

行政院環境保護署

103 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

地下水中含氯有機污染物厭氧生物整治

期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：國立中央大學／生命科學系

計畫主持人：陳師慶 教授

計畫執行期間：102年11月25日起至

103年11月24日

中 華 民 國 103 年 11 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案 計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

■達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

- ☐ 實驗失敗
- ☐ 因故實驗中斷
- ☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐已發表篇； ☐未發表之文稿篇；■撰寫中 1 篇； ☐無

專利：☐已獲得件； ☐申請中件； ☐無

技轉：☐已技轉； ☐洽談中； ☐無

其他：（100 字為限）

3. 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）

旨在於發展地下水含氯有機污染環境之現地生物復育可行性評估與規劃。本計畫的最終標的乃是協助針對臺灣地區的污染場所進行生物復育與整治，未來可實際應用於多氯有機汙染物污染場址，並持續進行相關污染的生物復育基礎與應用性研究，達到降解多氯有機汙染物並迅速整治復育受多氯有機汙染物污染環境之目標。同時可從本計畫所獲得之經驗與成果，推廣至其他多氯有機汙染物染場址之探討與開發。

參與本計畫的學生與人員將可學習到最新之環境生物科技、分子生物科技、生物化學與微生物學知識之整合，並將其應用於環境科學與工程上研究議題。在執行計畫的研究過程中，執行計畫的研發人員與學生

也能從過程中學習到問題分析與實驗設計及如何進行實驗數據之整理、分析及討論等學術訓練，未來可投入生物科技相關產業或繼續在學術領域發展。

綜言之，本實驗室過去數年在應用生物科技、環境微生物以及微生物的生物整治等相關研究已奠定相當的研發能量與基礎，同時也已建立研究污染環境微生物多樣性與菌種之篩選及其相關機制與應用的技術平台，並有許多相關成果與經驗已多次發表於國內外學術會議及國際期刊。本計畫之執行，除了可提供參與人員的專業訓練，獲取各種新的生物科技研究方法，得到微生物學與環境生技的知識與技能之培訓外，對實驗室參與其他研究計畫之學生，以及協同主持人之實驗室參與之同學及研究人員等，均能從此研究中獲得更多面向的環境微生物多樣性與其在綠色科技的關聯之知識與思考。這些專業知識與技能將能提供參與的學生在規劃將來的生涯時，不論是希望繼續留在學術界進一步深造，或是進入相關產業界，均有非常大的助益。

計畫成果中英文摘要

中文摘要

氯化有機溶劑常用於工業之清洗溶劑其具有低可燃、易爆、低沸點及高蒸氣壓等特性，如四氯乙烯(perchloroethene, PCE)、三氯乙烯(trichloroethene, TCE)、1,1,2-三氯乙烷(1,1,2-trichloroethane, 1,1,2-TCA)與四氯甲烷(carbon tetrachloride, CT)等。早期台灣區域土壤及地下水污染防治觀念尚未成熟，導致人為的不當傾倒或是意外洩漏使得氯化有機溶劑造成地下水污染。生物整治法被喻為自然、環保及節能的處理技術，也是目前環境污染整治的趨勢。評估現地生物復育技術可行性其中最重要條件之一為場址本身須具有可降解污染物之微生物。當場址中可降解污染物微生物數量較低或場址整治急迫性高時，可額外添加微生物進行生物強化(Bioaugmentation)整治受污染之場址。受污染之場址皆可能含有可降解污染物之微生物存在，若能於污染降解途徑完整之場址確實鑑定出含氯污染物降解途徑中各階段之脫鹵球菌之種類及數量，將可有助於後續場址現地生物整治設計(採用生物刺激(Biostimulation)或生物強化)或作為未來生物強化之菌種純化來源。

在期末報告的研究執行內容與成果，主要是著重於評估臺南市永康鹽行段設置一模場進行含氯污染物整治試驗，本模場定期採樣偵測結果顯示有監測到含氯污染物降解之趨勢，並產生最終產物乙烯，顯示該模場降解機制完整。模場含氯污染物之降解乃為微生物進行厭氧還原脫氯機制所致。因此本計畫採用 Metagenomics 技術結合 qPCR 進行菌相分析，欲建立完整環境微生物在含氯污染場址之完整生化代謝圖譜，期末成果著重在生物營養鹽添加後是否促進氯化有機污染物降解，並建立完整環境菌相及降解機制分析，這些成果將應用在未來不同的多氯有機污染物污染場址的生物復育研究暨菌相分析工作，作為未來場址全場整治之參考依據亦可作為菌種純化場址之參考來源地點。

Abstract

The chlorinated solvent (PCE, TCE, 1,2,2-TAC, and CT) has ignitable, explosive, low-melting, and high pressure characteristics, and are often used for cleansing solvent in industries. In the past, we did not realize the issue how we can prevent our dwelling environments near soils or groundwater from contamination, thus leading to the accidental leakage of the chlorinated solvent into the groundwater. Bioremediation is a friendly, cost-effective, and safe technique which is commonly used for remediation in contaminated sites. Bioaugmentation is to add exogenous microorganisms with the potential to degrade polluted chemicals. In this study, we hope to detect the presence of one *dehalococcus* species with the ability for degrading the chlorinated solvent, and then harvest it for application of bioaugmentation.

In the mid-term report, our research field trial is located in 臺南市永康鹽行段 decreased to the undetected level the monitoring well, we indicated that the degradation of the chlorinated solvent occurs. To assure the success of bioremediation in our field trial, we need to confirm the presence of *Dehalococoides* for future application. In this study, we will first apply the metagenome and qPCR to detect the change of bacterial community before and after bioremediation, and prove the role of *Dehalococoides* in field trial contaminated with the chlorinated solvent. We herein emphasize that the advantages of metagenome over other molecular techniques are to prove more information about the population of each bacterial genus and even in species within the soils or water, and also to be a fast, and high accurate technique. With this bioremediation proposal, we hope that our biomediation strategies can prove the standard model for the degradation of the chlorinated solvent in field trial.

Key word: Metagenome , The chlorinated solvent , Biomediation

行政院環境保護署

103 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工作

目次

計畫成果報告大綱	1
第一章：計畫緣起與目的	3
1.1 計畫緣起	3
1.2 計畫目的	8
1.3 計畫執行期程與經費	9
第二章：研究方法與過程	10
2.1 模場基本資料	10
2.2 模場暨 BioScreen 系統配置	10
2.3 地下水採樣方法與原因	13
2.3.1 採樣方法	13
2.3.2 分析項目	14
2.4 萃取環境樣品中的總 DNA	15
2.5 Metagenomics 技術利用 16S rDNA 建立污染場址之環境生物菌相	16
2.5.1 多源基因組建庫	16
2.5.2 全基因組建庫	16
2.5.3 建立污染場址之環境生物菌相	16
2.5.4 定序方式暨分析流程	17
2.5.5 分析使用軟體	18
2.6 Metagenomics 分析環境中功能性基因並建立環境菌相	18
2.6.1 定序方式暨分析流程	18
2.6.2 生物資訊分析流程	19
2.6.3 分析使用軟體	19

2.7 即時定量 PCR 絕對定量 <i>Dehalococcoides</i> sp. 的含量	20
2.7.1 即時定量 PCR	20
2.7.2 建立標準曲線	20
2.7.3 計算環境中樣品 <i>Dehalococcoides</i> sp. 數量	21
2.8 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	22
第三章：主要發現與結論	21
3.1 含氯污染場址之基本環境參數分析	23
3.2 含氯污染場址之環境水質分析	25
3.3 含氯污染場址水質之關切汙染物及最終產物分析	28
3.4 含氯污染場址水相樣品中的總 DNA 萃取	30
3.5 構築 Metagenome 分析所需之 16S rDNA 庫	31
3.6 Metagenom 16S rDNA 生物資訊分析	33
3.6.1 原始數據品質檢測	33
3.6.2 Metagenome 菌相分析結果	34
3.7 構築 Metagenome 分析所需之功能性基因庫	41
3.7.1 功能性基因樣本品質檢測	41
3.8 Metagenom 功能性基因暨菌相分析生物資訊分析	42
3.8.1 原始數據品質檢測	42
3.8.2 Trim	42
3.8.3 Merge	43
3.9 MEGAN Analysis 生物資訊分析	43
3.10 LCA 生物資訊分析	44
3.11 KEGG 生物資訊分析	45
第四章：檢討與建議事項	49
參考文獻	53

圖次

圖 1-1 含氯污染物於地下環境中的傳輸型態	4
圖 2-1 模場試驗配置圖	12
圖 2-2 模場灌注模擬結果	12
圖 3-1 監測井水樣之 pH 值變化	23
圖 3-2 監測井水樣之導電度變化	24
圖 3-3 監測井水樣之氧化還原電位變化	24
圖 3-4 監測井水樣之溶氧量變化	25
圖 3-5 主要監測井 BP-02 水樣之 TOC 變化	26
圖 3-6 主要監測井 BP-02 水樣之環境參數變化	27
圖 3-7 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之 TOC 變化	27
圖 3-8 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之環境參數變化	28
圖 3-9 主要監測井 BP-02 水樣之關切汙染物及最終產物分析	29
圖 3-10 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之關切汙染物及最終產物分析	29
圖 3-11 本計畫進行 metagenome 分析之 16S rDNA region	32
圖 3-12 2% Agarose Gel 分析 16S rDNA region	33
圖 3-13 生物復育前後菌相消長變化圖	40
圖 3-14 功能性基因樣本品質檢測結果	41
圖 3-15-1 功能性基因樣本品質檢測結果	44
圖 3-15-2 功能性基因樣本品質檢測結果	44
圖 3-16 Chloroalkane and chloroalkene degradation	47
圖 3-17 Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	47
圖 3-18 Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation	48
圖 4-1 微生物組成在多氯有機汙染物降解過程中所扮演之角色	49

表次

表 1-1 含氯汙染物毒理學特性彙整表	4
表 1-2 IARC 致癌分類表	4
表 1-3 地下水整治方法統計表	5
表 1-4 分子鑑定技術比較	7
表 2-1 整治井基本資料彙整表	11
表 2-2 模場試驗地下水水質採樣規劃表	13
表 2-3 PCR 使用之引子序列	20
表 2-4 即時定量 PCR 引子序列	21
表 3-1 環境水相總 DNA 萃取及品管	30
表 3-2 前人研究環境菌相所分析的 16S rDNA region	31
表 3-3 16S rDNA region 之 PCR 引子設計	32
表 3-4 LCA_Taxonomy profiling table	43
表 3-5 KEGG 代謝途徑統整表	45
表 3-6 KEGG 厭氧代謝途徑統整表	46

**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工作
計畫成果報告大綱**

計畫名稱：地下水中含氯有機污染物厭氧生物整治

計畫執行單位：國立中央大學

計畫主持人(包括協同主持人)：陳師慶、劉仲康、簡志青、馬念涵、王健家

計畫期程：103 年 2 月 24 日起 103 年 11 月 24 日止

計畫經費：2,198,290 元

本報告之架構將主要內容分為四章陳述，包含第一章計畫緣起與目的；第二章研究方法與過程；第三章主要發現與結論以及第四章檢討與建議事項。報告架構內容簡述如下：

(一) 計畫緣起與目的：闡述含氯污染物對環境污染的重要性及與對人體及生物可能之危害，簡單介紹含氯污染物，回顧文獻上有關微生物降解含氯污染物及應用於生物復育等研究報導，說明以生物復育法處理含氯污染物污染場址的可行性與優勢，以及場址的微生物生態與環境因子的影響。最後確立生物復育技術整治含氯污染物污染場址之完整生化代謝圖譜並作為未來本模場之場址全場整治之參考依據亦可作為菌種純化場址之參考來源地點。

(二) 研究方法與過程：詳述本研究目前之研究方法與過程。研究過程中之重要儀器需求與使用方法均詳述於本章節。研究方法涵蓋污染場址之 BioScreen 系統設置、監測含氯污染物及其代謝產物、建立場址總 DNA 之萃取及純化方法、建立利用 Metagenome 分析污染場址之總菌相平台、建立 QRT-PCR 測定功能性基因平台以應用於本計畫之研究工作等。

(三) 主要發現與結論：計畫之結果與發現之整理與呈現。本章節報告此計畫在本期工作中的所獲得之重要成果，同時也闡述如何使用各種分析方法進行實驗，並分析歸納結果。

(四) 檢討與建議事項：計畫目前執行的工作進度與目標均已達到，並就結果進行討論。

第一章：計畫緣起與目的

1.1 計畫緣起

土壤與地下水的污染防治在環境資源的永續發展與利用中是極為重要的一環。當土壤與地下水遭受到污染並且持續擴張，將會危害到我們生活的環境甚至破壞自然生態等。臺灣地狹人稠，但是因為經濟因素，卻又不得不發展各種產業，常常造成各種不同的污染問題，在過去數十年來工商業的迅速發展下，臺灣的土壤與地下水的污染也伴隨著經濟成長而來。這些污染包括重金屬污染農地或水產資源如鎘米污染以及綠牡蠣污染等 (Chen 1991; Jeng et al. 2000; Hsu et al. 2006)，以及有機物污染如戴奧辛或石化產品之污染等 (Chen et al. 2005; Kao et al. 2010a; Wang et al. 2010; Huang et al. 2011)。

含氯有機物是種污染物被大量發現在世界各地的工業區 (David et al., 2014) 因其分子構造密度比水大、高密度、低黏滯性、水中溶解度小、低吸附性、易揮發等特性，故含氯有機化合物通常視為「比水重之非水相液體」(Dense non-Aqueous Phase Liquid，簡稱 DNAPL)，常見的有機溶劑包括四氯乙烯(PCE)、三氯乙烯(TCE)、四氯化碳(CTET)、二氯乙烯(DCE)、二氯乙烷(DCA)及氯乙烯(VC)等，其中重要的是，氯乙烯是比三氯乙烯更危險，對人體的毒性更大。美國癌症研究總署(IARC)將其中 PCE、TCE 及 VC 等多種含氯污染物及其代謝產物分類為「很可能對人體具致癌性(2A)」或「確定對人體具致癌性(Group 1)」(IARC, 2002)。含氯污染物之毒理學特性彙整如表 1-1 所示，IARC 致癌分類為如表 1-2 所示。

DNAPL 進入地下環境後，因其低黏滯度的特性，可以在地表下快速移動；高密度的特性可以在較低的水頭壓力下進入地下水位面；與水的低介面張力使其易穿入土壤細小孔隙或裂縫，導致可穿入較深地層或累積在隙縫中(廖，93 年)，含氯污染物於地下環境中的傳輸如圖 1-1 所示。

DNAPL 滲入未飽和層中部分揮發為氣相，部分微溶於水中，其餘受重力影響向下傳輸至飽和層，在飽和層中持續溶解於地下水而成持久性污染來源(賴，94 年)。綜上所述，DNAPL 的特殊性質及台灣沖積地質之複雜性，對 DNAPL 污染整治作業之困難度及技術層面較油品類或重金屬類高。

表 1-1 含氯汙染物毒理學特性彙整表

關切汙染物	國際癌症研究署 (IARC)	主要影響器官	
		致癌反應	非致癌性反應
氯乙烯	Group 1	肝臟	肝
四氯乙烯	Group 2A	肝臟	肝
三氯乙烯	Group 2A	肝臟/肺	肝/腎
1,1,1-三氯乙烷	Group 3	—	肝
1,1-二氯乙烯	Group 3	—	肝
順-1,2-二氯乙烯	—	—	肝/血
1,1-二氯乙烷	—	—	腎

資料來源:行政院衛生署國民健康局，健康風險評估指引，第二章，p.2-2，92 年。

表 1-2IARC 致癌分類表

致癌分類	說明
Group 1	流行病學證據充分，確定對人體具致癌性
Group 2A	流行病學證據有限或不足，很可能對人體具致癌性
Group 2B	流行病學證據有限，且動物實驗證據有限或不足。
Group 3	流行病學證據不足，且動物實驗證據亦不足或無法歸入其他類別
Group 4	人類及動物均欠缺致癌性或流行病學證據不足，且動物致癌性欠缺

參考資料:IARC, <http://www.iarc.fr/>

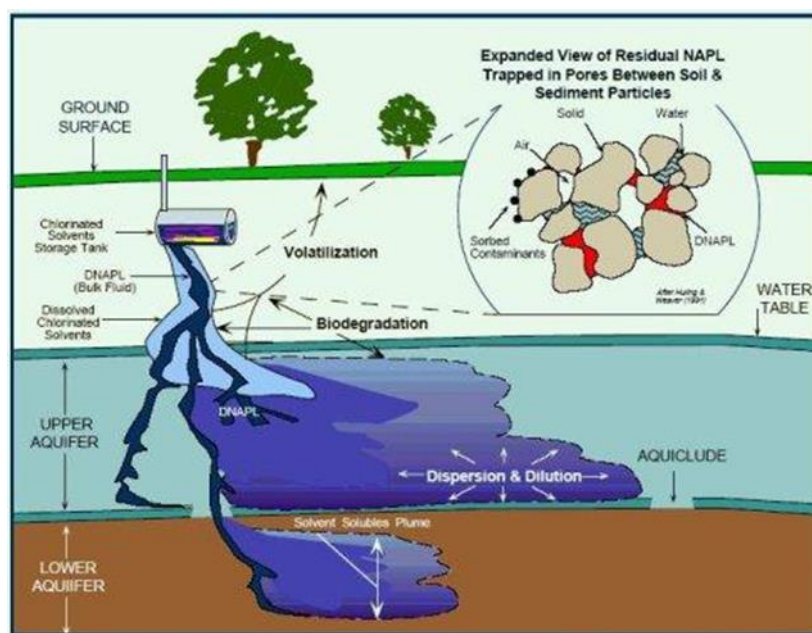


圖 1-1 含氯汙染物於地下環境中的傳輸型態資料來源:US. EPA, 2003

依處理方法而言，含氯有機污染物整治方法可分為物理技術、化學處理技術及生物處理技術等三大類別。物理處理技術係利用污染物的物理特性進行整治作業如表 1-3，涵括土壤開挖法、空氣曝氣法、DNAPL 純相回收、地下水抽除處理法及熱處理技術等。化學處理技術係利用氧化還原機制，降低污染物質、移動性或毒性的方法，包含現地化學氧化法、現地化學還原法、透水性反應牆、零價鐵還原及界面活性劑等。生物處理技術係利用生物代謝轉化並降解污染物，涵蓋植生復育及地下水生物整治等(工業局，92 年)。

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

表 1-3 地下水整治方法統計表

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

備註：各場址選用之整治方案可能為 1 個以上。

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

現地生物整治最簡單的方法乃為自然衰減(Natural attenuation)，其主要作法為針對污染場址定期檢測並評估其污染物降解成效(Singh et al., 1998; Rittmann, 2000)。然而，在臺灣許多場址因其土地利用型態或考量周遭居民健康，無法採用自然衰減，生物強化及生物刺激便為主要應用之整治方法。然而，生物強化及生物刺激往往會發生現場施作成果不如實驗室試驗結果(Imhoff et al., 1995)。生物刺激主要為提供微生物適當的生存環境，藉此增加其整治速率。為提供微生物適當之生存環境，須包括添加氮、磷、微量元素、電子供應者或電子接受者，並需要針對環境 pH、土壤含水分進行控制(Bedient et al., 1994; Fountain et al., 1998)。在某些案例中，鑒於自然環境中微生物數量較少甚至缺乏等情況下，可透過菌種植入增加現場菌種便可提升生物降解成效(Liang et al., 2004; Scott et al., 1998)。此外，在部分場址其土地開發具有急迫性或初期採生物刺激法成效不彰之情況下亦可同時採用生物刺激法結合生物強化。Ademola 等人於 2006 年針對受到 cis-DCE 及 trans-DCE 污染之土壤及地下水進行自然衰減、生物刺激、生物強化及生物刺激結合生物強化等方式進行試驗。試驗結果顯示以兩種結合成效最好，其次為生物刺激、生物強化，最後則為自然衰減。由結果可知，結合兩種生物整治技術，將可得到最佳的整治成效。

本計畫採用 BioScreen 系統搭配專利生物營養鹽 Percol，以達到生物刺激之功效，BioScreen 係屬於地下水循環生物復育系統 (Groundwater Circulation Bio-remediation System, GCB) 之一，GCB 可將受污染的地下水抽至地表，添加營養鹽(或其他物質)或加以處理後再回注到污染區的上游；也可在地表下形成一個內部循環，而不需將地下水抽取到地面，以降低污染物在地表環境的釋出。本法主要的目的乃在控制污染圈的持續擴大、加速污染區域內污染傳輸，並藉由外部或內部循環供應生物分解所須的必要物質，而促進生物分解。Percol 商業型生物營養鹽主要組成為食品級蔬菜油，並含有鈉、鉀、鈣、釋氮劑及維他命 B12 等物質。

實施有效的生物修復策略依賴於微生物與生俱來的群落的動態、結構和功能 (Shah et al., 2013)。根據生物和非生物因素，微生物適應環境和相應的環境條件具有特定的關聯。微生物群落組成在生態系統中分解、代謝人為/外源性化合物，發揮著關鍵作用(Shah et al., 2011)。因此了解微生物群落生態系統內的生物化學轉換，有助於預測未來的環境變遷所造成危機。微生物群落分析可提供生態系統的損害程度評估。許多工業性污染的地區可發現微生

物群落組成改變(Desai et al., 2009)。在含污染物污染的環境中，環境中可分解污染物的細菌可能因此廣泛地分佈在這些環境，進一步進行分解代謝。任何單一微生物是無法完成所有的代謝反應進而降解環境污染物。然而，不同的細菌群落，可共同交互執行所有的代謝反應，完成生物修復 (Shah et al., 2011)。因此，快速、深入分析菌相變動及可能的生物降解代謝途徑為現地生物復育的關鍵步驟。分子鑑定技術比較如表 1-4

表 1-4 分子鑑定技術比較

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

過去微生物學家是利用培養的方式探究環境中微生物的組成，然而 99 % 以上的微生物是無法培養的 (Amann et al, 1995)，因此，80 年代發展出非培養的研究方式 (cultured independend method)，包含 T-RFLP、DGGE、SSCP 以及 cloning and sequencing 等方式研究環境微生物 (Nocker et al., 2007) 以上方式，皆是針對族群共有的目標基因的 amplicons 來分析。而 T-RFLP、DGGE、SSCP 以及 cloning and sequencing 等方式中，以 cloning 和 sequencing 的方法能提供最精確的資訊，然而，在相對高度複雜的環境生態時，必須挑選許多 clone 去進行定序，才足以呈現真實物種組成，例如至少要定序 1000 個的 clone 才足以呈現環境的菌相 (Acinas et al., 2004)。

Metagenomics 是近年來才發展出來的興新學門，主要是透過研究分析環境基因體，進而描繪環境生物的代謝特性。一個完整的環境系統，是由許多種生物所組成，除了看的見的生物之外，當然也包括看不見的微生物族群，這些族群的數量遠比動植物多 (Kimura, 2006)，然而，如要描繪一個真實的環境生化代謝圖譜，最有效的方式就是直接萃取環境中的總 DNA 或 RNA 加以分析，藉由基因體的資訊，對環境做全面性的了解。

一般來說，一群微生物可能是相互合作降解環境污染物。然而，不是所有菌種可降解各種各樣的污染物，可藉 Metagenomics 測定在污染廠址內具有分解污染物潛力菌種種類和其在所有菌種種類分佈比率，然而透過分析工業污染場地的微生物群落基因序列，並經由生物分類資訊軟體分析，可提供污染物及其化合物存在的污染場址，其微生物群落組成。這種做法將有利於鑑定是否具有特定微生物，參與降解途徑的關鍵生化反應步驟。這項研究的目的是評估內生性土壤及水體微生物群落，並預測受污染的場址之微生物復育前和後的菌相分析，當我們對於環境中菌相的分佈以及優勢菌種可以有非常完整瞭解後，便可有利於特定菌種的分離、純化與培養，並進而利用這些菌種來進行各類環境污染的生物復育。

1.2 計畫目的

地下水含氯有機物汙染物因其低水溶性及比重大於水等特性，被視為難去除的污染物之一。現地生物整治費用較離地處理低廉、可持續降解氧化後低濃度含氯有機物、將污染物轉為無害物質等優點。本計畫模場透過連續式 BioScreen 生物灌注系統、專利生物製劑 (Percol®)，另配合厭氧微生物鑑定

等，建立完整系統評估監測機制，使現地地下水中含氯有機污染物厭氧生物整治達最佳化。此外，鹵化烯烴生物厭氧代謝過程中，鹵化速率至二氯乙烷(DCA)與二氯乙烯(DCE)時大幅趨緩，推究其原因係進行該階段脫氯的特定菌種有限，冀透過本模場之菌種鑑定發現適合臺灣在地特定脫氯菌，找出還原脫氯的關鍵菌種。

主要研究目標如下：

- 利用加強式現地生物復育技術探討地下水中含氯有機污染物生物降解途徑及相關環境控制參數
- 利用 Metagenomics 建立污染場址之環境生物菌相，加強含氯污染物生物降解研究，提供更深入的可行性評估
- 利用 QRT-PCR 定量 *Dehalococcoides* 菌之數量及測定還原脫氯基因 *vcrA*、*bvcA*、*tceA* 之表現量，預測污染場址脫氯效能
- 透過 Metagenomics 結合 qPCR，利用其高解析度及高通量的特性，提高菌種鑑定效率及準確度，釐清場址菌種分布及其相關性，提高未來進行生物強化時菌種純化存活率。

1.3 計畫執行期程與經費

本計畫執行期程自中華民國 103 年 2 月 24 日至中華民國 103 年 11 月 24 日止，計畫執行總經費核定為新台幣 220 萬元整。

第二章：研究方法與過程

2.1 模場基本資料

依據環保局 101 年計畫水力傳導係數(K)介於 1.23×10^{-6} m/s 至 9.83×10^{-6} m/s，平均水力傳導係數為 3.68×10^{-6} m/s，透過場址量測作業，求得水力坡降(I)約為 0.010，由於場址主要為粉土夾黏土，故推估孔隙率(n)約為 0.45，根據達西定律(Darcy's Law)，計算本場址平均地下水流速約為 2.58 m/yaer。

$$V = K \times I / n$$

$$V = 3.68 \times 10^{-6} \times 0.010 / 0.45 = 8.19 \times 10^{-8} \text{ m/s} \doteq 0.007 \text{ m/day}$$

本場址相關水力參數如下：

- ✧ 水力傳導係數(Hydraulic conductivity, K)： 3.68×10^{-6} m/sec。
- ✧ 導水係數(Transmissivity, T)： 1.91×10^{-5} m²/sec。
- ✧ 儲水係數(Storage coefficient, S) 0.0105。
- ✧ 抽水速率 1.7 L/min 時，影響半徑為 4 公尺。
- ✧ 場址流速：每年 2.58 公尺。
- ✧ 地下水流向：南向北或南向西北流。
- ✧ 地下水位：約介於地表下 1.4 至 2.1 公尺間。

2.2 模場暨 BioScreen 系統配置

本場址位於台灣南部一模場試驗場址，該場址因遭人棄置廢液造成該地區地下水中含有 PCE、TCE 及 1,1,2 三氯乙烷等污染物，由於汙染歷史較為年久，目前未飽和層中並無含氯汙染物存在。本模場地下水水位約 2.0~2.2m，水力傳導係數(K)介於 1.23×10^{-6} m/s 至 9.83×10^{-6} m/s，地下水流速約為 2.58 m/yaer。本案模場設計圖 2-1 所示，其中包含 4 口監測井 BP-01、BP-02、BP-03 及 EPB-MW1DA；4 口灌注井 I01、I02、I03 及 I04；1 口抽水井 E01。

BP-01 位於模場地下水流向之上游，其目的作為環境背景監測用途，BP-

02 及 EPB-MW1DA 為模場試驗主要監測井(表 2-1)。本模場 BioScreen 系統係屬於地下水循環生物復育系統 (Groundwater Circulation Bio-remediation System, GCB) 之一，GCB 可將受污染的地下水抽至地表，添加營養鹽(或其他物質)或加以處理後再回注到污染區的上游；也可在地表下形成一個內部循環，而不需將地下水抽取到地面，以降低污染物在地表環境的釋出。本法主要的目的乃在控制污染圈的持續擴大、加速污染區域內污染傳輸，並藉由外部或內部循環供應生物分解所須的必要物質，而促進生物分解。

運作灌注方式為抽取井(E01)抽取地下水後至控制系統內加入生物藥劑(percol)再平均回注 4 口灌注井內，控制系統為 24 小時持續運轉，運轉過程中每小時藥劑灌注量約為 100ml，抽取流量控制為每小時約 1.2m³。percol 主要成分為食品級蔬菜油、鈉、鉀、鈣及維他命 B12 等物質，同時含有乳酸、谷氨酸等迅速分解之釋氮基質、另有腐植酸、黃腐酸等緩慢分解之釋氮物質，可提供現地微生物適當的電子供應者及營養鹽，促進含氯有機污染物還原脫氯降解為乙烯或乙烷等無害物質，因此透過主要監測井可進一步了解厭氧還原脫氯途徑。

根據地下水流方向，於污染團上游設置 3 口灌注井，並於污染中游設置抽水井，下游設置 1 口灌注井，透過水力環境的控制，將灌注藥劑有效的傳輸至由整治井所圍起來的整個反應區，如圖 2 所示。由現場調查結果顯示地面下 8-17 m 均有污染濃度，其中最高濃度之深度為 12 m，故整治井設置深度為 14 m，開篩長度考量灌注壓力及流體情況，開篩長度設定於 5 m 長(9-14 m)，抽水井及灌注井開篩深度均相同。為能使藥劑可以快速流布反應區域，設計灌注井間距為 1 m，灌注井及抽水井間距為 1.5 m，透過水力計算在低流速抽水(0.6 m³/hr)的情況，在 1-2 月便可使藥劑流布反應區。

表 2-1 整治井基本資料彙整表

No.	功能	數量(口)	井徑(吋)	井深(m)	開篩(m)
1	抽水井	1	2	14	9-14
2	灌注井	4	2	14	9-14
3	監測井	4	2	14	9-14
小計		9	—	—	—

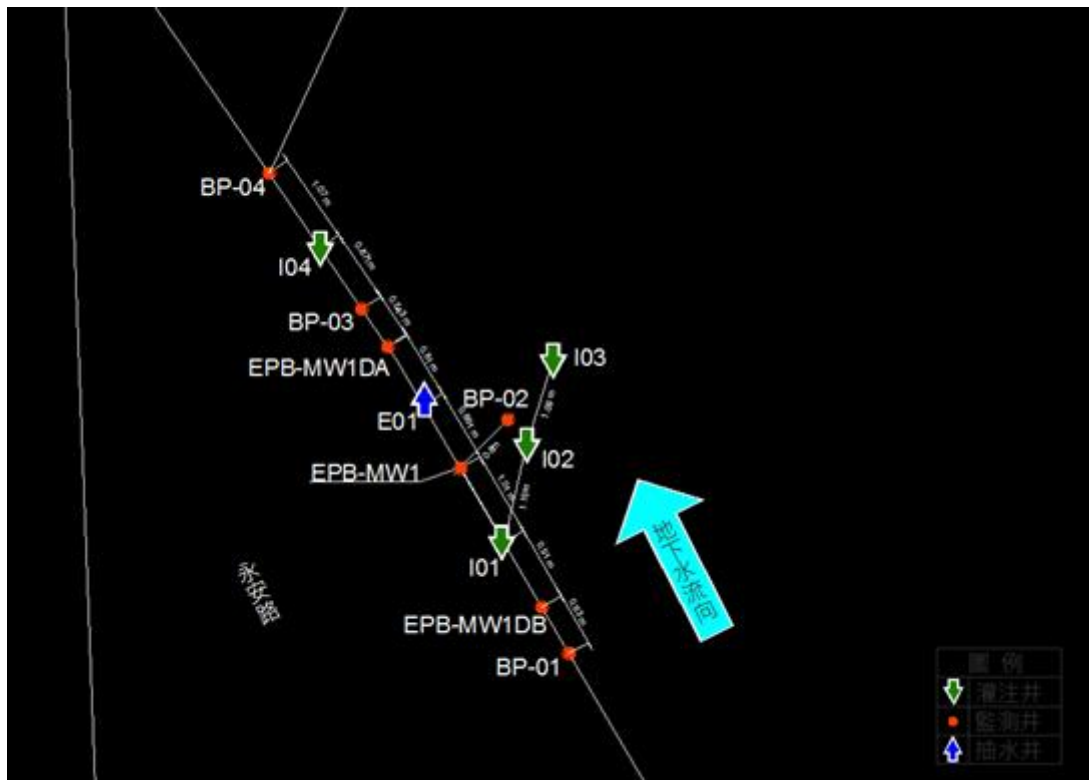


圖 2-1 模場試驗配置圖

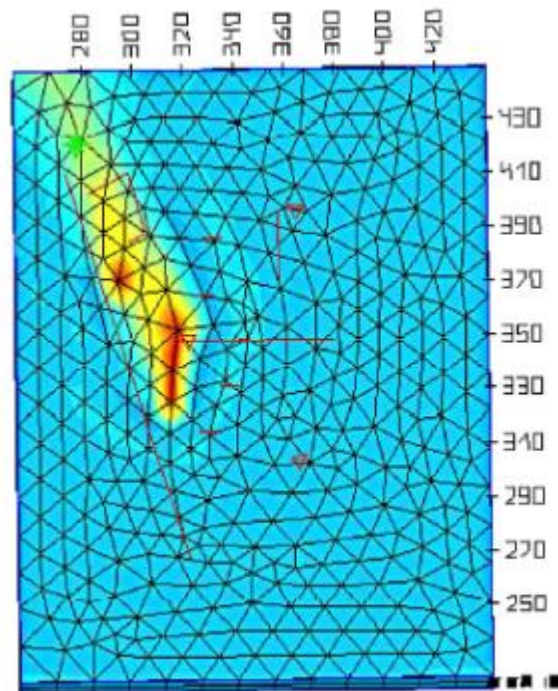


圖 2-2 模場灌注模擬結果

2.3 地下水採樣方法與原因

本研究為利用厭氧還原脫氯機制進行污染生物降解，分析項目將分成環境分析項目、關切污染物及微生物相分析。透過厭氧環境參數的採樣分析，可用來確認厭氧還原脫氯的狀態，並能回饋地下環境情況，藉以調整模場控制參數。本研究水質分析將依據行政院環境保護署環境檢驗所(NIEA)公告之地下水採樣及分析方法執行。

為能比較系統運作前後差異，微生物相分析將於系統啟動前採樣 1 次，系統運作穩定後採樣 1 次，共採 2 次，系統運作穩定需依據地下水質參數監測結果加以評估，預定為系統運轉 6 個月後進行採樣。模場試驗地下水水質採樣規劃表如表 2-2。

表 2-2 模場試驗地下水水質採樣規劃表

分析項目	運轉前	運轉中					運轉後	小計
	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月-10 月	
一般項目 (總有機碳(TOC)、總鐵(Fe)、 二價鐵(Fe^{2+})、硝酸鹽(NO_3^-)、 亞硝酸鹽(NO_2^-)、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、 氯離子(Cl^-)、硫酸鹽(SO_4^{2-}))	1	4	4	4	1	1	3	18
關切污染物 (VOCs)	1	4	4	4	2	2	3	20
最終產物 (甲烷(CH_4)、乙烯(C_2H_4))	1	4	4	4	2	2	3	20

2.3.1 採樣方法

分析項目包含揮發性有機物故模場觀測井採樣將採用「微洗井」方式進行，減少不必要的擾動造成濃度的偏差，為配合厭氧環境水樣採集利用氮氣(99.99%)鋼瓶作為微洗井氣體來源，減少曝露於氧氣中造成的水質改變，採樣深度將設定於井篩中段，以 0.1-0.5 L/min 的小抽水率抽水，控制最大水位洩降 $<0.125 \text{ Ls}$ (Ls 代表井篩長度)。在汲水期間同時測定現場水質變化，待水質穩定後進行裝樣及保存，水質穩定的標準為連續測定數值變動需符合 pH

值 ± 0.2 、DO $\pm 10\%$ 及 ORP ± 20 mV 為穩定。

地下水水樣之保存及運送方法均照 NIEA 公告之規定進行，微生物相水樣採樣水量為 20 L 採集後利用氮氣灌入樣品瓶頂空，以 4°C 保存運送至前處理實驗室利用 0.22 μ m 孔徑之濾膜過濾，暫存於-80°C 保存箱中，運用至分析實驗室進行後續分析。

2.3.2 分析項目

(1) 現場分析項目

水溫(T)

導電度(EC)

溶氧(DO)

氧化還原電位(ORP)

pH 值

(2) 實驗室一般分析項目

環境參數

總有機碳(TOC)、鐵(Fe)、錳(Mn)、硝酸鹽(NO_3^-)、亞硝酸鹽(NO_2^-)、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、氯離子(Cl^-)、硫酸鹽(SO_4^{2-})

關切污染物

四氯乙烯(PCE)、三氯乙烯(TCE)、二氯乙烯(DCE)、氯乙烯(VC)

最終產物

甲烷(CH_4)、乙烯(C_2H_4)

本計畫水質分析將依據行政院環境保護署環境檢驗所(NIEA)公告分析方法執行。

2.4 萃取環境樣品中的總 DNA

實驗步驟為將 20 L 之水樣採集後利用氮氣灌入樣品瓶頂空，以 4°C 保存運送至前處理實驗室利用 0.22 μm 孔徑之濾膜過濾，將過濾模暫存於 -80 °C 保存箱中，之後利用去離子水沖提濾膜上之微生物並利用 PowerWater® DNA Isolation kit 萃取 DNA，其操作步驟如下：

- (1) 把濾膜放入到 5ml PowerWater® Bead Tube 中。
- (2) 往 PowerWater® Bead Tube 加入 1 ml PW1 溶液。
- (3) 把 PowerWater® Bead Tube 安裝在 MO BIO 渦旋儀適配器並最以大轉速渦旋振盪 5 分鐘。
- (4) 室溫 $\leq 4000g$ 離心 1 分鐘。
- (5) 使用吸取上清，並轉移到一个乾淨的 2ml Collection Tube 中並以 13000g 離心 1 分鐘。
- (6) 加入 200 μl PW2，稍微渦旋混勻，4°C 存放 5 分鐘。
- (7) 13000g 離心 1 分鐘並避開沉澱轉移上清到一个乾淨的 2ml Collection Tube。
- (8) 加入 650 μl PW3，渦旋混勻。
- (9) 提取 650 μl 上清到一个 Spin Filter 中，13000g 離心 1 分鐘。棄去濾液重複上述步驟直到過濾完所有上清液。
- (10) 把 Spin Filter 放到一个乾淨的 2ml Collection Tube 中。
- (11) PW4 使用前先搖勻。加入 650 μl PW4，13000g 離心 1 分鐘。
- (12) 棄去濾液，加入 650 μl PW5 溶液，13000g 離心 1 分鐘。
- (13) 棄去濾液，13000g 離心 2 分鐘，充分甩乾沖洗液。
- (14) 把 Spin Filter 放到一个乾淨的 2ml Collection Tube 中。
- (15) 加入 100 μl PW6 到離心柱白色濾膜中心。
- (16) 13000g 離心 1 分鐘，此時 DNA 即成功萃取。

(17) DNA (-20℃-80℃) 保存。

(18) 使用 NanoDrop (Thermo) 測定 DNA 濃度與品質並以 1.2 % 瓊脂膠體電泳分析產物。

2.5 Metagenomics 技術利用 16S rDNA 建立污染場址之環

境生物菌相

2.5.1 多源基因組建庫

(1) 樣本 DNA 分別以 F27 & R534、F519 & R926 及 F968 & R1492 三對引子進行 16S rRNA V1-V3、V4-V5、V6-V9 PCR 放大。其產物分別為 508 bp、412 bp、524 bp。

(2) 以 1.2 % 瓊脂膠體電泳分析產物再以 Agencount® RNAClean® XP Purification Beads 純化 PCR DNA 產物。

2.5.2 全基因組建庫

(1) 樣本 DNA 以 SOLID™ Library Micro Column Purification Kit 純化後以 Covaris S220 進行物理性碎裂，以 2 % 瓊脂膠體進行電泳並將 450bp 切割進行膠體萃取。

(2) 以 Agencount® RNAClean® XP Purification Beads 純化。

(3) 進行端點修補使用 End Repair Master Mix 於 25℃ 反應 30 分鐘後再以 70℃ 反應 10 分鐘。

2.5.3 建立污染場址之環境生物菌相

(1) 將多源基因組及全基因組建庫後之 DNA 進行 adapter 接合與放大。

(2) Adapter 接合使用 Ligation Master Mix 於 25℃ 反應 30 分鐘後再以 70℃ 反

應 10 分鐘。

(3) 以 Agencount® RNAClean® XP Purification Beads 純化 Ligated DNA。

(4) library 擴增進行使用 Amplification Master Mix 於 72°C 反應 2 分鐘後再以 (94°C/30 秒、60°C/30 秒、72°C/60 秒)12 循環，最後以 72°C 反應 5 分鐘。

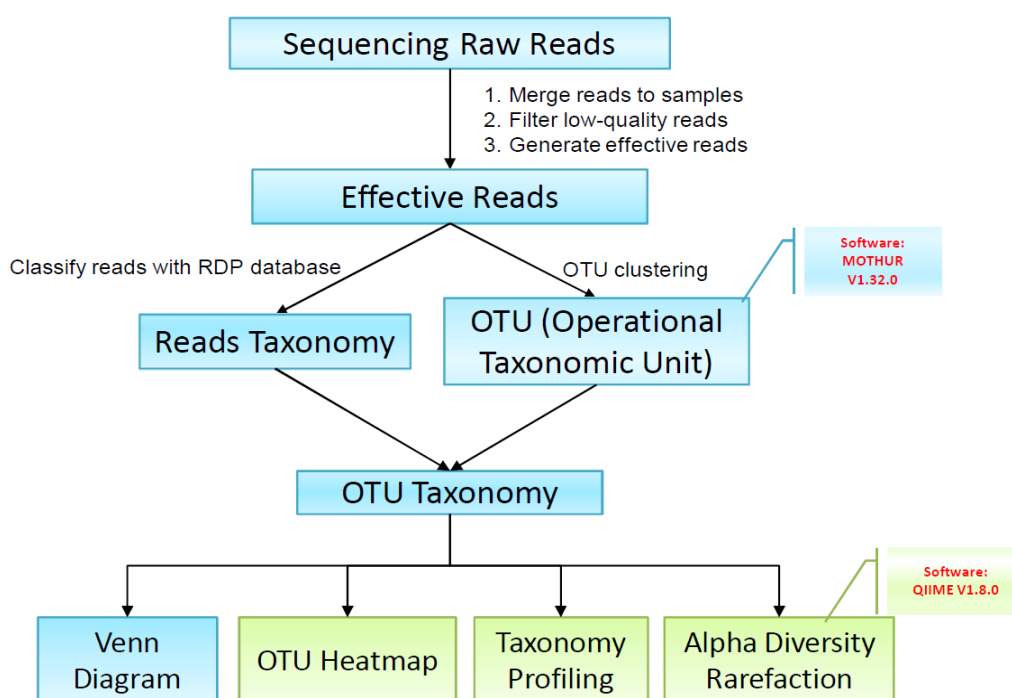
(5) 以 Agencount® RNAClean® XP Purification Beads 純化擴增 library。

(6) 定量是以 Qubit® 2.0 Fluorometer 並搭配 Quant-iT dsDNA High Sensitivity AssayKit 進行測量。定性則是使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 搭配 Agilent HighSensitivity DNA kit 檢測 library 片段大小分佈。

(7) 所構築之 library 以 Illumina MiSeq System 2 x 300 bp kit 進行雙端定序 (Paired-end Sequencing)。

2.5.4 定序方式暨分析流程

由於 MiSeq System 進行 2 x 300bp Paired – end Sequencing，經由合併 (merge) 雙端序列可獲得較長的 read，可模擬 Roche 454 long read 平台，故所構築之 library 以 Illumina MiSeq System 上機進行 2 x 300bp Paired – end Sequencing 定序。



2.5.5 分析使用軟體

OUT 分析使用軟體 MOTHUR V1.32.0，群落分析使用 QIIME V1.8.0。

2.6 Metagenomics 分析環境中功能性基因並建立環境菌相

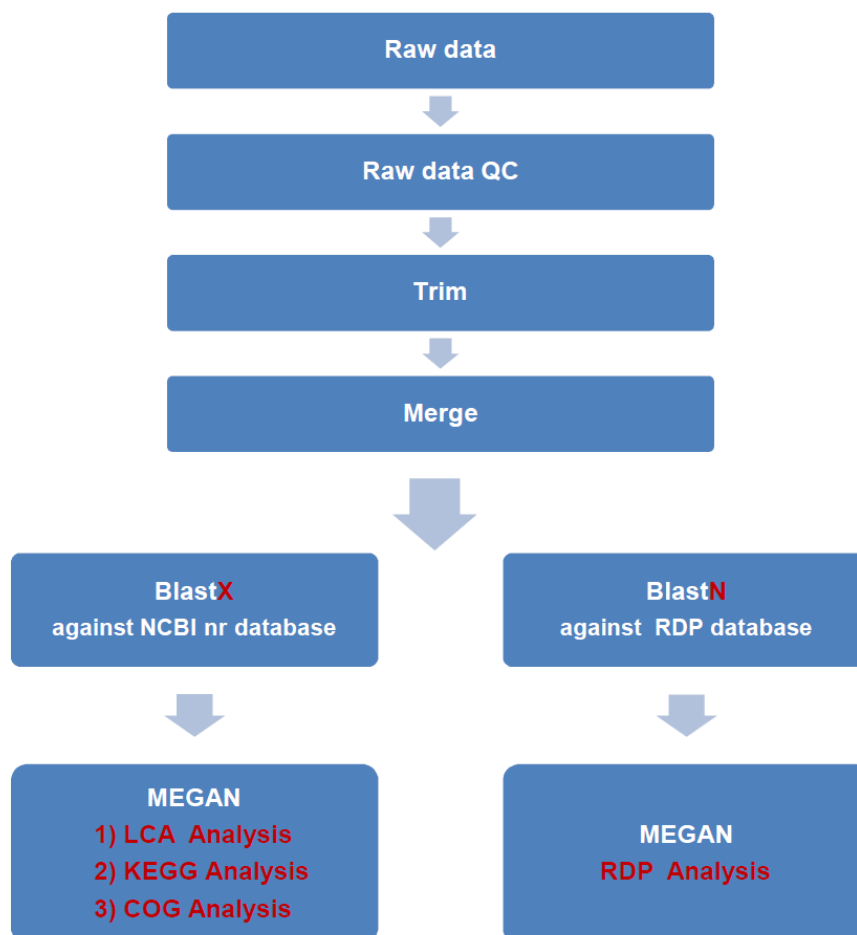
2.6.1 定序方式暨分析流程

如下圖，以 Covaris S220 先將 DNA 打斷，接著使用 Ovation Ultralow DR Multiplex System 1-96 (NuGEN) 將打斷後的 DNA 構築為 library，其後使用兩套系統進行 library 品質的檢測其濃度與品質。

一套為 Qubit® 2.0 Fluorometer，搭配其 High Sensitivity Kit，另一套為 Agilent 2100Bioanalyzer，使用其 DNA 1000 Kit 進行檢測，確認 library 品質良好後即可進行定序。



2.6.2 生物資訊分析流程



上圖為生物資訊分析流程，定序所獲得之原始數據首先進行品質檢測，以確定其品質可往下進行後端分析，接著設定參數將低於QV30的序列去除，亦即將定序錯誤率高於 1/1000 的序列修剪掉，保留高品質的數據，確保後端分析結果的可信度。由於組裝(de novo assembly)時，read 長度較長其組裝效果優於長度短的 read，故使用修剪後的 paired reads，根據兩端序列中間是否有 overlap 的區段先進行 merge，將 F 端與 R 端組裝成單一更長的 read，再將此 merged reads 與 not merge reads 進行後端分析。

備註： Quality Value， $QV = -10\log_{10}(Pe)$, Pe 為定序可能的錯誤率。

2.6.3 分析使用軟體

使用 CLC Genomics Workbench 7.0 及 MEGAN5 軟體進行分析

2.7 即時定量 PCR 絕對定量 *Dehalococcoides* sp.的含量

2.7.1 即時定量 PCR

本計畫以 SYBR Green 法進行絕對定量 *Dehalococcoides* sp.的含量，首先利用 Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA)針對 *Dehalococcoides* sp. 設計其特定的引子。設定此軟體的搜尋條件為(1)擴增產物的長度在 50-150 bp，(2)引子的 T_m 值為 58-60℃，(3)GC 的含量百分比在 30-80 mol%，沒有三個以上連續的 G 或 C。藉由 NCBI BLAST 的分析測試引子對 *Dehalococcoides* sp.的專一程度。

表 2-3. PCR 使用之引子序列

Gene	Primer sequence ^a (5'→3')	reference
<i>Dehalococcoides</i> 16 S rRNA gene	Dhc730FgCggTTTTCTAggTTgTC Dhc 1350R CACCTTgCTgATATgCgg	He, 2003

^af, forward primer; r, reverse primer;

GC clamp, CgCCCGCCgCgCgCggCgggCggggCgggggCACggggggg

2.7.2 建立標準曲線

利用 Dhc730F 與 Dhc 1350R 這組引子進行 PCR 放大環境中 *Dehalococcoides* sp. 的 16S rRNA 基因片段。將此 PCR 產物接合到 pGEM-T Easy Vector (50ng/μl)上，進行定序確認物種。將確定為 *Dehalococcoides* sp.的質體進行後續的標準曲線建立。

設立 4 種以上不同稀釋倍數的樣本。抽取包含 *Dehalococcoides* sp.序列的質體後，取 5 μL 原始樣本(標準品)加入 45 μL 滅菌過濾的 ddH₂O 先行稀釋 10 倍，之後再以此稀釋 10 倍的樣本為原液進行序列稀釋。依下列方程式 (1)，將序列稀釋的各種濃度換算成 gene copies，做出一條標準曲線(gene copies 對 Ct 值做圖)，此研究進行三重複的反應以做出較為準確的標準曲

公式(1)針對已知濃度 DNA 標準品換算 gene copies (Ritalahti et al., 2006)

$$\text{gene copies} = (\text{DNA concentration [ng/}\mu\text{l]}) \left(\frac{1\text{g}}{1000^3\text{ng}} \right) \left(\frac{1\text{ molbp DNA}}{660\text{ g DNA}} \right) \\ \times \left(\frac{6.023 \times 10^{23}}{\text{molbp}} \right) \left(\frac{1\text{ copy}}{\text{plasmid size [bp]}} \right) \times (\text{volume of template } [\mu\text{l}])$$

接下來以所建立之標準曲線為基準，和所欲檢測的樣品一同進行 realtimePCR，再將所得到樣品數值與標準曲線對照，即可得知樣品中 *Dehalococcoides* sp. 數量。

表 2-4. 即時定量 PCR 引子序列

引子名稱	引子序列	reference
DHC1200F	CTggAgCTAATCCCCAAAgCT	Ritalahti, <i>et al.</i> , 2006
DGC1271R	CAACTTCATgCaggCggg	

2.7.3 計算環境中樣品 *Dehalococcoides* sp. 數量

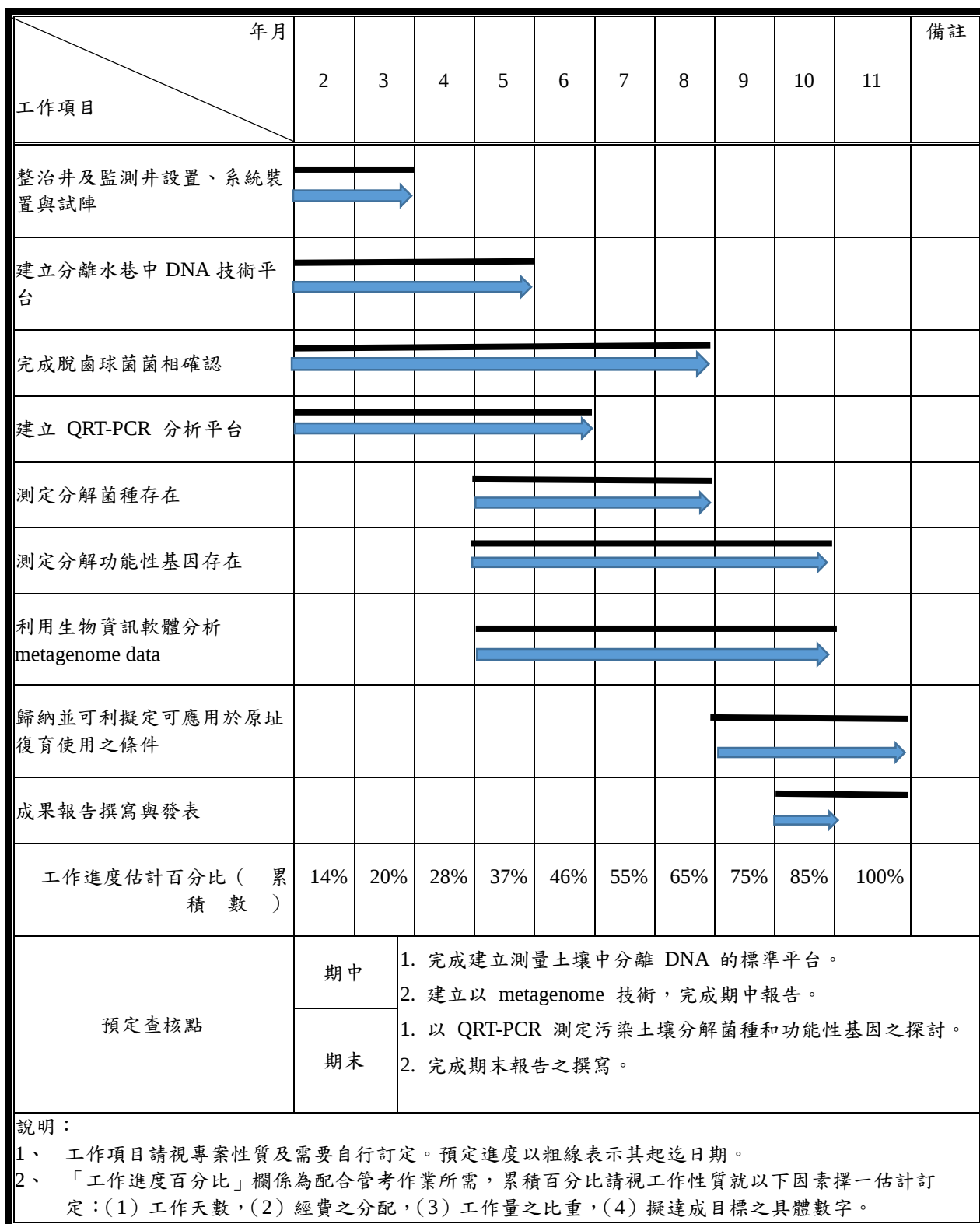
利用下方公式(2)，將環境 DNA 所測得的 Ct 值，利用標準曲線找出相應的 gene copies 數目，並換算成每 L 地下水樣品中有多少 *Dehalococcoides* sp. gene copies 數目。

公式(2)環境中樣品 gene copies 換算公式 (Ritalahti *et al.*, 2006)

gene copies per L sample

$$= \frac{(\text{gene copies per reaction mix}) \times (\text{volume of DNA } [\mu\text{l}])}{(2\text{ }\mu\text{l DNA per reaction mix}) \times (\text{L sample used})}$$

2.8 研究進度及預期完成之工作項目(甘特圖)



第三章：主要發現與結論

3.1 含氯污染場址之基本環境參數分析

利用中華民國行政院環境保護署環境檢驗所(NIEA)公告之地下水採樣及分析方法執行。分析項目包含水溫(T)、導電度(EC)、溶氧(DO)、氧化還原電位(ORP) 及 pH 值，監測井分別為 BP-01、BP-02、BP-03、BP-04 及 EPB-MW1DA。BP-02 及 EPB-MW1DA 為主要監測井。

圖 3-1 為監測井水樣之 pH 值變化；其他基本環境參數分析如：圖 3-2 監測井水樣之導電度變化、圖 3-3 監測井水樣之氧化還原電位變化、圖 3-4 監測井水樣之溶氧量變化。

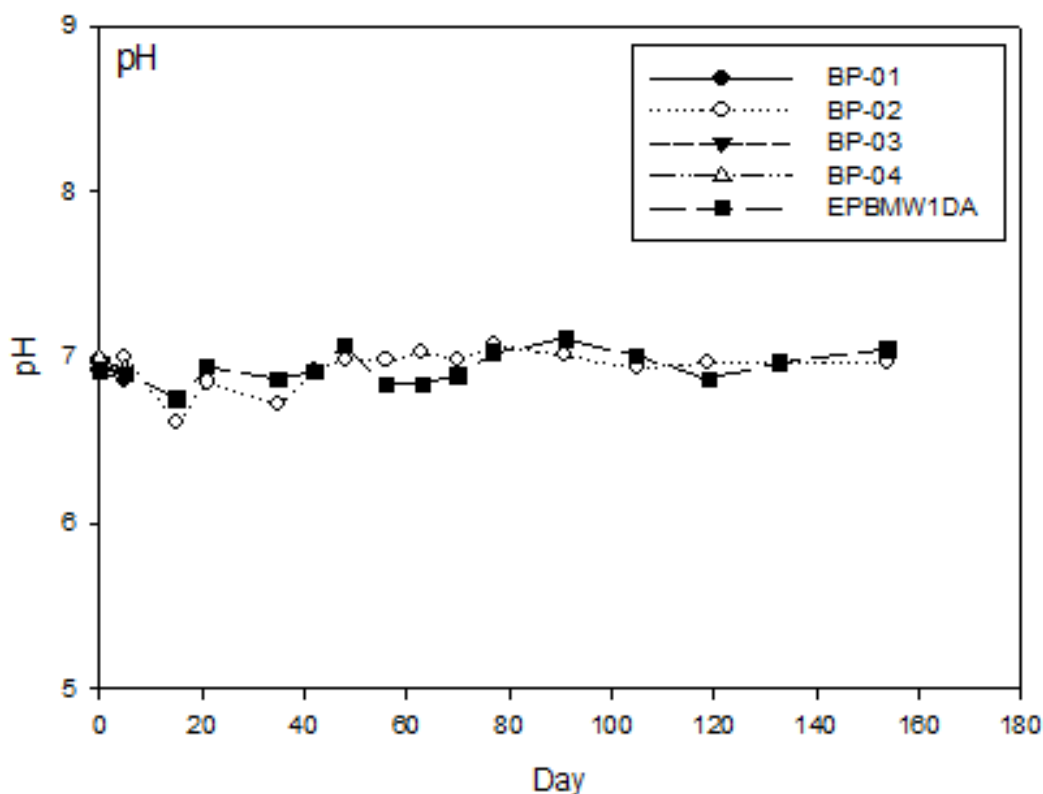


圖 3-1 監測井水樣之 pH 值變化

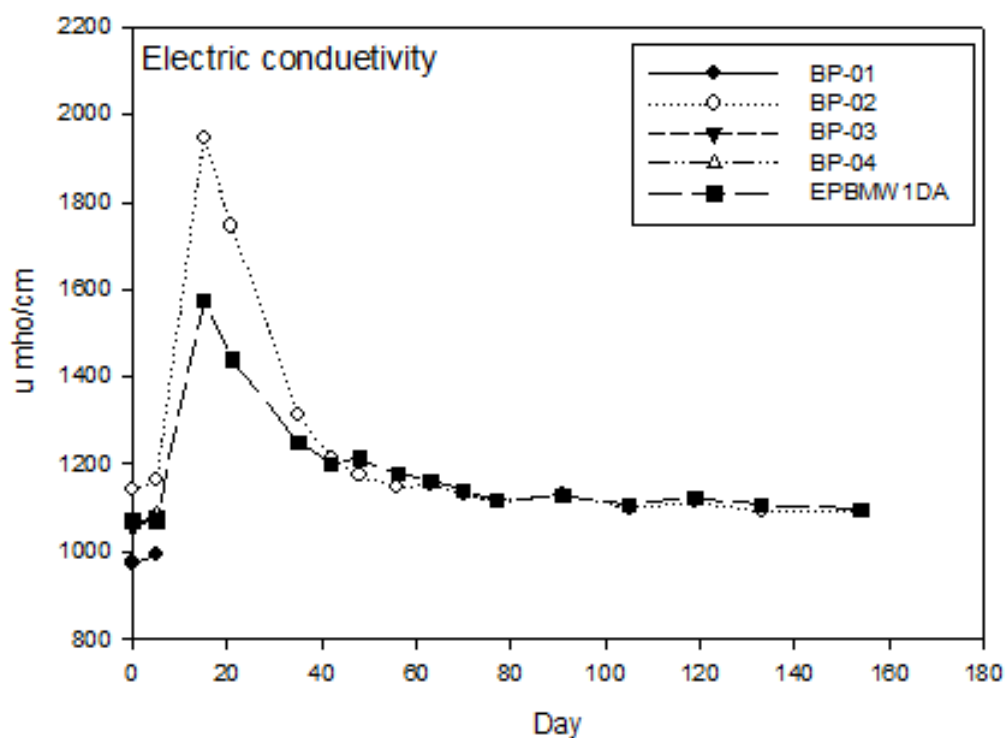


圖 3-2 監測井水樣之導電度變化

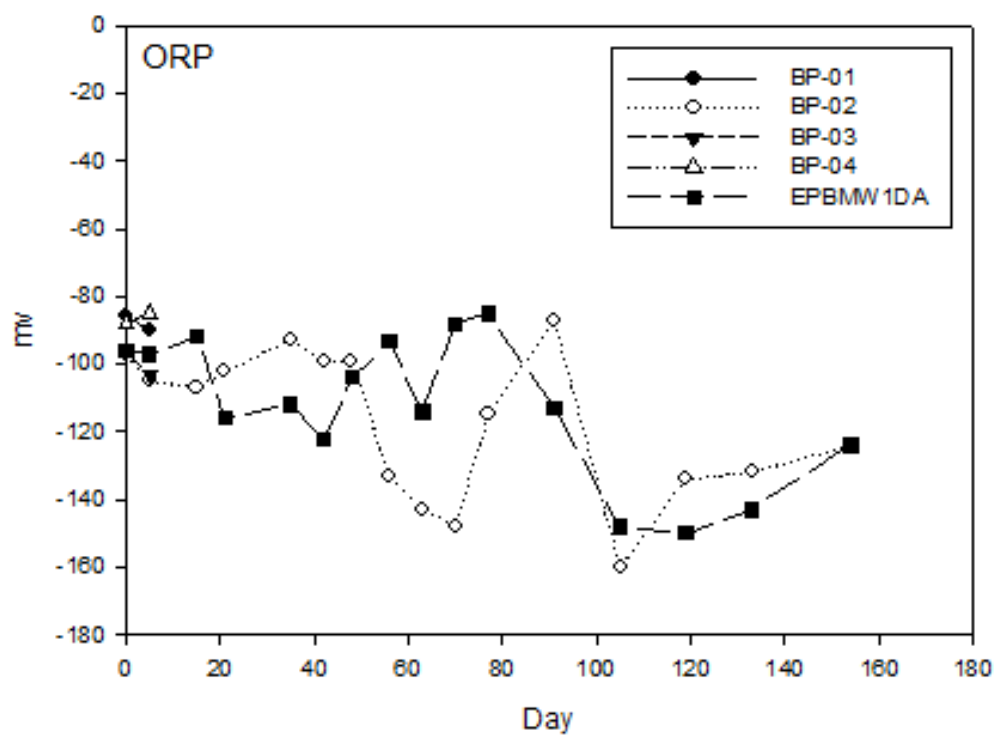


圖 3-3 監測井水樣之氧化還原電位變化

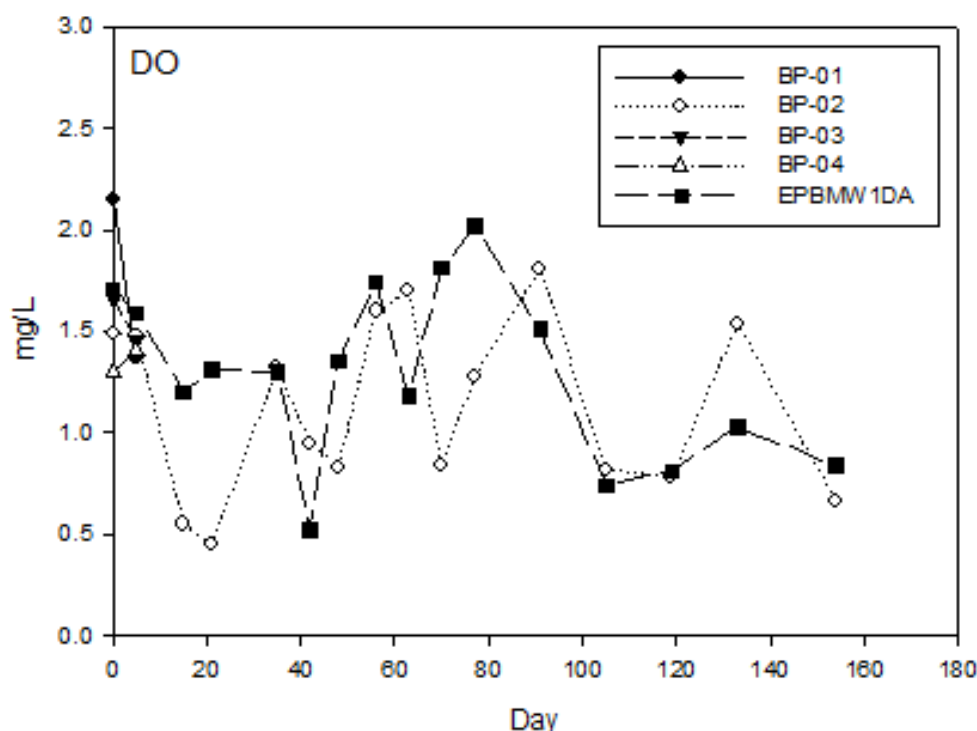


圖 3-4 監測井水樣之溶氧量變化

鑒於場址污染歷程久遠且並無針對場址地下水進行調查，因此整治污染場址前，須先釐清場址目前污染狀況，及相關背景資料調查，由於進行生物整治工作，本計畫需額外添加生物營養鹽，為證明其並無二次污染疑慮及改變地下水質，結果顯示地下水之基本環境參數其背景值與添加生物營養鹽後 pH 值並無顯著差異，導電度於添加營養鹽後增加，其因生物營養鹽中有許多提供微生物生長之電子供應者，隨著降解的過程中微生物利用其生長後導電度也回歸環境背景值，氧化還原電位與溶氧量則維持於環境自然變化之範圍內，足見本生物營養鹽並無二次污染及改變地下水質之疑慮。

3.2 含氯污染場址之環境水質分析

利用中華民國行政院環境保護署環境檢驗所(NIEA)公告分析方法執行。分析項目包含總有機碳(TOC)、鐵(Fe)、錳(Mn)、硝酸鹽(NO_3^-)、亞硝酸鹽(NO_2^-)、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、氯離子(Cl^-)、硫酸鹽(SO_4^{2-})，監測井分別為 BP-02 及 EPB-

MW1DA。

圖 3-5 為主要監測井 BP-02 水樣之 TOC 變化、圖 3-7 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之 TOC 變化，利用生物刺激法所添加之 percol 生物營養鹽主要成分為食品級蔬菜油、鈉、鉀、鈣及維他命 B12 等物質，同時含有乳酸、谷氨酸等迅速分解之釋氮基質、另有腐植酸、黃腐酸等緩慢分解之釋氮物質，可提供現地微生物適當的電子供應者及營養鹽，促進含氯有機汙染物還原脫氯降解為乙烯或乙烷等無害物質，由結果所示添加生物刺激營養鹽後，總有機碳含量增加，可以幫助微生物生長，進而加速含氯汙染物質降解。其他鐵(Fe)、錳(Mn)、硝酸鹽(NO_3^-)、亞硝酸鹽(NO_2^-)、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)、氯離子(Cl^-)、硫酸鹽(SO_4^{2-})，如下圖 3-6、圖 3-8 所示。

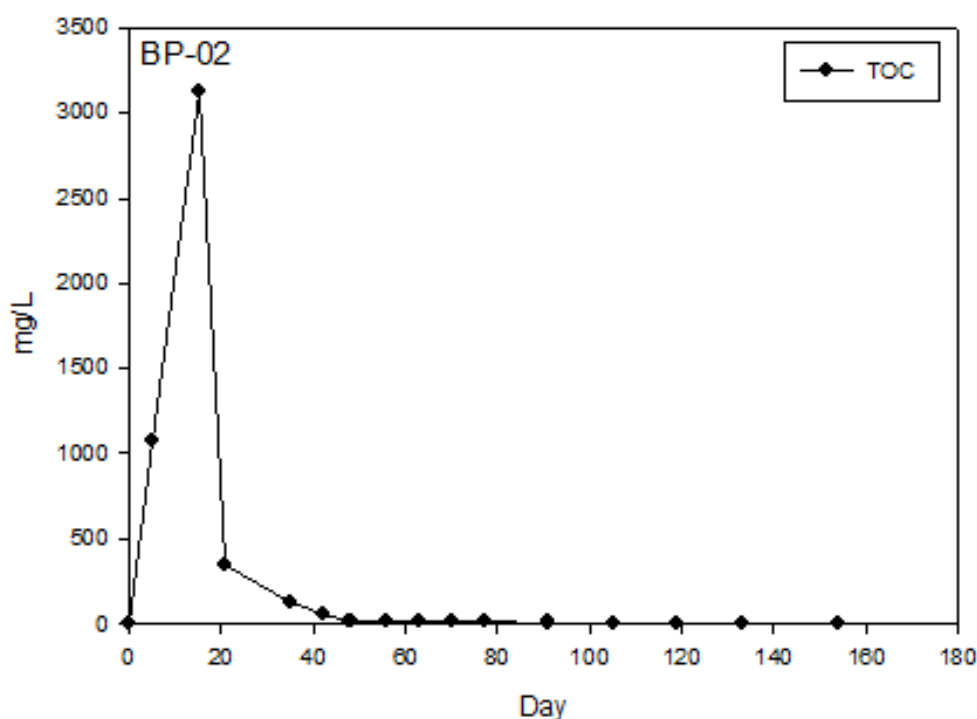


圖 3-5 主要監測井 BP-02 水樣之 TOC 變化

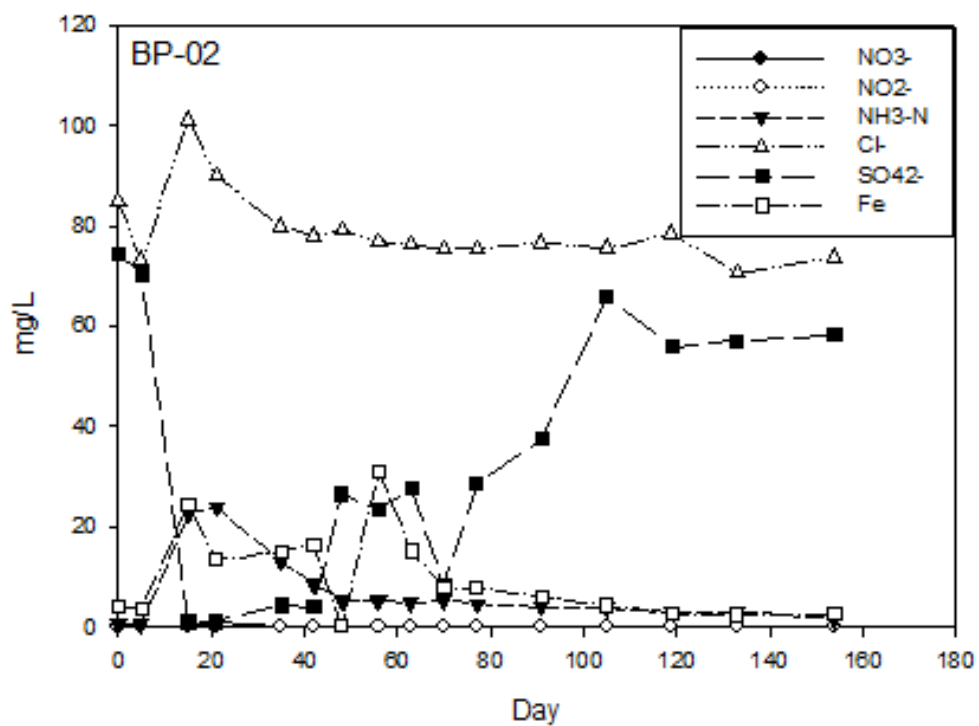


圖 3-6 主要監測井 BP-02 水樣之環境參數變化

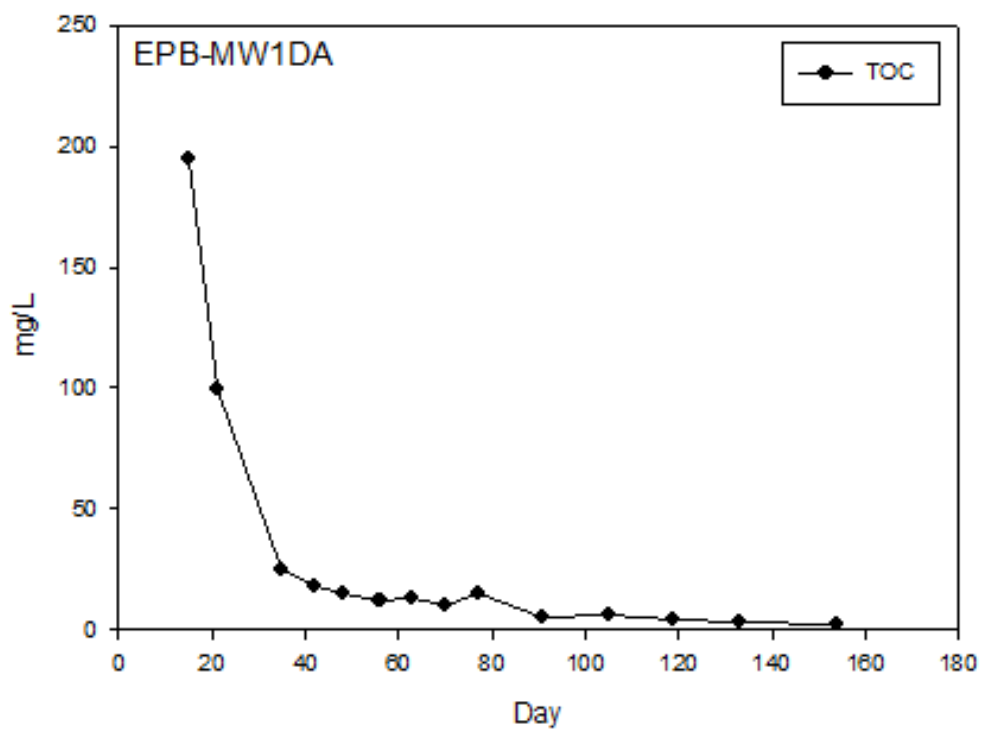


圖 3-7 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之 TOC 變化

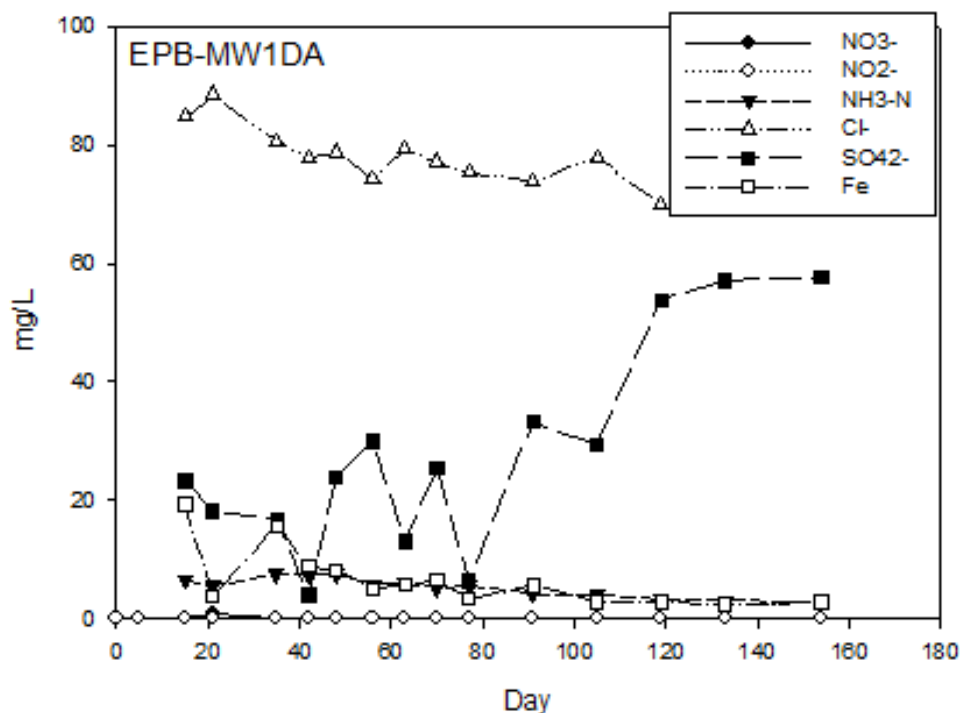


圖 3-8 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之環境參數變化

由主要監測井 BP-02 及 EPB-MW1DA 之分析結果顯示，添加生物營養鹽後地下水中總有機碳增加，其為提供微生物生長所需之碳源及電子供應者，並因其於降解過程中地下水之擴散作用生物營養鹽會逐漸擴散至本場址之各個角落，促進生物降解之功效。

3.3 含氯污染場址水質之關切汙染物及最終產物分析

利用中華民國行政院環境保護署環境檢驗所(NIEA)公告分析方法執行。分析項目包含關切汙染物:四氯乙烯(PCE)、三氯乙烯(TCE)、二氯乙烯(DCE)、氯乙烯(VC)，最終產物:乙烯(C₂H₄)，監測井分別為 BP-02 及 EPB-MW1DA

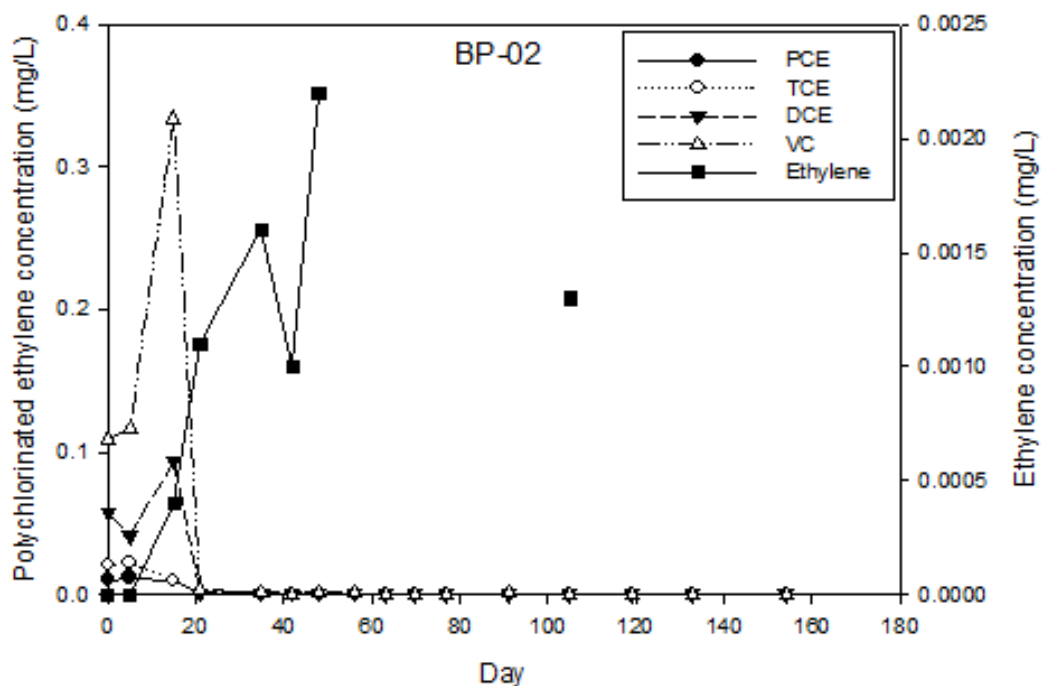


圖 3-9 主要監測井 BP-02 水樣之關切污染物及最終產物分析

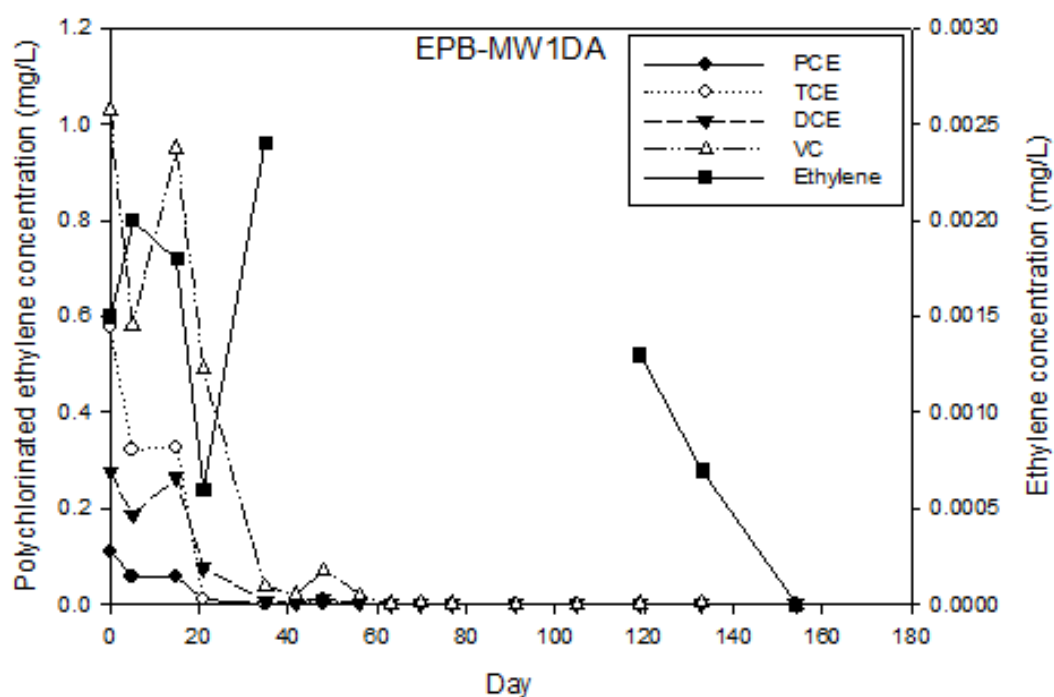


圖 3-10 主要監測井 EPB-MW1DA 水樣之關切污染物及最終產物分析

主要監測井 BP-02 及 EPB-MW1DA，都可見到未加生物刺激應養鹽之前，場址可偵測到四氯乙烯、三氯乙烯、二氯乙烯及氯乙烯存在且高於法規所規定之標準值，若無盡早進行整治，將使污染深度逐年增加，但經過生物整治及添加生物刺激應養鹽之後可見到四氯乙烯、三氯乙烯含量降低並且二氯乙烯及氯乙烯在 20 天左右含量上升，參考歷年監測結果顯示，監測出之高濃度，係由於二氯乙烯主要為代謝副產物且其與分佈地下水流方向一致，推估可能為上游污染源之代謝物累積結果。氯乙烯對人體毒性高，目前該區域清查結果並無使用或飲用地下水情形，後續仍需持續利用管制程序並加強宣導，降低下游民眾的健康風險。本次整治結果觀察到四氯乙烯、三氯乙烯、二氯乙烯及氯乙烯於整治後含量皆大幅下降且降解後有乙烯產生，足可證明生物復育之成效。

3.4 含氯污染場址水相樣品中的總 DNA 萃取

為取得後續實驗所需之 16S rDNA，首要步驟即是完整萃取環境中所有微生物之 DNA，我們將水樣採集後利用去離子水沖提濾膜上之微生物並利用 PowerWater® DNA Isolation kit 萃取 DNA，之後我們使用 Nano drop 測定 DNA 之濃度及品質，其結果如下：

表 3-1 環境水相總 DNA 萃取及品管

	樣品名稱	Sample Quality Control					備註
		樣品種類	QC 方法	A260/A280	濃度(ng/μl)	Total Amount (μg)	
1	Water DNA 1/2	Genomic DNA	Nano drop	1.84	66.2	9.93	
2	Water DNA 1/4	Genomic DNA	Nano drop	1.77	70.9	10.63	
3	Water DNA 3/4	Genomic DNA	Nano drop	1.73	42.1	6.31	

結果顯示我們已成功萃取出環境水相樣本之總 DNA 並且樣本之濃度狀態與 ratio 值均符合之後放大 16S rDNA 所需之標準。

3.5 構築 Metagenome 分析所需之 16S rDNA 庫

根據前人研究，目前針對土壤或水樣等環境菌相分析的 16S rDNA region 為 V6 或 V5-V9 region (表 3-2)，而本計畫擬分析最完整之環境菌相，因此規劃將 V1-V9 分成三個 amplicon 進行 metagenome 的分析希望達到最完整之分析結果，其說明為圖 3-13

表 3-2 前人研究環境菌相所分析的 16S rDNA region

Reference	Samples	F primer	R primer	16S_regions
Sogin et al, 2006	Deep sea	967F CAACGCGAAGAACCTTACC	1046R CGACAGCCATGCANCACT	V6
Huber et al, 2007	Deep sea	967F-PP CNACGCGAAGAACCTTANC & 967F-UC1 CAACGCGAAAAACCTTACC & 967F-UC2 CAACGCGCAGAACCTTACC & 967F-UC3 ATACGCGARGAACCTTACC & 967F-AQ CTAACCGANGAACCTYACC	1046R CGACAGCCATGCANCACT & 1046RPP CGACAACCATGCANCACT & 1046RAQ1 CGACGGCCATGCANCACT & 1046RAQ2 CGACGACCATGCANCACT	V6
Huber et al, 2007	Deep sea	958arcF: AATTGGANTCAACGCCGG	1048arcR CGRCGGCCATGCACCWC & 1048arcR CGRCRGCCATGYACCWC	V6
Roesch et al, 2007	Soils	787F GNTACCTTGTACGACTT	1492R ATTAGATACCCNGGTAG	V5-V9
Andersson et al, 2008	Human gut	784F AGGATTAGATACCTGGTA	1061R CRRACGAGCTGACGAC	V5-V6
Dowd et al, 2008a	Cattel feces	530F GTGCCAGCMGCNGCGG	1100R GGGTTTCGNTCGTTG	V4-V6
Huse et al, 2008	Human gut	338F ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	533R TTACCGCGGCTGCTGGCAC	V3
Huse et al, 2008	Deep sea vents	967F CAACGCGAAGAACCTTACC & & ATACGCGA[AG]GAACCTTACC	1046R AGGTGNTGCATGGCTGTGC & 1046R1 AGGTGNTGCATGGTTGTGC	V6
McKenna et al, 2008	Macaque gut	F8 CTGCTGCCTYCCGTA	R357 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	V2-V3
Kim et al, 2008	Tidal sediments	bact363F CAATGGRSGVRASYCTGAHS	Bact531R:CTNYGTMTTACCGCGGCTGC	V3
Kim et al, 2008	Tidal sediments	Arch339F GGYGCASCAGGCGCGVAW	Arch523R TMCCGCGGCKGCTGVCASC	V3
Turnbaugh et al, 2008	Human gut	8F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	338R RTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	V2
Turnbaugh et al, 2008	Human gut	967F-PP CNACGCGAAGAACCTTANC & 967F-UC1 CAACGCGAAAAACCTTACC & 967F-UC2 CAACGCGCAGAACCTTACC & 967F-UC3 ATACGCGARGAACCTTACC & 967F-AQ CTAACCGANGAACCTYACC	1046R CGACAGCCATGCANCACT & 1046RPP CGACAACCATGCANCACT & 1046RAQ1 CGACGGCCATGCANCACT & 1046RAQ2 CGACGACCATGCANCACT	V6
Keijser et al, 2008	Mouth	909F AAACCTYAAARRAATTGACGG & 917F GAATTGACGGGGGCCGCA	1061R TCACGRCACGAGCTGACGAC	V6
Fierer et al, 2008	Human skin	27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	338R CATGCTGCCTCCCGTAGGAGT	V2-V3
Dethlefsen et al, 2008	Human gut	F1 CAACGCGAAGAACCTTACC & F2 ATACGCGAGGAACCTTACC	R CGACARCCATGCASCACCT	V6
Dethlefsen et al, 2008	Human gut	F ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	R TTACCGCGGCTGCTGGCAC	V3
Spear et al, 2008	Human vagina	27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	355R GCTGCCTCCCGTAGGAGT	V2-V3

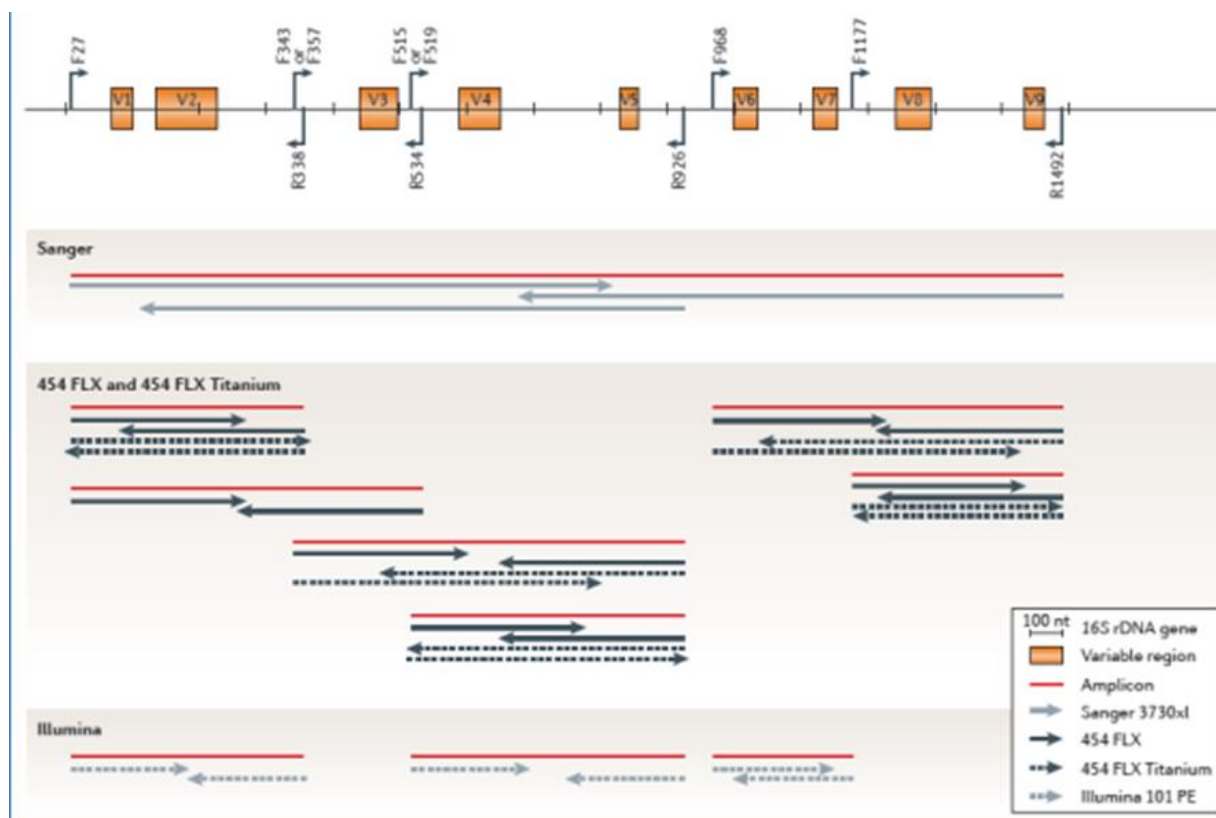


圖 3-11 本計畫進行 metagenome 分析之 16S rDNA region

依本計畫本計畫進行 metagenome 分析之 16S rDNA region，其 PCR 之所需引子，我們設計如下表 3-3

表 3-3 16S rDNA region 之 PCR 引子設計

Region	Primer		Annealing temp	Amplicon size
V1-V3	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	60°C	508bp
	534R	ATTACCGCGGCTGCTGGC		
V4-V5	519F	CAGCMGCCGCGGTAA	45°C	408bp
	926R	CCGTCAATTTYTTTTRAGTTT		
V6-V9	968F	AACGCGGAAGAACCTTAC	60°C	524bp
	1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		

依上述引子之設計，我們將總 DNA 利用 PCR 聚合酶鏈鎖反應儀將 16S rDNA region 進行增幅，結果利用 2% Agarose Gel 進行電泳分析，其結果如下圖 3-14，其樣本之濃度狀態與 ratio 值均符合之後 Metagenome 分析標準，接著利用次世代定序儀進行序列分析。

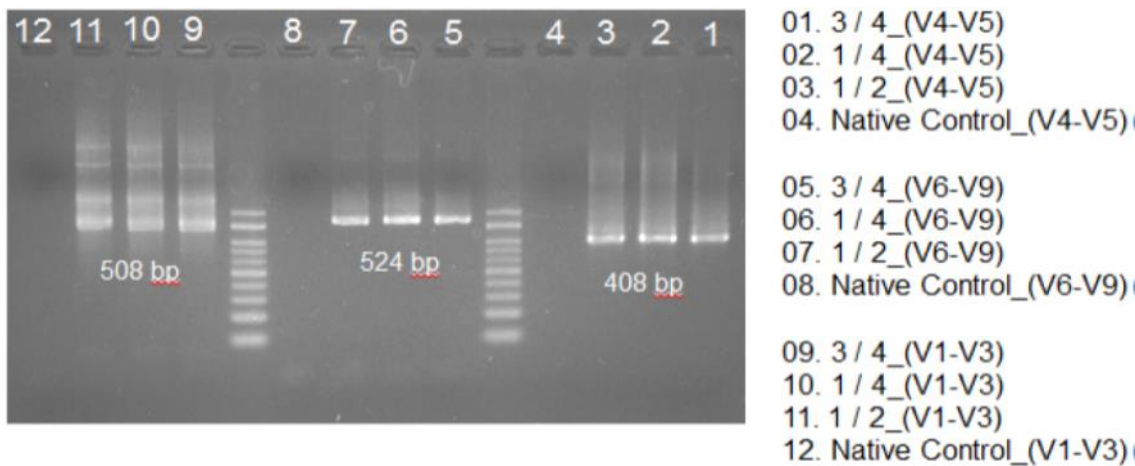


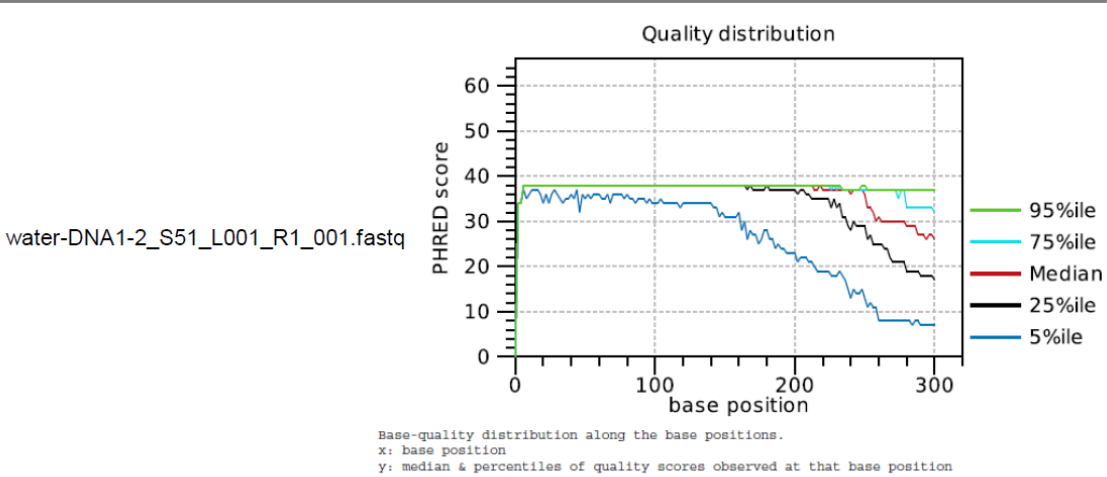
圖 3-122% Agarose Gel 分析 16S rDNA region

3.6 Metagenom16S rDNA 生物資訊分析

3.6.1 原始數據品質檢測

Sample name	File name	Number of reads	Longest read (bp)
Water DNA 1\2	water-DNA1-2_S51_L001_R1_001.fastq	3,357,364	300
	water-DNA1-2_S51_L001_R2_001.fastq	3,357,364	300

Quality distribution



分析樣品進行 paired-end library 測序所獲得雙端數據量，品質皆符合生物資訊後續分析要求。

3.6.2 Metagenome 菌相分析結果

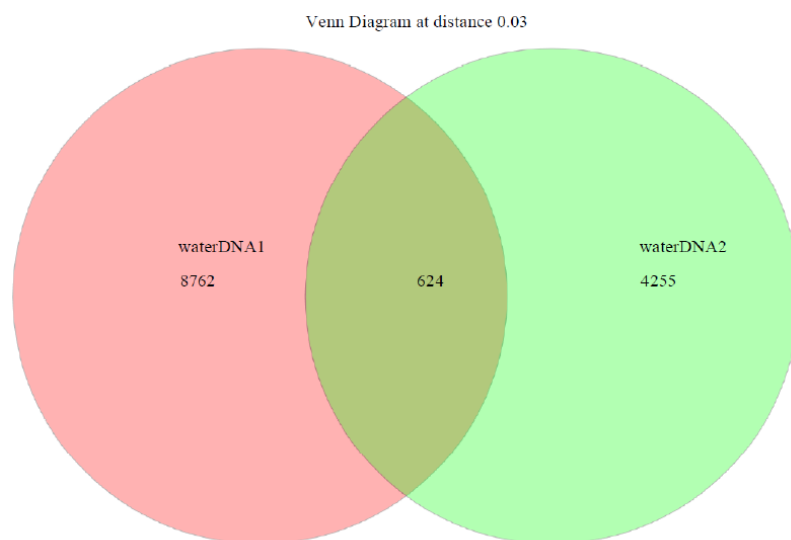
本計畫對場址進行生物復育前後 16s rRNA 區域進行分析，將增幅出的片段以 MiSeq2*300bp 進行測序，所獲得所有原始數據進行資料分析，以期獲得微生物菌相分佈。將所獲得原始數據混和同時先將兩端數據合併(merge)為單一條較長的序列(read)，過濾掉測序品質差的序列後，即為有效序列(effective reads)，再將這些有效序列進行叢集(cluster)，將序列相似的歸類為同一個 OTU(OperationalTaxonomic Unit，操作分類單元)，最終再將所獲得的 OTU 進行菌種分類。(waterDNA1 為生物復育前之樣本，waterDNA2 為生物復育後之樣本)

其結果如下：

V1-V3 region

OTU Taxonomy

此區域 13,641 個 OUT 分類，隸屬於 30 個不同的 phylum，歸於 436 個 genus，其中又可區分出 715 個 species，但其中 283 個 speciesunclassified。下圖 Venn diagram 顯示生物復育前後 OUT 交集數量共有 624 個。



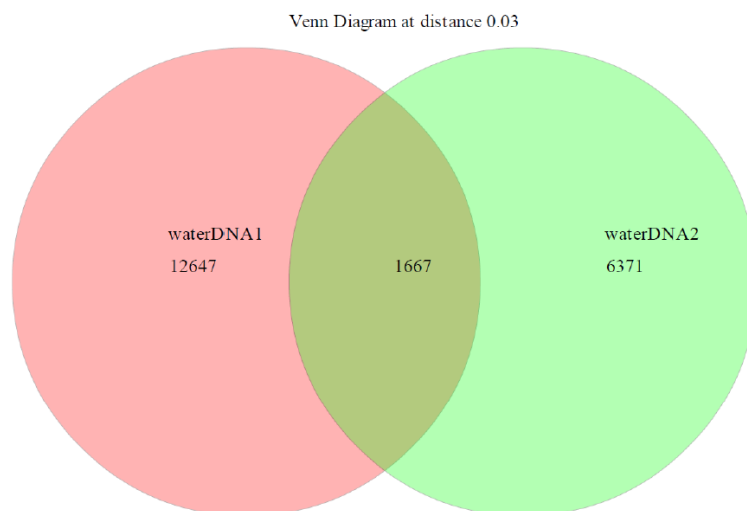
V4-V5 region

OTU Taxonomy

此區域獲得 20,685 個 OTU，隸屬於 30 個不同的 phylum，歸於 570 個

genus，其中又可區分出 1,026 個 species，但其中 357 species unclassified。

下圖 Venn diagram 顯示生物復育前後 OUT 交集數量共有 1667 個。

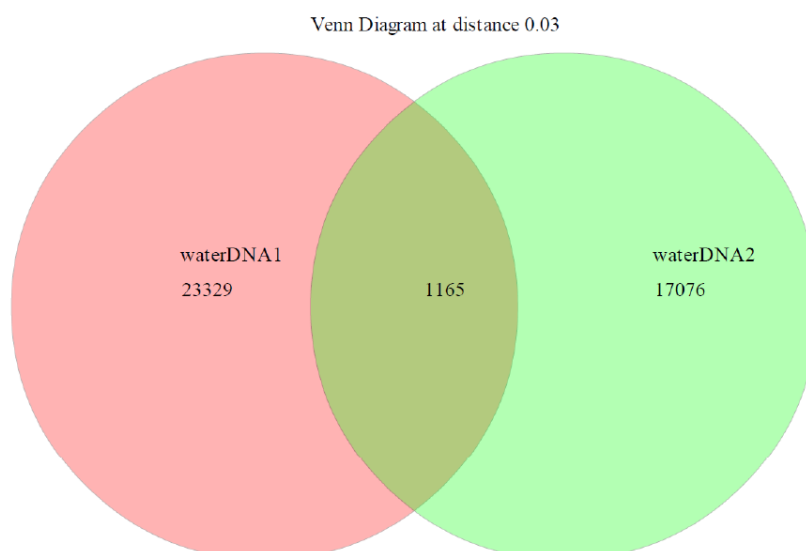


V6-V9 region

OTU Taxonomy

此區域共獲得 41,570 個 OTU，隸屬於 29 個不同的 phylum，歸於 549 個 genus，其中又可區分出 963 個 species，但其中 361 species unclassified。

下圖 Venn diagram 顯示生物復育前後 OUT 交集數量共有 1165 個。



在 OTU Taxonomy 分析後可列出 V1-V3、V4-V5、V6-V9 region 於生物復育前後有產生交集且最豐富之菌種，詳列於下。

V1-V3 region

taxon	total	waterDNA1	waterDNA2
<i>Sulfuricurvum_kujiense</i> _DSM_16994_(T)	253	53	206
<i>Paludibacter_propionigenes</i> _(T)_WB4	164	8	163
<i>Dehalogenimonas_lykanthroporepellens</i> _(T)_BL-DC-9	92	78	18
uncultured_candidate_division_OD1_bacterium__DA18	86	83	5
<i>Desulfatiferula_olefinivorans</i> _(T)_LM2801	62	62	0
<i>Geobacter_thiogenes</i> _(T)	53	49	8
<i>Anaeromyxobacter_dehalogenans</i> _(T)_2CP-1__ATCC_BAA-258	53	53	1
<i>Victivallis_vadensis</i> _(T)_Cello	47	12	36
<i>Desulfurivibrio_alkaliphilus</i> _(T)_AHT2	45	45	1
<i>Malikia_spinosa</i> _(T)_IAM_14918	43	0	43
<i>Geobacter_psychrophilus</i> _(T)_P35	40	39	4
<i>Ignavibacterium_album</i> _(T)_Mat9-16	38	38	8
uncultured_candidate_division_SR1_bacterium__SRB30	38	0	38
<i>Desulfovibrio_putialis</i> _(T)_DSM_16056	37	5	36
<i>Aquabacterium_parvum</i> _(T)_B6	34	30	6
<i>Anaerovorax_odorimutans</i> _(T)_NorPut	32	5	31
<i>Desulforegula_conservatrix</i> _(T)	31	30	4
<i>Meniscus_glaucopis</i> _(T)_ATCC_29398	30	17	19
<i>Dehalobacter_restrictus</i> _(T)_PER-K23	30	3	29
<i>Opitutus_terrae</i> _(T)_PB90-1	29	27	4
<i>Spirochaeta_caldaria</i> _(T)_DSMZ7334	26	15	16
<i>Smithella_propionica</i> _(T)_LYP	25	25	1
<i>Geothrix_fermentans</i> _(T)_H5	23	23	2
<i>Desulfarculus_baarsii</i> _(T)_DSM_2075	22	20	3
uncultured_candidate_division_OD1_bacterium__BMS43	22	21	3
uncultured_Acidobacteria_bacterium__R3.0074	21	20	1
<i>Levilinea_saccharolytica</i> _(T)_KIBI-1	21	12	13
<i>Pelobacter_acetylenicus</i> _(T)_WoAcy1_DSM2348	21	21	1
<i>Dechloromonas_agitata</i> _(T)_CKB	20	19	2
<i>Eubacterium_aggregans</i> _(T)_SR12_DSM_12183	18	0	18
uncultured_eubacterium_WCHB1-26	18	8	10
<i>Hydrogenophaga_bisanensis</i> _(T)_K102	17	17	2
<i>Saccharofermentans_acetigenes</i> _(T)_P6	17	5	17
<i>Dechloromonas_hortensis</i> _(T)_MA-1	16	1	16

Taxon 為菌種名稱，waterDNA1 為生物復育前之菌相，waterDNA2 為生物復育後之菌相

V4-V5region

taxon	total	waterDNA1	waterDNA2
Dehalogenimonas_lykanthroporepellens_(T)__BL-DC-9	212	186	37
Sulfuricurvum_kujiense_DSM_16994_(T)	114	21	97
Paludibacter_propionicipigenes_(T)__WB4	93	9	90
Malikia_spinosa_(T)__IAM_14918	83	10	74
Ignavibacterium_album_(T)__Mat9-16	55	54	11
uncultured_candidate_division_OD1_bacterium__SRC17	41	38	5
Dechloromonas_denitrificans_(T)__type_strain:_ED1	37	12	27
Desulforegula_conservatrix_(T)	37	36	3
Desulfuromonas_michiganensis_(T)__BB1	35	35	0
Georgfuchsia_toluolica_(T)__G5G6	32	32	1
Eubacterium_aggregans_(T)__SR12__DSM_12183	31	1	31
Blastopirellula_marina_(T)__IFAM_1313	27	25	3
Aquabacterium_parvum_(T)__B6	27	22	7
uncultured_soil_bacterium_PBS-III-27	27	14	17
Geothrix_fermentans_(T)__H5	26	26	1
Desulfovibrio_putialis_(T)__DSM_16056	25	2	24
Opitutus_terrae_(T)__PB90-1	25	23	7
Saccharofermentans_acetigenes_(T)__P6	25	7	23
Desulfatiferula_olefinivorans_(T)__LM2801	23	23	1
Anaerovorax_odorimutans_(T)__NorPut	22	4	22
Dehalobacter_restrictus_(T)__PER-K23	22	1	22
Longilinea_arvoryzae_(T)__KOME-1	20	14	10
uncultured_eubacterium_WCHB1-41_(T)	20	20	0
Papillibacter_cinnamivorans_(T)__CIN1__DSM12816	20	0	20
Syntrophorhabdus_aromaticivorans_(T)__UI	19	19	2
uncultured_eubacterium_WCHA1-33_(T)	18	2	18
Sporobacter_termitidis_(T)__SYR	18	4	18
Anaeromyxobacter_dehalogenans_(T)__2CP-1__ATCC_BAA-258	17	16	3
Proteiniclasticum_ruminis_(T)__D3RC-2	17	1	17
Nitrospira_moscoviensis_(T)	16	16	0
Bdellovibrio_bacteriovorus_(T)__HD_100__DSM_50701	16	16	2
Spirochaeta_caldaria_(T)__DSMZ7334	16	12	6
Desulfotomaculum_acetoxidans_(T)__DSM_771	16	11	7
Syntrophomonas_zehnderi_(T)__OL-4	16	3	15

Taxon 為菌種名稱，waterDNA1 為生物復育前之菌相，waterDNA2 為生物復育後之菌相

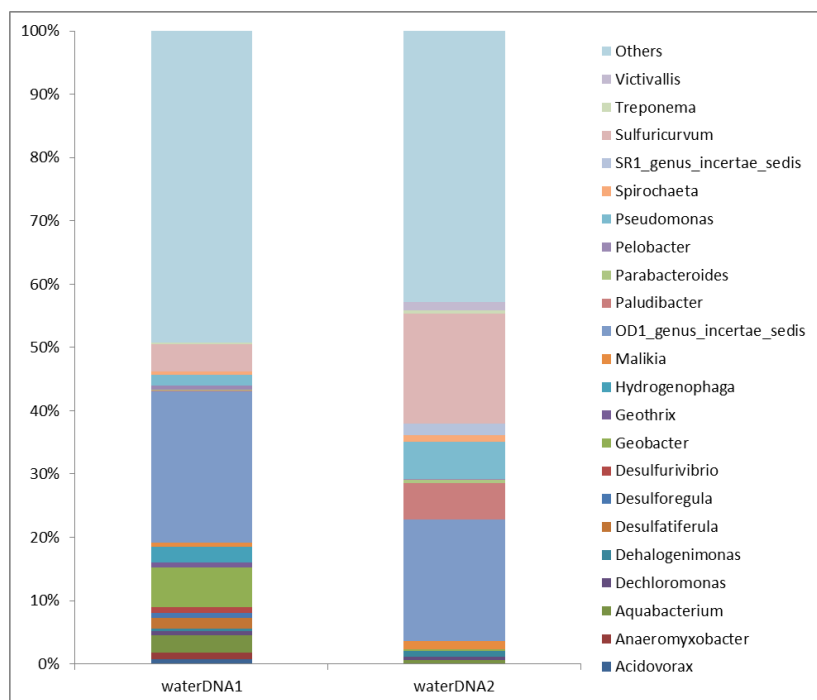
V6-V9region

taxon	total	waterDNA1	waterDNA2
<i>Sulfuricurvum_kujiense</i> _DSM_16994_(T)	635	326	317
<i>Desulfatiferula_olefinivorans</i> _(T)_LM2801	578	577	2
<i>Sporomusa_malonica</i> _(T)_DSM_5090_Type	289	9	282
<i>Pelobacter_propionicus</i> _(T)_DSM_2379	253	253	1
<i>Desulforegula_conservatrix</i> _(T)	239	230	12
<i>Desulfovibrio_putialis</i> _(T)_DSM_16056	231	2	231
<i>Victivallis_vadensis</i> _(T)_Cello	217	26	198
<i>Geobacter_thiogenes</i> _(T)	203	143	62
uncultured_eubacterium_WCHA1-80_(T)	194	1	194
<i>Geothrix_fermentans</i> _(T)_H5	175	174	3
<i>Dehalogenimonas_lykanthroporepellens</i> _(T)_BL-DC-9	171	169	4
<i>Ignavibacterium_album</i> _(T)_Mat9-16	166	153	26
<i>Anaeromyxobacter_dehalogenans</i> _(T)_2CP-1_ATCC_BAA-258	163	163	2
<i>Trichococcus_patagoniensis</i> _(T)_PMagG1	135	5	131
<i>Opitutus_terrae</i> _(T)_PB90-1	134	79	62
<i>Eubacterium_barkeri</i> _(T)	114	0	114
<i>Clostridium_magnum</i> _(T)_DSM_2767	101	8	94
<i>Dehalobacter_restrictus</i> _(T)_PER-K23	95	4	95
<i>Desulfuromonas_michiganensis</i> _(T)_BB1	92	92	2
<i>Proteiniclasticum_ruminis</i> _(T)_D3RC-2	92	10	85
uncultured_eubacterium_WCHB1-41_(T)	84	83	3
<i>Dechloromonas_denitrificans</i> _(T)_type_strain:_ED1	70	56	15
<i>Desulfovibrio_psychrotolerans</i> _(T)_type_strain:_PWC=_JS1	69	35	35
<i>Oxobacter_pfennigii</i> _(T)_DSM_3222	67	18	55
uncultured_soil_bacterium_PBS-III-9	62	12	54
<i>Geobacter_pelophilus</i> _(T)_Dfr2	57	57	1
<i>Acetobacterium_paludosum</i> _(T)_DSM_8237	56	0	56
<i>Desulfotomaculum_acetoxidans</i> _(T)_DSM_771	56	51	17
<i>Desulfomonile_limimaris</i> _(T)	50	50	2
<i>Malikia_granosa</i> _(T)_type_strain:_P1	46	46	0
<i>Geobacter_argillaceus</i> _(T)_G12	46	46	0
<i>Desulfarculus_baarsii</i> _(T)_DSM_2075	39	36	6
<i>Sedimentibacter_saalensis</i> _(T)_ZF2	39	2	39
<i>Desulfosporosinus_auripigmenti</i> _(T)_type_strain:_DSMZ_13351	39	30	12

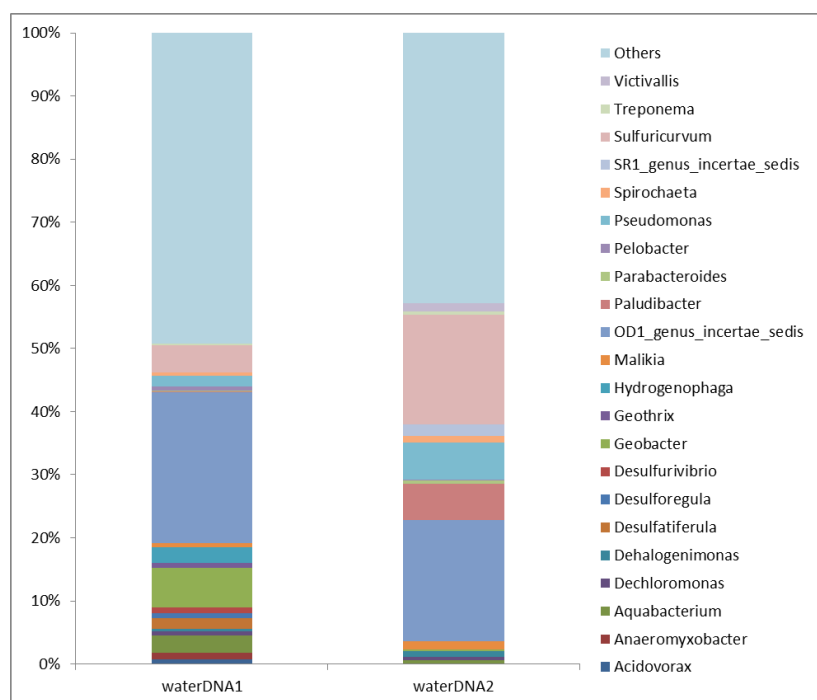
Taxon 為菌種名稱，waterDNA1 為生物復育前之菌相，waterDNA2 為生物復育後之菌相

因本計畫利用 metagenome 描繪污染場址經生物復育前後之菌相變化，得到數據資料龐大，因此我們依照菌”科”的層級分類其結果如下；waterDNA1 為生物復育前之菌相，waterDNA2 為生物復育後之菌相

V1-V3region



V4-V5region



V6-V9region

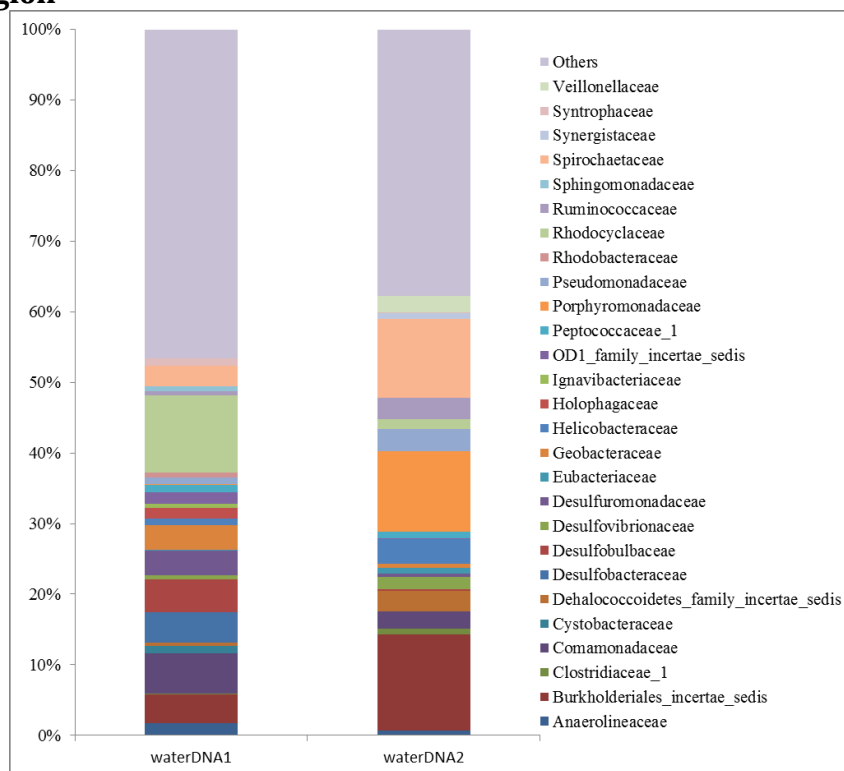


圖 3-13 生物復育前後菌相消長變化圖

微生物的菌相分析，由上面的結果顯示我們將復育前菌相(waterDNA1)及生物復育後菌相(waterDNA2)在菌”科”的層級進行比較，前人對環境中之菌相進行分析時皆使用 16S rDNA 中的部分區段，不是使用 16S rDNA 全長，因此本計畫為了完整環境菌相的分析，我們將 16S rDNA 區分為 V1-V3，V4-V5 及 V6-V9 完整掃描環境中微生物之 16S rDNA 全長。而在這些區段中我們分別對 V1-V3，V4-V5 及 V6-V9 區段分析未進行生物復育前與生物復育後所佔比例最高的菌科

V1-V3: OD1familyincertainesedis (24%) vs Helicobacteraceae (17%),

V4-V5: Rhodocyclaceae (11%) vs Burkholderiales_incertain_sedi (14%),

V6-V9: Desulfuromonadaceae vs Ruminococcaceae (10 %)

我們也詳列了各個區段中分別利用”屬”及”種”作為分類的詳細菌株分類資料，統計在 V1-V3，V4-V5 及 V6-V9 區段中佔比例最高的菌株分別為: V1-V3: *Sulfuricurvum_kujiense* DSM16994 (17%)

V4-V5: *Paludibacter_propionigenes* WB4 (9%)

V6-V9: *Sulfuricurvum_kujiense* DSM16994 (7%)

3.7 構築 Metagenome 分析所需之功能性基因庫

3.7.1 功能性基因樣本品質檢測

以 Qubit 檢測樣本

以 nanodrop 檢測 DNA 樣本時，對樣本的品质要求 O.D A260/A280 值需在 1.8 以上，此次樣本檢測結果符合要求。

取 1 ul 以 1.2% Agarose gel 進行電泳及 Agilent DNA 1000 Assay 檢測 library 樣本品質，其品質皆合乎分析標準。

樣品名稱	樣品種類	A260/A280	濃度(ng/ul)	Total Amount (µg)	備註
Water DNA 1/2	gDNA	1.84	66.2	9.93	

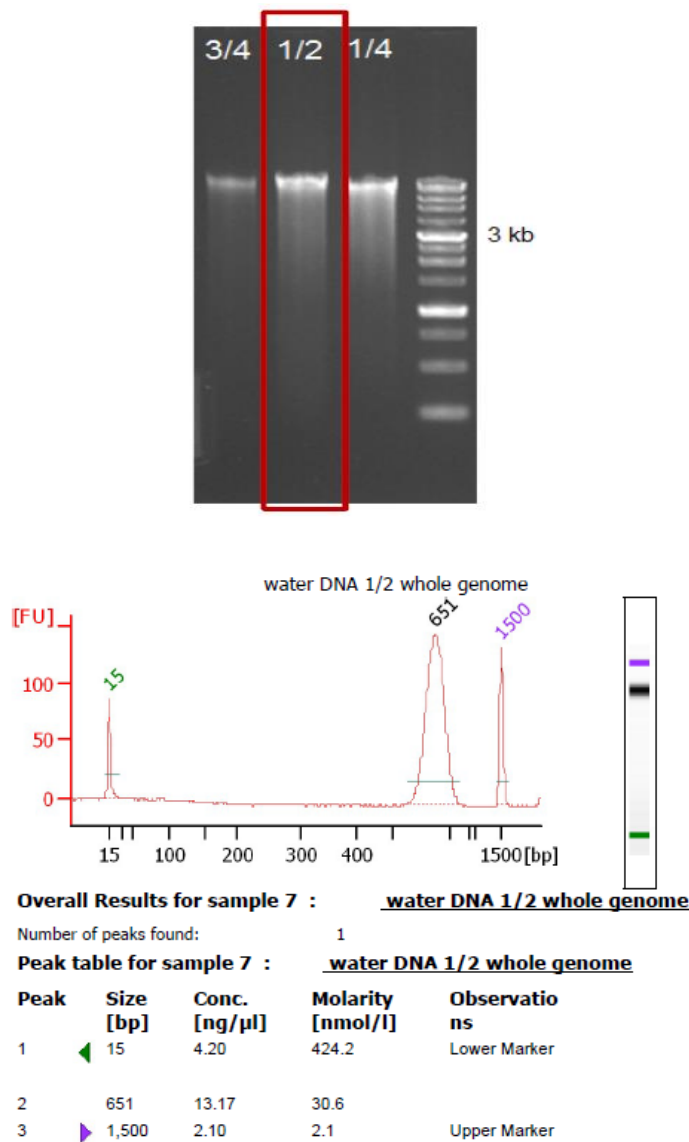


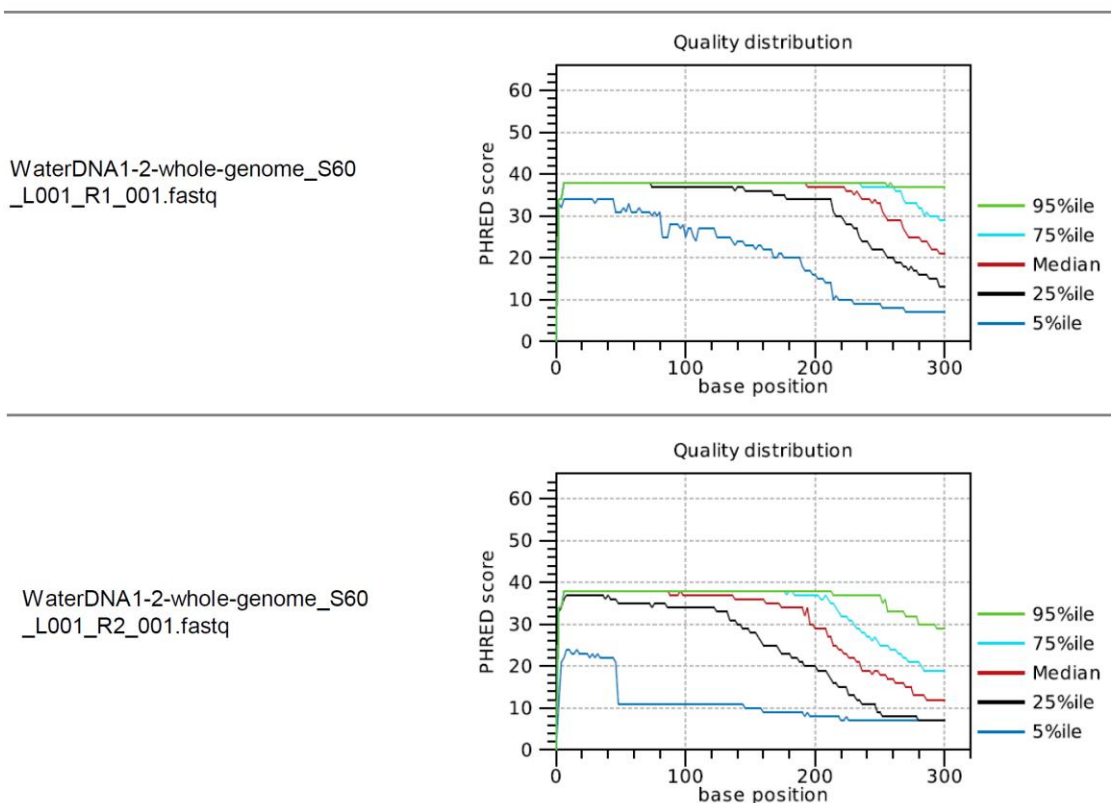
圖 3-14 功能性基因樣本品質檢測結果

3.8 Metagenom 功能性基因暨菌相分析生物資訊分析

3.8.1 原始數據品質檢測

File name	Number of reads	Longest read (bp)	Raw data throughput (bp)
WaterDNA1-2-whole-genome_S60_L001_R1_001	7,560,881	301	2,275,825,181
WaterDNA1-2-whole-genome_S60_L001_R2_001	7,560,881	301	2,275,825,181

下圖為雙端數據以CLC Genomics Workbench 7.0軟體進行定序品質分析，可見reads每一個base的QV值。R1端數據在第250~260 base，其平均QV值高於30，R2端數據在第200~220 base之間，其平均QV值高於30，因此，判斷此次定序品質相當良好，後續修剪序列時，參數可設定 $QV \geq 30$ (即錯誤率需低於1/1000)。



3.8.2 Trim

使用 CLC Genomics Workbench 7.0 進行分析，由於此次定序品質相當良好，故根據下方參數設定修剪(Trim) QV 低於 30、有 ambiguous 以及可能殘留的 adaptor 的序列，此外，為提高後端分析效果及準確度，亦去除修剪後長度低於 64 bp 的 read，修剪後所保留的 trimmed reads，共有 15,121,762 條 reads，平均長度為 176.4 bp。

序列修剪後所保留的 reads，將其中仍為 paired reads 經 merge 分析，使雙端序列合併，獲得較長的 read，用以模擬 Roche 454 long read 平台所獲得的 long read，再將此 merged reads 進行後端分析。使用 CLC Genomics Workbench 7.0 進行分析，結果獲得 357,852 mergedreads。

Merged reads 共有 357,852 條，進行 BLastX 分析後，經 MEGAN5 進行 LCA 分析，結果如下表 LCA_Taxonomy profiling table 所示，71.4% reads 比對到 cellular organisms，而比對到 Bacteria 的 reads 佔整體總 reads 的 66.4%，Archaea 佔整體的 2.2%。

[illegible]

3.10 LCA 生物資訊分析

下圖為 Taxonomy profiling bar chart_Phylum level，可見主要菌種屬於 *Proteobacteria* 這門(24.2%)，次要為 *Firmicutes* 門(12.1%)。

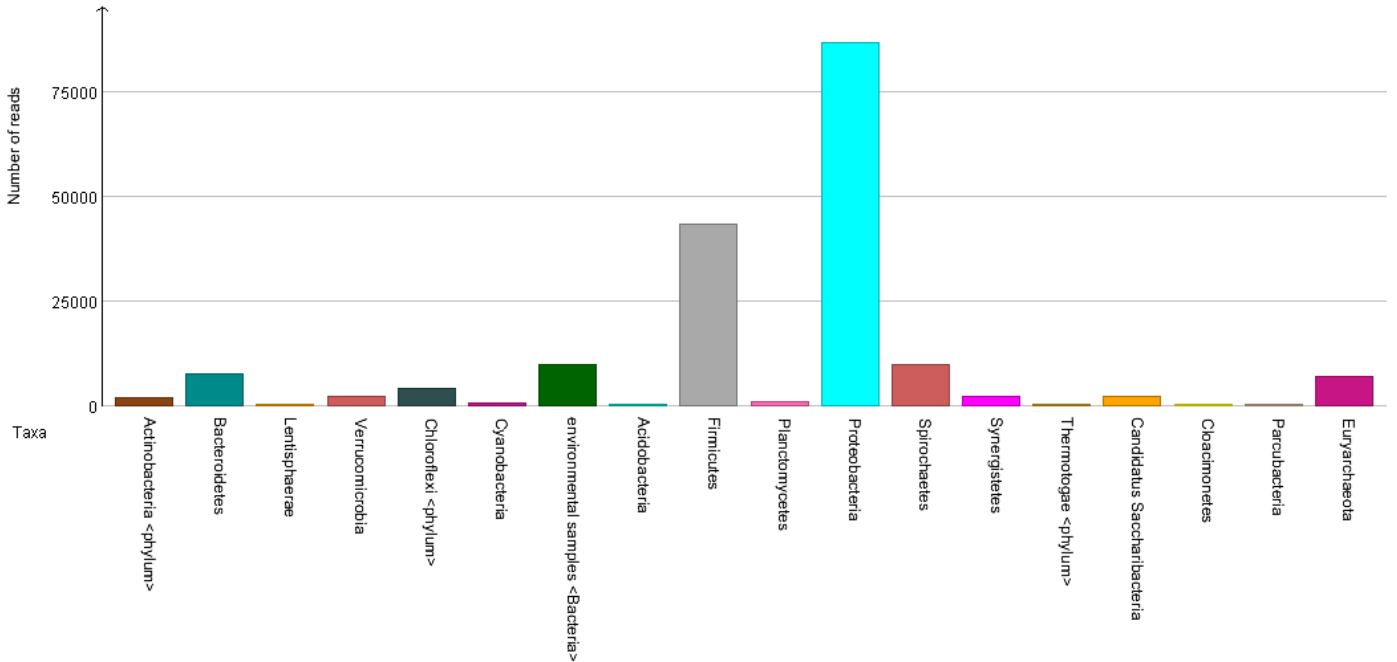


圖 3-15-1 功能性基因樣本品質檢測結果

下圖為 Taxonomy profiling bar chart_Species level，可見前三名主要菌種分別為 *Clostridium* sp. CAG:1024 (0.8%)、*Geobacter lovleyi* (0.7%) 及 *Dehalococcoides mccartyi* (0.6%)。

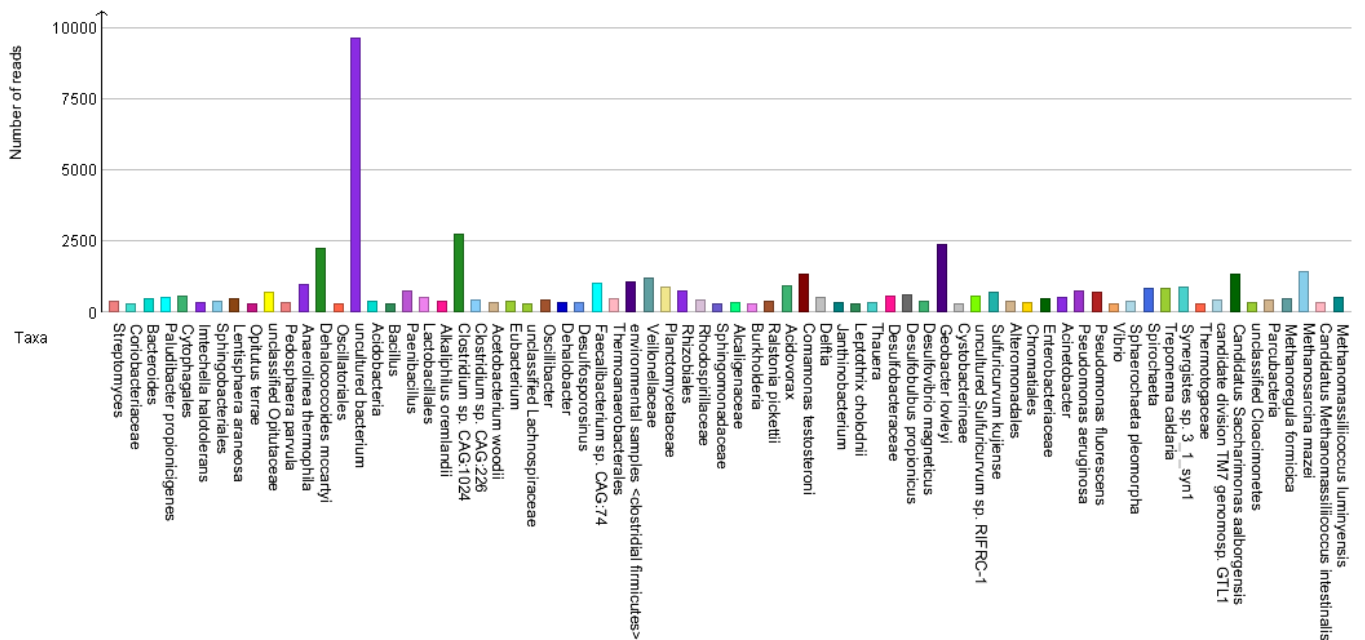


圖 3-15-2 功能性基因樣本品質檢測結果

3.11KEGG 生物資訊分析

Merged reads 共有 357,852 條，進行 BLastX 分析後，經 MEGAN5 進行 KEGG 分析，結果如下表 KEGG report 所示，前 10 個表現量最高的 pathway 依序為 Purine metabolism、Pyrimidine metabolism、Nitrogen metabolism、Methane metabolism、Pyruvate metabolism、Glycolysis / Gluconeogenesis、Oxidative phosphorylation、Amino sugar and nucleotide sugar metabolism、Carbon fixation pathways in prokaryotes、Alanine, aspartate and glutamate metabolism。

表 3-5KEGG 代謝途徑統整表

Pathway				Read number
KEGG	Metabolism	Nucleotide Metabolism	Purine metabolism	7368
KEGG	Metabolism	Nucleotide Metabolism	Pyrimidine metabolism	7226
KEGG	Metabolism	Energy Metabolism	Nitrogen metabolism	3741
KEGG	Metabolism	Energy Metabolism	Methane metabolism	3626
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pyruvate metabolism	3455
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis	3164
KEGG	Metabolism	Energy Metabolism	Oxidative phosphorylation	3159
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	3129
KEGG	Metabolism	Energy Metabolism	Carbon fixation pathways in prokaryotes	3097
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2983
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Arginine and proline metabolism	2918
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Glycine, serine and threonine metabolism	2656
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Citrate cycle (TCA cycle)	2231
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Butanoate metabolism	2220
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2128
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Cysteine and methionine metabolism	2068
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Propanoate metabolism	2035
KEGG	Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Peptidoglycan biosynthesis	1975
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Starch and sucrose metabolism	1953
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pentose phosphate pathway	1921
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Fructose and mannose metabolism	1811
KEGG	Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	One carbon pool by folate	1597
KEGG	Metabolism	Energy Metabolism	Carbon fixation in photosynthetic organisms	1418
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Lysine biosynthesis	1415
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1400
KEGG	Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Porphyrin and chlorophyll metabolism	1313
KEGG	Metabolism	Lipid Metabolism	Fatty acid metabolism	1267
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Valine, leucine and isoleucine degradation	1232
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Galactose metabolism	1206
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1204
KEGG	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pentose and glucuronate interconversions	1125
KEGG	Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Pantothenate and CoA biosynthesis	1052
KEGG	Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Terpenoid backbone biosynthesis	1013
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Histidine metabolism	1001
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Tyrosine metabolism	981
KEGG	Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Selenocompound metabolism	976
KEGG	Metabolism	Lipid Metabolism	Fatty acid biosynthesis	941
KEGG	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Phenylalanine metabolism	899
KEGG	Metabolism	Lipid Metabolism	Glycerophospholipid metabolism	888
KEGG	Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Nicotinate and nicotinamide metabolism	877
KEGG	Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Benzoate degradation	806

在 KEGG 的分析中又可細分，將有關厭氧生物降解的 pathway 分別列在下表

表 3-6KEGG 厭氧代謝途徑統整表

Xenobiotic degradation pathways	numbers of reads
Benzoate degradation	806
Drug metabolism - other enzymes	647
Chloroalkane and chloroalkene degradation	631
Aminobenzoate degradation	520
Nitrotoluene degradation	506
Toluene degradation	342
Naphthalene degradation	315
Bisphenol degradation	248
Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	239
Xylene degradation	187
Drug metabolism - cytochrome P450	181
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	171
Dioxin degradation	167
Caprolactam degradation	165
Atrazine degradation	146
Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	140
Ethylbenzene degradation	124
Styrene degradation	120
Fluorobenzoate degradation	113
Steroid degradation	32
Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation	9

由此結果可發現在場址厭氧代謝的過程和 21 個 pathways 有關，其中又有 3 個 pathways 和厭氧還原脫氯有關，分別是：

Chloroalkane and chloroalkene degradation

Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation

Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation

其代謝圖詳列於下圖 3-15、圖 3-16、圖 3-17

Tetrachloroethene (197.1.8) → Trichloroethene (197.1.8) → trans-1,2-Dichloroethene (197.1.8) → Vinyl chloride (197.1.-) → Ethylene (11413.69) → Ethylene oxide (11413.69) → Acetyl-CoA (111.1.-) → Pyruvate metabolism

Trichloroethene (197.1.8) → cis-1,2-Dichloroethene (197.1.8) → Vinyl chloride (197.1.-)

Ethylene (11413.69) → Acetylene (421112) → Acetaldehyde (421112) → Pyruvate metabolism

Ethylene oxide (11413.69) → Ethylene glycol (3.3.2.10) → Glyoxylate and dicarboxylate metabolism

47

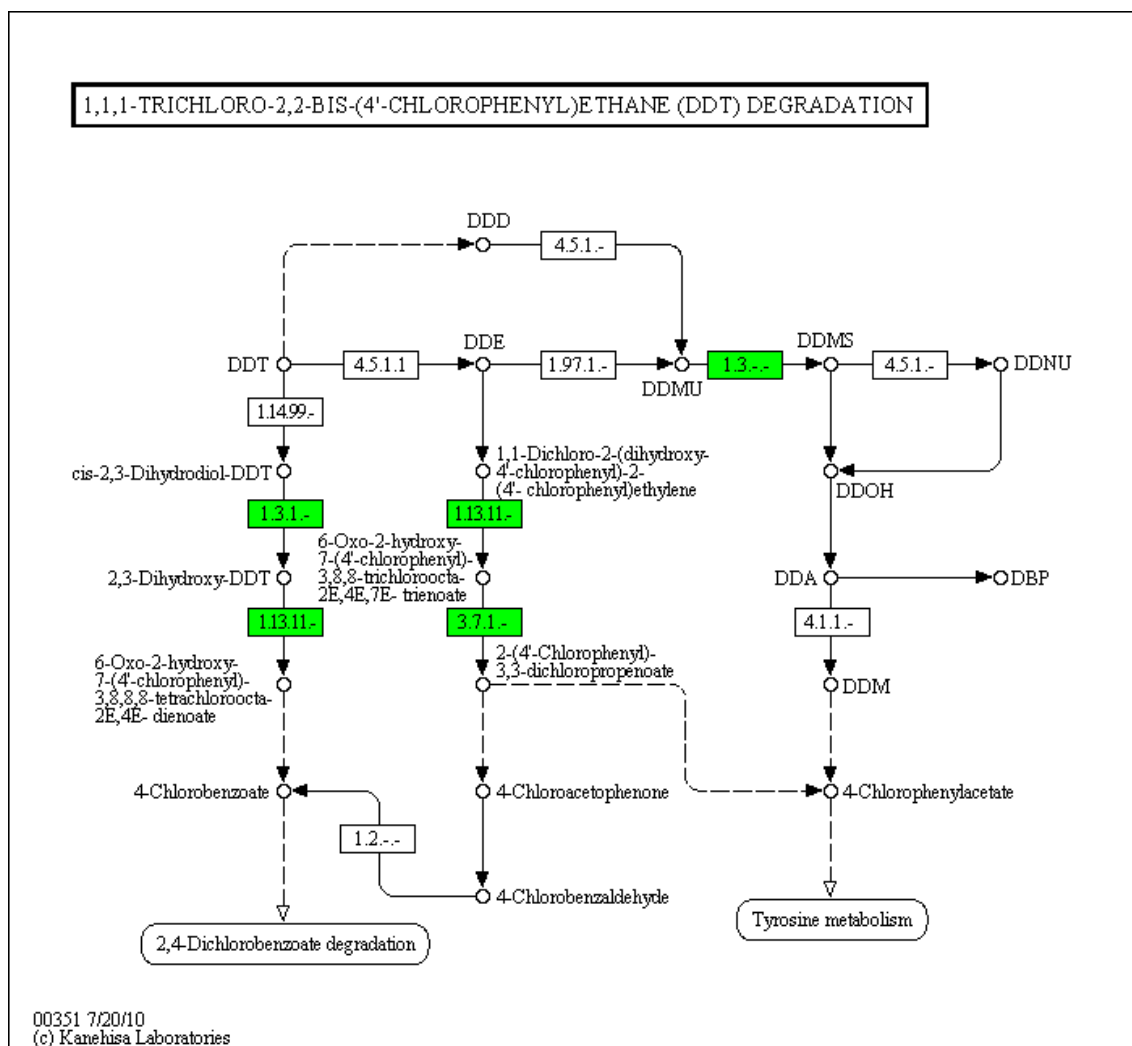


圖 3-18 Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation

第四章：討論與建議事項

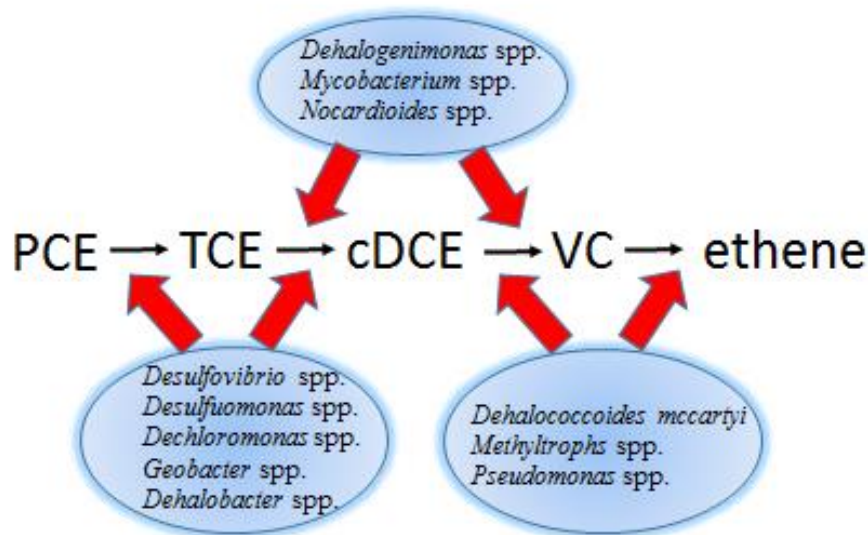


圖 4-1 微生物組成在多氯有機污染物降解過程中所扮演之角色

微生物組成在生態系統中扮演代謝人為/外源性化合物的關鍵作用(Shah et al., 2013)，由於科技的發達，在工業化的過程中許多污染造成污染場址微生物族群組成的轉變(Desai et al., 2009)，而任何單一微生物是無法完成所有的代謝反應進而降解環境污染物。然而，不同的細菌群落，可共同交互執行所有的代謝反應，完成生物修復(Shah, 2011; Shah, 2012)，因此了解微生物的組成及代謝途徑能更廣泛且有效的應用於各種污染物質，包括一些外源物質(xenobiotics) 或難分解的污染物(recalcitrant pollutants) (Ramos et al., 2011)。

本計畫利用 Metagenome 技術，對被含氯有機污染物之場址進行一系列的整治工程及分析整治過程中所以微生物族群變化及功能性基因分析，如前一章節結果顯示，我們利用新一代的 Metagenome 分析技術應用在場址的菌相分析，得到了超過 600 種以上的微生物在此環境中的鑑定數據，這個結果和傳統的 DGGE 技術相比，可以更真實地描繪出環境中真實的微生物分布情況，此外過去在鑑定環境菌相的研究中，大多只利用菌株本身 16S rDNA 其中的一個區段去做分析及探討，本計畫則利用 16S rDNA 中 V1-V3, V4-V5, 和 V6-V9 做全面性的分析，這樣的分析方式就算連環境中低豐富度的族群都能

被成功的鑑定出來(Kotik et al., 2013)，這是使用傳統方式去分析環境中全菌相，只能幫助我們鑑定出微生物的種類，在微生物菌相分析中，結果顯示我們發現的許多可能參與多氯有機化合物的菌株，因此我們也使用了 DNA 全基因組功能性基因的分析，這不只能幫我們鑑定微生物的種類也可以幫我們統計環境種的功能性基因，使我們可以了解環境中微生物有代謝那些化合物的潛力，在前人的研究中指出從中鑑定每種方法都有一定的優點和局限性。因此，為了獲得微生物群落的全貌，我們使用了兩種不同的方式的研究(Shah et al., 2013)。

比對前人研究參與多氯有機化合物降解的菌株，我們發現 *Anaeromyxobacter*, *Desulfuomonas* 和 *Desulfovibrio* 在本場址中也扮演著重要的角色，*Desulfuomonas* 在 TCE 的降解中扮演者還原脫氯的角色，特別是在四氯乙烯降解至二氯乙烯的過程(David et al., 2014)。*Dechloromonas* spp. 是一株厭氧的氯酸鹽還原菌(Wolterink et al., 2005)可以參與多氯有機汙染物的降解，在我們的研究中我們也同樣的發現到這些菌株的存在，這些菌株也須利用硫酸根來幫助它們生長，高總有機碳也會刺激加速其生長。

Geothrix fermentans 和 *Sulfuricurvum kujiense* 能夠在具有硫酸鹽的環境下將 TCE 降解(Tsai et al., 2014)，而這兩株菌也在生物復育的過程中被我們偵測到，同時我們也偵測到 *Dehalobacter restrictus* PERK23 其也被證實和多氯有機汙染物的降解有關(Kruse et al., 2013)。

Dehalogenimonas spp. 在高濃度的氯有機汙染物環境下依然可以進行厭氧還原脫氯的過程，對於受汙染的土壤及地下水生物復育有重要的意義(Maness et al., 2012)，而我們研究發現本模場在添加生物營養鹽後，其族群顯著增加，*Dehalogenimonas lykanthroporepellens* 也有在本模場發現，*Dehalogenimonas lykanthroporepellens* 可以將四氯乙烯降解至氯乙烯，但無法將氯乙烯轉換成乙烯(Maness et al., 2012)，我們都知道 *Dehalococcoides* 是氯乙烯降解製乙烯的關鍵菌株，我們使用 LCA 法對環境中的全基因組進行分析，果然發現 *Dehalococcoides mccartyi* 的存在，但是在利用 16S rDNA 進行分析時，並未發現到此菌株的存在。雖然利用 16S rDNA 分析環境中菌相是一種有效的方法，然而這種分析方式並不適合分析 *Dehalococcoides*(Kotik et al., 2013)。此外有文獻指出 *Dehalococcoides* 是很難利用 16S rDNA 區別出來的(Holmes et al., 2006; Tas et al., 2010)。

文獻指出即使有監測到 *Dehalococcoides* 的存在，在脫氯過程中也不一定會參與反應，脫氯過程可能只是自營菌的反應。例如：氯乙烯降解製乙烯的反應是可以經由 *Methylobacter* 和 *methane monooxygenase* 的參與完成 (Kotik et al., 2013)，然而，屬於甲烷菌屬的菌株在本研究當中生物降解氯乙烯後其含量是下降的，這意味著 *Methylobacter* 在本場址中是次要的代謝路徑，另外也有研究指出 *Pseudomonas*, *Mycobacterium* 和 *Nocardioides* (Mattes et al., 2010) 這些菌株是可以在有氧的環境下代謝氯乙烯，在本研究中我們也發現高比例的 *Pseudomonas* spp. 而 *Mycobacterium* 和 *Nocardioides* 我們也有在本場址發現，在本模場降解過程中我們觀察到添加生物營養鹽後 *Pseudomonas* spp. 的含量相對增加且伴隨著乙烯產生，因此我們推測 *Pseudomonas* spp. 也有可能參與多氯有機污染物的降解，綜合本場址之微生物相與溶氧量及氧化還原電位之結果比較，我們發現由於 ORP 及 DO 之結果顯示，本場址似乎是以耗氧亦或是兼性厭氧之方式代謝多氯有機污物，因此導致 *Pseudomonas*, *Mycobacterium* 和 *Nocardioides*，等菌株伴隨著降解過程增加，抑或是菜樣時溶氧量檢測發生錯誤，這點待後續檢討討論，但我們推論環境中污染物質之降解作用會根據現場場址之環境參數，微生物族群會自我平衡，並自主調節使用之碳氮源，微生物的降解並無法由目前發表之文獻得到統一的降解過程，因每個場址環境參數及微生物族群是動態組成，隨時都會變化，這也是為什麼需要不斷持續調查現場環境參數及微生物菌項變化之原因，本場址降解多氯有機污染物之菌株關鍵角色扮演圖詳見圖 4-1。

最後我們利用全功能性基因定序經由 KEGG 和 COG 分析四氯乙烯降解至乙烯的關鍵基因，分析出一些本場址可能利用的生化代謝路徑，這些路徑都可以在未來提供我們針對受到多氯有機污染物污染之場址進行整治時，不管是利用菌株純化(生物加強)或是純化蛋白質(生物刺激)應用於生物復育很好的參考，我們可以利用探討現場環境參數及菌相探討該使用何種工法使生物復育達到最好的成效，例如：如本場址經調查分析後沒有降解污物之菌株，我們便可選擇使用生物強化法，額外添加可降解污染物之本土菌株，如污染場址具有可降解污染物之菌株，但成效不彰，我們便可設計刺激該菌株生長之生物添加劑，利用生物刺激法加強污染物去除之成效，本計畫利用 KEGG 所推導出之降解途徑途中可告訴我們污染場址中帶有或是缺乏哪些重要的關鍵降解基因，這可以讓我們評估本場址之微生物族群是否能不用額外添加降解菌株就可以完成生物復育之工作，如缺乏關鍵降解基因，我們便可添加帶有可降解該污染物基因之菌株，以達到生物復育之成效，這些成果皆可提

供於後續的模場整治很好的參考。

參考文獻

- 廖文彬，污染物在地下水之傳輸現象。地工技術雜誌，第 28-37 頁，1991。
- 賴彥融，董瑞安，李俊錡，金屬離子與腐質植對零價鐵去除四氯乙烯之影響，第二屆土壤與地下水技術研討會，2004。
- 經濟部工業局，「工廠土壤及地下水污染整治技術手冊－石化業」，第 4-75 頁，2003。
- 美國環保署 Hazardous Waste Clean-up Information 網站，網址為 <http://clu-in.org/>
- Acinas, S. G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L. & Polz, M. F. 2004 Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551–554.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H., 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59: 143–169.
- American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the examination of Water and Wasterwater, 22nd ed., APHA-AWWWA-WEF, Washington, DC, 2005.
- Bedient, P.B., Rifai, H.S., and Newell, C.J. Grouond Water Contamination-Transport and Remediation, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1994.
- Bedard, D.L., Ritalahti, K.M., 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.
- Chen Z-S. (1991) Cadmium and lead contamination of soils near plastic stabilizing materials producing plants in northern Taiwan. *Water Air Soil Pollut.* 57-58: 745-754.
- Chen, K.F., Kao, C.M., Wang, J.Y., Chen, T.Y., Chien, C.C. (2005) Natural attenuation of MTBE at two petroleum-hydrocarbon spill sites. *J Hazard Mater.* 125 (1-3): 10-16.
- Desai C, Parikh RY, Vaishnav T, Shouche YS, Madamwar D 2009. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. *Res Microbiol* 160:1–9
- Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, et al. (2008a) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol* 8: 125.
- Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R(2008) The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 105:17994–17999.
- Fountain, J.C. Technologies for dense nonaqueous phase liquid source zone remediation. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), TE-98-02, 1998.
- Huang, C.-J., Chen, K.-S., Lai, Y.-C., Wang, L.-C., Chang-Chien, G.-P. (2011) Characterization of atmospheric dry deposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofuran in a rural area of Taiwan. *Aerosol Air Qual Res.* 11(4): 448-459.

- Hsu MJ., Selvaraj K., Agoramoorthy G. (2006) Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environ Pollut.* 143 (2): 327-334.
- Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., and Sogin, M.L. (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet* 4: e1000255
- Imhoff, P.T., Gleyzer, S.N., McBride, J.F., Vancho, L.A., Okuda, I. and Miller, C.T. Cosolvent-enhanced remediation of residual dense nonaqueous phase liquids: experimental investigation. *Environ. Sci. & Technol.*, 29, pp.1966-1976, 1995.
- Jeng M-S., Jeng W-L., Hung T-C., Yeh C-Y., Tseng R-J., Meng P-J., Han B-C. (2000) Mussel Watch: A review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991-98. *Environl Pollut.* 110(2): 207-215.
- Julie A. Huber, David B. Mark Welch, Hilary G. Morrison, Susan M. Huse, Phillip R. Neal, David A. Butterfield, Mitchell L. Sogin. 2007 Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere, *Science* Vol. 318 no. 5847 pp. 97-100
- Kao, C-M., Chen, C-S., Tsa, F-Y., Yang, K-H., Chien, C-C., Liang, S-H., Yang, C-A., Chen, S-C. (2010a) Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume. *J Hazard Mater.* 178(1-3): 409-416.
- Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W. 2008. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 87: 1016–1020.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., Guan, K.L. (2008) Regulation

- of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10:935–945.
- Liang, C., Bruell, C.J., Marley, M.C., and Sperry, K.L. Persulfate oxidation for in situ remediation of TCE I- activated by ferrous ion with and without a persulfate-thiosulfate redox couple. *Chemosphere*, 55, pp.1213-1223, 2004.
- Mitchell L. Sogin , Hilary G. Morrison , Julie A. Huber , David Mark Welch , Susan M. Huse , Phillip R. Neal , Jesus M. Arrieta , and Gerhard J. Herndl.2006 Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”*PNAS*,vol. 103 no. 32, 12115–12120
- NOCKER, A., SOSSA, K.E. & CAMPER, A.K. 2007a. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 252–260
- Rittmann, B.E. (2000) Natural attenuation for groundwater remediation, A report of the National research Council 5-8.
- Scott, M. J., Metting, F. B., Fruchter, J. S. and Wildung, R. E. “In situ Redox Manipulation for Immobilization of Inorganic Contaminations: Subsurface Barrier Technology Results in Significant Cost Savings, Demonstrating the Value of Basic Science Investments.” PNNL-SA-30297, UC-402,1998.
- Shah V, Zakrzewski M, Wibberg D, Eikmeyer F, Schlüter A, Madamwar D. 2013. Taxonomic profiling and metagenome analysis of a microbial community from a habitat contaminated with industrial discharges. *Microb Ecol.* 2013 Jun 25.
- Shah V, Jain K, Desai C, Madamwar D 2011. Metagenomics and integrative ‘-omics’ technologies in microbial bioremediation: current trends and potential applications. In: Marco D (ed) *Metagenomics: current*

- innovations and future trends. Caister Academic Press, Norfolk, pp 211–240
- Singh, J., Comfort, S.D., Shea, P.J. (1998) Long-term RDX sorption and fate in soil. *Journal of Environmental Quality* 27, 572-577.
- Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI(2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3:213–223.
- U.S. EPA “Capstone Report on the Application Monitoring and Performance of Permeable Reactive Barriers for Ground-Water Remediation”, EPA/600/R-03/045a, 2003
- Wang, M.-S., Chen, S.-J., Huang, K.-L., Lai, Y.-C., Chang-Chien, G.-P., Tsai, J.-H. (2010) Characterization of persistent organic pollutants emitted from a municipal solid waste incinerator in Taiwan. *Environ Eng Sci.* 27 (11): 955-965.
- Conrad, M. E., Brodie, E.L., Radtke, C.W., Bill, M., Delwiche, M.E., Lee, M.H., et al. (2010) Field evidence for co-metabolism of trichloroethene stimulated by addition of electron donor to groundwater. *Environ Sci Technol* 44:4697-4704.
- Cupples, A.M.(2008) Real-time PCR quantification of *Dehalococcoides* populations: methods and applications. *J Microbiol Methods* 72:1-11
- David, M. M., Cecillon, S., Warne, B.M., Prestat, E., Jansson, J.K., Vogel, T.M. (2014) Microbial ecology of chlorinated solvent biodegradation. *Environ Microbiol* : In press.
- Dhal, P.K., Sar, P. (2014) Microbial communities in uranium mine tailings and mine water sediment from Jaduguda U mine, India: A culture independent analysis. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 49:694-709

- Desai, C., Parikh, R.Y., Vaishnav, T., Shouche, Y.S., Madamwar, D. (2009) Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes.*Res Microbiol***160**:1-9
- Desai, C., Pathak, H., Madamwar, D. (2010) Advances in molecular and "-omics" technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites.*Bioresour Technol* **101**:1558-1569
- Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., David, M.M., Denonfoux, J., Lyon, D.Y., et al. (2012) In situ TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes.*Microb Biotechnol***5**:642-645.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**:2194–2200
- Fang, H., Cai, L., Yu, Y., Zhang, T. (2013) Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresour Technol* **129**:209-218
- Freeborn, R.A., West, K.A., Bhupathiraju, V.K., Chauhan, S., Rahm, B.G., Richardson, R.E., et al. (2005) Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. *Environ Sci Technol***39**:8358-8368.
- Friis, A.K., Heimann, A.C., Jakobsen, R., Albrechtsen, H.J., Cox, E., Bjerg, P.L. (2007) Temperature dependence of anaerobic TCE-dechlorination in a highly enriched Dehalococcoides-containing culture. *Water Res***41**:355-364
- He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E. (2002) Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environ Sci*

- Technol***36**:3945-3952.
- Handelsman, J.(2004)Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms.*Microbiol Mol Biol Rev***68**:669-685
- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., et al. (2002)Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe.*Appl Environ Microbiol***68**:485-495.
- Holmes, V. f., He, J., Lee, P. K. H., Alvarez-Cohen, L. (2006) discrimination of multiple Dehalococcoides strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5877-5883.
- Kittelmann, S., Friedrich, M.W.(2008)Identification of novel perchloroethenerespiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing. *Environ Microbiol***10**:31-46.
- Kruse, T., Maillard, J., Goodwin, L., Woyke, T., Teshima, H., Bruce, D. et al.(2013) Complete genome sequence of *Dehalobacter restrictus* PER-K23(T.). *Stand Genomic Sci* **8**:375-388.
- Löffler, E. E., Sanford, R. A., Ritalahti, K. M. (2005) Enrichment, cultivation, and detection of reductively dechlorinating bacteria. *Methods Enzymol***397**: 77-111.
- Lonergan, D.J., Jenter, H.L., Coates, J.D., Phillips, E.J., Schmidt, T.M., Lovley, D.R. (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J Bacteriol***178**: 2402-2408.
- Maness, A.D., Bowman, K.S., Yan, J., Rainey, F.A., Moe, W.M. (2012) Dehalogenimonas spp. can reductively dehalogenate high Concentrations of

- 1,2-dichloroethane, 1,2-dichloropropane, and 1,1,2-trichloroethane. *AMB Express* **2**(1):54
- Mattes, T. E., Alexander, A.K., Coleman, N.V. (2010) Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **34**:445-475.
- Pfeiffer, P., Bielefeldt, A.R., Illangasekare, T., Henry, B. (2005) Partitioning of dissolved chlorinated ethenes into vegetable oil. *Water Res* **39**:4521-4527.
- Scheutz, C., Durant, N.D., Dennis, P., Hansen, M.H., Jørgensen, T., Jakobsen, R., et al. (2008) Concurrent ethene generation and growth of *Dehalococcoides* containing vinyl chloride reductive dehalogenase genes during an enhanced reductive dechlorination field demonstration. *Environ Sci Technol* **42**:9302-9309.
- Schloss, P.D. 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS One* **4**:e8230.10.1371.
- Schloss, P.D. 2010. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol* **6**:e1000844.10.1371/journal.pcbi.1000844.
- Schloss, P.D. 2013. Secondary structure improves OTU assignments of 16S rRNA gene sequences. *ISME J* **7**:457–460.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol* **75**:7537–754.
- Shah, V., Zakrzewski, M., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Schlüter, A., Madamwar, D. (2013) Taxonomic Profiling and Metagenome Analysis

- of Microbial Community from a Habitat Contaminated with Industrial Discharges. *Microb Ecol*: In press.
- Shukla, A.K, Upadhyay, S.N., Dubey, S.K. (2014) Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Crit Rev Biotechnol* **34**:101-114.
- Tas, N., van Eekert, M. H. A., de Vos, W. M., Smidt, H. (2010) The little bacteria that can-diversity, genomics and ecophysiology of 'Dehalococcoides' spp. in contaminated environment. *Microb. Biotechnol.* **3**:389-402.
- Tiehm, A., Schmidt, K. R. (2011) Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes--aspects of field application. *Curr Opin Biotechnol* **22**:415-421.
- Tsai, T.T., Liu, J.K., Chang, Y.M., Chen, K.F., Kao, C.M. (2014) Application of polycolloid-releasing substrate to remediate trichloroethylene-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *J Hazard Mater* **68**:92-101.
- Wolterink, A., Kim, S., Muusse, M., Kim, I.S., Roholl, P.J., van Ginkel, C.G., et al. (2005) *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:2063-2068.