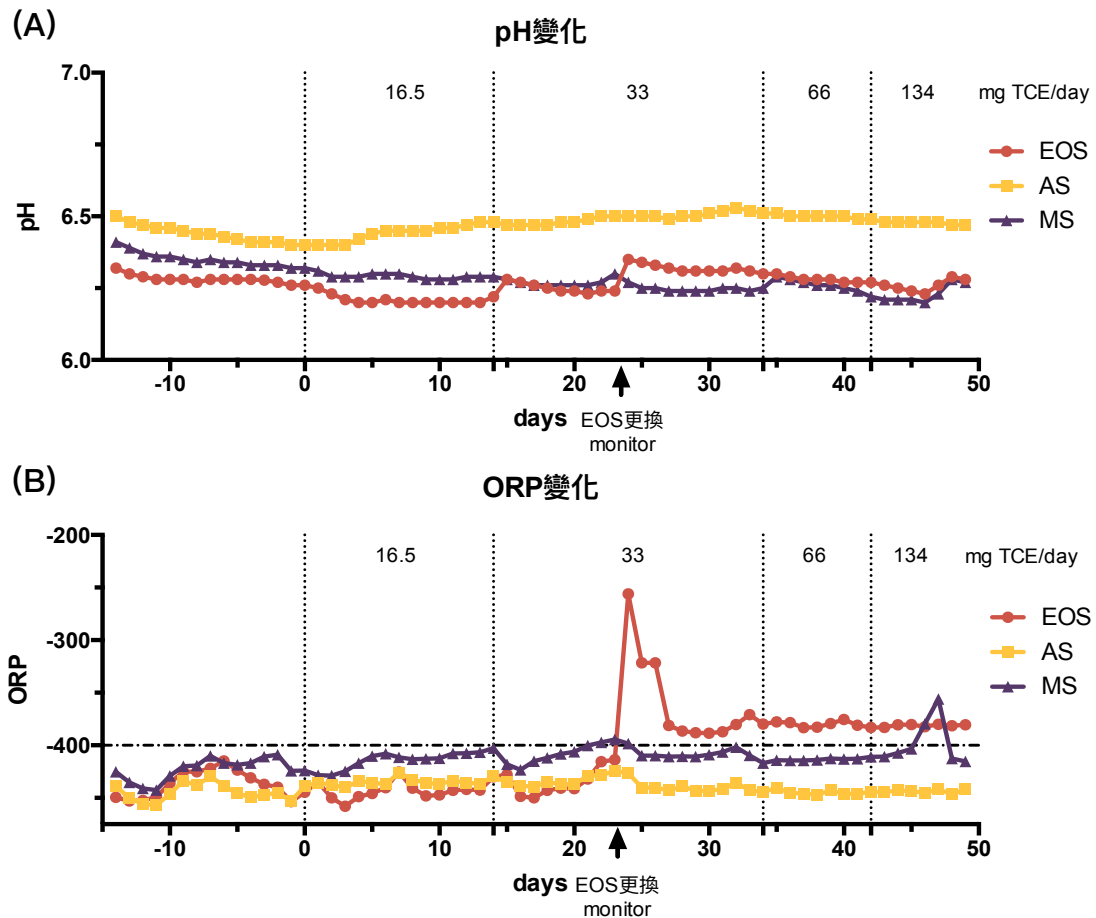


圖 5.1 反應槽環境變化。(A)反應槽 pH 值變化；(B)反應槽 ORP 變化。

表 5.2 反應槽 pH 與 ORP 平均值

監測項目	EOS	AS	MS
pH	6.26±0.04	6.47±0.03	6.28±0.05
ORP (mV)	-413.9±33.6	-440.0±6.8	-412.4±12.5

備註：EOS 槽於第 24 天由於監測儀故障造成數據異常，故不納入當天數據作計算。



(五) 結果與討論

5.2 反應槽採樣與水質分析

在本計畫執行階段，採樣頻率為一週兩次，採樣項目包含氣體與水質分析。氣體的分析方式為各取 0.5 mL 之反應槽氣體進行含氯乙烯含量分析、乙烯含量分析與氣體組成 (參照圖 5.2)。水質分析則是取 30 mL 來自各個反應槽之均勻水相，取 5 mL 做懸浮固體變化量分析，剩餘水樣則使用高速離心機離心 8,000 rpm，再將上清液利用 0.22 μ m 濾膜過濾，隨後分別進行揮發酸含量分析與有機碳含量分析，剩餘污泥則加入 RNA letter 後保存於 -80°C 冰箱留待進行微生物實驗 (參照圖 5.2)

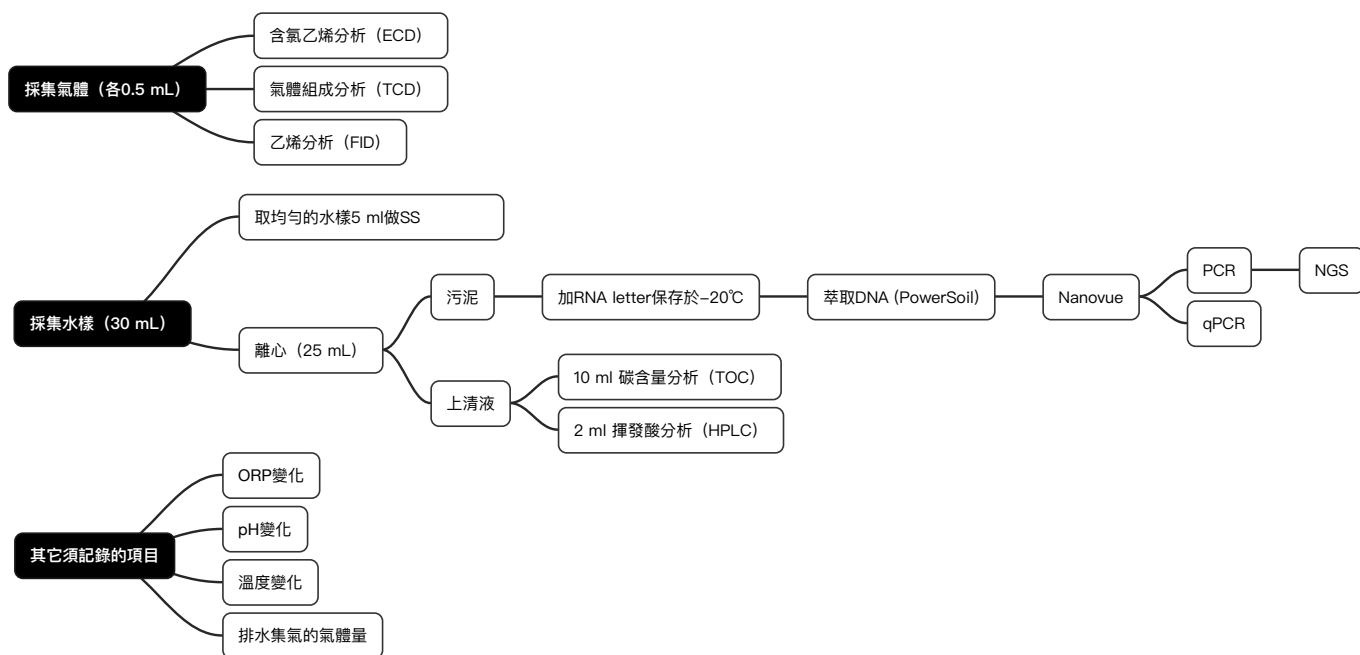


圖 5.2 反應槽採樣與分析項目

5.2.1 含氯乙烯含量分析結果

圖 5.3 顯示含氯乙烯在反應槽中被降解的情形。在實驗的過程中，我們一共提升了四次 TCE 的負荷，希望能夠探討在不同碳源下脫氯菌可以處理 TCE 的負荷量，而依照反應槽添加不同體積的三氯乙烯共可分為四個試程，第一試程為第 0 至 13 天，每日進流 15 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (3.3 mg/L)；第二試程為第 14 至 33 天，每日進流 30 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (6.6 mg/L)；第三試程為 34 到 41 天，每日進流 60 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (13.2 mg/L)；第四試程為第 42 到 50 天，每日進流 120 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (26.4 mg/L)。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

在第一試程中，三個反應槽在完成三氯乙烯至乙烯的脫氯過程中，並無三氯乙烯、二氯乙烯或氯乙烯的明顯累積，說明尚未達到其脫氯效果的極限。在第二試程中，三個反應槽在試程後期皆有反式二氯乙烯的累積，顯示二氯乙烯降解至氯乙烯的速率變慢了。在第三試程與第四試程同樣可以觀察到一樣的情況，皆是反式二氯乙烯的累積，我們推測可能是二氯乙烯的累積過多，讓帶有將二氯乙烯降解至氯乙烯功能性基因的脫氯菌群未能即時將二氯乙烯降解，也可能是受限於有限的碳源所導致脫氯菌群生長變慢，而無法降解掉反應槽內的二氯乙烯。

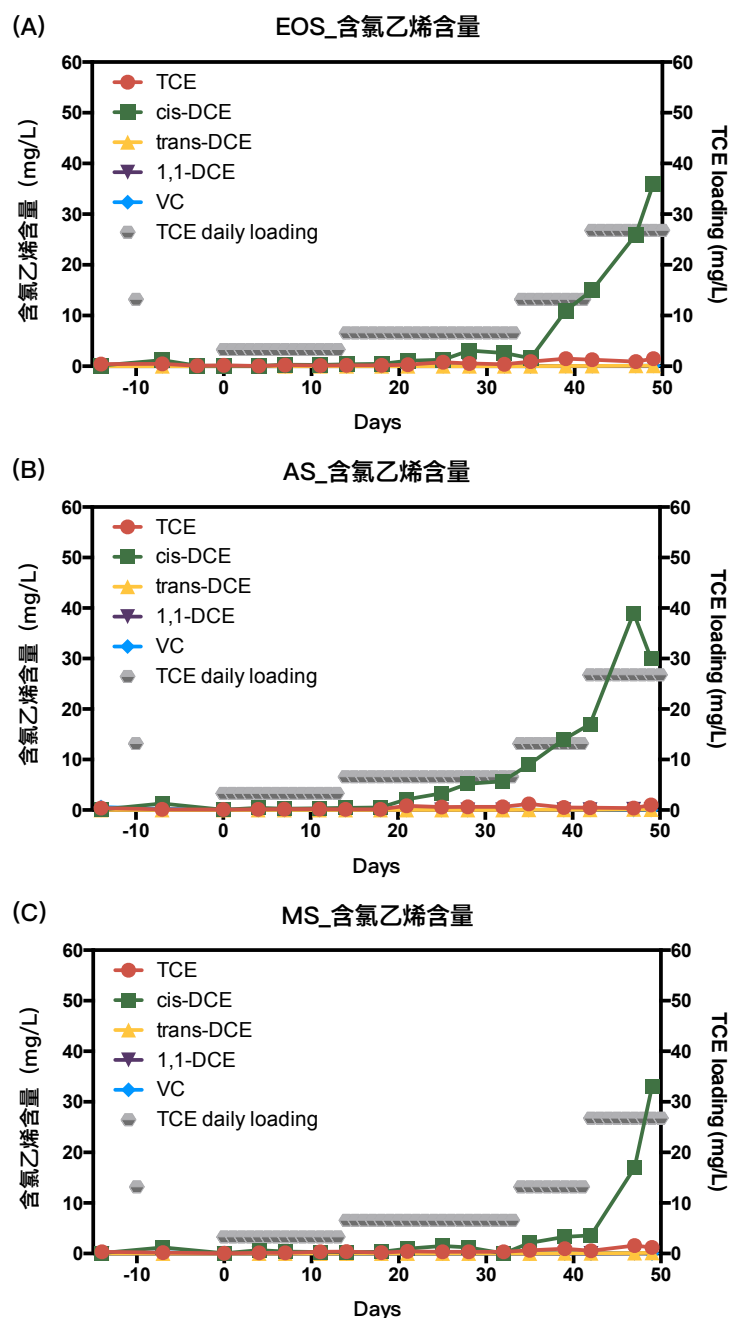


圖 5.3 反應槽含氯乙烯含量變化。(A) EOS 槽含氯乙烯含量變化；(B) AS 槽含氯乙烯含量變化；(C) MS 槽含氯乙烯含量變化。



(五) 結果與討論

5.2.2 乙烯含量分析結果

三氯乙烯的降解過程會從三氯乙烯降解成二氯乙烯 (順式、反式、1,1 二氯乙烯)，再降解成氯乙烯，最後再被降解成無毒的乙烯，因此觀察反應槽體乙烯的含量變化可以幫助我們判斷反應槽脫氯效果的好壞。

圖 5.4 顯示各反應槽中乙烯含量變化。結果顯示在植種菌群適應期間，僅給予反應槽一次 TCE 飽和水溶液，乙烯會逐漸累積，直到第一試程開始，此時開始每日添加 15 mL 並且個別給予含不同碳源的基質，三個反應槽內的乙烯含量才逐漸下降，到第一試程後期 EOS 槽與 AS 槽的乙烯才又逐漸累積，顯然在這個階段，各個反應槽內的菌群結構正慢慢在改變以適應新的環境，我們推測 MS 槽在第一試程結束時菌群結構可能還沒改變完，尚未適應新環境，因此乙烯的產量較少。而到了第二試程，EOS 槽的乙烯到後期逐漸呈現下降的趨勢；AS 槽的乙烯含量則是穩定地保持在一定的含量；MS 槽則是到後期逐漸呈現上升的趨勢。到了第三與第四試程後，其趨勢變化與第二試程相同。較意外地是 EOS 槽的乙烯含量變化，到了後期乙烯的含量一路下降，與含氯乙烯含量結果觀察到的現象不太一樣 (圖 5.3)，由於並未觀察到 EOS 槽的三氯乙烯、二氯乙烯或氯乙烯有較高累積的現象 (相較於另外兩槽)，其乙烯產量應該和另外兩槽相當才對，然而結果卻呈現下降趨勢，因此我們推測可能在 EOS 槽中，乙烯被微生物利用掉了，才會導致乙烯含量下降，但這個假設仍須再後續設計實驗加以證明。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

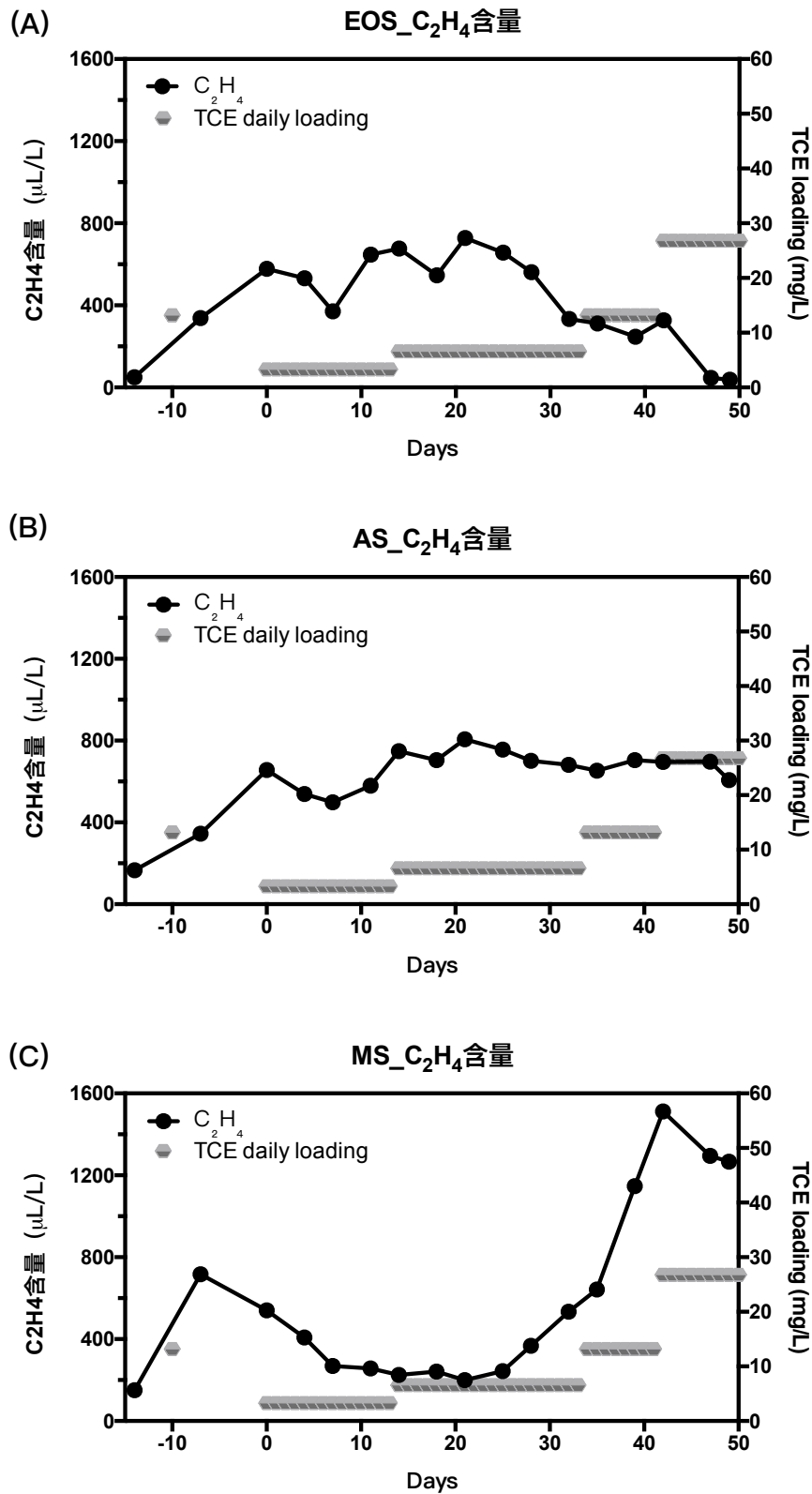


圖 5.4 反應槽乙烯含量變化。(A) EOS 槽乙烯含量變化；(B) AS 槽乙烯含量變化；(C) MS 槽乙烯含量變化。



(五) 結果與討論

5.2.3 氣體組成分析結果

本項計劃研究的是脫氯菌降解三氯乙烯的情況，厭氧還原脫氯菌通常以氫氣當作電子供給者，含氯有機物當電子接受者，此電子流動可以使脫氯菌進行脫氯呼吸反應而獲得能量。因此在脫氯的過程中，如果不能獲得足夠的氫氣（電子），那麼就會無法有效地將三氯乙烯降解成二氯乙烯、一氯乙烯，達到完全脫氯的效果。在厭氧條件下，有機物分解產生的電子常以氫氣的形式釋放到水中。除了還原脫氯菌之外，甲烷菌會利用氫氣生長並產生甲烷，另外亦有文獻報導有些甲烷菌可進行 TCE 的脫氯反應。因此偵測甲烷氣體含量，可判斷存在於反應槽內的甲烷菌活性，提供消耗掉氫氣的資訊，幫助研判脫氯效率的發展趨勢。

由圖 5.5 顯示，在植種菌群適應期到第一試程之間，三個反應槽當中的甲烷是呈現逐漸上升的趨勢，顯示甲烷菌在這兩個時期在反應槽當中的豐富度應佔相當高的比例。之後，在進到第二試程初期，三個反應槽中的甲烷含量依然很高，佔約 30%，然而，三個反應槽隨著時序的增加，到後期甲烷含量漸漸地下降，尤其 EOS 槽甲烷下降的比例較其他兩槽顯著，顯示在第二試程後期，三個反應槽當中的甲烷菌其豐富度有下降的趨勢。而進入到第三、第四試程，甲烷的含量依然呈現下降的趨勢，EOS 槽的甲烷含量下降趨勢尤為明顯，因此我們推測在第三及第四試程中 EOS 槽當中電子的流動是較偏向脫氯菌群的而非甲烷菌，對於脫氯效果應有好的影響。而 AS 與 MS 槽當中，甲烷含量亦呈下降趨勢，顯示甲烷菌的豐富度應有減少。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

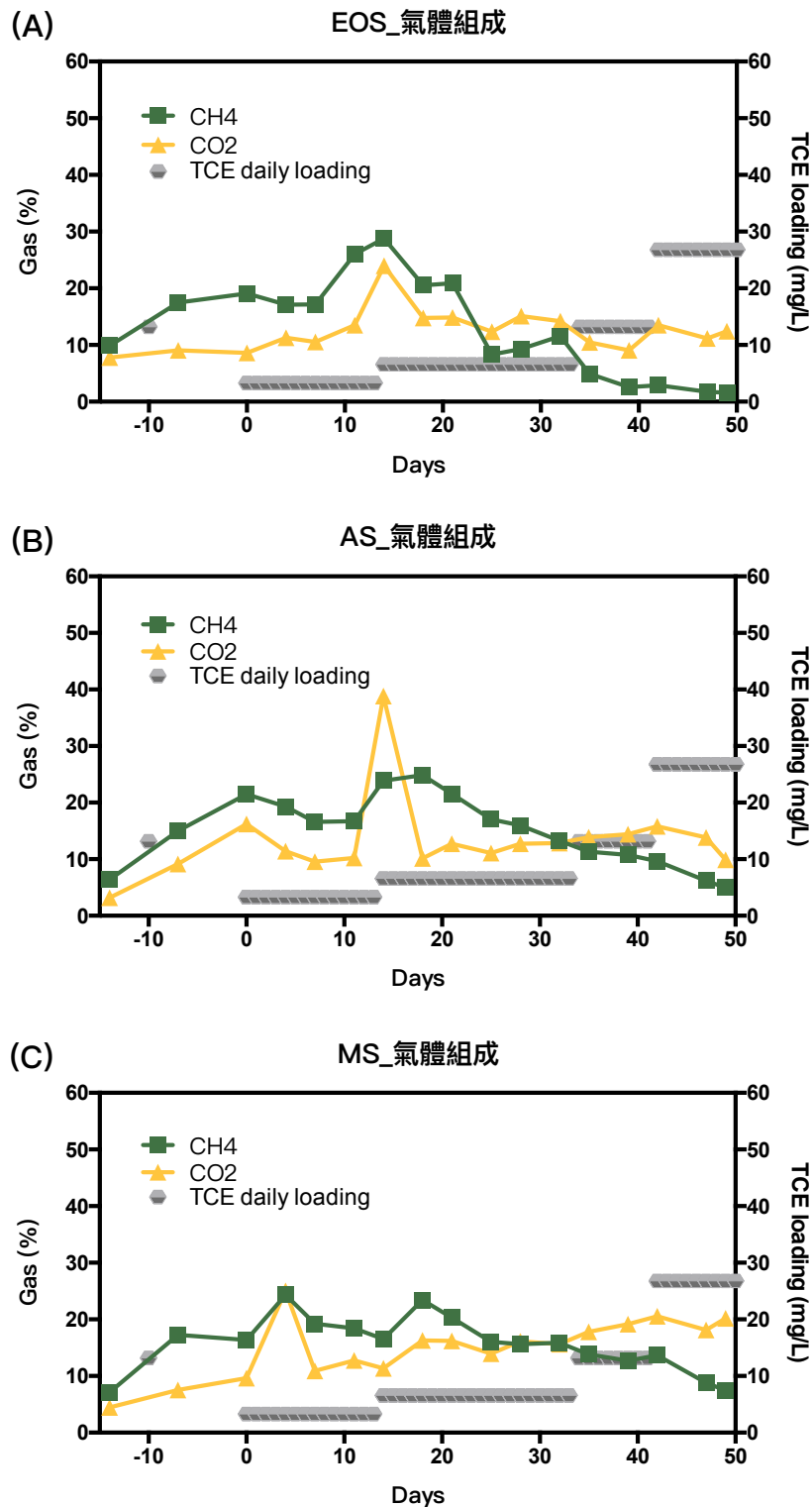


圖 5.5 反應槽氣體組成變化。(A) EOS 槽氣體組成變化；(B) AS 槽氣體組成變化；(C) MS 槽氣體組成變化。



(五) 結果與討論

5.2.4 揮發酸含量分析結果

厭氧微生物代謝有機物過程，依序進行有機物的水解，將複雜大分子有機物裂解成較小分子而溶於水中，然後酸化菌接著降解這些代謝產物，產生醇類與揮發酸，部分電子會以氫氣的形式釋出。接著，醇類與揮發酸繼續被降解成乙酸與氫氣，最後，甲烷菌或脫氮菌的代謝反應則利用乙酸與氫氣，進行最終礦化反應。因此，揮發性脂肪酸 (VFA) 在酸化反應的過程中，微生物將有機物進行轉化產生，同時可能伴隨產生氫氣、醇類等代謝產物。因此，分析揮發酸種類與濃度可判斷藥劑在反應槽內的發酵分解狀況。許多脫氮菌亦代謝揮發酸而生長，控制揮發酸的產生可培養特殊脫氮群。因此，揮發酸的分析是還原生物脫氮重要的指標之一。

由結果圖 5.6 可以看到，在植種菌群適應期時，三個反應槽的酸類不易累積，顯示產生的揮發酸容易被反應槽內的微生物分解，因此反應槽內的微生物可代謝掉基質提供的碳源。接著，當進入第一試程，分別更換碳源為乳化油、乙酸與糖蜜並開始每日進流 15 mL TCE 後，初期三個反應槽都可以看到有酸類的累積：EOS 槽為甲酸與乙酸的累積最為明顯；AS 槽為甲酸與乙酸的累積最為明顯；MS 槽則是為乙酸與丙酸的累積最為明顯。而到了第一試程後期，三個反應槽的酸類又慢慢下降。顯示菌群需要花一點時間才能適應基質中碳源的改變，在第一試程初期，菌群的結構開始改變，由原本一開始無法代謝揮發酸，到第一試程後期菌群開始可以代謝掉反應槽中累積的揮發酸，因此我們推測甲烷菌與脫氮菌在第一試程後期的豐富度應較前期高。進入第二試程後，我們增加了 TCE 飽和水溶液的日進流量，從原本 15 mL 變成 30 mL，期間三個反應槽皆有少許的乙酸累積，但在第二試程後期幾乎沒有酸類的累積，說明微生物依然可以快速地消耗掉揮發酸。在進到第三試程時，我們又增加 TCE 飽和水溶液的日進流量，從原本 30 mL 變成 60 mL，此時 AS 槽的乙酸明顯開始累積，另外兩槽的酸類則沒有明顯累積，顯示在第三試程中，AS 槽的甲烷菌群與脫氮菌群可能無法快速分解乙酸，才導致乙酸的累積，而這很可能是受限於 AS 槽內碳源的供給有限所導致。最後，進到第四試程也跟第三試程的情形大致相同，AS 槽有乙酸累積，而另外兩槽則只有在試程後期有些許乙酸累積。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

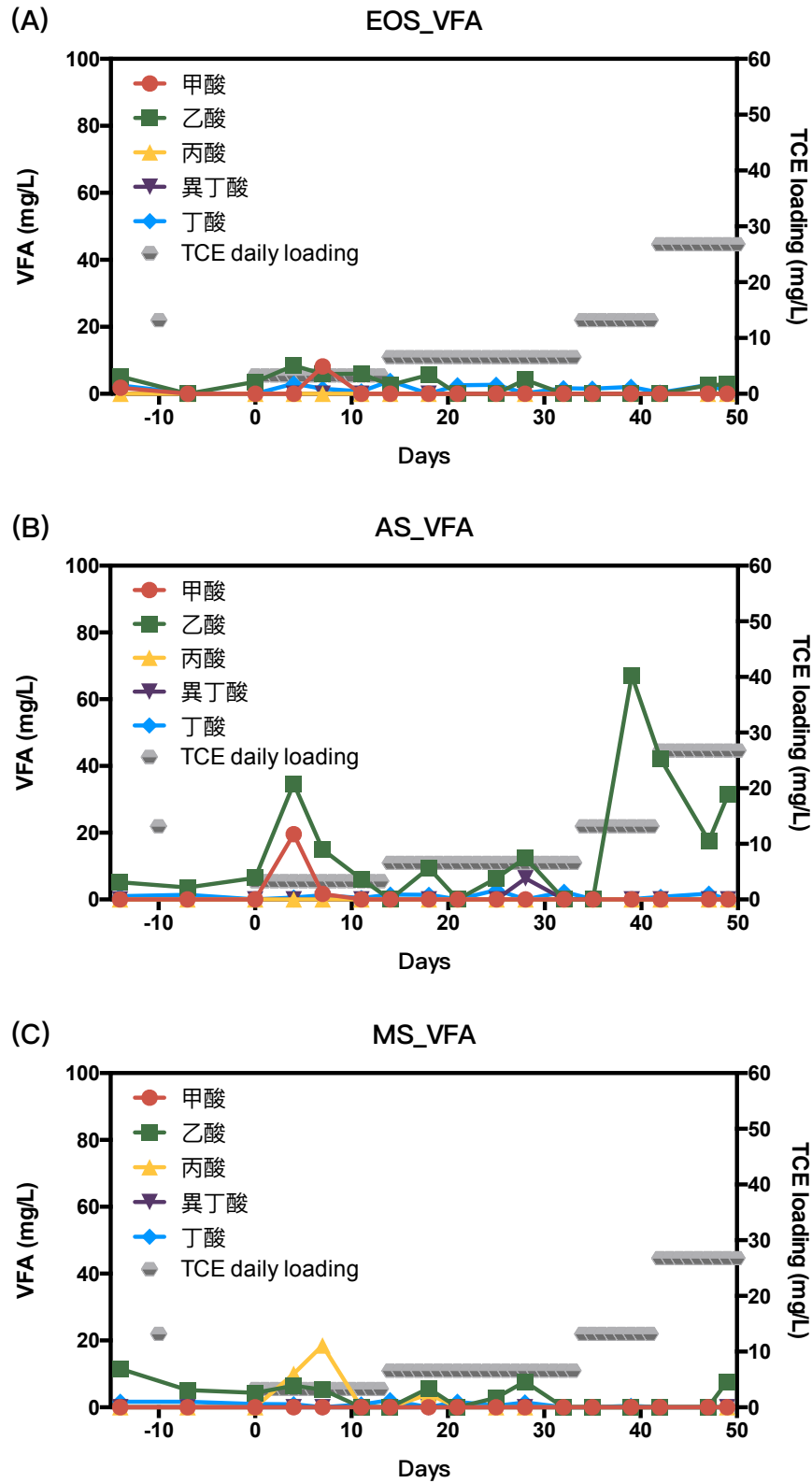


圖 5.6 反應槽揮發酸變化。(A) EOS 槽揮發酸含量變化；(B) AS 槽揮發酸含量變化；(C) MS 槽揮發酸含量變化。



(五) 結果與討論

5.2.5 有機碳含量分析結果

厭氧還原脫氯菌通常是以氫氣當作電子供給者，含氯有機物當電子接受者，此電子流動可以使脫氯菌進行脫氯呼吸反應而獲得能量。本計畫使用之基質中，我們添加碳源（乳化油、乙酸、糖蜜）作為供氫者，三種基質的供氫能力不同，糖蜜的主要成分為蔗糖，每莫爾蔗糖可提供 48 莫爾電子為最強，乳化油成分為植物油，每莫爾乳化油的碳可提供 48 莫爾電子次之，乙酸供電子能力最低，而且需要在氫分壓極低的厭氧環境下，乙酸才能共營分解成氫氣。透過分析溶解性有機碳濃度，可以幫助我們瞭解反應槽內的碳源是否足夠讓脫氯菌進行脫氯呼吸作用。

在實驗過程中，反應槽每日皆會進流含有碳源的基質，EOS 槽每日進流約 7.12 mg/L 的碳源、AS 槽每日進流約 4.68 mg/L 的碳源、MS 槽每日進流約 6.08 mg/L 的碳源。由圖 5.7 顯示，在第一與第二試程，乳化油與乙酸槽的 TOC 濃度大約在 10-20 mg/L，糖蜜槽的 TOC 濃度大約在 15-20 mg/L 之間變動。複雜基質的碳源（糖蜜與乳化油），揮發酸濃度僅佔 TOC 濃度的 15%，而乙酸槽的揮發酸濃度佔 TOC 濃度達約 40%，此結果顯示，三個槽內的碳源皆足夠，但是乙酸槽可能含生物合成之有機碳較不利於供氫。進到第三試程後，TOC 濃度逐漸下降，TOC 與 TCE 負荷有中等的相關性，顯示提升 TCE 負荷，使有機物分解更徹底。EOS 槽與 MS 槽的碳源雖有降低但還足夠，而 AS 槽則是不太足夠的。進到第四試程後，三個反應槽內的碳源幾乎都不足，這也可能是反應槽內二氯乙烯累積的主要原因。

由於反應槽內的微生物眾多，甲烷菌就佔了絕大部分，脫氯菌的比例相對上是比較少的，因此控制反應槽內電子的走向就相當的重要。在試程後期，雖然碳源較為不足，但我們提高了三氯乙烯的進流量，進而會抑制甲烷菌的生長，因此我們預期電子的流向會偏向脫氯菌，幫助脫氯菌的生長，然而仍須進一步透過微生物實驗的結果來證明這個假設。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

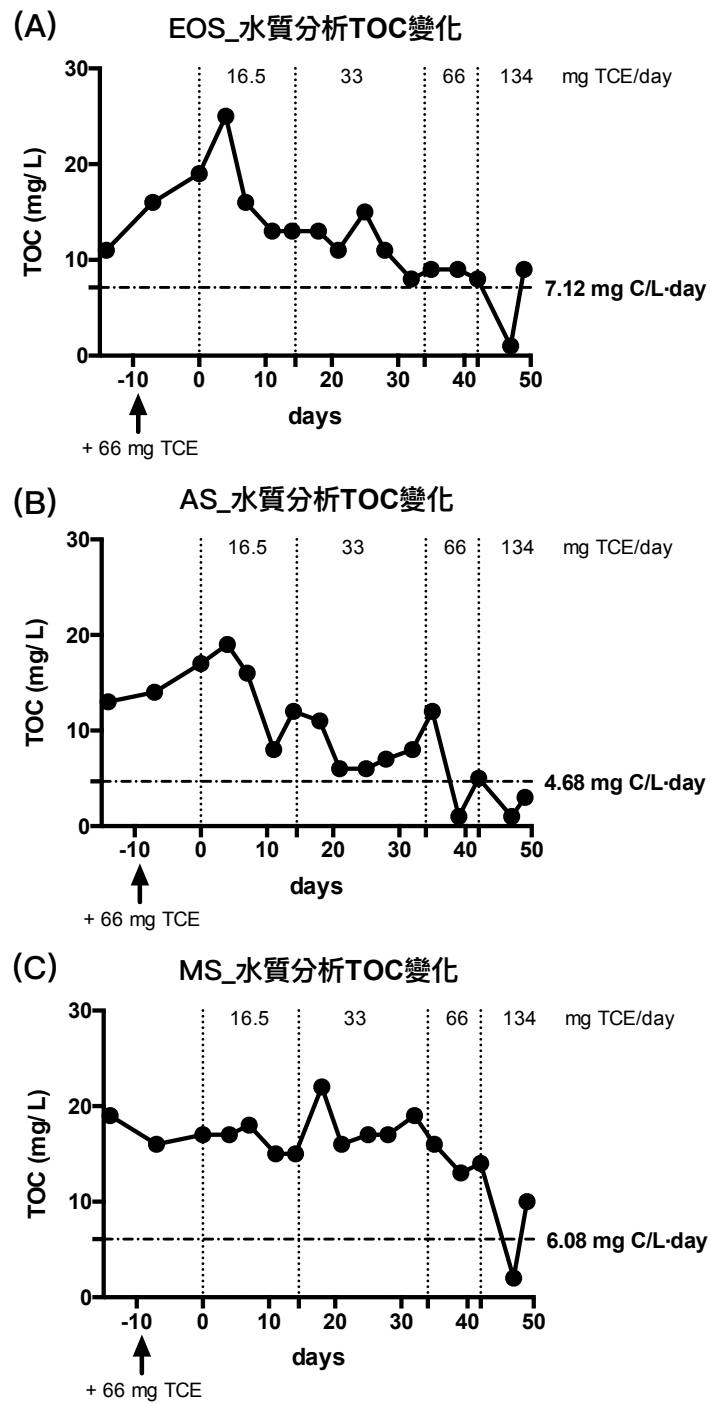


圖 5.7 反應槽內碳源的變化。(A)EOS 槽內碳源的變化；(B)AS 槽內碳源的變化； (C)MS 槽內碳源的變化。



(五) 結果與討論

5.2.6 懸浮固體變化量結果

反應槽的污泥量可以反映微生物的生長情況，污泥量越多可能代表微生物生長情形是較好的。為瞭解反應槽內污泥含量的變化，因此我們將每一採樣點之樣品進行懸浮固體變化量分析。

從第一試程初期，三個反應槽的污泥量是較高的，隨著時序的變化，污泥量漸漸減少，推測是反應槽內的微生物正在適應反應槽內的環境。進到第二試程後，初期污泥量是較少的，到後期則又慢慢增加。這樣的結果顯示，反應槽內的微生物可能需要一段時間來適應反應槽的環境，菌群結構會緩慢變化成適合在高濃度 TCE 環境下生存的樣貌。

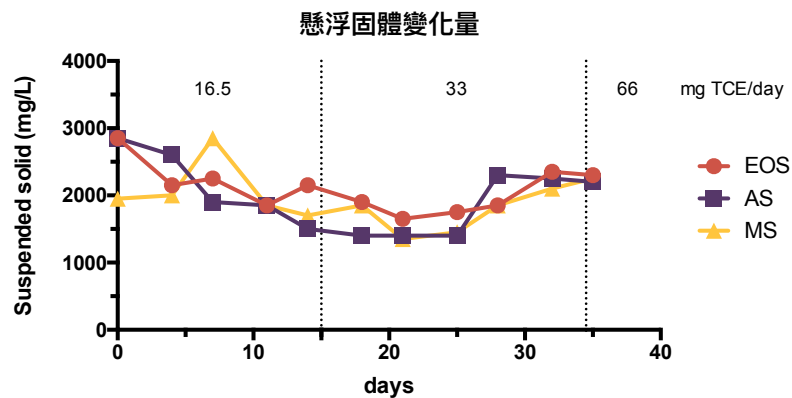


圖 5.8 懸浮固體變化量。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.3 反應槽脫氯效果評估

在此計畫中，本團隊欲評估三種在實場整治中的常用碳源（分別為乳化油、乙酸、糖蜜）在厭氧反應槽系統中對於脫氯的差異性，預期藉由量化反應槽脫氯的速率能夠比較出三種碳源對於脫氯效果好壞。

5.3.1 反應槽脫氯速率

由於反應槽是採連續進流方式，每日會固定進流一定體積的三氯乙烯，因此可以計算出兩個採樣點之間所進流的三氯乙烯其氯的總莫耳數 (Input)；藉由兩採樣點之含氯乙烯分析結果則可計算出在兩採樣點時間內（分別為 T_0 與 T_1 ）被降解掉的含氯乙烯含量與氯的總莫耳數。進一步以下列公式計算出各反應槽的脫氯速率：

$$\frac{[(\text{Input Cl mol} + T_0 \text{ Cl mol}) - T_1 \text{ Cl mol}]}{T_1 - T_0}$$

在本計畫執行階段，依照反應槽添加不同體積的三氯乙烯共可分為四個試程，第一試程為第 0 至 13 天，每日進流 15 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (3.3 mg/L)；第二試程為第 14 至 33 天，每日進流 30 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (6.6 mg/L)；第三試程為 34 到 41 天，每日進流 60 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (13.2 mg/L)；第四試程第 42 到 50 天，每日進流 120 mL 的飽和三氯乙烯水溶液 (26.4 mg/L)。

圖 5.9 (A) 顯示各反應槽之脫氯速率。第一與第二試程中，各反應槽脫氯速率相當，然而進到第三試程中，EOS 槽初期的脫氯速率較其他兩槽快，但後期則落後其他兩槽；第四試程中，則 EOS 槽的脫氯速率較快、MS 槽次之，AS 槽的脫氯速率較慢。

將各試程的脫氯降解速率分別取平均，可以從圖 5.9 (B) 的結果得知，在第一與第二試程期間，三個反應槽的脫氯速率相當；而在第三試程中，MS 槽的脫氯速率較佳、AS 槽次之，而 EOS 槽的脫氯效率較差，推測應該跟更換線上監測器有關，由於脫氯菌群需生長於較厭氧的環境，反應槽內液體一旦曝露在空氣中，就會使得厭氧程度趨向好氧，脫氯菌群的生長情形就會受到抑制。然而，在第四試程中，結果顯示 EOS 槽其脫氯速率較佳、MS 槽次之，而 AS 槽則較差，說明 EOS 槽其厭氧環境趨於穩定，使得脫氯菌的生長情形好轉。



(五) 結果與討論

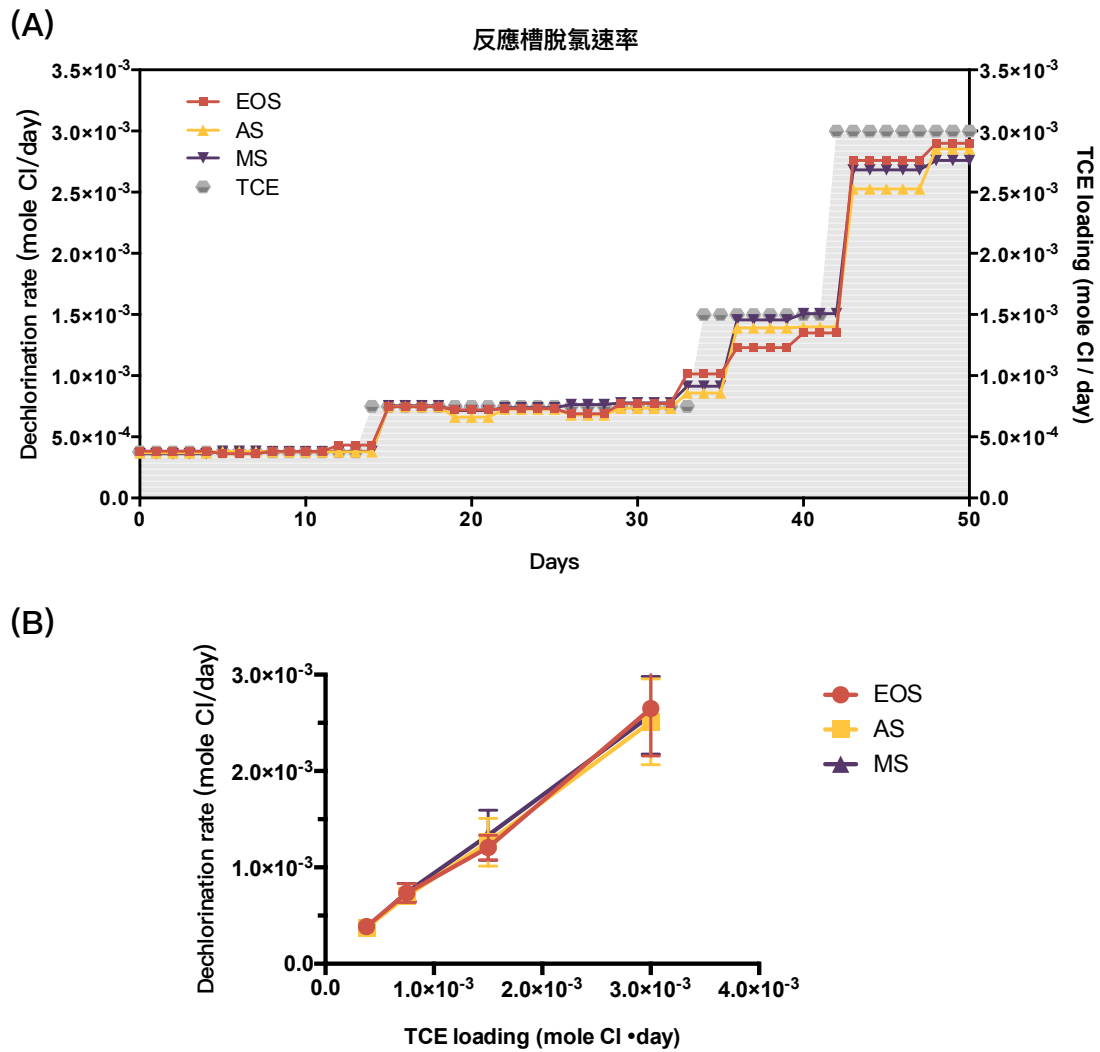


圖 5.9 反應槽脫氯速率比較。(A) 各反應槽脫氯速率之比較；(B) 各試程內平均脫氯效率之比較。



5.4 微生物高通量定序分析結果

本計劃中設計三個使用不同碳源作為基質的反應槽，分別為乳化油 (EOS)、乙酸 (AS) 與糖蜜 (MS)，並且於反應槽運作的三個月期間，採集了 15 個時間點的水質與微生物樣本，共計 45 個樣本。本計畫中微生物高通量定序分析所使用的引子，屬於廣效性引子，主要複製細菌與古菌 16S rRNA 的 V3-V4 高變異序列區段，定序的原始深度為每個樣本介於 96,709~236,859；各樣本經過去除 chimera 序列及 copy number 校正後隨機抽取 31,000 條序列進行微生物種鑑定。

5.4.1 微生物多樣性 (Alpha diversity)

α 多樣性是指一特定區域或生態系統內的多樣性，經常用物種豐富度來度量。在物種歧異度 (α -diversity) 分析上，以 Chao1、Shannon 和 Simpson 指數來比較樣本內物種的歧異性。Chao1 評估樣本真實的豐富度，Shannon 評估物種均勻度，Simpson 計算物種被分類時的專一程度。

圖 5.10 以盒鬚圖表示 EOS 槽、AS 槽與 MS 槽試程樣本之物種歧異度，在圖 5.10 (A) 中 EOS 槽、AS 槽與 MS 槽的樣本 Chao1 指數中間值分別約為 847、847 與 932，顯示 MS 槽的樣本有較高的菌群豐富度。以 OTU 而言 (圖 5.10(B)) MS 反應槽 OTU 介於 640~759，而 AS 和 EOS 反應槽的 OTU 分別介於 561~731 和 552~715 之間，表示以乙酸和乳化油為碳源的環境比以糖蜜為碳源的環境讓微生物物種變動更劇烈。在圖 5.10 (C) 中 EOS 槽、AS 槽與 MS 槽的樣本 Shannon 指數中間值分別約為 6.41、6.43 與 6.82，顯示 MS 槽的群落多樣性是較高的。而在圖 5.10 (D) 中 EOS 槽、AS 槽與 MS 槽的樣本 Simpson 指數中間值分別約為 0.97、0.97 與 0.98，顯示 MS 槽樣本之優勢菌群所佔的比例比另外兩槽的樣本稍大。

圖 5.11 顯示 EOS、AS 與 MS 槽反應槽樣本以三種指數度量微生物多樣性並呈現時序性變化，可以觀察到在第一與第二試程時，三個反應槽的菌群豐富度是較高的，而隨著時間的進展以及增加三氯乙烯的負荷，菌群的豐富度漸漸下降，顯示在第三至第四試程時反應槽內無法適應高濃度三氯乙烯的菌群會受到抑制，使得相較於第一與第二試程時的微生物多樣性較為簡單。以整個試程而言，AS 和 EOS 反應槽有因 TCE 濃度增加，而讓微生物種類減少的趨勢，反觀，MS 反應槽則沒有因 TCE 濃度增加讓微生物種類降低，顯示 MS 反應槽中的微生物對 TCE 較有抗毒性的能力。



(五) 結果與討論

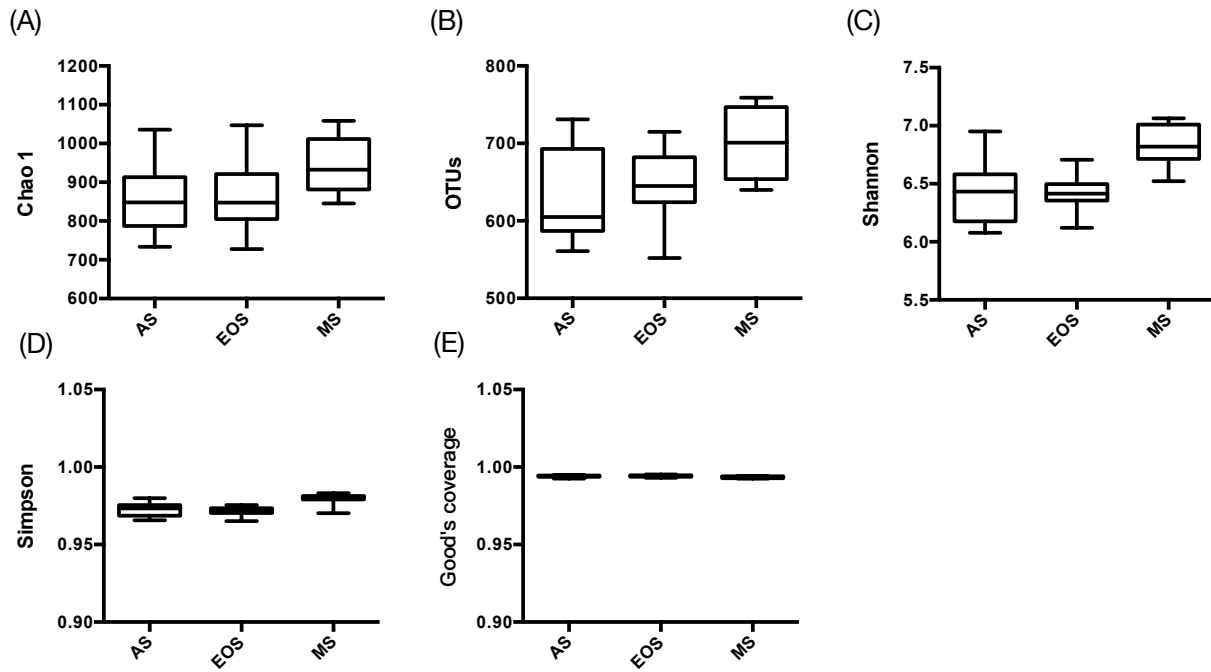


圖 5.10 反應槽樣本微生物多樣性。反應槽樣本進行微生物高通量定序分析後分別以 (A) Chao 1、(B) OTU、(C) Shannon、(D) Simpson、(E) Good's coverage 五種指數度量微生物多樣性。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

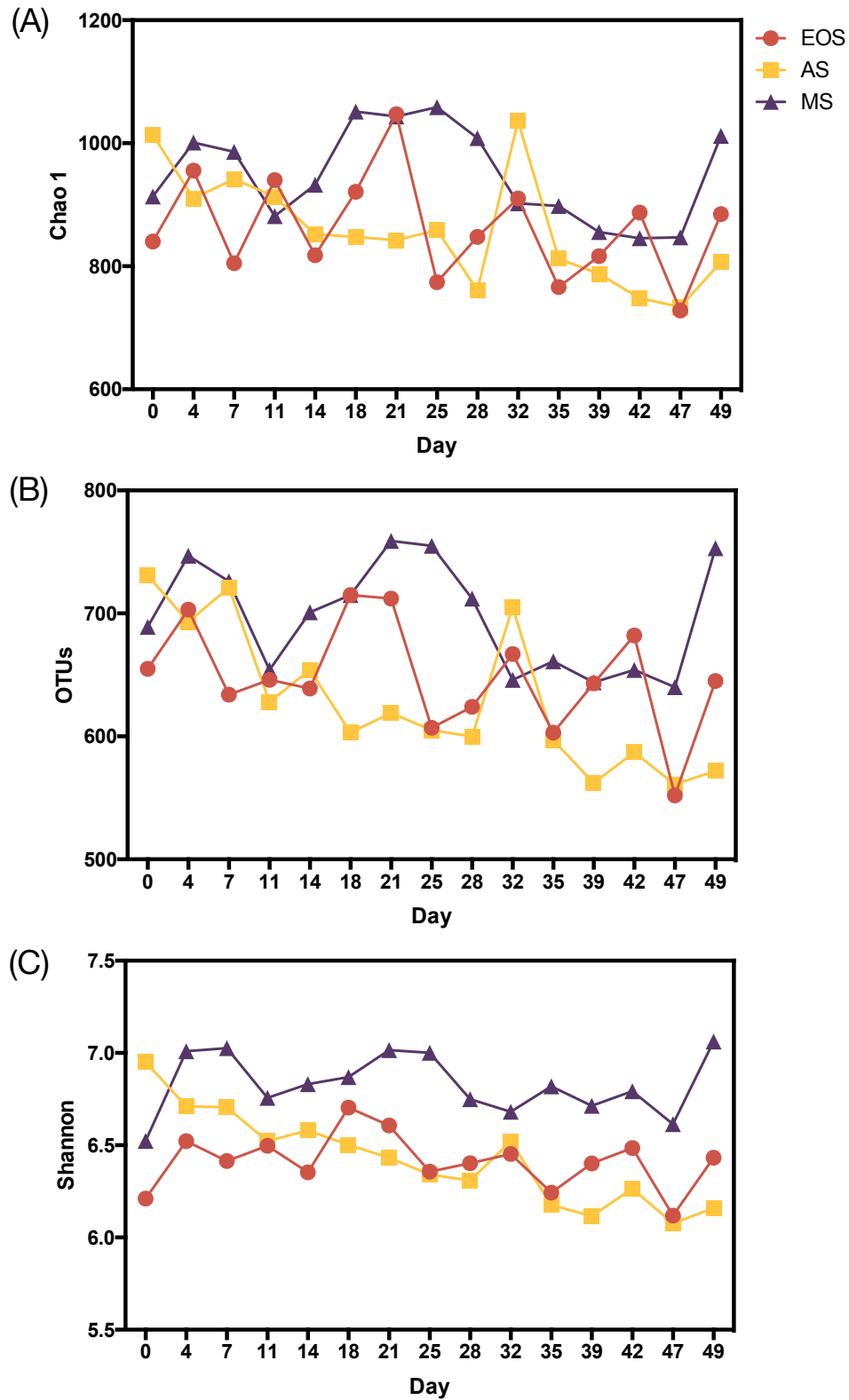


圖 5.11 反應槽各採樣點樣本以 (A) Chao 1、(B) OTU、(C) Shannon 三種指數度量微生物多樣性並呈現時序性的變化。



(五) 結果與討論

5.4.2 微生物組成結構

本計畫反應槽中微生物的多樣性是非常豐富，而在這樣的微生物系統中古菌與細菌分別扮演著不同的角色。添加碳源能夠讓產氫菌群產生氫氣供給脫氯菌生長並進行還原脫氯反應。然而，反應槽內有大量的甲烷菌，會與厭氧脫氯菌競爭氫氣，而脫氯菌生長速度緩慢，一旦脫氯菌無法獲得足夠氫氣作為電子提供者，脫氯菌的生長就會減緩，因此反應槽當中古菌數量會間接影響到脫氯菌的生長情形，所以了解各樣本當中古菌比例是有其必要性的。

圖 5.12 是反應槽樣本完成高通量定序分析後依照古菌及細菌豐富度做圖的結果。EOS 槽的結果顯示，在所有採樣點中，EOS07 樣本古菌豐富度最高，約為 5.7%，EOS49 樣本中古菌豐富度則最低，只有 1.5%。AS 槽的結果顯示，AS00 樣本的古菌豐富度在所有採樣點中是最高的，約為 6.3%，AS47 樣本古菌豐富度只有 1.9%，是所有採樣點中最低的。MS 槽的結果則顯示，MS14 樣本中的古菌豐富度有 6.4%，而 MS00 與 MS49 這兩個樣本的古菌豐富度分別為 1.9%與 2.2%，在所有採樣點中是較低的。而在最初的採樣點觀察到古菌的比例較低可能是因為剛更換碳源，反應槽內的微生物還在適應新的環境，無法快速利用糖蜜這種較為複雜的碳源，而隨著時間的進展，微生物結構慢慢穩定，糖蜜漸漸被古菌利用掉，因此在後面幾個採樣點才會觀察到古菌的豐富度增加。

綜合三個反應槽的結果，我們可以觀察到隨著時間的進展以及增加三氯乙烯的負荷，三個反應槽呈現的趨勢是相同的，古菌的豐富度都會因為三氯乙烯的增加而減少，顯示提高三氯乙烯負荷對於古菌生長是有抑制的現象。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

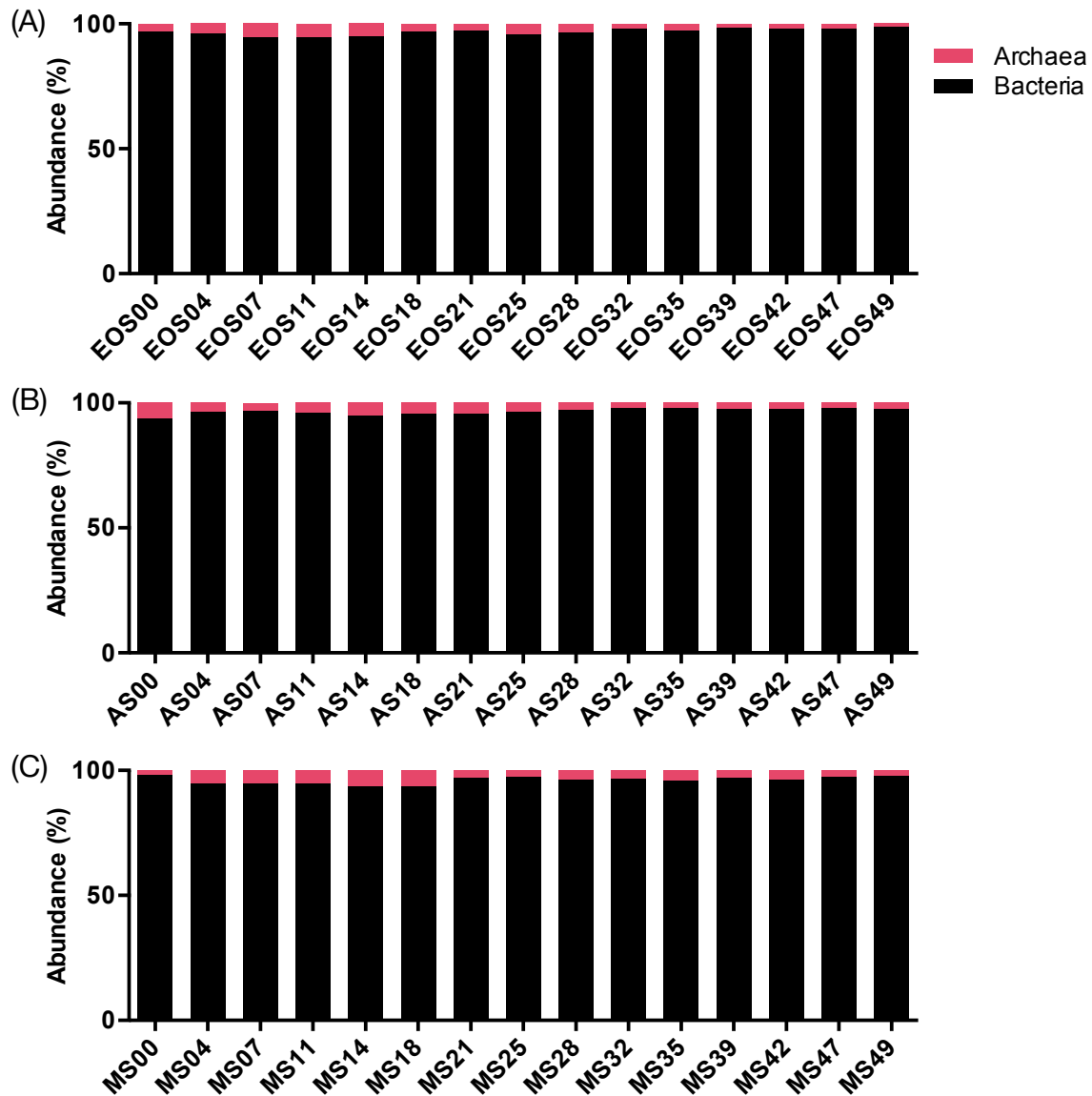


圖 5.12 反應槽(A)EOS、(B)AS、(C)MS 槽各採樣點樣本進行微生物高通量定序分析後所得之古菌與細菌豐富度。



(五) 結果與討論

5.4.2.1 細菌組成結構

圖 5.13 以 Phylum 階層來看，EOS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Betaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Bacteroidetes* 與 *Chlorobi* 這五個菌門，其豐富度分別為：19.1%、18.2%、14.6%、14.3%、7.7%。而再進一步以 Class 階層來看（圖 5.14），EOS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Betaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Bacteroidia* 與 *Ignavibacteria* 這五個菌綱，其豐富度分別為：19.1%、18.2%、14.6%、14.1%、7.7%。

以 Phylum 階層來看（圖 5.13），AS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Betaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Bacteroidetes* 與 *Acidobacteria*，豐富度分別為：19.7%、15.8%、13.3%、10.6%與 10.4%。而再進一步以 Class 階層來看（圖 5.14），AS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Betaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Bacteroidia* 與 *Ignavibacteria* 這五個菌綱，豐富度分別為 19.7%、15.8%、13.3%、10.5%與 8.3%。

以 Phylum 階層來看（圖 5.13），MS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Armatimonadetes*、*BRC1* 與 *Bacteroidetes*，豐富度分別為：21.7%、19.4%、12.7%、12.0%與 9.2%。而再進一步以 Class 階層來看（圖 5.14），MS 槽在最後一個採樣點的優勢細菌菌群依序分別為：*Deltaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Bacteroidia* 與 *Alphaproteobacteria* 這五個菌綱，豐富度分別為 21.7%、19.4%、12.7%、11.9%與 6.8%。

綜合以上結果，可以觀察到在 Phylum 階層 EOS 槽與 AS 槽的優勢菌群較為相似，MS 槽的優勢菌群較為不同，而在 Class 階層則可以觀察到在三個反應槽當中 *Proteobacteria* 都佔了很大的比例，尤其是 *Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria* 與 *Deltaproteobacteria*。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

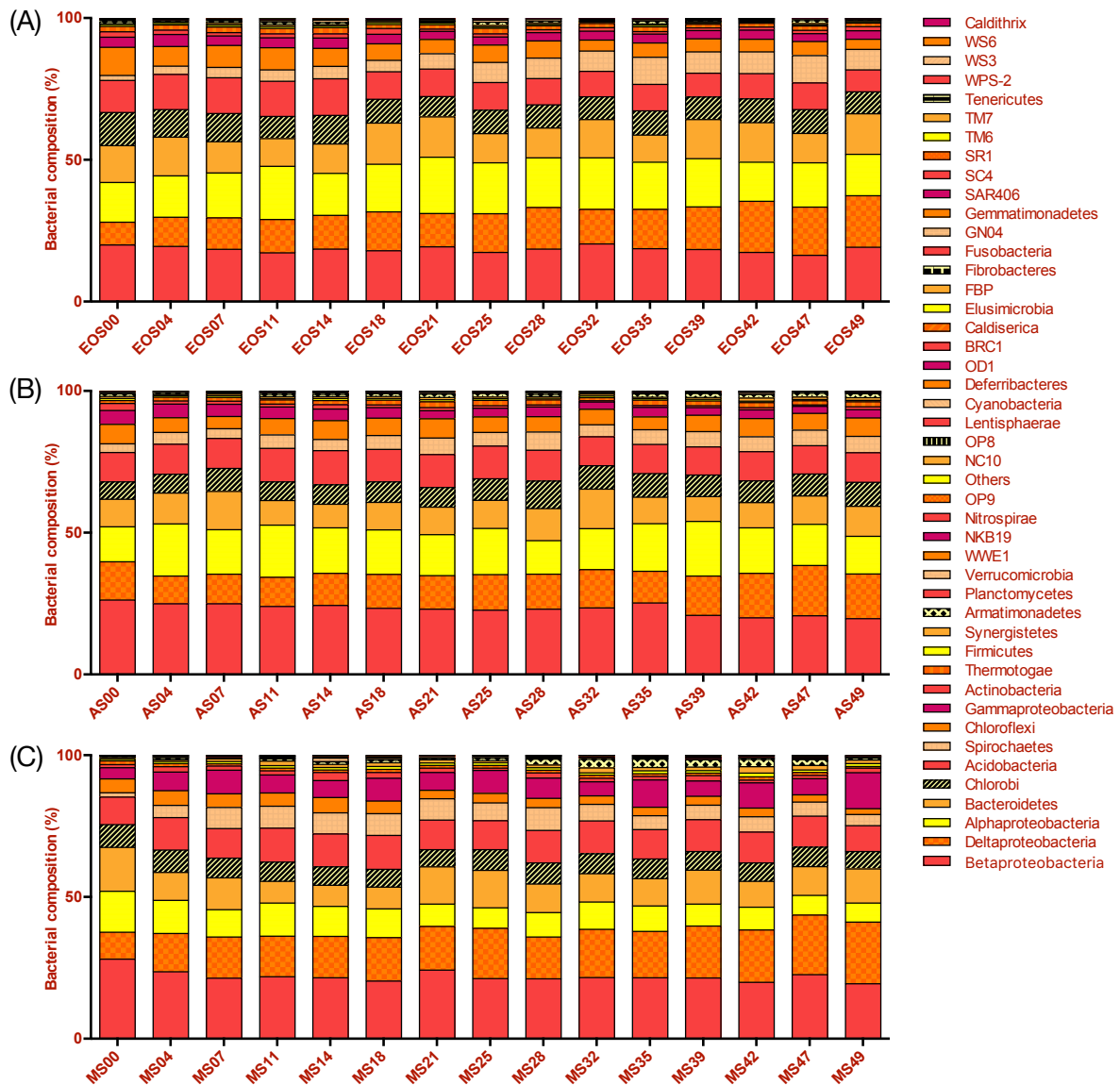


圖 5.13 以 Phylum 階層分析反應槽 (A)EOS、(B)AS、(C)MS 槽各採樣點樣本之細菌族群分佈。



(五) 結果與討論

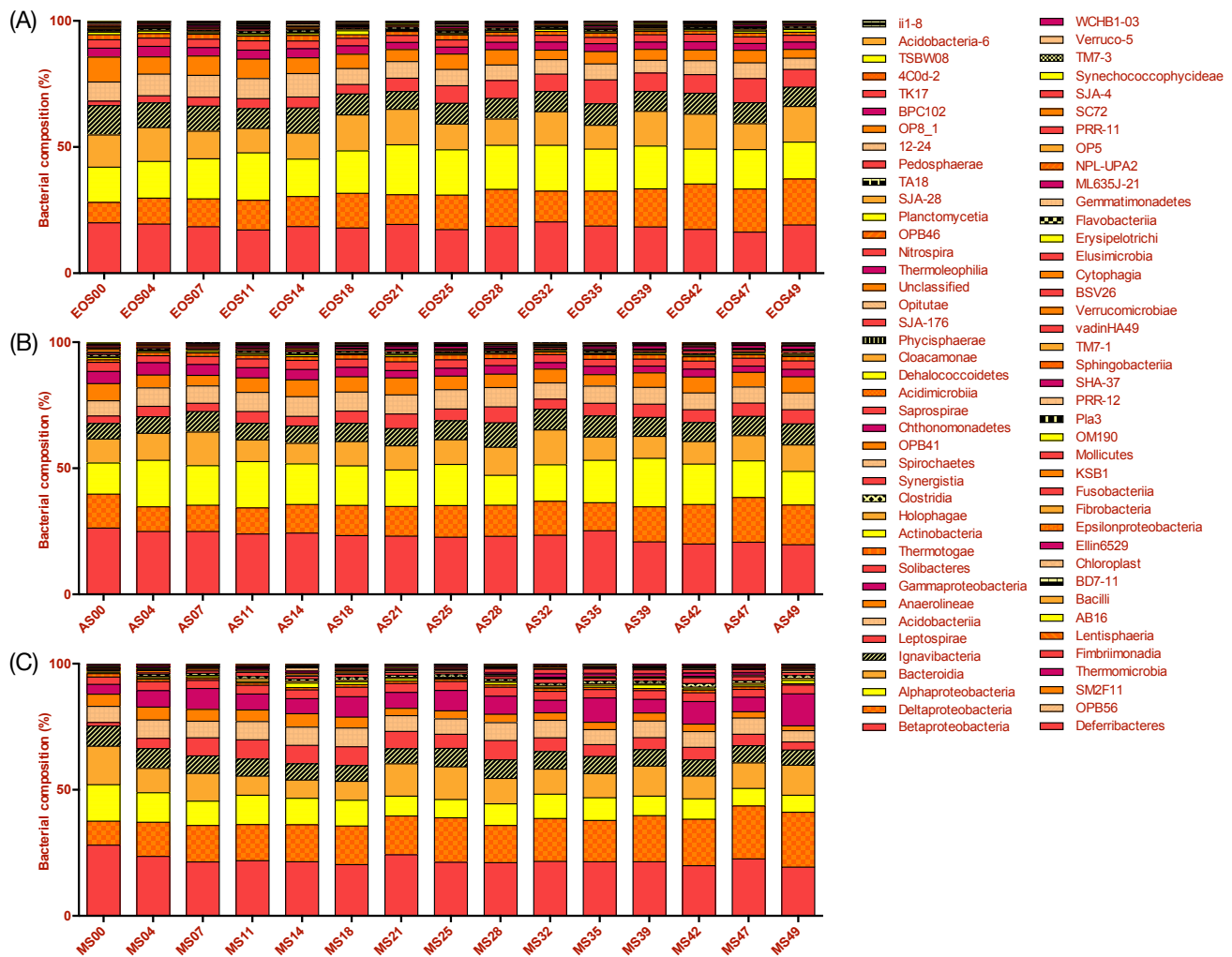


圖 5.14 以 Class 階層分析反應槽 (A)EOS、(B)AS、(C)MS 槽各採樣點樣本之細菌族群分佈。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.4.2.2 古菌組成結構

如圖 5.15 所示，以 Phylum 階層來看，EOS 槽、AS 槽與 MS 槽的所有採樣點樣本當中，主要都是 *Euryarchaeota* 這個菌門的古菌為優勢古菌菌群，皆佔古菌總和的 99% 以上，其餘則是 *Crenarchaeota* 這個菌門，只佔 0~1%。

而由圖 5.16 可以觀察到，三個反應槽所有採樣點的樣本中，以 Class 階層來看的話，*Euryarchaeota* 這個菌門的菌還可以細分至 *Methanobacteria*、*Methanomicrobia* 與 *Thermoplasmata* 這三個菌綱。EOS 槽主要的優勢古菌為 *Methanomicrobia*、*Methanobacteria* 與 *Thermoplasmata*，如 EOS49 樣本中分別佔反應槽古菌中的 77%、16.3% 與 6.4%，其餘則是 *Crenarchaeota* 這個菌門內的菌綱 *MCG*，含量約 0.2%。AS 槽主要的優勢古菌也是 *Methanomicrobia*、*Methanobacteria* 與 *Thermoplasmata*，在 AS49 樣本中的豐富度分別為 67.9%、21.7% 與 10.3%，最後是 *MCG* 菌綱的豐富度約為 0.1%。MS 槽主要的優勢古菌為 *Methanomicrobia*、*Methanobacteria* 與 *Thermoplasmata*，在 MS49 樣本中的豐富度分別為 73.7%、19.8% 與 5.79%，最後是 *MCG* 菌綱的豐富度約為 0.6%。2012 年 Brisson 研究團隊針對穩定去除 TCE 系統進行微生物 metagenomics 分析，結果發現在 *Methanobacteria* 中有 406 個新基因參與 B12 合成代謝路徑中 9 個重要基因 78。

綜合三個反應槽當中古菌含量變化的觀察，可以發現無論在 EOS 槽、AS 槽或是 MS 槽當中，古菌的含量變化都不大，除了在 AS 槽當中，可以觀察到在 AS 槽當中，隨著增加 TCE 的負荷 *Thermoplasmata* 這個菌綱的含量會呈現些微增加的趨勢，從約 5.0% 增加到第四試程後期的 17.3%。



(五) 結果與討論

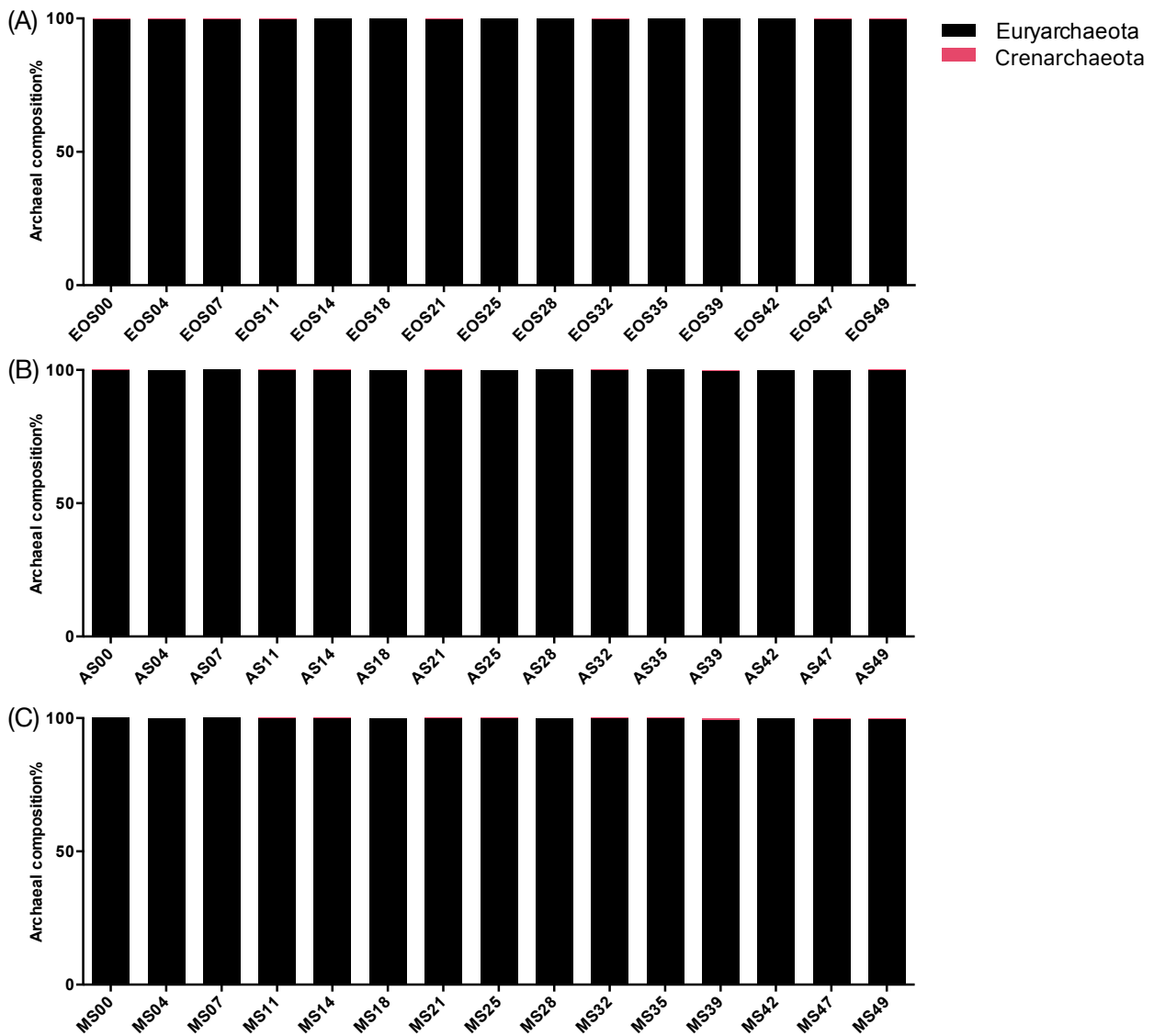


圖 5.15 以 Phylum 階層分析反應槽 (A)EOS、(B)AS、(C)MS 槽各採樣點樣本之古菌族群分佈。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

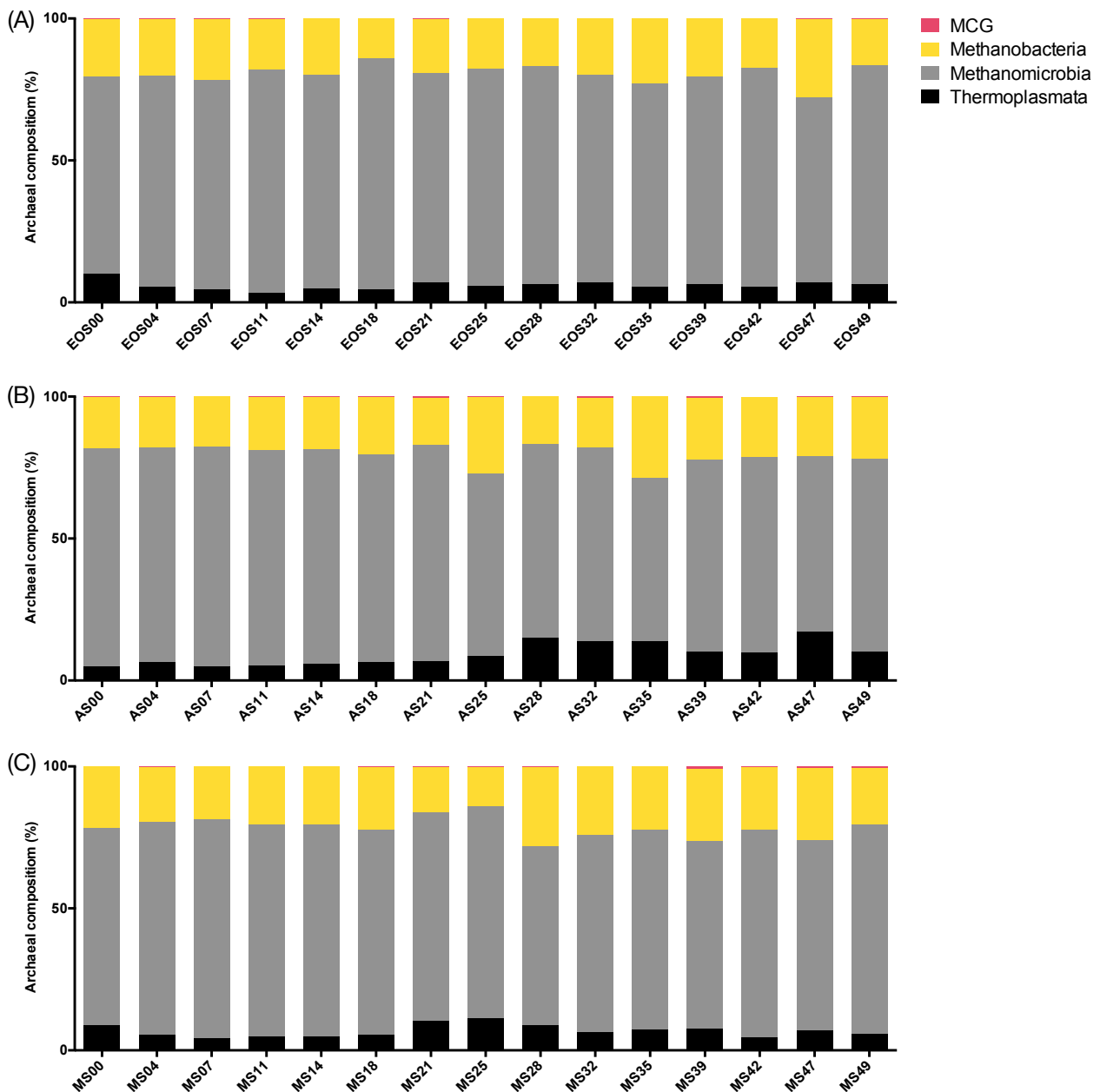


圖 5.16 以 Class 階層分析反應槽 (A)EOS、(B)AS、(C)MS 槽各採樣點樣本之古菌族群分佈。



(五) 結果與討論

5.4.3 微生物菌相動態變化

為瞭解使用不同碳源的反應槽在不同操作時間下微生物菌群的動態變化，本計畫利用主座標分析 (Principal coordinates analysis, PCoA)、集群分析 (cluster analysis) 和典型相關性分析 (Canonical correlation analysis, CCA) 分析從初始 (0 天) 到第 49 天環境樣本並以 OTU 分類為基礎的動態變化及在不同基質 (AS、MOS、EOS) 下，不同採樣時間且隨著 TCE 負荷增加彼此之間微生物菌群的相似性。

從圖 5.17 的主座標分析顯示更換基質後第 0 天，AS、MS、EOS 反應槽微生物菌群結構就不同。隨著操作時間和 TCE 濃度增加，EOS 反應槽微生物變動往 PC1 左邊方向移動，顯示微生物菌相很劇烈的改變。不同於 EOS 反應槽，AS 反應槽和 MS 反應槽微生物菌群動態顯得比較穩定。

根據集群分析 (圖 5.18) 顯示在 49 天操作期間，MS 反應槽中的微生物菌群歸為同一群，表示微生物菌群變動不明顯。在 AS 反應槽的微生物群相分為三群，第一群為 AS07 和 AS32，第二群為 AS04、AS11、AS49、AS47、AS42、AS39、AS35、AS28、AS25、AS21、AS14 和 AS18，第三群為 AS00。另外，反應槽微生物菌群變動最大的則是 EOS 反應槽，此槽微生物變動主要分成兩大類，一類為 EOS42、EOS49、EOS39、EOS32、EOS21 和 EOS18，另一類為 EOS14、EOS07、EOS00、EOS04、EOS11、EOS47、EOS35、EOS28 和 EOS25。

進一步，將反應槽微生物 OTU 合併反應槽操作參數 (ORP、pH、揮發酸、TCE 進流負荷、多氯乙烯和乙烯) 進行典型相關性分析，結果如圖 5.19 所示。樣本 EOS14、EOS07、EOS00、EOS04、EOS11、EOS47、EOS35、EOS28 和 EOS25 主要的揮發酸為甲酸和丁酸；AS32 和 AS35 樣本中乙酸明顯較多，以 OTU589318 (*Ignavibacteriaceae*) 和 OTU638638 (*Acidobacteriia*)。除此之外，在氯乙烯方面可以看到 EOS25 和 EOS18 有產生 VC，但沒有觀察到有主要的 OTU，而三氯乙烯和二氯乙烯都沒有與樣本有相關。另外，在 MS42 樣本中可以觀察到乙烯，且主要貢獻的 OTU 為 OTU807206 (*Deltaproteobacteria*) 和 OTU423327 (*Achromobacter*)。透過典型相關性分析重要的 OTU 在分類上仍在綱 (class) 或科 (family)，表示微生物種類還有許多尚未被發掘的。綜合上述分析結果顯示不同碳源產生的微生物不同進而影響脫氯效果及揮發酸種類。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

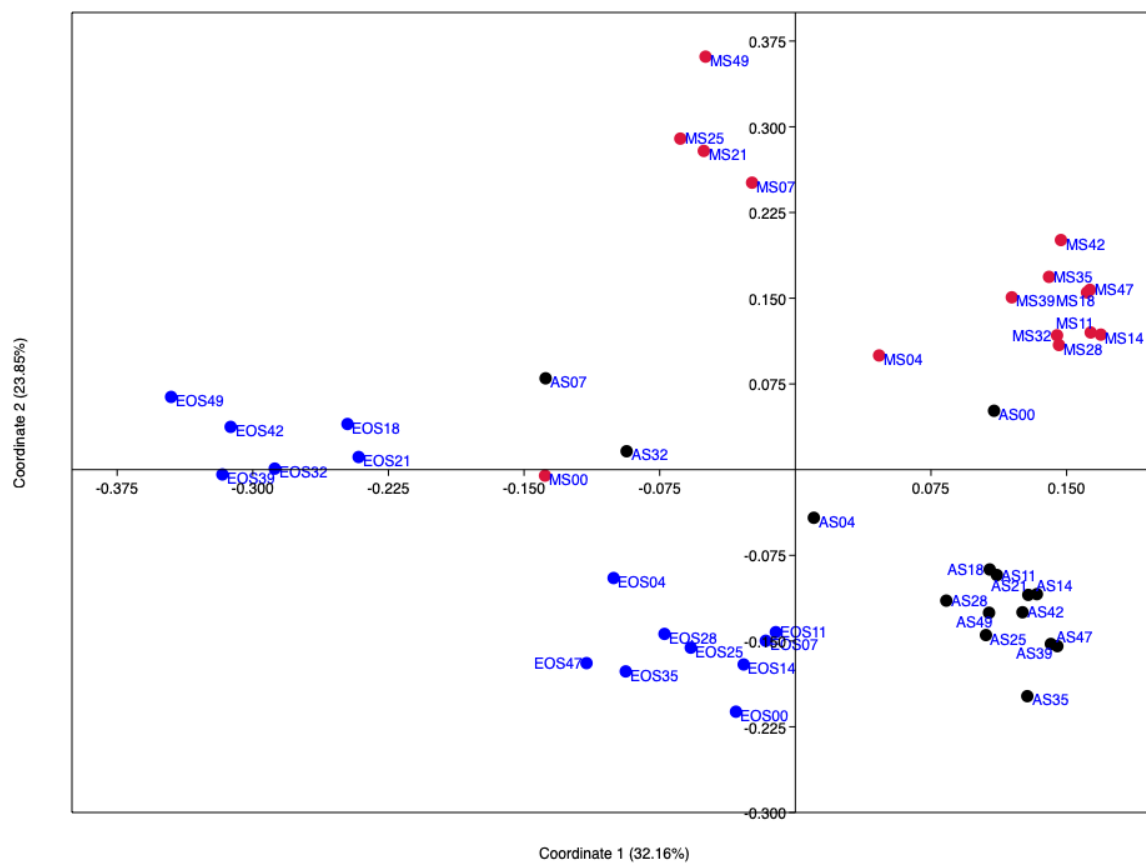


圖 5.17 微生物主座標分析

(五) 結果與討論

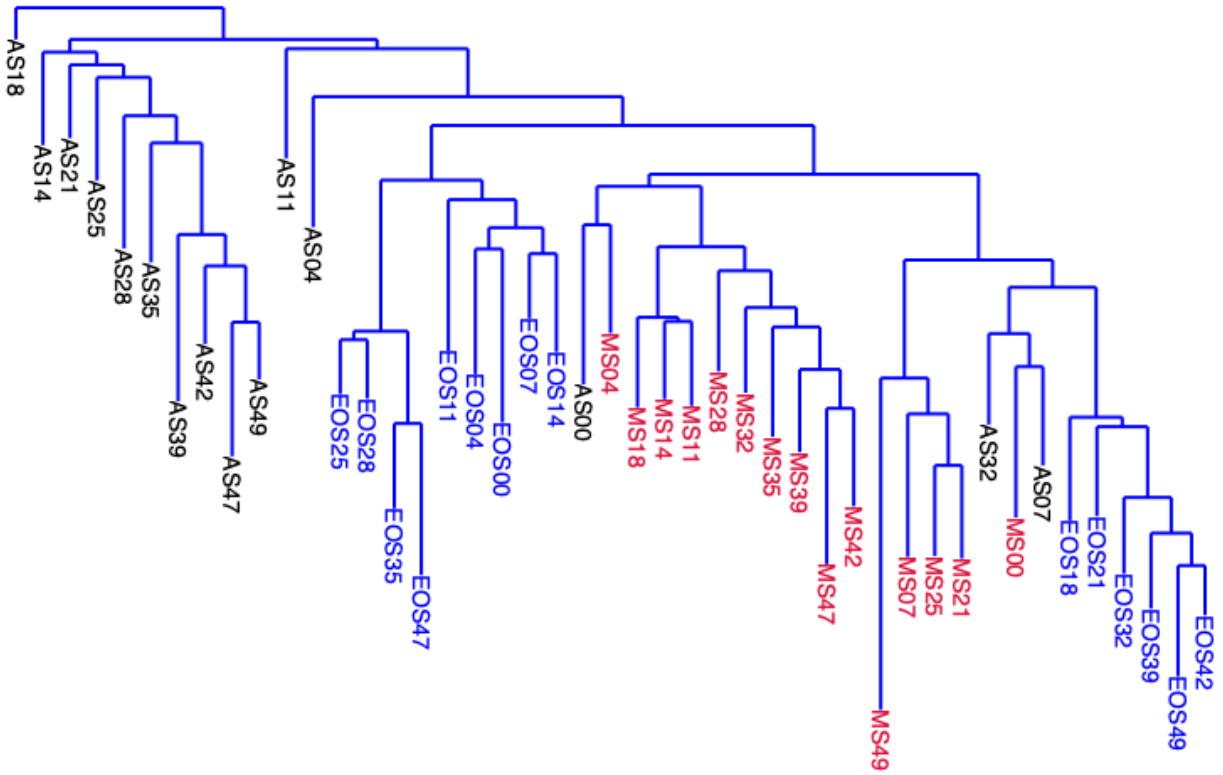


圖 5.18 微生物群集分析

地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

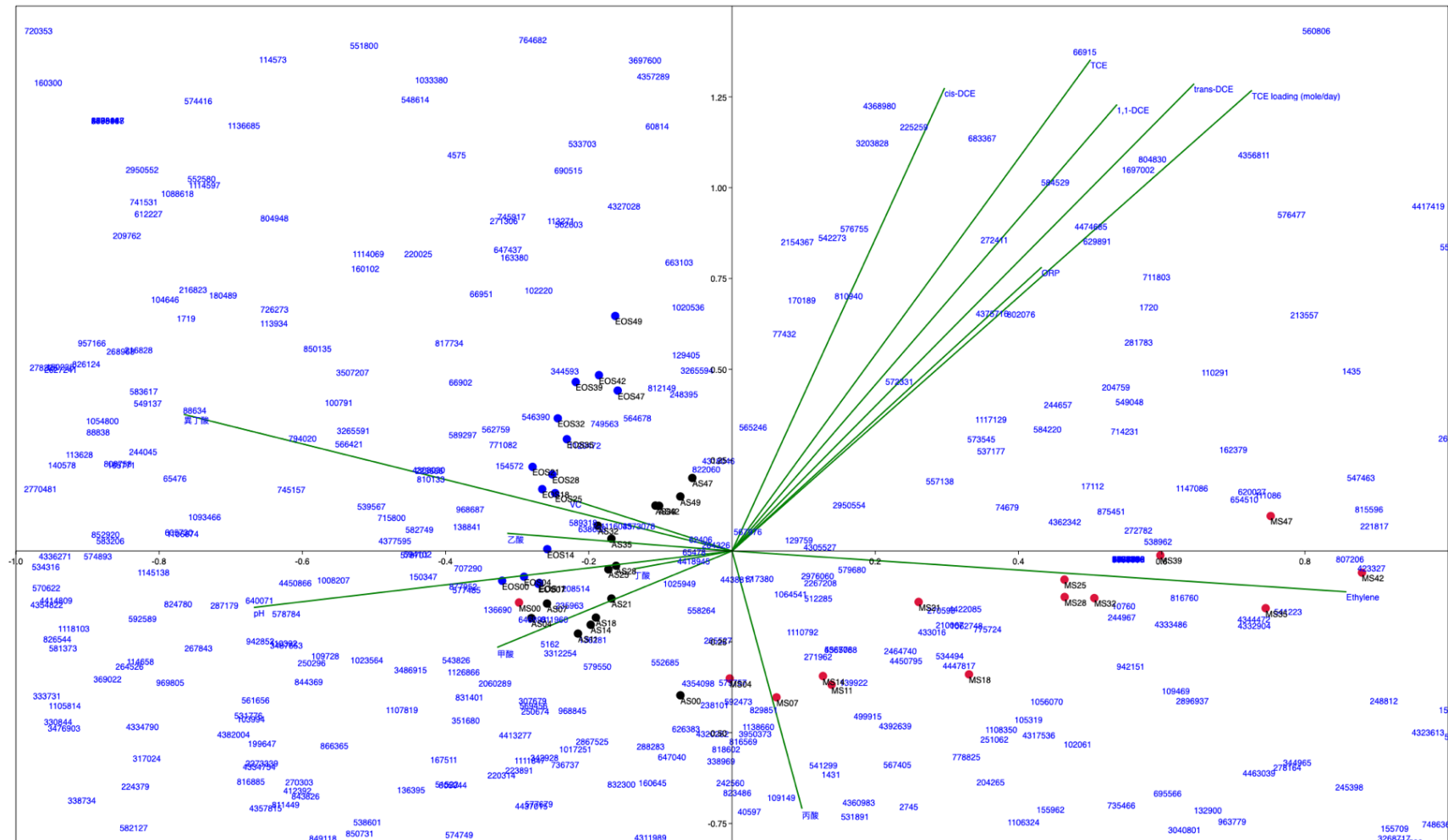


圖 5.19 微生物典型相關性分析



(五) 結果與討論

5.4.4 關鍵菌群分析

過去文獻已指出 *Dehalogenimonas*、*Desulfitobacterium*、*Dehalobacter*、*Desulfuromonas*、*Geobacter*、*Dehalococcoides* 此 6 種菌皆是能參與在降解三氯乙烯過程中的重要菌群，因此藉由微生物高通量定序分析結果，我們可以得知此 6 種菌群在三個反應槽、不同採樣點樣本中的豐富度變化。

圖 5.20 (A) 為三個反應槽各採樣點樣本之 *Dehalococcoides* 豐富度，可以觀察到在 EOS 槽當中，*Dehalococcoides* 的豐富度較 AS 與 MS 槽高，約為 0~0.10%，在操作天數第 21、39 與 49 天時，*Dehalococcoides* 豐富度皆為 0.10%。AS 槽只有在操作天數第 7 天與第 32 天有測到 *Dehalococcoides*，豐富度分別為 0.04% 與 0.02%。而 MS 槽當中的 *Dehalococcoides* 豐富度則約為 0~0.10%。

圖 5.20 (B) 為三個反應槽各採樣點樣本之 *Dehalogenimonas* 豐富度，在三個反應槽的採樣點樣本當中，EOS 槽內的 *Dehalogenimonas* 豐富度是較低的，僅有第 18、39 天有測到 0.01% 的 *Dehalogenimonas*；AS 槽則是在操作天數第 0、4、7、11、18、21、25、28、32、35、42、49 天分別測到 0.04%、0.03%、0.03%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%、0.02%、0.01% 的 *Dehalogenimonas*；MS 槽在操作天數第 0、4、7、11、14、18、21、25、28、47、49 天分別測到 0.05%、0.05%、0.04%、0.01%、0.02%、0.02%、0.02%、0.02%、0.01%、0.01%、0.02% 的 *Dehalogenimonas*。

圖 5.20 (C) 為三個反應槽各採樣點樣本之 *Geobacter* 豐富度，可以觀察到三個反應槽內 *Geobacter* 的豐富度與三氯乙烯負荷呈正相關，也就是說，隨著三氯乙烯負荷的提升，*Geobacter* 的豐富度也隨之增加。EOS 槽當中 *Geobacter* 的豐富度約在 2.64%~7.38% 之間；AS 槽中 *Geobacter* 的豐富度約在 3.2%~11.5% 之間；MS 槽內 *Geobacter* 的豐富度約在 3.6%~10.7% 之間。

在我們的反應槽系統內，主要的脫氯菌群為 *Geobacter*、*Dehalogenimonas* 與 *Dehalococcoides*，並且 *Geobacter* 是在這三個反應槽系統內豐富度最高的脫氯菌群，再來是 *Dehalococcoides*，最後才是 *Dehalogenimonas*。而在 EOS 槽、AS 槽與 MS 槽當中，於整個試程期間內的採樣樣本中皆無偵測到 *Desulfitobacterium*、*Desulfuromonas*、*Dehalobacter* 菌群，推測可能是在我們的反應槽系統內沒有這幾種脫氯菌參與在其中，或是這些菌群豐富度過低已超過偵測極限，因此無法得知其豐富度。*Geobacter*、*Dehalogenimonas* 與 *Dehalococcoides* 這三類已知的脫氯菌群的豐富度相當低，這樣低豐富度的脫氯菌事實上反映出 TCE 濃度相對於有機碳濃度是偏低的，因此有機碳濃度可以降低，應不致影響脫氯菌生長。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

另一方面，這些結果顯示地下水氯化有機物污染實際整治成效不易根據這些脫氯菌群相對豐富做出良窳之判斷。

根據圖 5.20，*Dehalogenimonas* 豐富度隨著時間逐漸下降，長期以往，勢必被逐漸淘汰。反觀 *Geobacter*，相對豐富度則是隨培養時間逐漸上升；*Dehalococcoides* 菌群相對豐富度則是維持上下震盪。這些發現顯示不同脫氯菌群的時序動態趨勢不同，本研究的三種基質系統培養出的 TCE 脫氯菌群以 *Geobacter* 和 *Dehalococcoides* 為優勢，並不因為基質種類不同而改變，但是添加乳化油培養出的 *Geobacter* 豐富度低於乙酸與糖蜜。由於 *Geobacter* 是分解 TCE 主要的脫氯菌，因此將產生較少通量的代謝物，有助於 *Dehalococcoides* 轉換 DCE 與 VC，較不易累積中間產物的現象。



(五) 結果與討論

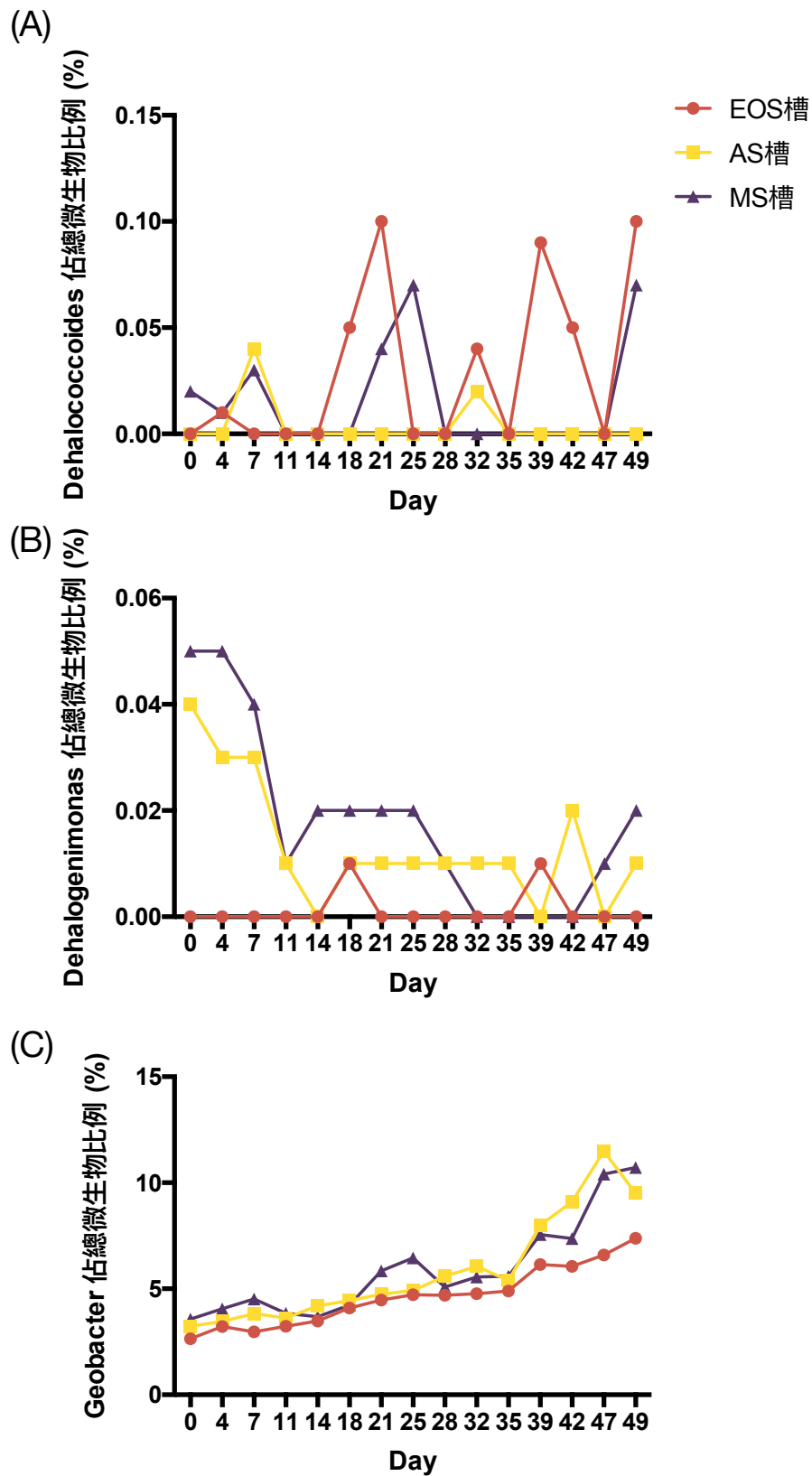


圖 5. 20 脫氯菌群 (A) *Dehalococcoides*、(B) *Dehalogenimonas*、(C) *Geobacter* 於操作試程的變化。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.4.5 微生物菌群交互作用

為瞭解微生物菌群間的交互作用，將不同降解時期 (TCE→DCE/VC) 微生物菌群豐富度結合微生物網路 (microbial network)，建立的菌群間的生態關係網絡，將提供調控關鍵微生物消長的關鍵資訊。生態族群網絡建立是根據次世代高通量定序技術分析時間序列的樣本中各種菌群 16S rRNA 基因的豐富度，然後分析各菌群豐富度彼此之相關性，接著套入描述物種－物種關係的 Lotka–Volterra 生態模式，評估出各菌群間的生態互動關係。本研究原先預計觀察脫氯菌 *Desulfitobacterium*、*Dehalobacter*、*Desulfuromonas*、*Geobacter*、和 *Dehalococcoides* 與其他微生物之間的交互作用，但是在本研究的三個反應槽 (AS、EOS 和 MS) 中都沒有偵測到 *Desulfitobacterium*、*Dehalobacter* 和 *Desulfuromonas*，因此，只將作為節點，繪製出互動網絡。

圖 5.21 為 EOS 反應槽、AS 反應槽和 MS 反應槽脫氯菌與其他微生物的交互作用網路圖。紅色線表示抑制者 (depressor)，表示微生物之間為抑制關係；綠色線表示幫助者 (helper)，表示微生物之間為助長關係，而箭頭指向微生物表示是接受者。例如圖 5.21 (C) BA008 會幫助 *Geobacter* 生長，而 *Geobacter* 會抑制 *Ignavibacteriaceae* 生長。從圖 5.21 顯示雖然是以脫氯菌 *Geobacter* 和 *Dehalococcoides* 作為節點進行交互作用分析，但透過 NGS 分析結果發現 *Dehalococcoides* 豐富度非常少，導致在 *Dehalococcoides* 進行微生物交互作用分析貢獻度很小，主要都是以 *Geobacter* 為主的交互作用網路圖。圖 5.21 三個反應槽比較可以發現 EOS 反應槽的 Helper 是較多的，而 AS 反應槽的 Depressor 較多，Helper 很少，表示在 EOS 反應槽的環境是有助於 *Geobacter* 生長的，反之，在 AS 反應槽環境有許多其他的微生物會抑制 *Geobacter* 生長。有趣的是，MS 反應槽的脫氯菌交互作用就顯著地比 EOS 反應槽和 AS 反應槽簡單許多，可以看到許多微生物 (*Koribacter*、*Comamonadaceae*、*Aquabacterium*、*Ignavibacteriaceae*、BA008 和 SJA-88) 都是有助於 *Geobacter* 生長且沒有微生物會抑制 *Geobacter* 生長，這才是 *Geobacter* 在 MS 反應槽中相對豐富度高的主因。透過微生物交互作用得知不同碳源提供的微生物種類不同，進一步會影響脫氯菌數量，合適的碳源可以有助於增加脫氯菌的種類和數量。



(五) 結果與討論

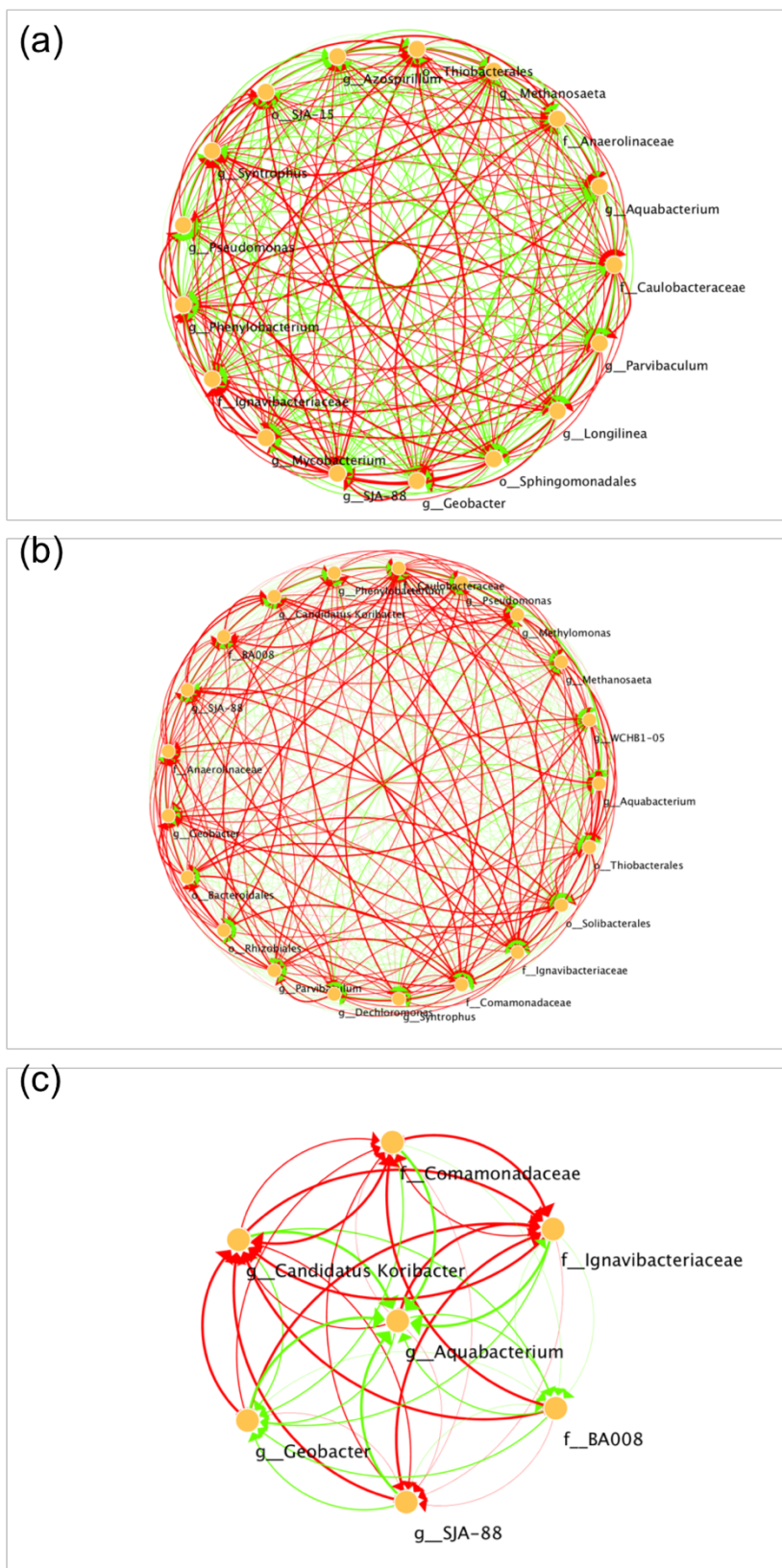


圖 5.21 微生物交互作用網絡圖 (a) EOS 反應槽 (b) AS 反應槽 (c) MS 反應槽



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.4.6 微生物菌量分析結果 (QPCR 法)

由先前水質分析的結果可得知，隨著增加三氯乙烯的負荷，各反應槽內會有不同的變化，像是 AS 槽隨著時間的增加，其乙酸有逐漸累積的趨勢，或者是隨著時間的增加以及三氯乙烯負荷的增加，三個反應槽內都有二氯乙烯的累積等等，這些都屬於環境的變動，而在環境改變的情況下，微生物族群結構與數量可能也會產生變化，清楚掌握在各試程中微生物的消長，精準定量微生物數量是必要的。因此，本計畫採用了 QPCR 法，分別設計不同引子以專一地定量樣本中總細菌 16S rRNA 基因、*Dehalococcoides* 16S rRNA 基因與古菌基因。

5.4.6.1 總細菌 16S rRNA 基因 QPCR

由圖 5.22 可看到三個反應槽各個採樣點樣本在總細菌 16S rRNA 基因 QPCR 的分析結果。

EOS 槽樣本在第一試程與第二試程前期，隨著三氯乙烯負荷的增加會提升總細菌數量 ($1.08 \times 10^9 \sim 3.48 \times 10^9$ copies/mL)，然而在操作天數第 24 天時，因反應槽操作與維護關係，使反應槽內液體接觸到空氣中的氧氣，從 QPCR 結果可以看出這樣的變動使得反應槽內總細菌數量由 3.48×10^9 copies/mL 減少成 1.51×10^9 copies/mL。在這之後，EOS 槽的總細菌數量又隨著三氯乙烯負荷增加而逐漸增加，一直到第四試程時，微生物總菌量降低為 1.60×10^9 copies/mL，推測可能是因為反應槽內微生物無法及時將三氯乙烯完全降解成無毒的乙烯，而是相對地累積在二氯乙烯的階段 (圖 5.3)，因此導致反應槽內對於高濃度三氯乙烯或二氯乙烯較無耐受性的微生物族群的死亡。

AS 槽樣本的結果顯示，在前三個試程內，每當反應槽內三氯乙烯負荷增加，都會導致微生物數量的下降，隨後則再隨著時間的增加，微生物數量為 $7.88 \times 10^8 \sim 4.33 \times 10^9$ copies/mL，然而第四試程中的高濃度三氯乙烯負荷同樣對 AS 槽內微生物數量使其減少至 1.18×10^9 copies/mL。原因推測可能是 AS 槽內的碳源不足 (圖 5.7 (B))，限制了反應槽內微生物的生長。

MS 槽樣本的結果則顯示，在前三個試程內，其總細菌數量雖有所起伏，但從趨勢來看，是呈現緩慢下降的趨勢，微生物數量約為 $8.98 \times 10^8 \sim 2.25 \times 10^9$ copies/mL。直到第四試程，總細菌數量才有大幅增加至 3.18×10^9 copies/mL。同時，配合先前的乙烯含量結果 (圖 5.4) 也觀察到 MS 槽的乙烯含量在第四試程時大幅提升，顯示此時 MS 槽內即使仍有二氯乙烯的累積 (圖 5.3)，但脫氯菌群較先前更能有效



(五) 結果與討論

地將三氯乙烯轉換成乙烯，推測應是此時反應槽內的脫氯菌群有較大幅度的增長使其脫氯活性相較於前三試程是比較強的。

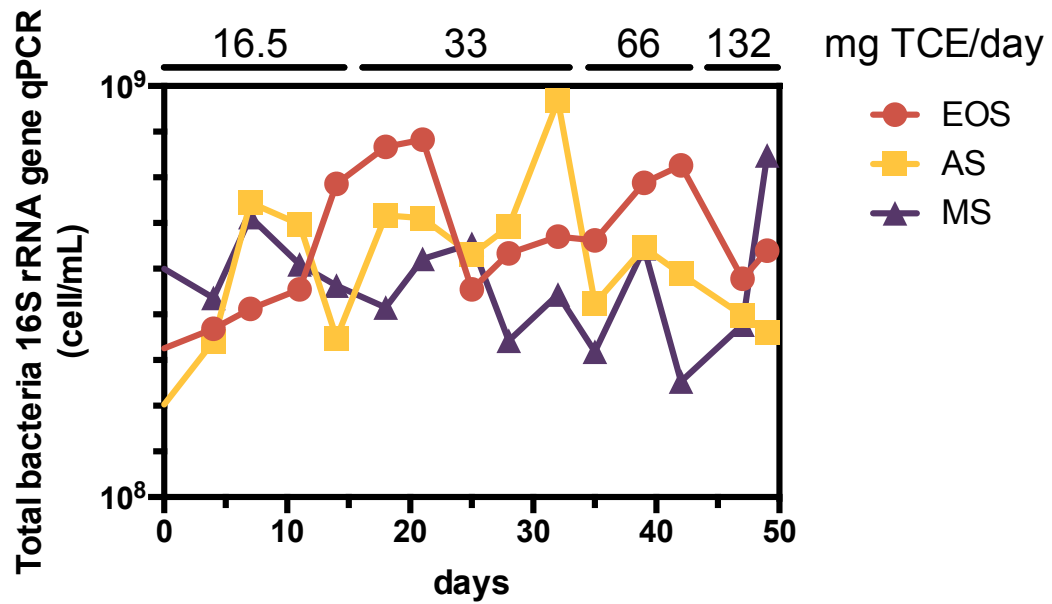


圖 5.22 反應槽樣本之總細菌 16S rRNA 基因 QPCR 結果。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.4.6.2 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR

Dehalococcoides 為反應槽內重要的脫氯菌群之一，並且 *Dehalococcoides* 菌群具有將三氯乙烯完全脫氯至乙烯的能力，瞭解此菌消長對於掌握反應槽整體的脫氯情形是有幫助的，因此我們利用 QPCR 法進一步定量反應槽內 *Dehalococcoides* 的數量。

由圖 5.23 可看到三個反應槽各個採樣點樣本在 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR 的分析結果。

EOS 槽樣本的 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR 結果顯示，在第一試程至第二試程初期 *Dehalococcoides* 數量呈現增加的趨勢，尤其在第二試程的第一個採樣點能夠偵測到高達 5.28×10^6 copies/mL 的 *Dehalococcoides*。而在第二試程的第二個採樣點之後，可以觀察到 *Dehalococcoides* 數量瞬間減少許多，只偵測到 2.32×10^6 copies/mL 的 *Dehalococcoides*，這是由於在操作天數第 24 天時，更換了新的監測器，同時也重新校正反應槽中的 pH meter 與 ORP sensor，使得反應槽內液體接觸到空氣中的氧氣所導致。由於脫氯菌群需要在厭氧環境下才能存活，反應槽內氧氣濃度增加對於脫氯菌的生長是不利的，然而隨著時間的增加，反應槽內的氧氣會被一些兼性厭氧的微生物利用掉，使反應槽可以回復到絕對厭氧的狀態下。並且，我們提高了三氯乙烯的進流量，進而會抑制甲烷菌的生長，電子的流向會偏向脫氯菌，幫助脫氯菌的生長，因此在第三試程與第四試程，我們也觀察到 *Dehalococcoides* 的數量逐漸增加。

AS 槽樣本的 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR 結果顯示，在第一試程至第二試程之間，*Dehalococcoides* 的數量呈現緩慢增加的趨勢（由 2.04×10^5 copies/mL 增加至 1.93×10^6 copies/mL），雖然在第一試程後期 *Dehalococcoides* 數量減少為 4.04×10^5 copies/mL，但隨著進到第二試程增加三氯乙烯的負荷，其數量很快又成長回來。第三試程前期可以觀察到 *Dehalococcoides* 的數量再次減少，推測與再次增加三氯乙烯的負荷有關，脫氯菌可能需要一點時間適應更高三氯乙烯濃度的環境，而第三試程中期至第四試程，*Dehalococcoides* 數量則不太有變化，推測應是此時反應槽內碳源被利用的差不多（圖 5.7），因此限制了脫氯菌或其他微生物的生長。

MS 槽樣本的 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR 結果則顯示，隨著調高三氯乙烯的負荷，其 *Dehalococcoides* 的數量呈緩慢增加的趨勢（由 2.89×10^5 copies/mL 增加至 2.48×10^6 copies/mL），然而每當調高三氯乙烯的進流量，



(五) 結果與討論

Dehalococcoides 的數量則會稍微減少，顯示反應槽內 *Dehalococcoides* 也需要時間來適應較高負荷的三氯乙烯。

綜合三個反應槽的結果，我們觀察到每當調高反應槽的三氯乙烯負荷，會先觀察到反應槽內 *Dehalococcoides* 數量減少，隨後再慢慢增加的趨勢 (AS 槽尤為明顯)，說明脫氯菌需要花一點時間適應更高三氯乙烯濃度的環境，並且提高三氯乙烯濃度的確可以增加反應槽內脫氯菌的數量。

本研究結果顯示，只要系統中關鍵脫氯菌的數量達到某一個密度($>0.5 \times 10^5$ cell/ml)，即可達成不錯的 TCE 還原脫氯的效果，和藥劑種類並無太大關連。添加乳化油較有利於脫氯菌群生長，*Dehalococcoides* 菌群密度高於在乙酸與糖蜜的系統。

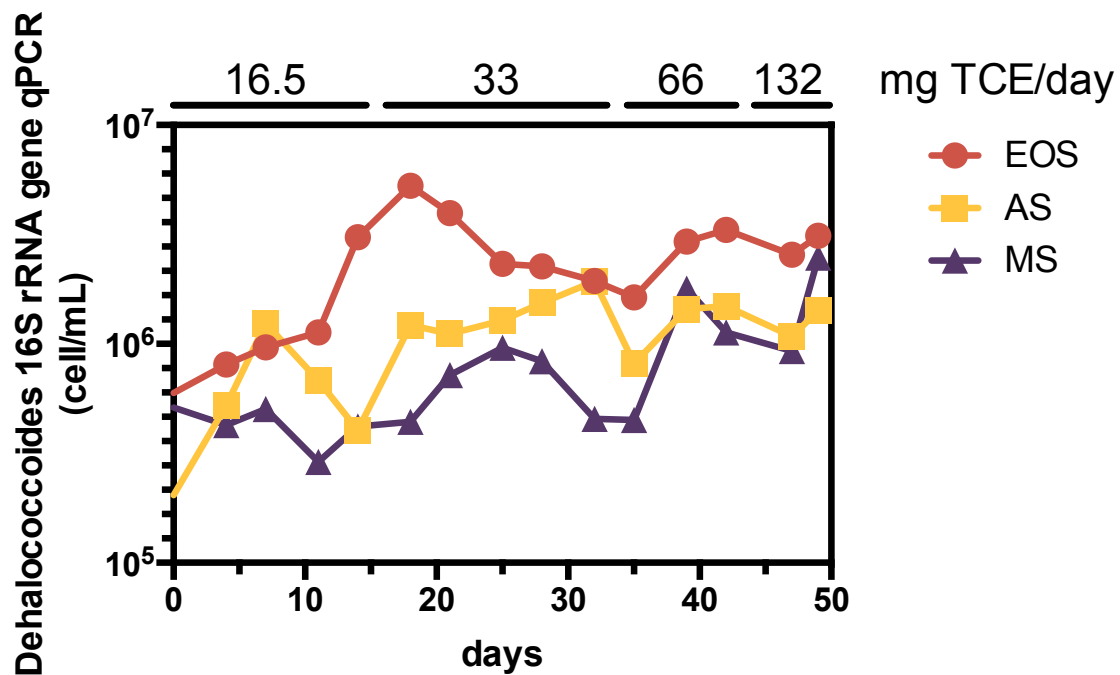


圖 5.23 反應槽樣本之 *Dehalococcoides* 16S rRNA 基因 QPCR 結果。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.4.6.3 Archaea QPCR

由於反應槽內微生物眾多，包含古菌和細菌，都需要利用碳源作為營養來源以維持生長，因此瞭解反應槽內古菌與細菌數量可以幫助我們推估電子的走向，而藉由 QPCR 的方法可以定量古菌於各個試程中在反應槽內的數量。

由圖 5.24 可看到三個反應槽各個採樣點樣本作 Archaea QPCR 的分析結果。首先，EOS 槽樣本的 Archaea QPCR 結果顯示，在第一試程至第二試程初期，古菌的數量是隨著時間而增長的，然而進到第二試程時，因在操作天數第 24 天時更換了新的監測器、校正反應槽中的 pH meter 與 ORP sensor，使得反應槽內液體接觸到空氣中的氧氣，導致古菌數量的減少，一直到第三試程後期才慢慢增加，然而在第四試程提升三氯乙烯負荷後，古菌數量又下降。AS 槽樣本的 Archaea QPCR 結果則是可以觀察到，每當提高三氯乙烯負荷，則古菌數量都會下降，說明高濃度的三氯乙烯對於古菌是有毒性的，然而適應一段時間後，古菌的數量會再回升。MS 槽樣本的 Archaea QPCR 結果顯示，古菌的數量從第一試程起便開始下降，並且其穩定下降的趨勢並不像 AS 槽會因提高三氯乙烯負荷而有明顯的上升或下降，說明在 MS 槽中其生長條件是較不利於古菌生長的。

綜合三個反應槽的結果，我們可以觀察到隨著時間與三氯乙烯負荷的增加，三個反應槽內的古菌數量都是呈現下降的趨勢，但數量都仍有 $1.06 \times 10^8 \sim 1.39 \times 10^8$ cell/L，說明提高三氯乙烯負荷會稍微抑制古菌的生長。

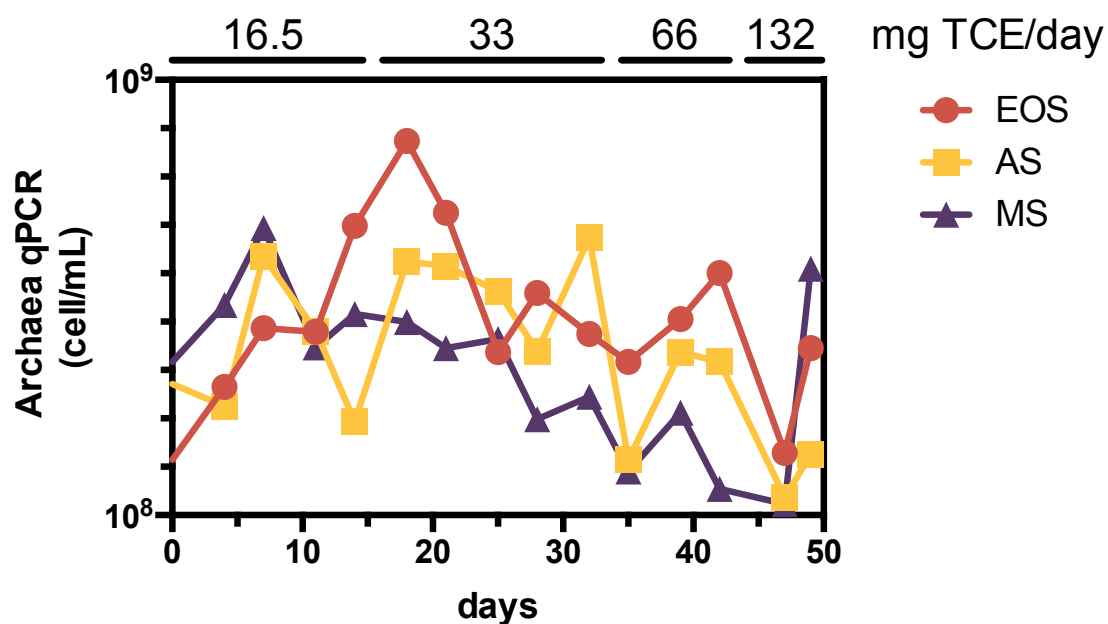


圖 5.24 反應槽樣本之 Archaea QPCR 結果。



(五) 結果與討論

5.4.6.4 反應槽脫氯情形比較

從 QPCR 的結果可以幫助我們瞭解到在每個採樣點中反應槽內的總細菌、古菌與 *Dehalococcoides* 的絕對菌量，然而若是我們將 *Dehalococcoides* 的菌數除以總細菌的菌數，我們便可以得到每個採樣點中 *Dehalococcoides* 的相對豐富度，如圖 5.25 (A)所示，在 EOS 槽中 *Dehalococcoides* 的相對豐富度是較高的，除了在第 42 天的採樣點，AS 槽的 *Dehalococcoides* 相對豐富度較高，但整體上，可以觀察到 EOS 槽中 *Dehalococcoides* 的相對豐富度和提高三氯乙烯負荷是有相關聯的，當我們在第一與第二試程提高三氯乙烯時，*Dehalococcoides* 的含量變增加，而在操作天數第 24 天時遇到不可預期因素，導致反應槽內含氧量提高，使得對氧氣較為敏感的 *Dehalococcoides* 數量減少，因此可以觀察到在第三試程初期的 *Dehalococcoides* 數量減少，隨後進入第四試程，我們再次將三氯乙烯負荷提高後，*Dehalococcoides* 數量又隨之增加。而在 AS 槽與 MS 槽方面，則可以觀察到這兩個反應槽當中，*Dehalococcoides* 豐富度的消長趨勢是很相近的，並且 *Dehalococcoides* 豐富度也是隨著提高三氯乙烯負荷而隨之增加。

如圖 5.25 (B)所示，我們將三個反應槽的 *Dehalococcoides* 脫氯速率 (圖 5.9 (A)) 除以 *Dehalococcoides* 實際菌量 (圖 5.23)，會得到每個反應槽在每個採樣點時的每個 *Dehalococcoides* 細菌的平均氯去除率 (mole C/day/DHC cell)。可以觀察到，平均來看，MS 槽當中每天、每顆 *Dehalococcoides* 細菌可以脫氯的數量是較多的，AS 槽次之，EOS 槽第三。我們推測在整個操作試程內，三個反應槽皆未達到期脫氯速率的極限，因此無法真正比較哪個反應槽的脫氯速率較佳。而由於 EOS 槽當中 *Dehalococcoides* 的實際菌量較高，但三個反應槽每日的氯去除率是相近的 (圖 5.9 (A))，因此相對地，EOS 槽的每日、每顆 *Dehalococcoides* 細菌的實際脫氯速率會較慢。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

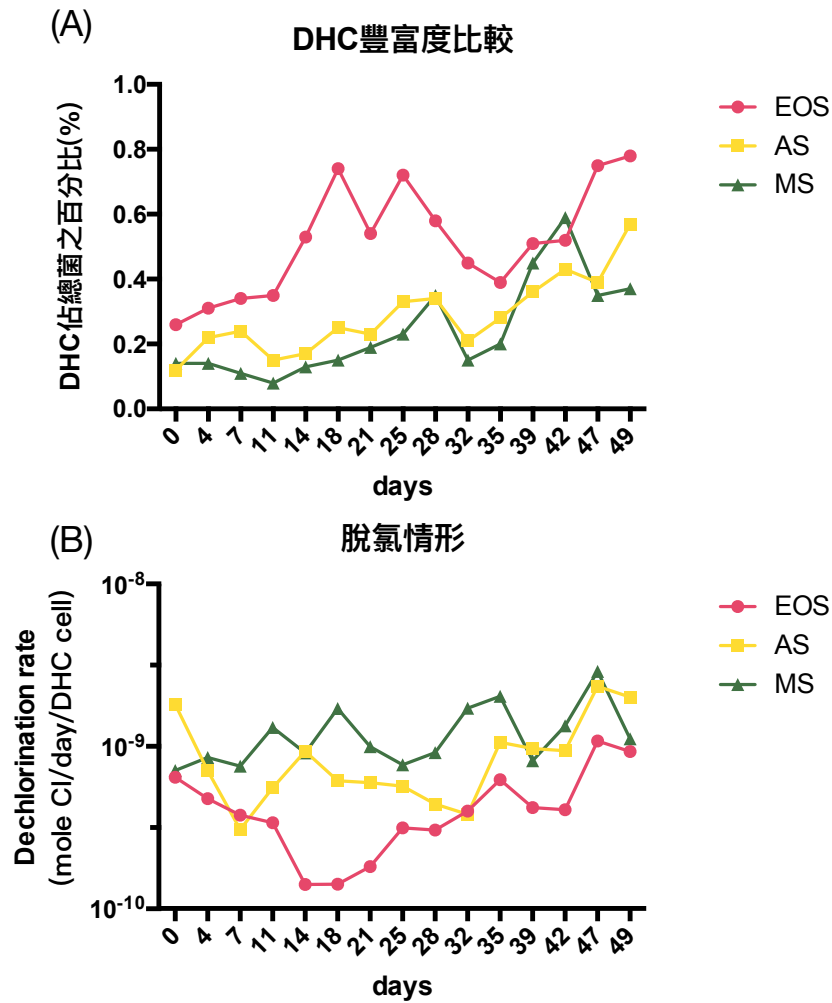


圖 5.25 各反應槽之 (A) *Dehalococcoides* 豐富度比較、(B) 脫氯情形比較。



(五) 結果與討論

5.4.6.5 反應槽於各試程內之細菌與古菌比例

反應槽內的微生物種類眾多，並且當中的微生物之間的關係是相當複雜的。添加碳源能夠讓產氫菌群產生氫氣供給脫氯菌生長並進行還原脫氯反應。然而，反應槽內有大量的甲烷菌，會與厭氧脫氯菌競爭氫氣，而脫氯菌生長速度緩慢，一旦脫氯菌無法獲得足夠氫氣作為電子提供者，脫氯菌的生長就會減緩，因此反應槽當中古菌數量會間接影響到脫氯菌的生長情形。另一方面，厭氧脫氯菌不僅需仰賴產氫菌群進行厭氧還原脫氯反應，還需要其他共生菌提供維生素 B12、必需氨基酸等生長因子促進脫氯菌生長與脫氯呼吸反應，因此瞭解反應槽內古菌與細菌的數量比例是相當重要的，可以幫助我們掌握脫氯菌在反應槽內生長情形的好壞。除此之外，碳源的選擇也是決定生長菌群的重要關鍵，本計畫所使用的乳化油、乙酸與糖蜜為不同複雜程度的碳源，其降解途徑皆不同，因此三個反應槽所養出來的菌群結構也會有所不同，而我們可以藉由分析細菌與古菌的菌量來瞭解提高三氯乙烯的負荷是否會影響三個利用不同碳源的反應槽內其細菌與古菌的菌量比。

如圖 5.26 顯示，EOS 槽在第一與第二試程 (Day 0 ~ Day 32) 古菌的比例大約在 37~50%之間，而在第三及第四試程 (Day 35 ~ Day 49) 時，隨著提高三氯乙烯的負荷，古菌的比例漸漸減少，大約在 29~38%之間；AS 槽在第一與第二試程 (Day 0 ~ Day 32) 古菌的比例大約在 32~54%區間，而在第三及第四試程 (Day 35 ~ Day 49) 時，隨著提高三氯乙烯的負荷，古菌的比例漸漸減少，大約在 28~37%之間；MS 槽在第一與第二試程 (Day 0 ~ Day 32) 古菌的比例大約在 38~50%區間，而在第三及第四試程 (Day 35 ~ Day 49) 時，隨著提高三氯乙烯的負荷，古菌的比例漸漸減少，大約在 29~38%之間。

綜合三個反應槽的結果，我們可以觀察到在第一試程與第二試程中，古菌皆佔了反應槽微生物中很大的比例，一直到第三試程與第四試程中，古菌的比例才隨著時間進展呈現逐漸下降的趨勢。另一方面，由於乳化油、乙酸與糖蜜為不同複雜程度的碳源，我們原先假設三個反應槽的古菌與細菌比例皆會不同，但結果顯示三個反應槽呈現的古菌與細菌的比例趨勢相當接近。我們推測由於這三個反應槽在馴養階段皆使用乳化油作為碳源，而在我們更換碳源、開始操作反應槽到結束採樣這段期間，時間不夠長使得反應槽內原本的乳化油還沒有整個被置換掉，因此更換碳源的效應還沒辦法發揮到很好的作用，使得三個反應槽的細菌與古菌比例上差異不大。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

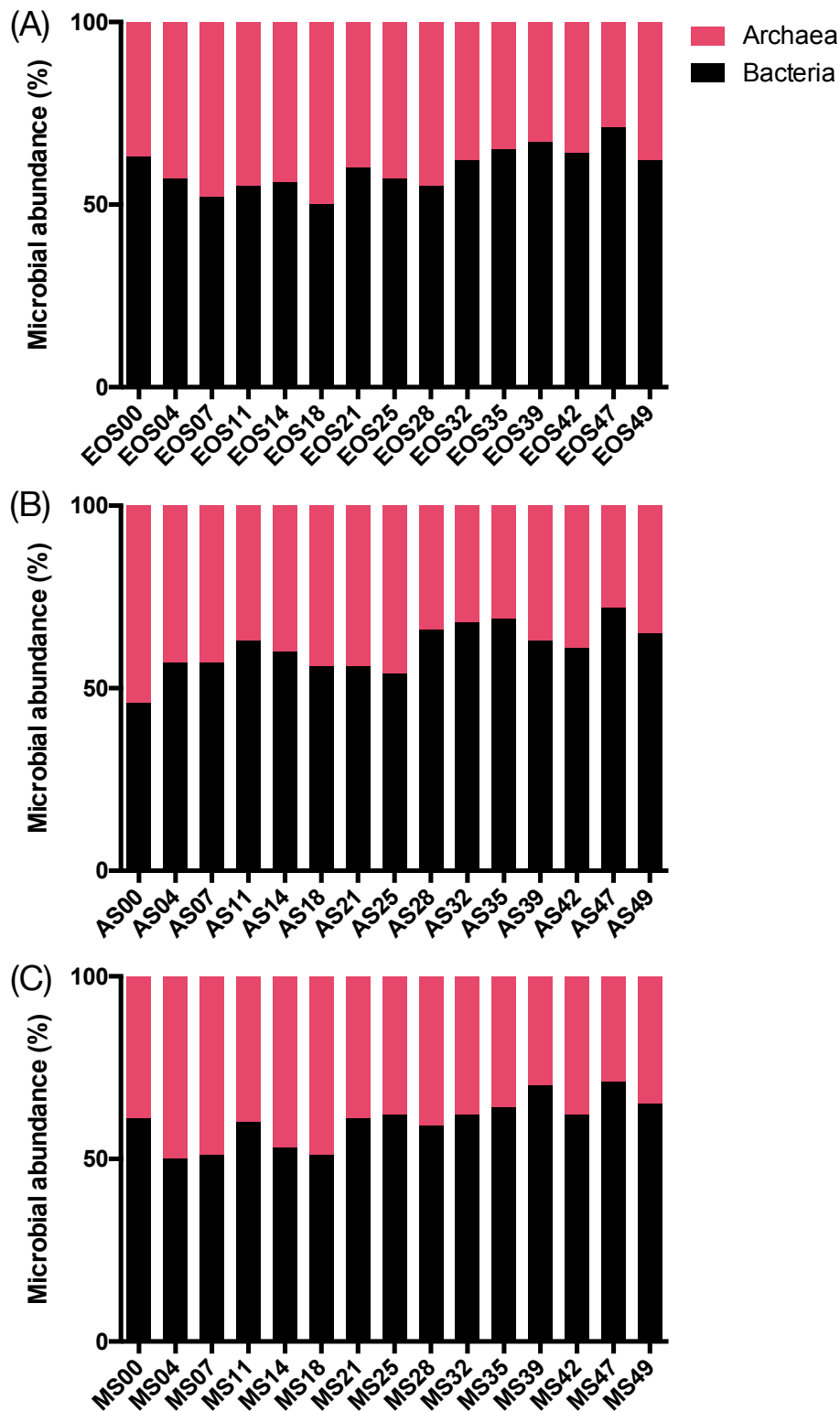


圖 5.26 細菌與古菌豐富度比較。(A) EOS、(B) AS、(C) MS 槽之細菌與古菌豐富度比較。



(五) 結果與討論

5.4.7 微生物高通量定序分析 (NGS) 與微生物菌量分析 (QPCR) 之比較

為了探討樣本中微生物菌群豐富度，我們採取不同的方法學來進行菌群豐富度的分析，分別是微生物高通量定序分析以及 QPCR，微生物高通量定序分析可以讓我們知道樣本中各菌群的相對豐富度，而 QPCR 可以讓我們知道樣本中特定菌群的絕對菌量，甚至可以將兩個方法學做結合，來求得特定菌群的菌量，例如：將同一樣本在 NGS 所得到的脫氯菌 *Dehalococcoides* 豐富度乘上 16S rRNA 基因 QPCR 所得的絕對菌量，我們可以進一步將 NGS 所測到的 *Dehalococcoides* 豐富度轉換成絕對菌量來做比較。

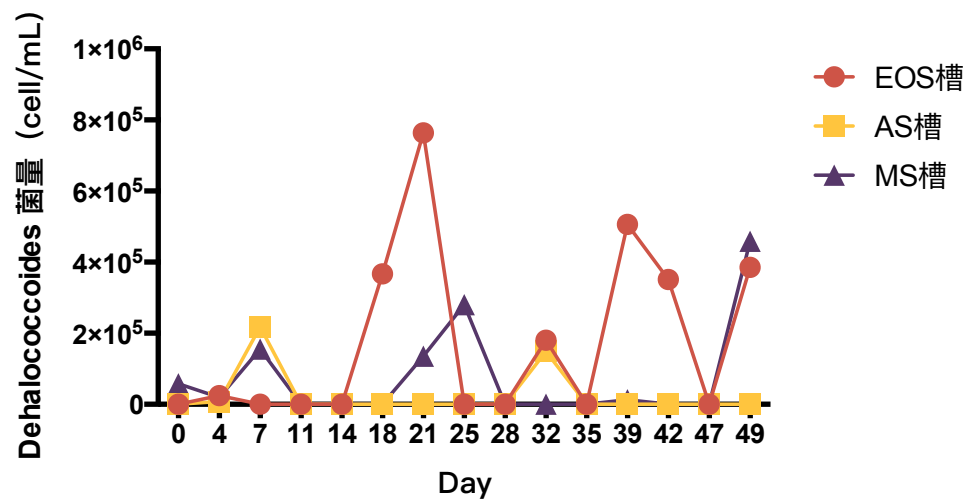
在圖 5.27 中，我們將各反應槽採樣點樣本之 NGS 數據的 *Dehalococcoides* 豐富度乘上總細菌 16S rRNA QPCR 數據後所得到的絕對菌量做比較。從結果可以知道，並非所有的採樣點樣本中皆可測到 *Dehalococcoides*，在 EOS 槽僅在第 4、18、21、32、39、42、49 天的樣本中可偵測到分別為 2.49×10^4 cell/mL、 3.67×10^5 cell/mL、 7.64×10^5 cell/mL、 1.80×10^5 cell/mL、 5.06×10^5 cell/mL、 3.51×10^5 cell/mL、 3.85×10^5 cell/mL 的 *Dehalococcoides* 菌數。AS 槽僅在第 4、7、32 天的樣本中可偵測到分別為 7.71×10^3 cell/mL、 2.18×10^5 cell/mL、 1.49×10^5 cell/mL 的 *Dehalococcoides* 菌數。MS 槽則是在第 0、4、7、21、25、39、49 天的樣本中分別可測到約 5.79×10^4 cell/mL、 1.97×10^4 cell/mL、 1.55×10^5 cell/mL、 1.35×10^5 cell/mL、 2.80×10^5 cell/mL、 1.30×10^4 cell/mL、 4.59×10^5 cell/mL 的 *Dehalococcoides* 菌數。

然而，我們利用 QPCR 法偵測各樣本中 *Dehalococcoides* 菌數所得的結果顯示各採樣點樣本內皆含有 *Dehalococcoides*，並且可以觀察到隨著增加三氯乙烯的負荷，*Dehalococcoides* 菌群數量有成長的趨勢 (圖 5.23)。以 QPCR 偵測樣本中 *Dehalococcoides* 數量的結果顯示，EOS 槽各採樣點樣本所測到最低與最高菌數分別為 5.97×10^5 cell/mL 與 5.28×10^6 cell/mL；AS 槽中各採樣點樣本所測到最低與最高菌數分別為 2.04×10^5 cell/mL 與 1.93×10^6 cell/mL；MS 槽中各採樣點樣本所測到最低與最高菌數則分別為 2.89×10^5 cell/mL 與 2.48×10^6 cell/mL。

而會造成兩種方法學所得到的絕對菌數差異的原因主要是因為兩個方法所使用的引子不同，專一性程度也不同，我們用來做高通量定序的引子可以涵蓋細菌以及古菌的 DNA 區域做增幅，而用來做 QPCR 的引子則是針對 *Dehalococcoides* 的 DNA 區域做增幅。因此，在此計畫中，我們更傾向以 QPCR 所得到之 *Dehalococcoides* 菌數做實驗數據上的探討與說明，而 NGS 方法加上 QPCR 法所求出的 *Dehalococcoides* 菌數則用以輔助參考 (古菌的菌數定量也是)。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

圖 5.27 微生物高通量定序分析結果換算 *Dehalococcoides* 絕對菌數。



(五) 結果與討論

5.5 結果討論

1. AS 槽較早有二氯乙烯的累積

添加三種碳源 (乳化油、乙酸、糖蜜) 分子結構複雜程度不同，而微生物皆可利用這些碳源 (乳化油、乙酸、糖蜜) 在水解過程所產生的電子作為生長的能量來源，但乳化油與糖蜜的水解路徑最終都會水解成乙酸，再繼續被代謝成甲烷、二氧化碳，或生物質量。這三種基質在厭氧條件下分解產生氫氣效率不同，糖蜜發酵產氫速率快，使環境氫分壓較高。乳化油發酵產氫速率較慢，使氫分壓較低，且乳化油會濃縮 TCE 濃度，使脫氯反應動力學較快。乙酸分解產生氫氣分壓最低，供給電子於還原脫氯的效率最低。因此，添加乙酸作為碳源的 AS 槽在第二試程起便開始有二氯乙烯的累積，EOS 槽與 MS 槽則分別在第三試程與第四試程才開始有二氯乙烯的累積，因此我們可以推論出乳化油與糖蜜這兩種碳源其水解所提供的電子應能夠更有效地讓二氯乙烯脫氯成氯乙烯或乙烯。

2. AS 槽的乙酸累積較其他兩槽多

由於許多脫氯菌群需仰賴代謝揮發酸來達到生長的目的，因此揮發酸含量的分析可以視為還原生物脫氯的重要指標之一。在揮發酸類中乙酸尤為重要，甲烷菌或脫氯菌的代謝反應會利用乙酸與氫氣，進行最終礦化反應。然而，添加乙酸作為碳源的 AS 槽在整個實驗的過程中都有乙酸的累積，尤其高濃度二氯乙烯會可能抑制產氫乙酸化菌的活性，使得到了第三與第四試程的乙酸累積量更為明顯，說明 AS 反應槽在高 TCE 負荷的情況下，微生物代謝乙酸的效率較另外兩個反應槽差。

3. 在第四試程時，EOS 槽甲烷與乙烯含量較其他兩槽少

在第一與第二試程前期，三個反應槽的甲烷含量有隨著時序而增加的趨勢，說明在這個時期甲烷菌群在反應槽中應佔極高的微生物族群比例；然而進到第二試程後期、第三試程與第四試程時，三個反應槽的甲烷含量都隨著時序而逐漸下降，尤其 EOS 槽在第四試程後期所分析到的甲烷含量極少，推測應是在高 TCE 負荷的情況下，菌群結構發生改變，使得甲烷菌豐富度下降，其改變應有助於脫氯菌群進行脫氯功能，因為甲烷菌會和脫氯菌群競爭電子，若甲烷菌豐富度下降，則有助於脫氯菌獲得電子、增加其生長速率，進而提高脫氯速率。

在乙烯的含量變化上，三個反應槽所呈現的乙烯含量變化完全不同：EOS 槽的乙烯含量在第一試程到第二試程初期是呈現上升的趨勢，而到了第二試程後期



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

則開始下降，直到第四試程結束；AS 槽的乙烯含量在第一試程初期開始增加到一定量後，一直到第四試程結束，反應槽內的乙烯都保持相同的含量；MS 槽的乙烯含量在第一試程與第二試程初期尚未開始累積，從第二試程後期則呈現上升的趨勢一直到第四試程。由於三氯乙烯最終會降解成乙烯，並且由含氯乙烯數據分析可得知 EOS 槽在第四試程除了二氯乙烯（其累積的量並未高於其他兩槽）並無其他含氯化合物累積，因此 EOS 槽在第四試程時乙烯含量極低是目前數據較無法解釋的部分，我們推測應有微生物可以進一步代謝乙烯，才導致反應槽內乙烯含量偏低的現象。另外，AS 槽與 MS 槽在高 TCE 負荷的情況下，其乙烯含量分別呈現定值與升高的趨勢，相對來講是較為合理的，雖然有二氯乙烯的累積（僅稍高於每日進流的氯莫耳數），但脫氯速率依然很快的情況下，三氯乙烯仍然可以被完全脫氯成乙烯。

4. AS 槽的脫氯速率在第四試程時較慢

為評估三氯乙烯脫氯功能表現好壞，因此我們採取計算各反應槽在各試程脫氯速率的方式來進行比較。我們利用 ECD 分析各種含氯乙烯物質含量數據，除以單位時間後得到各試程之平均脫氯速率。結果顯示各反應槽在第一與第二個試程所得到的脫氯速率相當，我們推測這是因為我們給予的 TCE 負荷量尚未達到反應槽所能負荷的極限，因此給予多少 TCE 皆會被降解成其他含氯數較低的含氯乙烯或乙烯。而在第四試程時，AS 槽的平均脫氯速率較另外兩槽慢，而由 ECD 分析的結果可以得知 AS 槽有二氯乙烯的累積，因此我們推測 AS 槽脫氯速率的變慢應是二氯乙烯降解到氯乙烯的過程變慢了。

代入微生物分析數據顯示每個反應槽在每個採樣點時的每個 *Dehalococcoides* 細菌的平均氯去除率。結果觀察到 MS 槽當中每天、每顆 *Dehalococcoides* 細菌可以脫氯的數量是較多的，AS 槽次之，EOS 槽第三。

5. 不同碳源對微生物組成的影響

本研究提供由簡單結構至複雜結構的三種碳源觀察對微生物組成的變化。結果顯示越複雜的碳源對微生物組成越穩定，反觀，越簡單的碳源（如：乙酸和乳化油）會讓微生物菌群結構變動越劇烈，進一步影響脫氯成效。依據本研究結果顯示越穩定的微生物菌群結構對於三氯乙烯脫氯是有幫助的。

6. 脫氯菌的交互作用

透過 NGS 定序結果僅出現 *Geobacter* 和 *Dehalococcoides* 兩種脫氯菌，但由於 *Dehalococcoides* 相對豐富度過低，導致交互作用網絡圖主要以 *Geobacter* 為主



(五) 結果與討論

要節點。三個反應槽的 *Geobacter* 與其他微生物交互作用網絡圖顯示乙酸反應槽和乳化油反應槽網絡圖是非常複雜的，相較之下，糖蜜反應槽 *Geobacter* 與其他微生物交互作用網絡圖是比較簡單且有助於 *Geobacter* 生長。微生物交互作用結果同時也呼應結構複雜的碳源有助於微生物菌群的穩定，反而，越簡單利用的碳源越多微生物可利用，導致許多微生物產生競爭的關係。

7. 細菌與古細菌之間的關係

三個反應槽經過 50 天操作下，發現 TCE 負荷不斷提升但古細菌與細菌比例仍佔約 50% 左右。配合過去文獻指出甲烷菌會參與 B12 合成代謝途徑及甲烷菌可降解三氯乙烯，顯示在地下水中降解三氯乙烯，古細菌扮演重要的關鍵角色。



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

5.6 結論

本計畫利用反應槽實驗探討添加不同碳源，還原性脫氯菌群變化及降解三氯乙烯的關聯性，以及反應槽內全菌相動態與三氯乙烯完全脫氯效率之關係。本研究操作三個添加不同藥劑的反應槽，利用含碳量、酸類、乙烯及多氯乙烯濃度變化來評估三個反應槽 TCE 還原脫氯之功能表現，結果顯示添加的三種藥劑碳源均能促進 TCE 完全脫氯成乙烯，但是在高 TCE 負荷的條件下，乙酸作為碳源的反應槽中乙酸降解菌群活性受到抑制，使得完全脫氯效率低於其他反應槽，並累積較高濃度的二氯乙烯。高通量定序分析菌相的結果顯示，添加不同複雜程度的碳源均導致整體的菌群結構改變，尤其在添加糖蜜的情況下，微生物多樣性最為豐富，但不同的碳源並不會明顯地改變脫氯菌的種類及豐富度。但是，添加乳化油可以培養較高密度的 *Dehalococcoides*，添加乙酸與糖蜜則培養較高密度的 *Geobacter*。由於 TCE/TOC 比例較低(電子供給>>TCE 接受電子)，三個使用不同碳源的反應槽其 TCE 還原脫氯速率不相上下。另一方面，分析脫氯菌群與其他微生物網絡關係發現結構簡單的碳源，如乳化油與乙酸，其物種互動關係是相當複雜的，且菌群結構隨時間變動劇烈。相對地，使用結構較複雜的糖蜜作為碳源，微生物菌群結構較穩定，脫氯菌群與其他微生物的網絡關係也較為簡單。本研究建立了藥劑對脫氯微生物體與 TCE 脫氯表現的關聯性，相關成果有助於發展本土地下水 TCE 污染精準生物整治技術。

5.7 建議

在工程實務上如何針對整治場址選擇適當的藥劑改造地層厭氧狀態，並促進厭氧脫氯菌之生長甚為關鍵。本研究結果顯示，只要系統中關鍵脫氯菌的數量達到某一個密度($>0.5 \times 10^5$ cell/ml)，即可達成不錯的 TCE 還原脫氯的效果，和藥劑種類並無太大關連。然而，藥劑種類影響整體厭氧菌群結構、多樣性、以及脫氯菌之密度。添加糖蜜會產生較複雜而多樣性高的菌群結構，但是衍生的關鍵脫氯菌密度卻低於添加乳化油的系統。添加乳化油的菌群網絡卻遠比糖蜜系統的複雜，且有助於脫氯菌的生長。這些發現轉譯成工程應用，以糖蜜為基底的藥劑適合在整治初期使用，使地層環境快速厭氧化，並大量生長產氫發酵菌、B12 供給菌群等厭氧菌群。添加乳化油則較有利於 *Dehalococcoides* 脫氯菌群生長，以及上下游脫氯群生態平衡。當脫氯菌群已經達到 0.5×10^5 cell/ml，添加簡單的基質如乙酸，亦能持續維持脫氯菌群生長，以及還原脫氯活性。這些藥劑技術 know-how 可作為於場址整治時選擇藥劑種類與決定如何使用藥劑之參考。



期中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」

期中審查意見回覆對照表

□申請計畫書 ■期中報告

□修正計畫書 □期末報告

計畫年度	107 年度	計畫類型	■ 研究計畫 □ 模場試驗
計畫類別	□調查 ■整治 □其他		主持人：吳哲宏
計畫名稱	地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氮菌生態網路		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一			
1. 期中報告對計畫執行現況、流程及方法已具體說明。		1. 謝謝委員給予肯定。	
2. 本計畫無自籌款。		2. 依據徵求計畫書規定，本案無須自籌款。	
3. 期中報告對本計畫後續執行工作項目已說明 (p. 50 已簡述)。		3. 謝謝委員給予肯定。	
4. 計畫執行進度與預定進度相符，並未落後。		4. 謝謝委員給予肯定。	
5. 期中報告顯示計畫研究內容與原計畫目的相符。		5. 謝謝委員給予肯定。	
6. 期中報告的初步成果顯示，依據原計畫設計與初步成果所提出之討論與建議合理。		6. 謝謝委員給予肯定。	
(1) DCE 的累積與否以”乙酸”為討論重點，EOS & MS 反應槽中無乙酸的產出？ (圖 5.6 卻均可測得乙酸)(相關的合理性與機制建議整合說明)。		(1) EOS、AS 和 MS 後期都有發現 DCE 累積濃度約 30-40 mg/L，但只在 AS 槽偵測到大量乙酸。DCE 累積應該不只有乙酸槽累積單一因素。未來透過微生物交互作用應可以找出乙酸累積的主要因素及機制。	
(2) AS 槽反而有較低的 ORP (表 5.2)與前述現象的觀察與推論的合理性，建議討論。		(2) 由於水中氫離子與氫氧離子會影響 ORP 數值，因此，在較偏酸性 EOS 與 MS 槽 ORP 數值會相對比偏中性 AS 槽 ORP 數值高。各槽 ORP 不同主要原因是 pH 值不同導致的。	
(3) 乙烯的含量與前述說明的一致性？建議討論。		(3) 第 50 天三槽都偵測到 DCE 濃度累積約 30 mg/L，偵測乙烯結果發現 EOS 槽乙烯產量低於偵測下限，推測 EOS 槽中的菌群可能會利用乙烯，EOS 槽菌群與 MS 槽和 AS 槽菌群不同。未來會再利用分子生物技術進一步驗證。	
(4) p. 49 5.4 節 2. “AS 槽的乙酸累積較多”，此論點的意義？ (原本就是乙酸槽?) 。		(4) 脫氮菌群需依賴代謝乙酸達到生長的目的。AS 槽進流碳源為乙酸，在第 40	
(5) 氫氣含量與變化？			
7. 期中報告的初步成果顯示，目前的研			



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

究成果符合原計畫書所預期的成果。 8. 期中報告的初步成果顯示，本計畫已有初步研究成果，報告中說明已有一位碩士與二位博士研究生助理參與試驗，培育土水整治相關人才。 9. 期中報告已有初步成果，本成果是否可獲得專利或技術轉移，尚待未來期末報告中說明。 10. 期中報告已有初步成果，本研究可能可提升國內土壤與地下水污染整治技術與應用，符合政策。也可提升國內土水整治事業的發展，對社會經濟發展有助益。	天乙酸無法消耗殆盡，累積約有 70 mg/L，顯示甲烷菌與脫氯菌生長活性可能較低，亦影響氯乙烯脫氯成效。 (5) 在本計畫中以 GC-TCD 分析產氣組成，但是氫氣含量均低於儀器偵測下限。 7. 謝謝委員給予肯定。 8. 謝謝委員給予肯定。 9. 謝謝委員給予肯定。我們目前設計特定菌群專一性引子，可偵測特殊菌群在不同環境的動態變化。本團隊將朝向建議方向努力，目前仍在評估是否申請專利。 10. 謝謝委員給予肯定。
委員二 1. 請說明反應系統之穩定性，依相關綠口監測數據之結果，反應系統之穩定性應須進一步評估與說明。 2. 若無法說明反應系統之穩定性則氯乙烯之代謝或降解效率，則有待釐清與說明。 3. 反應系統中產物(乙烯)之累積或變化趨勢，應有更為完整之評估與說明。 4. 不同試程之氣體組成及 TOC 變化趨勢稍有差異，相關原因為何？建議計畫應針對不同產物之變化趨勢，予以一致性之討論與說明。	1. 51 天三組反應槽操作 pH、ORP 都維持在固定範圍之內沒有明顯地變動，表示在硬體設備上反應槽維持在厭氧條件沒有問題。在培養期間，TCE 負荷不斷提高，但三槽的三氯乙烯都可以完全降解成二氯乙烯。另外，偵測三槽懸浮固體物(biomass) 濃度皆在 200 mg/L 範圍內。綜合上述顯示反應槽系統維持得很穩定。 2. 本計畫有偵測三氯乙烯代謝產物至乙烯。由於乙烯有可能被微生物利用而轉換成其他代謝產物，導致三氯乙烯脫氯無法質量平衡，目前仍在克服中。 3. 謝謝委員建議。未來會在期末報告補充說明。 4. 謝謝委員建議。未來會在期末報告結合菌相分析後，補充說明之。
委員三 1. 構想書及計畫書之審查意見及回覆情形應具體列出以利審查。 2. 生物復育過程是否產生乙烯？其產率如何？系統之氯平衡又如何？建議宜加以量測並做說明。	1. 構想書與計畫書前已依據委員審查意見修改完成，並已核定本計畫執行通過。 2. 生物復育過程中會產生乙烯。脫氯菌 <i>Dehalococcoides</i> 菌群會將 VC 脫氯形成乙烯。本團隊以 GC-FID 分析產氣



期中審查意見回覆對照表

3. 報告之錯別字仍多，宜加強校稿以提升品質。	中的乙烯濃度，發現三槽的乙烯累積情形不同。由於乙烯還會被其他微生物進行代謝產生其他代謝產物（例如：乙烷），所以質量平衡與相關機制還在克服與研究中。 3. 謝謝委員糾正，未來會加強校稿以提高報告品質。
委員四 1. 建議宜再針對 As 對二氯乙烯、乙酸累積對脫氯菌在地下水活性及豐富度作試驗觀測其結果。 2. 生物反應槽之緩衝液對維持 pH 穩定性宜加以測試，以利維持 pH 境況對脫氯環境評估。 3. 建議宜對相關試驗模組分析水質理化性質以利與生物分析項目綜評其地下水之境況。	1. 目前正在進行脫氯菌豐富度分析，預計在期末報告中說明脫氯菌與多氯乙烯之間的關係。 2. 本實驗室過去有分別使用 NaHCO_3、$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 評估，結果發現 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 較容易維持反應中的 pH，因此，在本計畫中也是使用 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 來維持 pH 值。 3. 未來會將水質參數結合為生物分析並在期末報告中呈現分析結果。
委員五 1. 進度符合期中規劃。 2. 真正精準生物整治技術的基礎-鑑定菌相分布及互動關係，仍待期末報告呈現。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 微生物分佈和互動關係與微生物與多氯乙烯降解與水值參數相關性，皆會在期末報告中呈現。
委員六 1. 期中報告進度符合。 2. 期中報告自評表已達成國內投稿1篇、國外投稿1篇，其發表日期、發表處、名稱、影響指數等請補充說明於備註。 3. 本計畫預期成果與效益，以及相關應用性建議於期末報告時加以討論。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 目前已達到國內投稿1篇研討會論文。在期末報告前會本團隊會努力成計畫預定的績效目標。 3. 謝謝委員建議，會在期末報告討論成果效益及未來實質上的應用性。
專案主持人：_____ (簽名及蓋章)	



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

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」

期末審查意見回覆對照表

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

計畫年度	107 年度	計畫類型	■ 研究計畫 □ 模場試驗
計畫類別	□調查 ■整治 □其他		主持人：吳哲宏
計畫名稱	地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氮菌生態網路		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一		1. 謝謝委員給予肯定。	
11. 期末報告對研究計畫的執行現況、研究流程及方法說明具體完整。		2. 謝謝委員給予肯定。	
12. 計畫後續執行工作項目及內容已於報告書中 P. 79 說明，並已提出相關建議。		3. 謝謝委員給予肯定。	
13. 計畫執行進度與預定進度大致相符，計畫執行進度並無落後。		4. 謝謝委員給予肯定。	
14. 期末報告所說明的研究內容與原計畫目的大致相符。		5. 本計畫是以厭氧反應槽模擬地層厭氧環境，探討添加不同藥劑化合物(糖蜜、乳化油與乙酸)的條件下對三氯乙烯還原脫氮反應及微生物體結構的影響。在工程實務上如何針對整治場址選擇適當的藥劑改造地層厭氧狀態，並促進厭氧脫氮菌之生長甚為關鍵。本研究結果顯示，只要系統中關鍵脫氮菌的數量達到某一個密度(>0.5x10 ⁵ cell/ml)，即可達成不錯的TCE還原脫氮的效果，和藥劑種類並無太大關連。然而，藥劑種類影響整體厭氧菌群結構、多樣性、以及脫氮菌之密度。添加糖蜜會產生較複雜而多樣性高的菌群結構(圖 5.10)，但是衍生的	
15. 根據期末報告內容所提出之討論與建議合理，但是否能具體的應用於整治工程實務上仍待進一步說明討論。本計畫以”厭氧反應槽”的試驗觀察為主，如何將其應用於地下水污染場址，仍待討論。			
16. 期末報告所說明的整體研究成果符合預期，但工程實務的應用性(與應用對象)仍待說明討論。圖 5.20 說明脫氮菌			



期末審查意見回覆對照表

群只占厭氧微生物量中極低的比利，此特性於地下水現地整治中極具意義，此觀察結果與地下水氯化有機物污染實際整治成效的評估與整治效率的解讀，頗為關鍵，建議討論。 17. 本研究計畫的學術產出及活動、人才培育符合預期。 18. 本計畫的研發成果在獲得專利、技術轉移…等仍待持續評估。 19. 本計畫對國內地下水污染領域的發展有所助益。	關鍵脫氯菌密度卻低於添加乳化油的系統(圖 5.23)。添加乳化油的菌群網絡卻遠比糖蜜系統的複雜，且有助於脫氯菌的生長。這些發現顯示，以糖蜜為基底的藥劑適合在整治初期使用，使地層環境快速厭氧化，並大量生長厭氧菌群。添加乳化油則較有利於脫氯菌群生長。當脫氯菌群已經達到 0.5×10^5 cell/ml，添加簡單的基質如乙酸，亦能持續維持脫氯菌群生長，以及還原脫氯活性。這些藥劑技術 know-how 有助於場址整治時選擇藥劑種類與決定如何使用藥劑。(P69) 修訂版期報告增加有關本研究計畫成果之實務應用討論與建議 (P77)。 6. 謝謝委員給予肯定。由微生物體分析觀察雖然脫氯菌佔總菌量比例低，但脫氯菌的多樣性卻是很重要的。脫氯菌有些扮演從高氯數還原脫氯至低氯數乙烯，有些負責進行低氯數脫氯至乙烯。在地下水氯化有機物生物復育中脫氯菌數量和脫氯菌多樣性都是很重要的關鍵因素。 修訂版期報告增加有關討論(P62) 7. 謝謝委員給予肯定。 8. 本計畫研發成果只進行國際期刊投稿，目前還未進行專利或技術移轉。
---	---



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

	9. 謝謝委員給予肯定。
委員二 5. 期中報告審查意見及回覆情形應詳列於期末報告。 6. 報告之錯別字仍多，如 p79 第五行，乙烯誤植為”乙稀”，應加強校稿，提升報告品質。 7. 報告未見任何建議事項，既然已經花這麼多精神與力氣完成相關實驗，應就目前之研究成果務實評估所開發之技術是否可有效應用於地層多氯乙烯污染之精準生物復育，如有不足，又應當加強那些項目，宜提出具體之建議。	1. 謝謝委員意見。我們已將期中報告審查意見表及回覆情形列於期末報告後面。 2. 謝謝委員糾正。已將錯別字進行修正。 3. 謝謝委員提醒。報告書中已增加 5.7 建議。
委員三 4. 請補充期中報告及申請計畫書階段之審查意見及回覆辦理情形，以利瞭解本計畫之修正與執行成果。 5. 有關氣體產出及揮發酸含量(如圖 5.5~5.6)之變化差異甚大，請補充說明厭氧系統操作穩定性之測試結果。 6. 請補充說明不同碳源對脫氯效率影響之機制為何? 7. 請補充說明脫氯菌群之生長變化趨勢之影響因素為何?未來應用於實場之限制條件為何? 8. 期末報告未見建議事項，建議主持人應針對本研究執行過程所遭遇的問	1. 謝謝委員意見。我們已將期中報告審查意見表及回覆情形列於期末報告後面。 2. 反應槽監測 pH、ORP 都很穩定且三氯乙烯都完全降解。導致氣體產量和揮發酸變化有差異應是反應槽微生物組成的不同，而不是厭氧系統硬體操作穩定性的問題。 3. 本計畫使用糖蜜、乳化油及乙烯當作碳源。不同於乙酸，乳化油和糖蜜是較為複雜的結構，乳化油和糖蜜的代謝路徑也比乙酸複雜。這三種基質在厭氧條件下分解產生氫氣效率不同。微生物將這些複雜大分子有機物裂解成較小分子，再由酸化菌降解較小分子的代謝產物



期末審查意見回覆對照表

題，研擬未來可行的解決對策，並詳列於結論與建議事項中，以供未來研究或技術應用的參考。	並產生醇類和揮發酸以及氫氣。所以不同碳源參與的微生物也不一樣，進而影響脫氯效率。(P77) 4. 脫氯菌生長限制因素包含氧氣、維他命B12、氫、減少甲烷菌的競爭…等，面對應用在實場的瓶頸為氧化還原電位的調控及加入碳源的種類及次數。 藥劑影響脫氯菌生長及未來應用相關討論增列於 P62, P69, P80。 5. 謝謝委員提醒。報告書中已增加 5.7 建議。
委員四 4. 本技術對不同釋氯劑之微生物群資料庫建置與實際運用至地下水生物整治之條件參考效應宜作簡單補述。 5. 地下水分析 TOC 作為脫氯菌是否有足夠碳源進行脫氯效應評估之說明，依目前結果是否對不同碳源其差異可強化說明。 6. 建議本研究對於含氯地下水生物整治技術可提昇菌群數量、種類之能量可再說明。	1. 謝謝委員建議。已補充在報告書 5.6 結論與 5.7 建議的內容中。 2. 謝謝委員建議。我們添加碳源（乳化油、乙酸、糖蜜）作為供氯者，三種基質的供氯能力不同，產生之揮發酸累積程度亦不同，相關討論已增補於報告書 5.2.5 中 (P41)。 3. 謝謝委員建議。已補充在報告書中 (P62、P69、P77)。
委員五 3. 進度符合期末報告規劃。 4. 研究結果偏向微生物菌種變化與添加碳源之間的動態關係探討，但對於「發展本土下水 TCE 污染精準生物整治技	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 謝謝委員提醒。本計畫研究成果提供藥劑基質種類對 TCE 脫氯反應之影響及其與微生物體之關聯性，增加對使用藥



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

術」之關連則無任何論述，應提出相關建議與發展方向，以利發展具實廠應用性的整治技術。	劑之 know-how，相關建議已增加在 5.7 中。
委員六 請補充說明 50 天內各水槽 pH 值低於 6.2 時所添加 NaHCO_3 的體積。	各反應槽添加 NaHCO_3 體積如下： EOS 反應槽 14 天添加 40 mL 46 天添加 30 mL MS 反應槽 23 天添加 25 mL 34 天添加 30 mL 46 天添加 20 mL AS 反應槽無添加 NaHCO_3



(六) 參考文獻

(六) 參考文獻

- [1] Lovley, D. R. (2003) *Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation*, *Nature reviews. Microbiology* 1, 35-44.
- [2] Fincker, M., and Spormann, A. M. (2017) *Biochemistry of Catabolic Reductive Dehalogenation*, *Annu Rev Biochem* 86, 357-386.
- [3] Christiansen, N., Ahring, B. K., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1998) *Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of Desulfitobacterium hafniense*, *FEBS Lett* 436, 159-162.
- [4] Scholz-Muramatsu, H., Neumann, A., Meßmer, M., Moore, E., and Diekert, G. (1995) *Isolation and characterization of Dehalospirillum multivorans gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium*, *Arch Microbiol* 163, 48-56.
- [5] Sung, Y., Fletcher, K. E., Ritalahti, K. M., Apkarian, R. P., Ramos-Hernandez, N., Sanford, R. A., Mesbah, N. M., and Löffler, F. E. (2006) *Geobacter lovleyi sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium*, *Appl Environ Microbiol* 72, 2775-2782.
- [6] DeWeerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R., and Suflita, J. M. (1990) *Desulfomonile tiedjei gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium*, *Arch Microbiol* 154, 23-30.
- [7] Boyle, A. W., Phelps, C. D., and Young, L. Y. (1999) *Isolation from estuarine sediments of a Desulfovibrio strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4, 6-tribromophenol*, *Appl Environ Microbiol* 65, 1133-1140.
- [8] Lohner, S. T., and Spormann, A. M. (2013) *Identification of a reductive tetrachloroethene dehalogenase in Shewanella sediminis*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20120326.
- [9] Peng, X. X., Zhang, Z. L., Luo, W. S., and Jia, X. S. (2013) *Biodegradation of tetrabromobisphenol A by a novel Comamonas sp strain, JXS-2-02, isolated from anaerobic sludge*, *Bioresource Technol* 128, 173-179.
- [10] Sanford, R. A., Cole, J. R., and Tiedje, J. M. (2002) *Characterization and description of Anaeromyxobacter dehalogenans gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium*, *Appl Environ Microbiol* 68, 893-900.
- [11] Villemur, R., Lanthier, M., Beaudet, R., and Lepine, F. (2006) *The Desulfitobacterium genus*, *FEMS Microbiol Rev* 30, 706-733.



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

- [12] Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Muller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H., and Spormann, A. M. (2013) *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis* nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*, *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 625-635.
- [13] Moe, W. M., Yan, J., Nobre, M. F., da Costa, M. S., and Rainey, F. A. (2009) *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater, *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2692-2697.
- [14] Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., and Gorisch, H. (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes, *Nature* 408, 580-583.
- [15] Patil, S. S., Adetutu, E. M., Rochow, J., Mitchell, J. G., and Ball, A. S. (2014) Sustainable remediation: electrochemically assisted microbial dechlorination of tetrachloroethene-contaminated groundwater, *Microb Biotechnol* 7, 54-63.
- [16] Bedard, D. L., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2007) The *Dehalococcoides* population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1260, *Appl Environ Microbiol* 73, 2513-2521.
- [17] Bedard, D. L., Bailey, J. J., Reiss, B. L., and Jerzak, G. V. (2006) Development and characterization of stable sediment-free anaerobic bacterial enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260, *Appl Environ Microb* 72, 2460-2470.
- [18] Wang, S., and He, J. (2013) Dechlorination of commercial PCBs and other multiple halogenated compounds by a sediment-free culture containing *Dehalococcoides* and *Dehalobacter*, *Environ Sci Technol* 47, 10526-10534.
- [19] McMurdie, P. J., Behrens, S. F., Muller, J. A., Goke, J., Ritalahti, K. M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S., Löffler, F. E., and Spormann, A. M. (2009) Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*, *PLoS Genet* 5, e1000714.
- [20] Maymo-Gatell, X., Chien, Y. T., Gossett, J. M., and Zinder, S. H. (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene, *Science* 276, 1568-1571.
- [21] Cupples, A. M., Spormann, A. M., and McCarty, P. L. (2003) Growth of a



(六) 參考文獻

- Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and cis-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR, *Appl Environ Microbiol* 69, 953-959.
- [22] Lee, P. K. H., Cheng, D., Hu, P., West, K. A., Dick, G. J., Brodie, E. L., Andersen, G. L., Zinder, S. H., He, J. Z., and Alvarez-Cohen, L. (2011) Comparative genomics of two newly isolated *Dehalococcoides* strains and an enrichment using a genus microarray, *Isme J* 5, 1014-1024.
- [23] Cheng, D., and He, J. Z. (2009) Isolation and Characterization of "*Dehalococcoides*" sp Strain MB, Which Dechlorinates Tetrachloroethene to trans-1,2-Dichloroethene, *Appl Environ Microb* 75, 5910-5918.
- [24] Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D. E., and Ebersole, R. C. (2002) Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Appl Environ Microbiol* 68, 485-495.
- [25] Nikolausz, M., Chatzinotas, A., Palatinszky, M., Imfeld, G., Martinez, P., and Kastner, M. (2008) Single-nucleotide primer extension assay for detection and sequence typing of "*Dehalococcoides*" spp, *Appl Environ Microbiol* 74, 300-304.
- [26] Holliger, C., Schraa, G., Stams, A. J., and Zehnder, A. J. (1993) A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth, *Appl Environ Microbiol* 59, 2991-2997.
- [27] Maphosa, F., van Passel, M. W., de Vos, W. M., and Smidt, H. (2012) Metagenome analysis reveals yet unexplored reductive dechlorinating potential of *Dehalobacter* sp. E1 growing in co-culture with *Sedimentibacter* sp, *Environ Microbiol Rep* 4, 604-616.
- [28] Sleep, B. E., Seepersad, D. J., Kaiguo, M. O., Heidorn, C. M., Hrapovic, L., Morrill, P. L., McMaster, M. L., Hood, E. D., Lebron, C., Lollar, B. S., Major, D. W., and Edwards, E. A. (2006) Biological enhancement of tetrachloroethene dissolution and associated microbial community changes, *Environ Sci Technol* 40, 3623-3633.
- [29] Poritz, M., Goris, T., Wubet, T., Tarkka, M. T., Buscot, F., Nijenhuis, I., Lechner, U., and Adrian, L. (2013) Genome sequences of two dehalogenation specialists - *Dehalococcoides mccartyi* strains BTF08 and DCMB5 enriched from the highly polluted Bitterfeld region, *FEMS Microbiol Lett* 343, 101-104.
- [30] Duhamel, M., Mo, K., and Edwards, E. A. (2004) Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene,



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

Appl Environ Microb 70, 5538-5545.

- [31] Wang, S. Q., and He, J. Z. (2012) Two-step denaturing gradient gel electrophoresis (2S-DGGE), a gel-based strategy to capture full-length 16S rRNA gene sequences, *Appl Microbiol Biot* 95, 1305-1312.
- [32] Ding, C., Chow, W. L., and He, J. Z. (2013) Isolation of *Acetobacterium* sp Strain AG, Which Reductively Debrominates Octa- and Pentabrominated Diphenyl Ether Technical Mixtures, *Appl Environ Microb* 79, 1110-1117.
- [33] Ziv-El, M., Delgado, A. G., Yao, Y., Kang, D. W., Nelson, K. G., Halden, R. U., and Krajmalnik-Brown, R. (2011) Development and characterization of DehaloR², a novel anaerobic microbial consortium performing rapid dechlorination of TCE to ethene, *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 1063-1071.
- [34] Holmes, V. F., He, J. Z., Lee, P. K. H., and Alvarez-Cohen, L. (2006) Discrimination of multiple Dehalococcoides strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes, *Appl Environ Microb* 72, 5877-5883.
- [35] David, M. M., Cecillon, S., Warne, B. M., Prestat, E., Jansson, J. K., and Vogel, T. M. (2015) Microbial ecology of chlorinated solvent biodegradation, *Environ Microbiol* 17, 4835-4850.
- [36] McLean, J. E., Ervin, J., Zhou, J., Sorensen, D. L., and Dupont, R. R. (2015) Biostimulation and Bioaugmentation to Enhance Reductive Dechlorination of TCE in a Long-Term Flow Through Column Study, *Ground Water Monit R* 35, 76-88.
- [37] Mirza, B. S., Sorensen, D. L., Dupont, R. R., and McLean, J. E. (2016) Dehalococcoides abundance and alternate electron acceptor effects on large, flow-through trichloroethene dechlorinating columns, *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2367-2379.
- [38] Mirza, B. S., Sorensen, D. L., McGlinn, D. J., Dupont, R. R., and McLean, J. E. (2017) Dehalococcoides and general bacterial ecology of differentially trichloroethene dechlorinating flow-through columns, *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 4799-4813.
- [39] Duhamel, M., and Edwards, E. A. (2006) Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by Dehalococcoides, *FEMS Microbiol Ecol* 58, 538-549.
- [40] Futagami, T., Okamoto, F., Hashimoto, H., Fukuzawa, K., Higashi, K., Nazir, K. H., Wada, E., Suyama, A., Takegawa, K., Goto, M., Nakamura, K., and Furukawa, K. (2011) Enrichment and characterization of a trichloroethene-dechlorinating consortium containing multiple "dehalococcoides" strains, *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 1268-1274.



(六) 參考文獻

- [41] Yan, J., Im, J., Yang, Y., and Löffler, F. E. (2013) Guided cobalamin biosynthesis supports *Dehalococcoides mccartyi* reductive dechlorination activity, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20120320.
- [42] Simsir, B., Yan, J., Im, J., Graves, D., and Löffler, F. E. (2017) Natural Attenuation in Streambed Sediment Receiving Chlorinated Solvents from Underlying Fracture Networks, *Environ Sci Technol* 51, 4821-4830.
- [43] Bowman, K. S., Moe, W. M., Rash, B. A., Bae, H. S., and Rainey, F. A. (2006) Bacterial diversity of an acidic Louisiana groundwater contaminated by dense nonaqueous-phase liquid containing chloroethanes and other solvents, *FEMS Microbiol Ecol* 58, 120-133.
- [44] Macbeth, T. W., Cummings, D. E., Spring, S., Petzke, L. M., and Sorenson, K. S., Jr. (2004) Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture, *Appl Environ Microbiol* 70, 7329-7341.
- [45] Zhang, Y., Hu, M., Li, P. F., Wang, X., and Meng, Q. J. (2015) Analysis of trichloroethylene removal and bacterial community function based on pH-adjusted in an upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Appl Microbiol Biot* 99, 9289-9297.
- [46] Yang, Y., Capiro, N. L., Marcet, T. F., Yan, J., Pennell, K. D., and Löffler, F. E. (2017) Organohalide respiration with chlorinated ethenes under low pH conditions, *Environ Sci Technol*.
- [47] Suyama, A., Iwakiri, R., Kai, K., Tokunaga, T., Sera, N., and Furukawa, K. (2001) Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes, *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 1474-1481.
- [48] Sung, Y., Ritalahti, K. M., Sanford, R. A., Urbance, J. W., Flynn, S. J., Tiedje, J. M., and Löffler, F. E. (2003) Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp nov., *Appl Environ Microb* 69, 2964-2974.
- [49] Liu, N., Li, H., Li, M., Ding, L., Weng, C. H., and Dong, C. D. (2017) Oxygen exposure effects on the dechlorinating activities of a trichloroethene-dechlorination microbial consortium, *Bioresour Technol* 240, 98-105.
- [50] Zhanaroli, G., Negroni, A., Haggblom, M. M., and Fava, F. (2015) Microbial dehalogenation of organohalides in marine and estuarine environments, *Curr Opin Biotechnol* 33, 287-295.



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

- [51] Freitas, J. G., Rivett, M. O., Roche, R. S., Durrant Nee Cleverly, M., Walker, C., and Tellam, J. H. (2015) *Heterogeneous hyporheic zone dechlorination of a TCE groundwater plume discharging to an urban river reach*, *Sci Total Environ* 505, 236-252.
- [52] Pantazidou, M., Panagiotakis, I., Mamais, D., and Zikidi, V. (2012) *Chloroethene Biotransformation in the Presence of Different Sulfate Concentrations*, *Ground Water Monit R* 32, 106-119.
- [53] Berggren, D. R. V., Marshall, I. P. G., Azizian, M. F., Spormann, A. M., and Semprini, L. (2013) *Effects of Sulfate Reduction on the Bacterial Community and Kinetic Parameters of a Dechlorinating Culture under Chemostat Growth Conditions*, *Environmental Science & Technology* 47, 1879-1886.
- [54] Xinwei, M., Alexandra, P., and Lisa, A. Z. (2017) *The Effects of sulfate reduction on TCE dechlorination by Dehalococcoides-containing microbial communities*, *Appl Environ Microbiol*.
- [55] Men, Y., Yu, K., Baelum, J., Gao, Y., Tremblay, J., Prestat, E., Stenuit, B., Tringe, S. G., Jansson, J., Zhang, T., and Alvarez-Cohen, L. (2017) *Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Reveal the Structure and Dynamics of a Dechlorinating Community Containing Dehalococcoides mccartyi and Corrinoid-Providing Microorganisms under Cobalamin-Limited Conditions*, *Appl Environ Microbiol* 83.
- [56] Geiselbrecht, A. D., Herwig, R. P., Deming, J. W., and Staley, J. T. (1996) *Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget sound sediments*, *Applied and environmental microbiology* 62, 3344-3349.
- [57] Wrenn, B. A., and Venosa, A. D. (1996) *Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure*, *Canadian journal of microbiology* 42, 252-258.
- [58] Berthe-Corti, L., and Bruns, A. (1999) *The Impact of Oxygen Tension on Cell Density and Metabolic Diversity of Microbial Communities in Alkane Degrading Continuous-Flow Cultures*, *Microb Ecol* 37, 70-77.
- [59] Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. (1997) *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of 16S ribosomal DNA.*, *Appl Environ Microbiol* 63, 4516-4522.
- [60] Richardson, R. E., Bhupathiraju, V. K., Song, D. L., Goulet, T. A., and Alvarez-Cohen, L.



(六) 參考文獻

- (2002) *Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques*, *Environmental science & technology* 36, 2652-2662.
- [61] Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007) *Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy*, *Appl Environ Microbiol* 73, 5261-5267.
- [62] Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., and Martin, F. (2009) *454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity*, *New Phytol* 184, 449-456.
- [63] Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., and Triplett, E. W. (2007) *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity*, *The ISME journal* 1, 283-290.
- [64] Edwards, R. A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D. M., Saar, M. O., Alexander, S., Alexander, E. C., Jr., and Rohwer, F. (2006) *Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology*, *BMC genomics* 7, 57.
- [65] Lee, O. O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F. F., Al-Suwailem, A., and Qian, P. Y. (2011) *Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea*, *The ISME journal* 5, 650-664.
- [66] Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P., and Engstrand, L. (2008) *Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing*, *Plos One* 3, e2836.
- [67] Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., and Delong, E. F. (2008) *Microbial community gene expression in ocean surface waters*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3805-3810.
- [68] Keijser, B. J., Zaura, E., Huse, S. M., van der Vossen, J. M., Schuren, F. H., Montijn, R. C., ten Cate, J. M., and Crielaard, W. (2008) *Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults*, *J Dent Res* 87, 1016-1020.
- [69] Manter, D. K., Delgado, J. A., Holm, D. G., and Stong, R. A. (2010) *Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots*, *Microb Ecol* 60, 157-166.
- [70] Lu, L., Xing, D., and Ren, N. (2012) *Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H₂ production from waste activated sludge*, *Water Res* 46, 2425-2434.



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

- [71] Uhlik, O., Wald, J., Strejcek, M., Musilova, L., Ridl, J., Hroudova, M., Vlcek, C., Cardenas, E., Mackova, M., and Macek, T. (2012) *Identification of bacteria utilizing biphenyl, benzoate, and naphthalene in long-term contaminated soil*, *Plos One* 7, e40653.
- [72] Uhlik, O., Musilova, L., Ridl, J., Hroudova, M., Vlcek, C., Koubek, J., Holeckova, M., Mackova, M., and Macek, T. (2013) *Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil*, *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9245-9256.
- [73] Kotik, M., Davidova, A., Voriskova, J., and Baldrian, P. (2013) *Bacterial communities in tetrachloroethene-polluted groundwaters: a case study*, *Sci Total Environ* 454-455, 517-527.
- [74] Hug, T., Gujer, W., and Siegrist, H. (2005) *Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy*, *Water Res* 39, 3837-3848.
- [75] Elkelboom, D. H., and Geurkink, B. (2002) *Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants*, *Water Sci Technol* 46, 535-542.
- [76] Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurkink, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J., Snaidr, J., van der Waarde, J., and Tandoi, V. (2004) *Filamentous Alphaproteobacteria associated with bulking in industrial wastewater treatment plants*, *Syst Appl Microbiol* 27, 716-727.
- [77] Dick, L. K., and Field, K. G. (2004) *Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes*, *Appl Environ Microbiol* 70, 5695-5697.
- [78] Brisson, V. L., West, K. A., Lee, P. K., Tringe, S. G., Brodie, E. L., & Alvarez-Cohen, L. (2012). *Metagenomic analysis of a stable trichloroethene-degrading microbial community*. *ISME J*, 6(9), 1702-1714.



107 年度專案成果績效自評表

107 年度專案成果績效自評表

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

一、專案基本資料

填表日期：107 年 10 月 25 日

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質	專案類別	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
研究主題	☐ 調查 ☒ 整治 ☐ 其他		
申請機構系所	國立成功大學環境工程學系	計畫主持人	吳哲宏
專案名稱	地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡		
專案執行期程	☐ 申請階段 ☐ 期中 ☒ 期末		

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於「結案達成數」欄位中。(僅模場試驗類型專案需填寫工作進度達成數)

(一)學術面

項目			目標達成程度	申請 預估數	工作進 度達成 數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表名稱)
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			
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1		0	0			
		(2)研討會論文							
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告							
		(2)研究報告							
	4.專著 (本數)								
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會							
		(2)成果發表會							
		(3)論壇							
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術								
	(2)技術平台								
B 人才 培育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	1		1	1			
		(2)博士	2		2	2			
	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)							



地層多氯乙烯污染精準生物復育技術：建立脫氯菌生態網絡

(二)產業面

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



107 年度專案成果績效自評表

(三)政策面

項目		目標達成程度	申請 預估 數	工作 進度 達成 數	期中 達成 數	期末 達成 數	結案 達成 率	備註 (說明未達成原因或 其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數	3		0	4		
		收入(仟元)	100		0	110		
	2.諮詢服務	次數						
		收入(仟元)						
B 支援 合作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策						
		(2)法規						
		(3)規範						
		(4)標準						
D 社 會效 益	4.獲得認證(件數)							
	5.獲得獎項(件數)							
	6.提升能源效率(%)							
	7.節能減碳效率(%)							
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						

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

本計畫預期建立厭氧環境三氯乙烯完全脫氯至乙烯的舒服操作區(Comfort Zone)，作為調整現地環境條件的參考，提升生物整治效能。另外，應用次世代高通量定序技術建立添加不同釋氮劑還原脫氯的關鍵微生物菌群資料庫。此資訊可應用於實場地下水生物整治，減少低氯數乙烯累積的風險。且藉由模擬三氯乙烯完全脫氯的厭氧微生物集團生態關係，可預測促進/抑制脫氯菌的共生菌群多樣性，於科學層面預期可獲得全面性的地下水微生物多樣性的瞭解，增進污染微生物學的新知，以用在評估現地生物復育的狀況，有利精準微調菌群結構或環境條件，進而在工程上提高三氯乙烯的整治效率。